



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 Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire des Microorganismes

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Méthodes conventionnelles et innovantes d'identification des bactéries : identification présomptive de 25 bactéries phytopathogènes

Présenté par : BOUFGHED Nedjla Rayene
BOUZIT Wissam
CHABANE Nihal

Le : 13 /06/2024

Jury d'évaluation :

Présidente : Dr ABDELAZIZ Ouided (MCB- U. Constantine 1 Frères Mentouri)

Encadrante : Dr BOUBEKRI Karima (MCA- U. Constantine 1 Frères Mentouri)

Examinatrice : Dr MEZIANI Meriem (MCA- U. Constantine 1 Frères Mentouri)

Année universitaire

2023 - 2024

Remerciements

*Tout travail ne peut être réalisé sans l'aide de Dieu le plus puissant.
Alors, et en premier lieu, on remercie notre créateur qui nous a donné la
force et la santé pour en être la aujourd'hui.*

*Nous tenons à exprimer notre gratitude à notre encadrante
Dr BOUBEKRI Karima pour le choix du thème et pour son aide et ses conseils
précieux qui ont contribué à l'accomplissement de ce travail*

*Nos remerciements les plus sincères s'adressent également aux membres
du jury ; Dr ABDELAZIZ Ouided et Dr MEZIANI Meriem
qui ont accepté d'examiner notre mémoire et qui nous ont fait l'honneur de
siéger notre jury.*

*Nous tenons à remercier Mme Souada Ibtihadj pour son appuie précieux, Mme
Tir Radja et Mme Benlahreche Nour El Houda pour leurs assistances*

*Nous tenons également à remercier nos familles pour nous avoir montré
un énorme soutien tout au long de notre parcours éducatif et surtout
pendant notre travail, ainsi que nos amis et collègues pour tout leur
amour et leur soutien.*

*Notre cycle d'études ainsi que la réalisation de ce travail ne se seraient
pas aussi bien déroulé sans l'aide des enseignants et le personnel
administratif, nos remerciements les plus vifs vont à eux également.*

Dédicace

Du profond de Nos cœurs, nous dédions ce travail à tous ceux qui nous sont chers,

A NOS CHERES MERES

Aucune dédicace ne saurait exprimer notre respect, notre amour éternel et notre considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour notre instruction et notre bien-être.

Nous vous remercions pour tout le soutien et l'amour que vous nous portez depuis notre enfance et nous espérons que votre bénédiction nous accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A NOS CHERS PERES

Ce travail est dédié à nos pères, décédé trop tôt, qui nous ont toujours poussé et motivé dans nos études.

Que Dieu les protège pour nous.

A NOS CHERS FRERES, SŒURS, AMIES

Merci énormément pour votre soutien plus que précieux, Merci pour vos grands cœurs toutes vos qualités qui seraient trop longues à énumérer. Nos vies ne seraient pas aussi magiques sans votre présence et votre amour.

Nous vous aimons de tous nos cœurs.

Nihal, Wissam, Nedjla

Résumé :

L'identification bactériennes est cruciale pour la santé, l'agriculture, l'industrie alimentaire et la recherche scientifique. La taxonomie des procaryotes fournit un cadre pour classer et nommer ces microorganismes. Ce mémoire présente dans sa partie théorique, l'évolution des techniques d'identification, du conventionnel à l'innovant, en se basant sur l'application des méthodes telles que la culturomique, la microfluidique, la métagénomique et le séquençage nouvelle génération permettant une identification plus rapide et précise des bactéries cultivables et non-cultivables. Dans la partie pratique, une analyse phénotypique a été réalisée sur 25 isolats bactériens inconnus, préalablement isolés à partir de tissus infectés par des phytopathogènes. Les résultats montrent que ces bactéries couvrent presque toutes les formes cellulaires : bacilles, cocci, coccobacilles, ou même tétracoques des groupes Gram négatif et positif. La détermination des caractéristiques biochimiques a permis d'identifier les 25 isolats bactériens comme suit : le groupe des bacilles à Gram négatif comprend des bactéries suspectées des familles *Pseudomonadaceae* et *Enterobacteriaceae*, des genres *Yersinia* et *Serratia*. Les bacilles à Gram positif sont suspectés d'appartenir aux genres *Bacillus* et *Lactobacillus*. Les cocci à Gram positif ont été identifiés comme appartenant aux espèces *Micrococcus sp.* et *Staphylococcus sp.*, tandis que l'isolat sous forme de cocci à Gram négatif est suspecté d'appartenir au genre *Acinetobacter*. Une extraction de l'ADN génomique de 4 souches et l'amplification du gène de l'RNAr 16S par PCR sont réalisés. Les résultats soulignent l'importance de l'utilisation conjointe de différentes méthodes pour optimiser l'identification de ces bactéries, et proposent d'explorer des approches plus avancées dans le cadre de recherches futures. Cela pourrait ouvrir la voie à une identification plus rapide et plus précise de nos souches bactériennes.

Mots clé : Identification bactérienne, culturomique, microfluidique, métagénomique, séquençage, PCR.

Abstract:

Bacterial identification is crucial for health, agriculture, the food industry and scientific research. The taxonomy of prokaryotes provides a framework for classifying and naming these microorganisms. This dissertation presents in its theoretical part, the evolution of identification techniques, from conventional to innovative, based on the application of methods such as culturomics, microfluidics, metagenomics, and next generation sequencing allowing faster and more accurate identification of culturable and non-culturable bacteria.

In the practical part, a phenotypic analysis was carried out on 25 unknown bacterial isolates, previously isolated from tissues infected by phytopathogens. The results show that these bacteria cover almost all cellular forms: bacilli, cocci, coccobacilli, or even tetracocci of the Gram negative and positive groups. The determination of biochemical characteristics made it possible to identify the 25 bacterial isolates as follows: the group of Gram-negative bacilli includes suspected bacteria from the Pseudomonadaceae and Enterobacteriaceae families, from the *Yersinia* and *Serratia* genera. Gram-positive bacilli are suspected to belong to the genera *Bacillus* and *Lactobacillus*. Gram-positive cocci were identified as belonging to the species *Micrococcus* sp. and *Staphylococcus* sp., while the isolate in the form of Gram-negative cocci is suspected of belonging to the genus *Acinetobacter*. Extraction of genomic DNA from 4 strains and amplification of the 16S rRNA gene by PCR was performed. The results highlight the importance of using different methods together to optimize the identification of these bacteria, and suggest exploring more advanced approaches in future research. This could pave the way for faster and more accurate identification of our bacterial strains.

Keywords: Bacterial identification, culturomics, microfluidics, metagenomics, sequencing, PCR.

الملخص

يعد تحديد البكتيريا أمرًا بالغ الأهمية للصحة والزراعة وصناعة الأغذية والبحث العلمي. يوفر تصنيف بدائيات النوى إطارًا لتصنيف وتسمية هذه الكائنات الحية الدقيقة. تعرض هذه المذكرة في جزئها النظري، تطور تقنيات تحديد الهوية، من التقليدية إلى المبتكرة، بناءً على تطبيق طرق مثل المستنبتات، والموائع الدقيقة، والميتاجينوميات، وتسلسل الجيل التالي مما يسمح بتحديد أسرع وأكثر دقة للبكتيريا القابلة للاستزراع وغير القابلة للاستزراع. وفي الجانب العملي تم إجراء التحليل المظهري على 25 عزلة بكتيرية غير معروفة سبق عزلها من الأنسجة المصابة بالمرضات النباتية. أظهرت النتائج أن هذه البكتيريا تغطي جميع الأشكال الخلوية تقريبًا: العصيات، والمكورات، والمكورات، أو حتى المكورات الرباعية من مجموعتي سلبية وإيجابية الجرام. تحديد الخصائص البيوكيميائية جعل من الممكن التعرف على العزلات البكتيرية الـ 25 على النحو التالي: مجموعة العصيات سلبية الجرام تشمل البكتيريا المشتبه بها من عائلات *Pseudomonadaceae* و *Enterobacteriaceae*، من أجناس *Yersinia* و *Serratia*. يشتبه في أن العصيات إيجابية الجرام تنتمي إلى أجناس *Bacillus* و *Lactobacillus*. تم التعرف على المكورات إيجابية الجرام على أنها تنتمي إلى فصيلة *Micrococcus sp.* و *Staphylococcus sp.*، في حين يشتبه في أن العزلة على شكل مكورات سلبية الجرام تنتمي إلى جنس *Acinetobacter*. وتم استخراج الحمض النووي الجينومي من 4 سلالات وتحديد جين 16s rRNA بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل. تسلط النتائج الضوء على أهمية استخدام طرق مختلفة معًا لتحسين التعرف على هذه البكتيريا، وتقتراح استكشاف أساليب أكثر تقدمًا في الأبحاث المستقبلية. وهذا يمكن أن يمهد الطريق لتحديد سلالاتنا البكتيرية بشكل أسرع وأكثر دقة.

الكلمات المفتاحية: تحديد البكتيريا، المستنبتات، الموائع الدقيقة، الميتاجينوميات، تحديد التسلسل النكليوتيدي، تفاعل البوليميراز المتسلسل.

Liste d'abréviation

2DE : Electrophorèse Bidimensionnelle.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire.

AFM : Microscopie à Force Atomique.

ARN : Acide Ribonucléique.

ARN m : Acide Ribonucléique Messenger.

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomale.

BC : *Bacterial Canker*.

BCP : Gélose lactosée au pourpre de bromocrésol.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

CE : Electrophorèse capillaire.

CEC : Electrochromatographie .

CLSM: Confocale Laser Scanning Microscope.

ClustalW: *Clustal Weighting*.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

CPL : Chromatographie en Phase Liquide.

ddNTP : Didésoxyriboucléotides Triphosphate.

dNTP : Désoxyribonucléotide Triphosphate.

EMBL: *European Molecular biology Laboratory*.

FTIR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

Hi seq: *High-Throughput Sequencing*.

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*.

ICZN: *International Commission on Zoological Nomenclature*.

ITP : Isotachophorèse.

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*.

KOH : Hydroxyde de potassium.

LB : *Lysogeny Broth*.

Le milieu M.E.V.A.G : Moyen d'Enrichissement pour la Recherche des Vibrions Aérobie Gram-Négatif.

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption /Ionization Time of Flight*.

MALDI-TOF MS: *Matrix-Assisted Laser Desorption /Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*.

ME : Microscopie Electronique.

Medline: *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*.

MEGA: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*.

MET : Microscope Electronique à Transmission.

MM : Masse Moléculaire.

MR-VP : Methyl Red –Voges –Proskauer.

MS : Spectrométrie de Masse.

NAD+ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide.

NCBI: *National center for biotechnology information*.

NCBI: *International Code Bacterial Nomenclature*.

NGS: *Next Generation Sequencing*.

NOVA: *Novel Organism Verification and Analysis*.

PAGE : Electrophorèse en gel.

Pb : Pair de bases.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*.

PFGE: *Pulsed-field gel electrophoresis* (Electrophorèse sur gel a champ pulsé).

qPCR: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*.

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction).

RMN : Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire.

RT-PCR : Transcriptase Réverse d'acide Ribonucléique.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline.

SBS: *Sequencing By Synthesis*.

SDS: *Sodium Dodécyl Sulfate*.

TBE: *Tris-Borate-EDTA*.

WGS: *Whole Genome Sequencing*.

Liste des figures :

Figure 1 : Production d'une librairie de gouttelettes et petit écran composé.....	19
Figure 2 : Le processus en trois étapes de la réaction en chaîne par polymérase.....	21
Figure 3 : Présentation schématique de la méthode Sanger (terminaison de chaîne) pour le Séquençage l'ADN.....	24
Figure 4 : la méthode de ribotypage.....	24
Figure 5 : Le principe de la technologie Illumina.....	28
Figure 6 : Méthodes de culture avancées pour isoler les microbes.....	30
Figure 7 : Classification (rectangles bleus) et flux de travail (rectangles verts) du métagénomique à l'aide de différentes plateformes de séquençage et outils bioinformatiques.....	31
Figure 8 : Purification d'une souche sur milieu gélose (gélose King B) par la technique des stries.....	38
Figure 9 : Ensemencement en surface avec étalement par billes en verre.....	39
Figure 10 : ADN bactérien mélangé avec le colorant de charge chargé dans les puits.....	46
Figure 11 : Aspect macroscopique des colonies bactériennes pures.....	49
Figure 12 : Test KOH formation d'un filament qui indique une souche à Gram négatif.....	51
Figure 13 : Répartition des souches à Gram positif et à Gram négatif selon le pourcentage de chaque forme cellulaire.....	57
Figure 14 : Résultats négatifs et positifs des tests catalase et oxydase.....	58
Figure 15 : Test mannitol mobilité, tube positif et tube négatif.....	58
Figure 16 : La croissance des bactéries sur milieu BCP, absence et présence du virage de couleur.....	60
Figure 17 : Croissance bactérienne et virage de couleur sur le milieu gélose Mac Conkey...	61
Figure 18 : Test phénylalanine désaminase, absence du virage de couleur.....	61
Figure 19 : Comparaison des résultats de test M.E.V.A.G entre tubes positifs et tubes négatifs.....	62
Figure 20 : Profil sur API 20 E de la souche OK8.....	64
Figure 21 : Profil sur API 20 E de la souche OK9b.....	64
Figure 22 : Profil sur API 20 E de la souche OK43.....	64
Figure 23 : Clés dichotomiques de différenciation des Cocci à Gram positif.....	66
Figure 24 : Clés dichotomiques de différenciation des Cocci à Gram négatif.....	67
Figure 25 : Clés dichotomiques de différenciation des Bacille à Gram positif.....	68

Figure 26 : Clés dichotomiques de différenciation des Bacille à Gram négatif.....	69
Figure 27 : Clés dichotomiques pour le classement des Entérobactérie.....	70
Figure 28 : Résultats de l'extraction d'ADN après l'électrophorèse sur gel d'agarose traité par le logiciel image-j.....	73
Figure 29 : Résultats après la PCR et la vérification par électrophorèse sur gel d'agarose traité par le logiciel image-j.....	73

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents types de milieux de culture chromogènes.....11

Tableau 2 : Différents types de tests biochimiques.....13

Tableau 3 : Description macroscopique des souches étudiées.....49

Tableau 4 : Description microscopique des souches étudiées.....51

Tableau 5 : Les caractères biochimiques des souches étudiées.....59

Tableau 6 : Les résultats des tests biochimiques des bacilles à Gram négatif.....63

Tableau 7 : Identification présomptive des souches étudiées.....71

Tableau 8 : Etapes de la coloration de Gram.....89

Tableau 9 : Lecture de la galerie miniaturisée.....92

Table des matières

Remerciements	<i>i</i>
Résumé.....	<i>iii</i>
Abstract:	<i>iv</i>
المخلص	<i>v</i>
Liste d'abréviation.....	<i>vi</i>
Liste des figures	<i>ix</i>
Liste des tableaux	<i>xi</i>
Introduction	1
Chapitre 1 : Recherche bibliographes	3
1.La taxonomie moderne.....	4
1.1.Définition et historique de la taxonomie moderne.....	4
1.2.Importance de la taxonomie en microbiologie	5
1.3.Les différentes parties de la taxonomie	5
1.3.1.Classification	6
1.3.2.Nomenclature binomiale	6
1.3.3.Identification.....	7
1.4.L'identification des procaryotes.....	8
1.4.1.L'histoire et l'évolution de l'identification des procaryotes et son importance.....	8
1.4.2.Méthodes d'identification des procaryotes.....	9
1.4.3.L'analyse bioinformatique des séquences.....	33
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	37
2.Cadre d'étude	38
2.1.Souches bactériennes environnementales	38
2.2.Réactivation des souches.....	38
2.3.Purification des souches bactériennes	38
2.4.Identification des souches	39
2.4.1.Caractères cultureux et morphologiques	39
2.4.2.Caractère biochimique	40
2.4.3.Identification par la galerie API 20 E	44
2.4.4.Outils et procédures moléculaire.....	45
2.5.Conservation des souches.....	48
Chapitre 3: Résultats et discussion	48
3.Identification des souches :	49

3.1.Étude des caractères culturaux et morphologiques :	49
3.1.1.L’aspect macroscopique :	49
3.1.2.L’aspect microscopique :	51
3.2.Étude des caractères biochimiques	58
3.2.1.Tests de catalase, oxydase et Mannitol Mobilité	58
3.2.2.Les milieux sélectifs	58
3.3.Indentification par la galerie API 20E	62
3.4.Indentification des souches selon les Clés dichotomiques	63
Conclusion et perspectives	75
Références Bibliographiques	76
Annexes	87

Introduction

Introduction

L'identification précise des souches bactériennes est cruciale dans divers domaines tels que la santé publique, l'agriculture, l'industrie alimentaire et la recherche médicale. La taxonomie des procaryotes fournit un cadre essentiel pour classer et nommer ces micro-organismes, en se basant traditionnellement sur des caractères phénotypiques, mais de plus en plus sur des caractères génétiques. L'identification d'un phytopathogène notamment une bactérie est un processus crucial en phytopathologie pour diagnostiquer les maladies des plantes et mettre en place des stratégies de gestion efficaces. Ce processus peut impliquer plusieurs étapes et méthodes, allant des méthodes conventionnelles aux méthodes moléculaires innovantes.

Les méthodes conventionnelles d'identification bactérienne, bien que robustes et éprouvées, présentent des limites en termes d'efficacité, de rapidité, de coût et de sensibilité. Parallèlement, les avancées technologiques ont donné naissance à des méthodes innovantes, offrant ainsi une identification plus précise et rapide des agents pathogènes. Cependant, l'isolement et l'identification des bactéries non cultivables ou difficiles à identifier représentent encore un défi majeur en microbiologie, et pour cela comment surmonter ces limitations et identifier de manière efficace les souches non cultivables ou difficiles à identifier ? Et quelles sont les approches innovantes qui peuvent être utilisées dans ce contexte ?

L'intégration des méthodes innovantes de biologie moléculaire, telles que le séquençage de nouvelle génération (NGS), la PCR quantitative en temps réel (qPCR), la spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) la cultromique , la microfluidique et la métagénomique de plus la technique de vérification et l'analyse de nouvel organisme (NOVA) , en complément des techniques conventionnelles, permettrait de surmonter les limitations des méthodes traditionnelles et d'améliorer l'identification des bactéries pathogènes ou non pathogènes , non cultivables ou difficiles à identifier. (Wieser, 2012 ; Lavigne, 2013 ; Lagier et al., 2018 ; Muigg et al., 2024 ; Toshniwal, 2024).

Dans ce contexte, notre travail de mémoire s'articule autour de deux objectifs. Le premier vise l'aspect théorique, qui explore des approches innovantes pour l'identification des bactéries et particulièrement les bactéries non cultivables ou difficiles à identifier, en combinant des techniques de culture traditionnelles avec des méthodes moléculaires avancées, afin d'améliorer notre compréhension de la diversité microbienne et de son impact sur différents domaines. Le second objectif concerne l'aspect pratique de notre approche, qui cherche à démontrer l'utilisation de ces méthodes traditionnelles pour identifier des bactéries inconnues,

isolées préalablement à partir de tissus infectés par des phytopathogènes. Les différentes étapes comprennent le repiquage, la purification, l'identification des caractéristiques phénotypiques des isolats bactériens, ainsi que l'extraction de l'ADN génomique de certains d'entre eux pour une identification plus approfondie.

Chapitre 1 : Recherche bibliographique

1. La taxonomie moderne

1.1. Définition et historique de la taxonomie moderne

Le terme « taxonomie » est dérivé de deux mots grecs, « taxis ou taxos », qui signifient arrangement, et « nomia », qui signifie distribution ou méthode. La taxonomie moderne est une science qui étudie les relations entre les organismes vivants et leur classification en groupes appelés taxons. Contrairement aux méthodes traditionnelles axées principalement sur les caractéristiques morphologiques, la taxonomie moderne incorpore une variété de données provenant de multiples disciplines scientifiques pour classer les organismes de manière précise et exhaustive. Elle est basée sur leurs caractéristiques morphologiques, écologiques, évolutives et également sur les techniques moléculaires, chacune puisant l'information à des niveaux cellulaires différents. Elle est de ce fait appelée taxonomie polyphasique. Cette classification permet de comprendre les relations évolutives entre les espèces et fournit un système de nomenclature universellement accepté (Pace, 1997 ; Garrity *et al.*, 2004 ; Judd *et al.*, 2007 ; Enghoff, 2009).

La taxonomie moderne a une histoire riche et variée, qui remonte à l'Antiquité avec les remarquables contributions d'Aristote à la classification des animaux. Cependant, pendant l'âge d'or islamique, les savants musulmans ont laissé une marque significative sur le développement de la taxonomie. Des intellectuels tels qu'Al-Djâhiz (776-868) ont joué un rôle crucial en explorant divers domaines comme la biologie et l'histoire naturelle, posant ainsi les fondements des recherches taxonomiques à venir. Al-Jahiz, par exemple, a rédigé le "Kitab al-Hayawan" (Livre des Animaux), décrivant minutieusement les caractéristiques des animaux et utilisant une méthode de classification basée sur des observations directes. De même, des contributeurs comme Ibn al-Baitar et Ibn Sina ont enrichi la classification des végétaux et des animaux à travers leurs propres écrits, jetant ainsi les bases de la taxonomie moderne (Al-Jahiz *et al.*, 847). Leurs travaux sont devenus des références essentielles pour les chercheurs ultérieurs, stimulant le progrès des connaissances scientifiques à travers diverses cultures et civilisations. Toutefois, Carl von Linné, un naturaliste suédois du XVIII^e siècle, a établi les bases de la taxonomie moderne grâce à son système de nomenclature binominale, qui est encore largement utilisé de nos jours. Ses œuvres principales, "Systema Naturae" (1735) et "Species Plantarum", ont été des ouvrages de référence essentiels en biologie (Laurin *et al.*, 2023). Plus tard, Augustin de Candolle a proposé une approche différente de la taxonomie, mettant l'accent sur les discontinuités plutôt que sur la continuité dans la nature. Ses idées ont influencé le

développement de la taxonomie moderne, notamment en soulignant l'importance des ruptures dans la classification des organismes (De Candolle, 1813).

La révolution Darwinienne a également eu un impact majeur sur la taxonomie en introduisant une approche généalogique basée sur l'évolution des espèces. Les travaux de Darwin ont conduit à une classification plus phylogénétique, reflétant les relations évolutives entre les organismes (Darwin, 2018).

Le XXe siècle a vu le développement de la systématique phylogénétique, notamment avec l'émergence de la cladistique initiée par Willi Hennig. Cette approche se concentre sur la reconstruction des relations évolutives entre les espèces et a été largement adoptée dans la taxonomie moderne (Tassy, 2018).

Les progrès de la génomique et de l'analyse génétique ont également révolutionné la taxonomie, en permettant de mieux comprendre les relations et les liens entre les espèces.

1.2. Importance de la taxonomie en microbiologie

La taxonomie joue un rôle crucial en microbiologie en étudiant la grande variété des microorganismes présents sur notre planète. Chaque initiative de recherche aboutit directement ou indirectement à une multitude d'isolats, chaque découverte enrichissant notre compréhension de la diversité biologique. Chaque nouvel isolat apporte sa contribution à cette connaissance, puisqu'il doit être intégré au système taxonomique existant afin d'être étudié et exploité dans le domaine de la recherche scientifique. Les caractéristiques du microbiote permettent de l'inclure et de le classer, ce qui permet de comprendre l'origine de sa diversité (Kurhekar & Jaya, 2015).

Les microorganismes sont classés en fonction de leurs similitudes ou différences et de leurs interactions. L'importance d'une classification taxonomique précise a été mise en évidence par des défis majeurs tels que la montée en puissance des microorganismes multirésistants en microbiologie médicale et les erreurs dans les tests microbiologiques. Malgré des avancées dans ce domaine, il reste encore beaucoup à faire pour résoudre ces problèmes (Kurhekar & Jaya, 2015).

1.3. Les différentes parties de la taxonomie

La taxonomie comprend plusieurs parties qui travaillent ensemble pour classer et identifier ces microorganismes procaryotiques et eucaryotiques. Au sens large, la dynamique de la taxonomie comprend trois branches distinctes mais étroitement interdépendantes : la classification, la nomenclature et l'identification.

1.3.1. Classification

La classification dans le domaine de la taxonomie, est le processus d'organisation des microorganismes en catégories hiérarchiques basées sur leurs caractéristiques biologiques et évolutives. Cette classification permet de regrouper ces microorganismes en fonction de leurs similitudes et de leurs relations phylogénétiques, fournissant ainsi un cadre systématique pour comprendre la diversité de la vie sur terre (Mayr, 1996 ; Zimmer, 2008 ; Hey, 2009 ; Zachos, 2016 ; Aldhebiani, 2018).

La classification se compose de plusieurs niveaux hiérarchiques, du plus inclusif au plus spécifique. Au sommet de cette hiérarchie se trouve le royaume, qui regroupe les microorganismes partageant quelques similitudes fondamentales. En descendant dans la hiérarchie, on trouve le phylum (ou division), la classe, l'ordre, la famille, le genre et enfin l'espèce. Chaque niveau de classification permet de regrouper les microorganismes en fonction de leurs caractéristiques communes, de manière de plus en plus spécifique (Mayr, 1996 ; Zimmer, 2008 ; Hey, 2009 ; Zachos, 2016 ; Aldhebiani, 2018).

Les microorganismes peuvent être classés en fonction de différents critères, tels que leurs caractéristiques morphologiques, génétiques, écologiques ou comportementales. Les méthodes modernes de classification utilisent également des données moléculaires pour déterminer les relations phylogénétiques entre ces microorganismes (Mayr, 1996 ; Zimmer, 2008 ; Hey, 2009 ; Zachos, 2016 ; Aldhebiani, 2018).

La classification moderne est destinée à apporter des informations sur le degré de parenté entre ces unités cellulaires vivantes et donc sur l'évolution des espèces. C'est pourquoi, elle les classe en se fondant sur les caractéristiques qu'ils partagent. Grâce à cette méthode, il est possible de structurer et organiser des données ou des éléments complexes afin de faciliter leur compréhension, leur analyse et leur utilisation ultérieure (singleton, 2004).

1.3.2. Nomenclature binomiale

La nomenclature binomiale en microbiologie est la discipline taxonomique qui fournit des noms distinctifs aux individus selon des règles publiées, qui sont dérivées du système binomial permettant de nommer une espèce (Gevers, *et al.*, 2006 ; Mark *et al.*, 2021). Un nom binomial est composé de deux parties (Windelspecht, 2002). Il s'agit du nom générique (nom du genre) et du nom spécifique (ou épithète spécifique) distingue une espèce particulière du reste des espèces du genre (International Commission on Zoological Nomenclature [ICZN], 2020). Il est souvent sous une forme latinisée, appelé aussi nomenclature binaire ou système de

dénomination à deux termes. Souvent elle est basée sur la langue grecque ou latine, bien que le latin soit aujourd'hui une langue disparue, la dénomination des microorganismes est toujours utilisée dans cette langue (Windelspecht, 2002). Le nom générique est le genre taxonomique, un genre est un rang dans le système de classification qui se situe généralement au-dessous du niveau de la famille et au-dessus du niveau de l'espèce. Il est composé d'espèces ayant des attributs communs. Ces attributs peuvent être basés sur des similitudes structurelles ou sur la phylogénie.

Le système de nomenclature binomiale est essentiel dans la communauté scientifique pour l'identification uniforme des espèces (International Commission on Zoological Nomenclature [ICZN], 2020). Contrairement aux noms communs, les noms scientifiques sont cohérents et permettent aux scientifiques de comprendre le genre auquel appartient une espèce. Parmi les principaux codes de gouvernance pour la nomenclature binomiale on distingue le code pour bactéries ICNB (International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV], 2018; Lapage *et al.*, 2019). Ce code vise à fournir des noms perceptibles et cohérents pour les espèces. La nomenclature des bactéries est établie par convention, selon des règles (Lapage *et al.*, 1990) :

- Le nom doit être en latin ou doit être dérivé du latin.
- Il doit être écrit en italique lorsqu'il est dactylographié et doit être souligné lorsqu'il est écrit à la main. Par exemple : Escherichia coli ou *Escherichia coli*.
- Il se compose de deux parties, le premier mot est le genre et le deuxième mot est l'espèce.
- Le nom du genre commence par une majuscule tandis que le nom de l'espèce commence par des lettres minuscules.
- Le nom doit être court, précis et facile à prononcer.
- Le nom de l'auteur doit être écrit sous une forme abrégée après le nom de l'espèce.

1.3.3. Identification

Est un processus qui permet de distinguer des microorganismes des autres et les regrouper selon la similarité dans l'une des unités définies et marquées de la hiérarchie taxonomique selon des critères intéressants par des méthodes de comparaison à d'autres microorganismes connus pour définir les ressemblances et les différences entre eux. Ce processus implique les critères phénotypiques et de nombreuses méthodes d'identification moléculaire afin d'arranger les microorganismes au mieux (Gevers *et al.*, 2006 ; Paolozzi *et al.*, 2019).

La taxonomie conçoit des méthodes appropriées d'organiser et de cataloguer les unités taxonomiques, c'est-à-dire d'établir des relations entre les groupes d'organismes et de faire la distinction entre eux, elle fournit également des points de repère et référence pour une identification des organismes classés (Gevers *et al.*, 2006).

Le principe d'identification est d'appliquer un protocole méthodologique de plusieurs étapes consécutives, permettant de restreindre à chaque palier le champ d'investigation, jusqu'à l'identification finale de l'espèce. Ce protocole est bien sur variable et peut être plus ou moins développé en fonction des organismes étudiées, une phase de l'identification des microorganismes implique souvent l'évaluation de caractéristiques spécifiques. Cependant, l'identification finale repose sur la reconnaissance d'un profil global, déterminé par une série de tests significatifs complémentaires (Bousseboua, 2005).

1.4. L'identification des procaryotes

1.4.1. L'histoire et l'évolution de l'identification des procaryotes et son importance

Au XVII^e siècle le scientifique néerlandais Antonie van Leeuwenhoek a fait la découverte des bactéries pour la première fois, en utilisant un microscope rudimentaire. Il a posé les fondements de l'étude des microorganismes grâce à ses observations pionnières. Le microscopiste Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) a joué un rôle essentiel dans la révolution scientifique. Plus de 500 microscopes furent fabriqués par le Néerlandais, dont beaucoup avaient un grossissement bien supérieur à celui des modèles actuels. Ses recherches concernaient les bactéries, les protozoaires, les globules rouges, les spermatozoïdes et la façon dont les insectes et les parasites se reproduisent (Mark, 2023).

Carl Von Linné a élaboré un système de classification des organismes vivants, y compris les bactéries, en se basant sur des caractéristiques morphologiques et physiologiques au XVIII^e siècle. La microbiologie moderne est apparue au XIX^e siècle grâce aux travaux pionniers de scientifiques comme Louis Pasteur, Robert Koch et Ferdinand Cohn. Le rôle des microorganismes dans la fermentation et la maladie a été mettre en évidence par Pasteur, tandis que Koch a élaboré les principes de la bactériologie et a formulé les célèbres postulats de Koch pour identifier la cause des maladies infectieuses (Linnaeus, 1735 ; Pasteur, 1861 ; Koch, 1884).

La coloration de Gram, inventée par Hans Christian Gram en 1884, permet de distinguer les bactéries en Gram positif et Gram négatif, ce qui constitue une avancée majeure dans l'identification bactérienne. Le système de nomenclature bactérienne de Bergey a été créé plus tard dans le XIX^e siècle, permettant de classer et d'identifier les bactéries (Gram, 1884).

Le début du XXe siècle a été marqué par l'émergence de méthodes comme le séquençage de l'ADN et l'analyse phylogénétique, ce qui a permis une classification plus précise des bactéries en fonction de leur génétique et de leur évolution. Au cours des dernières décennies, la PCR (Polymerase Chain Reaction) et d'autres techniques de biologie moléculaire ont été largement utilisées pour identifier rapidement et précisément les bactéries, même à partir d'échantillons complexes (Sanger *et al.*, 1977 ; Woese & Fox, 1977).

L'apparition de technologies comme la spectrométrie de masse et la bio-informatique a récemment permis une caractérisation encore plus précise des micro-organismes, ce qui a contribué à l'évolution constante de l'identification bactérienne (Fenn *et al.*, 1989 ; Altschul *et al.*, 1990).

Il est crucial d'identifier les bactéries afin de diagnostiquer les infections, sélectionner des traitements efficaces et mener des études en microbiologie. L'identification permet d'identifier le genre de bactérie responsable d'une infection, ce qui guide les professionnels de la santé vers des antibiotiques adaptés et des mesures de surveillance. Cette détection peut aussi permettre de détecter des bactéries particulières dans des milieux de production alimentaire afin de garantir la sécurité des produits.

1.4.2. Méthodes d'identification des procaryotes

1) La mise en culture, l'isolement et la purification des bactéries cultivables

- **Milieu de culture classique**

Le concept de culture des microorganismes remonte au XIXe siècle et à cette époque, nous n'avions pas tous les produits et réactifs dont nous disposons aujourd'hui. Ils étaient cultivés dans des environnements naturels (carottes, pommes de terre, viande et autres). De nos jours, les milieux sont diversifiés et complexifiés (Branger *et al.*, 2007). Un milieu de culture est un support où des cellules, des bactéries, des levures et des moisissures peuvent être cultivées pour les étudier. Dans ce milieu, les cellules trouvent généralement les éléments nécessaires à leur croissance, tels qu'une source de carbone et d'énergie (glucose, lactose, acides gras etc), une source d'azote (Ammonium (NH₄⁺), nitrate (NO₃⁻), acides aminés, peptone, etc.), des facteurs de croissance (Vitamines, acides aminés essentiels, NAD⁺ (Nicotinamide adénine dinucléotide et le sang comme facteurs de croissances pour les bactéries exigeantes) et Hèmes qui sont des composants des cytochromes nécessaires pour les chaînes de transport d'électrons.) et quelques oligoéléments (Fer (Fe), zinc (Zn), cuivre (Cu), Cobalt (Co), manganèses (Mn)) (Tankeshwar, 2021).

La peptone, l'agar, l'eau, l'hydrolysat de caséine, l'extrait de malt, l'extrait de viande et l'extrait de levures sont des composants fréquemment employés. Toutefois, il est nécessaire d'ajouter des composants ou des nutriments supplémentaires au support lors de la culture de microorganismes particuliers. En outre, il est nécessaire d'adapter le pH du milieu en conséquence. On peut classer les milieux de culture selon trois manières : classification basée sur la cohérence (milieux solides, milieux semi-solides, milieux liquides, milieux biphasiques), classification basée sur la composition chimique (milieux complexes, milieux synthétiques, milieux semi-synthétiques), et classification selon la fonction du milieu (milieux basaux, milieux enrichi, milieux sélectifs, milieux d'enrichissement) (Tankeshwar, 2021).

- **Les milieux de culture chromogènes**

Ce sont des milieux de culture sélective et différentielle qui renferment des substrats chromogènes qui réagissent avec les enzymes spécifiques produites par certains microorganismes, entraînant un changement de couleur caractéristique. En microbiologie, ces milieux sont extrêmement bénéfiques pour une détection rapide et précise des bactéries (Prinzi, 2020). Lorsque les bactéries se développent sur ces milieux, les substrats chromogènes sont métabolisés par des enzymes bactériennes particulières, ce qui entraîne la production de pigments colorés. La couleur qui se développe peut-être spécifique à certaines espèces ou groupes de microorganismes, ce qui permet une identification visuelle des colonies bactérien. Ces milieux sont employés dans divers secteurs afin de vérifier la présence d'un germe d'intérêt. Grâce à leur technologie, la détection des germes devient plus fiable et plus précise, ce qui permet d'éviter certaines erreurs. Le substrat utilisé est sélectionné avec précaution afin d'assurer une spécificité optimale (Prinzi, 2020).

2) Méthodes macroscopiques

Correspond à l'observation visuelle et à la description d'un objet, d'un échantillon ou d'une structure à une échelle visible à l'œil nue ou à l'aide d'instruments optiques simples comme des loupes ou des microscopes à faible grossissement. Grâce à cette méthode, il est possible d'observer les propriétés générales d'un objet sans nous attarder sur les détails microscopiques. L'étude macroscopique d'un échantillon en microbiologie, par exemple, peut consister à observer sa forme, sa couleur, sa taille et toute autre caractéristique visible à l'œil nu. On utilise fréquemment cette technique pour étudier des organes, des tissus ou des organismes complets (Michael *et al.*, 2015).

Tableau 1 : Les différents types de milieux de culture chromogènes (Prinzi, 2020)

Nom du milieu	La bactérie identifiée	Les résultats
HardyCHROM™ CRE (Carbapenem Resistance Enterobacterales)	- <i>Escherichia coli</i> (résistante aux carbapénèmes) - <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> (résistante aux carbapénèmes)	- Colonies roses ou rose à magenta - Colonies bleu foncé
Hardy Diagnostics HardyCHROM Candida + auris	- <i>Candida auris</i> - <i>Candida albicans</i> - <i>Candida tropicalis</i> - <i>Candida krusei</i>	- Des colonies blanches avec des centres « bullseye » turquoise à vert sarcelle
HardyCHROM™ Group A Strep Agar	- Streptocoques du groupe A (<i>S. pyogenes</i>)	- Colonie rose à rouge
HardyCHROM™ O157	- <i>E. coli</i> entérohémorragique	- Colonie rouge ou rose
HardyCHROM™ UTI	- Les bactéries Gram-Négatifs et Gram-positifs.	- Différentes couleurs
HardyCHROM™ ECC	- <i>Escherichia coli</i> - D'autres coliformes	- Couleur bleue à violet foncé - Colonie rose, rouge ou blanche
Hardy Diagnostics HardyCHROM™ Campy Agar	- <i>Campylobacter spp</i>	- Colonie vert clair à vert bleuté
HardyCHROM™ Sakazakii	- <i>Cronobacter</i> (Enterobacter) <i>sakazakii</i>	- Colonie bleue ou bleu-vert
HardyCHROM™ ESBL	- <i>Escherichia coli</i> , - <i>Proteus mirabilis</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i> - <i>Klebsiella oxytoca</i> - Entérobactéries résistante à la ceftazidime et à la cefpodoxime.	- Colonies roses - Des colonies jaunes / colonies bleues
HardyCHROM™ Listeria	- <i>Listeria monocytogenes</i>	- Turquoise avec un halo blanc distinctif
HardyCHROM™ SS No Pro (no-Proteus)	- <i>Salmonella</i> et <i>Shigella spp.</i>	- Colonie rouge ou rose
HardyCHROM™ Vibrio	- <i>Vibrio sp.</i>	- Colonie verte ou bleu-vert

3) Méthodes microscopiques

La microscopie est un ensemble de techniques qui permettent de visualiser les structures biologiques. Elle permet de rendre visibles les objets invisibles à l'œil nu, que ce soit

par leur taille ou par leurs teintes. La microscopie est un ensemble de techniques d'imagerie d'objets de petite dimension. Les unités de mesure utilisées en microscopie sont micromètre (μm), nanomètre (nm) et angström (Å). L'instrument qui permet cette observation est appelé microscope. Le principe est toujours le même : une onde est transmise à la préparation ou émise par celle-ci. Cette onde est capturée par un objectif, concentrée et transmise par un oculaire, ce qui donne naissance à une image visible. Il est possible de contempler cette image à l'œil nu, de la photographier, de l'enregistrer par caméra et de la stocker sur ordinateur afin d'être retraitée (Venkateshaiah *et al.*, 2020). La microscopie est divisée en deux grands groupes : La microscopie optique (microscope à champs clair, à champs noir, microscope à statifs inversés, confocale à balayage) et la microscopie électronique (microscope électronique à transmission, à balayage, à force atomique).

4) Méthodes biochimiques

La majeure partie des pratiques microbiologiques consiste à identifier correctement les souches bactériennes isolées. Les tests biochimiques sont basés sur le fait que chaque type de bactérie, en raison de sa propriété métabolique spécifique, réagit différemment et donne certains types de résultats positifs ou négatifs. Les méthodes de microbiologie moléculaire ont révolutionné le processus d'identification bactérienne. Il est non seulement plus rapide et précis, mais également précis et largement utilisé (Nair, 2005 ; Singh & Sharma, 2013).

- **Méthodes biochimiques conventionnelles**

Le tableau 2 présente les tests biochimiques classiques les plus couramment utilisés pour identifier les isolats bactériens purs, avec leurs références. Il expose les propriétés chimiques de chaque réaction, ainsi que les substances ou milieux utilisés pour révéler les résultats du test, en indiquant toute modification de couleur éventuelle.

- **Méthodes basées sur la spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physico-chimique qui permet de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt comme les protéines, les lipides, les glucides et les acides aminés, en mesurant leur masse. Le concept fondamental consiste à séparer en phase gazeuse des molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport

Tableau 2 : Différents types de tests biochimiques.

Test biochimique	Caractéristiques chimiques	Réaction chimique	Milieu	Couleur	Références D'inventeur
Test d'oxydase	Identifier l'enzyme cytochrome oxydase	Chaîne de transport d'électrons	Le N, N, N, N-tétraméthyl-1,4-phénylènediamine	Bleue à violette	(Jones & Gates, 1956)
Test catalase	Détoxifier le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène	Bulles d'oxygène	H ₂ O ₂	/	(Loew, 1901)
Test de production d'indole	Dégradation de l'acide aminé tryptophane et production d'indole	Oxyde le tryptophane	Tryptophane	Rose / Rouge cerise	(Ishii, 1889)
Test au rouge de méthyle	Fermentation du sucre	Oxyde le glucose	Rouge de méthyle et bouillon Voges-Proskauer (MR-VP)	Rouge	(Clark & Lubs, 1915)
Test Voges-Proskauer	Production de produit final non acide ou neutre	Sucres fermentés par la voie du butanediol	Rouge de méthyle et bouillon Voges-Proskauer (MR-VP)	Rouge	(Voges & Proskauer, 1898)
Test sur gélose triple sucre et fer	Production de H ₂ S	Activité cytochrome oxydase	Gélose de fer aux trois sucres	Jaune	(Russell & Snyder en 1899)
Test sur gélose au sang	Production d'hémolysines	Activité d'hémolyse	Gélose au sang	Incolore	(1801-1900)
Test sur gélose au sel de mannitol	Production de sous-produits acides	Fermentation du mannitol	Gélose au sel de mannitol	Jaune	(Chapman, 1945)

Tableau 2 : Différents types de tests biochimiques (Suite).

Test biochimique	Caractéristiques chimiques	Réaction chimique	Milieu	Couleur	Références
Test d'hydrolyse de l'amidon	Production d'amylase et d'amylpectine	Hydrolyse de l'amidon en sucre	Gélose d'amidon	Jaune	(Cohn,1872)
Test d'hydrolyse du galactose	Production de glucose	Hydrolyse du galactose	Milieu bleu de méthylène éosine	Vert	(Correns, 1908)
Test de fermentation des glucides	Extraction des acides gras	Fermentation de mannitol	Milieu peptonique protéose	Jaune	(Bordet, 1895)
Test d'utilisation du citrate	Utilise une source de citrate et de carbone	Fermentation de citrate	Gélose au citrate de Simmon	Bleu	(Griffith, 1928)
Test d'uréase	Détecte les substances alcalines et forme de l'ammoniac	Urée hydrolysant	Gélose à l'urée de Christensen	Rose	(McCue, 1926)
Test production de sulfure d'hydrogène	Production de sulfure d'hydrogène	Réduire le composé soufré	Agar tryptone soja	Noir	(Escherich, 1885)
Test de réduction des nitrates	Formation de nitrate et d'ammonium	Réduction des nitrates	Bouillon nitrate	Rouge	(Pétri, 1887)

masse/charge mesuré en kilodalton (kDa). En microbiologie, elle est employée lors d'un prélèvement pour détecter des protéines de diverses masses.

Chez les pathogènes, la présence de ces protéines particulières permet parfois d'identifier un microorganisme en se référant à la masse et à l'abondance relatives de chaque protéine (Anhalt & Fenselau, 1975 ; Karas & Hillenkamp, 1988).

En raison de leur rapidité, de leurs coûts réduits, de leur simplicité et de leur utilisation à un large éventail de microorganismes, la spectrométrie de masse (MS) a gagné en popularité en tant qu'outil de typage microbien (Fox, 2006 ; Sauer & Kliem, 2010).

a. Chromatographie liquide

La chromatographie en phase liquide (CPL) est une méthode utilisée pour séparer les composés chimiques en se basant sur leur interaction différente avec une phase liquide stationnaire et une phase liquide mobile. Cette méthode consiste à introduire un échantillon dans un flux de phase liquide mobile qui est ensuite pompé à travers une colonne contenant une phase liquide stationnaire. La phase stationnaire interagit de manière différente avec les composés de l'échantillon, ce qui les sépare au fur et à mesure qu'ils traversent la colonne. Elle offre la possibilité de séparer, d'identifier et de quantifier différents éléments, tels que les médicaments, les protéines, les acides nucléiques, les métabolites, les pesticides, les polluants environnementaux, et bien d'autres encore (Snyder *et al.*, 2010 ; Skoog *et al.*, 2013).

b. Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode utilisée pour séparer les composés chimiques en se basant sur leur interaction différente avec une phase solide ou liquide et une phase gazeuse mobile. Cette méthode implique l'injection d'un échantillon dans un flux de gaz porteur qui déplace les composés à travers une colonne contenant une phase stationnaire. Les composés s'échelonnent le long de la colonne en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire et la phase mobile. Il s'agit d'une méthode de séparation qui peut être utilisée pour les composés gazeux ou susceptibles d'être volatilisés par élévation de température sans décomposition (dont la masse moléculaire $MM < 300$). Les composants peuvent varier en fonction de leur nature et de leur volatilité. La séparation nécessite seulement des quantités d'environ mg ; parfois même du μg . Des bactéries aérobies et anaérobies, des mycobactéries peuvent être identifiés grâce à cette technique. Les profils d'acides gras varient d'une espèce à l'autre chez les microorganismes, fournissant ainsi des informations précieuses pour la classification taxonomique. Les bactéries présentent une composition en acides gras peu commune, comprenant des acides gras à chaîne droite tels qu'un mélange de myristique, palmitique, stéarique et cis-9-hexadécénoïque, ainsi que des acides gras hydroxylés, cyclopropanes et à chaîne ramifiée de la série iso et anteiso. Cette configuration complexe peut être utilisée pour améliorer la classification bactérienne (Santos *et al.*, 2018).

c. Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)-Temps de Vol (TOF)

La spectrométrie de masse à temps de vol par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) est une méthode à haut débit qui consiste à comparer l'empreinte

protéique des cellules microbiennes avec une base de données de spectres de référence en utilisant différents algorithmes intégrés dans des systèmes modernes. Ces dernières années, l'utilisation de cet outil a été de plus en plus étudiée et mise en pratique pour l'identification et le typage des microorganismes. La technique de MALDI-TOF MS est considérée comme une technique d'ionisation "douce" car elle entraîne une fragmentation minimale ou nulle et permet d'identifier les ions moléculaires des analytes, même dans des mélanges complexes de biopolymères (Wieser, 2012 ; Lavigne, 2013).

De nos jours, cette technique est utilisée pour détecter les bactéries (y compris les mycobactéries), les levures, les moisissures et éventuellement les virus. La particularité de cette méthode est qu'elle permet de détecter les microorganismes en moins d'une heure, alors que les méthodes classiques peuvent prendre de 24 à 48 heures (Wieser, 2012 ; Lavigne, 2013).

- **Méthodes spectroscopiques**

La spectroscopie à fibre optique offre un potentiel considérable dans la recherche actuelle en tant que méthodologie multivariée puissante et reproductible, il est employé en biologie des systèmes, car il s'agit d'une méthode non destructive, très simple et dans une certaine mesure, précise, qui permet d'obtenir de grandes quantités d'informations en une seule mesure. La spectroscopie à fibre optique examine les rotations des groupes fonctionnels moléculaires, qui sont causés par l'énergie déplacée lorsque le rayonnement interagit avec un échantillon. Ces rotations entraînent une excitation électronique, une variation des vibrations et une variation des rotations. Selon les groupes moléculaires de l'échantillon, les spectres diffèrent et sont donc associés à leur composition chimique (protéines, lipides, glucides, membranes, produits pharmaceutiques, tissus humains, etc). On peut analyser des empreintes métaboliques dans des fluides, des cellules ou des tissus, et en théorie, n'importe quel échantillon peut être analysé virtuellement par spectroscopie. Il n'est pas toujours facile de diviser de nombreuses techniques d'analyse spectroscopique en fonction du type d'énergie radiative, de la nature de l'interaction ou du matériel analysé (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

- a. **Spectroscopie infrarouge (FTIR)**

La spectroscopie infrarouge, également connue sous le nom de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, est une méthode analytique couramment employée en chimie et en biologie afin d'analyser la qualité chimique des échantillons. Cette méthode utilise la combinaison de la lumière infrarouge avec les interactions chimiques des molécules. L'utilisation d'une quantité minimale d'échantillon permet d'obtenir, en une seule mesure, des

données détaillées sur les principales biomolécules (lipides, protéines, glucides, acides nucléiques).

Le FTIR offre la possibilité de réaliser une analyse biochimique économique de systèmes biologiques complexes, y compris des cellules vives, des tissus et même des organismes modèles complets. Dans l'évaluation des microorganismes en tant que systèmes biologiques, cette méthode donne lieu à un spectre très complexe avec des bandes d'absorption qui se superposent aux principaux composés. Ainsi, il est essentiel d'effectuer une analyse statistique multivariée adéquate pour extraire des spectres qui sont directement liées ou importantes pour le processus biologique étudié (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

b. Spectroscopie Raman – Spectroscopie vibrationnelle

Les techniques d'analyse puissantes en microbiologie, telle que la spectroscopie vibrationnelle, permettent d'analyser la composition chimique des échantillons biologiques, y compris les microorganismes. Le principe de la spectroscopie Raman repose sur la diffusion inélastique de la lumière. Une petite partie de la lumière laser est dispersée de manière inélastique lorsqu'elle est dirigée vers un échantillon, ce qui provoque un décalage de fréquence caractéristique connu sous le nom d'effet Raman. Les vibrations moléculaires dans l'échantillon sont à l'origine de ce décalage, ce qui permet d'obtenir des données sur sa composition chimique. On peut utiliser la spectroscopie Raman afin de détecter les biomolécules comme les protéines, les acides nucléiques, les lipides et les hydrates de carbone présents dans les milieux microbiens (Pahlow *et al.*, 2013).

c. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'utilisation de la spectroscopie RMN constitue une méthode alternative et efficace pour détecter les microorganismes. On applique des champs magnétiques forts et des impulsions radiofréquence aux noyaux des atomes. Dans le cas d'atomes tels que ^1H ou ^{13}C , le champ magnétique entraînera un spin nucléaire, absorbant ainsi l'énergie radiofréquence (spin de basse à haute énergie), et on détectera l'émission de rayonnement. Un spectromètre de RMN est caractérisé par la fréquence de résonance d'un noyau de l'atome d'hydrogène, qui est le noyau le plus abondant, le plus sensible et donc le plus étudié par RMN. En comparaison avec d'autres techniques, la RMN peut être effectuée de manière non invasive.

En utilisant la RMN *in vivo*, il est possible d'identifier les bactéries de manière non invasive en analysant directement les échantillons biologiques et en repérant les métabolites spécifiques produits par les cultures. Cela donne la possibilité d'évaluer de manière précise la

présence, la nature et l'évolution des infections bactériennes, ce qui peut avoir des conséquences significatives pour le diagnostic et le traitement des maladies bactériennes (Palamaa *et al.*, 2016). Elle est moins sensible et sa limite de détection est plus faible (environ 1 à 5 micromole (μM) et requiert des échantillons de taille relativement importante d'environ 500 microlitre (μL), mais ces problèmes sont compensés par le fait qu'il s'agit d'une méthode quantitative (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

- **Méthodes de séparation électrocinétique**

Les méthodes de séparation électrocinétique sont des techniques de séparation des composés chimiques qui exploitent les différences de mobilité des espèces chargées dans un champ électrique. Ces méthodes reposent sur les interactions entre les molécules et le champ électrique appliqué, ce qui permet de déplacer les espèces à travers un milieu de séparation. En microbiologie, les méthodes de séparation électrocinétique sont souvent utilisées pour séparer et analyser les constituants cellulaires, tels que les protéines, les acides nucléiques et les ions, ainsi que pour étudier les interactions moléculaires au sein des cellules ou entre les cellules et leur environnement. Les principales techniques de séparation électrocinétique en microbiologie comprennent électrophorèse capillaire (CE), électrochromatographie (CEC), électrophorèse bidimensionnelle (2DE), électrophorèse en gel (PAGE), isotachophorèse (ITP) (Wang, 2016).

- **Puces microfluidiques**

De l'ordre du millièème de millimètre, la microfluidique est la science de la manipulation des fluides à l'échelle micrométrique. Il est possible de réaliser des laboratoires sur des puces (Lab on chip) de 1 à 2 cm pour permettre des analyses rapides, avec un minimum de réactifs. Ces dispositifs miniaturisés sont fabriqués à partir de matériaux tels que le verre ou le polymère et sont utilisés dans diverses applications microbiologiques (LEEM_Plateforme, 2019). On peut dire que la création de séquenceurs d'ADN ne serait pas possible sans l'utilisation de la microfluidique. Cette science a connu des développements importants et rapides depuis son émergence dans les années 1990. Le principe de cette technique innovante combine la séparation et la détection des constituants de l'échantillon en contrôlant le mouvement des fluides dans des pompes microfluidiques, sans nécessiter de préparation ni de réactions particulières. Ces appareils portables combinent des microcanaux, des systèmes de pression et des systèmes de détection comme la fluorescence (Franco-Duarte *et al.*, 2019).

Les approches récentes se concentrent sur les techniques d'analyse standard au sein des pompes micro fluidiques à base de gouttelettes qui sont utilisées dans diverses applications microbiologiques, notamment :

- La PCR et le séquençage de l'ADN et de l'RNA
- La détection et l'identification des pathogènes à partir des spécimens cliniques.
- Le test de sensibilité aux antibiotiques
- Etude de la physiologie bactérienne

La microfluidique des gouttelettes est l'une des technologies clés qui ouvrent de nouvelles possibilités. La capacité de générer, manipuler et surveiller des gouttelettes transportant des cellules uniques ou de petites populations de bactéries de manière hautement parallèle et à haut débit crée de nouvelles approches pour résoudre les problèmes de diagnostic et de recherche sur l'évolution bactérienne (Kaminski *et al.*, 2016).

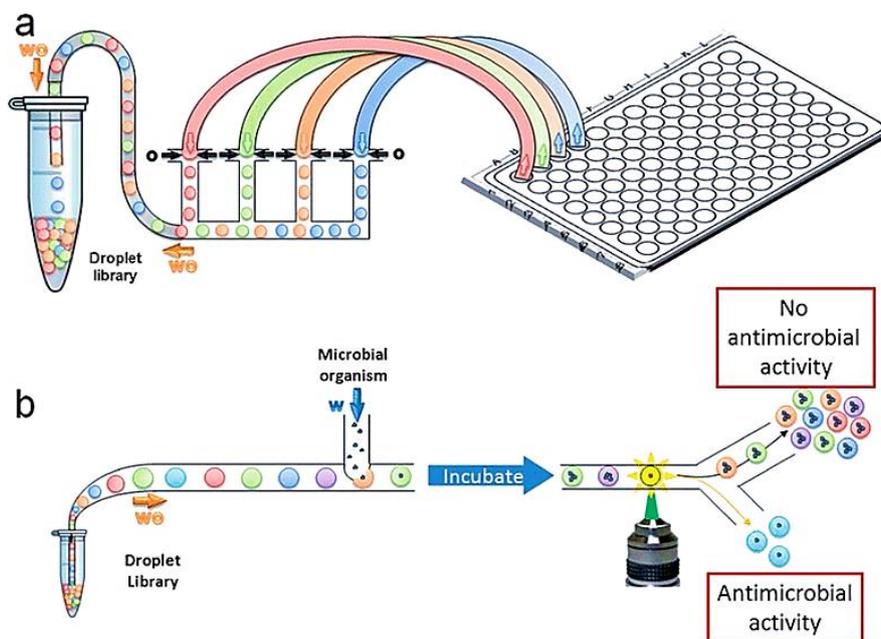


Figure 1 : Production d'une librairie de gouttelettes et petit écran composé. (a) Les puits d'une plaque de microtitration sont interfacés avec les entrées aqueuses de dispositifs de production de gouttelettes multiplexées (flèches colorées) pour émulsionner simultanément le contenu de chaque puits. Les gouttelettes sont regroupées pour former une librairie de gouttelettes. Chaque puits contient un code-barres unique, représenté sur la figure par une couleur différente, porté par les gouttelettes provenant de ce puits et utilisé pour décoder le contenu de chaque gouttelette. (b) Une librairie de gouttelettes de petits composés est criblée pour son activité antimicrobienne. Une aliquote de la librairie est réinjectée dans un dispositif microfluidique et une seule cellule microbienne est ajoutée à chaque gouttelette. Après incubation, les gouttelettes sont examinées pour détecter un arrêt de la croissance du microbe. Les petits composés encapsulés dans les gouttelettes sélectionnées sont identifiés par leurs codes-barres

et notés comme médicaments antimicrobiens potentiels. Les flèches indiquent le sens d'écoulement des différentes phases : fluide aqueux (w), huile de support (o) et gouttelettes d'émulsion eau dans huile (wo) (Guo *et al.*, 2012).

5) Méthodes moléculaires

a. La Réaction en Chaîne par Polymérase ou PCR (Polymerase Chain Reaction)

Le PCR, ou Polymerase Chain Reaction en anglais, est une technique de biologie moléculaire largement utilisée pour amplifier de manière exponentielle de petites quantités d'ADN ou d'ARN spécifiques *in vitro*. Cette technique enzymatique permet de produire rapidement et en grande quantité des copies d'une séquence d'ADN ou d'ARN ciblé (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) à partir d'un échantillon initial d'une faible quantité (de l'ordre de quelques pictogrammes). Les composants de PCR sont : modèle d'ADN, ADN polymérase, amorces, oligonucléotidiques, désoxyribonucléotide triphosphate, système tampon (David & Urlotte, 2002 ; Poitras & Houde, 2002).

Le processus de PCR comprend généralement trois étapes principales :

- **La dénaturation** : L'échantillon contenant l'ADN ou l'ARN à amplifier est chauffé à une température élevée (généralement 10 à 15 minutes à de 95°C), ce qui rompt les liaisons hydrogène entre les brins complémentaires, séparant ainsi les deux brins d'ADN ou d'ARN en une simple hélice.
- **L'hybridation** (ou l'alignement) : L'échantillon est ensuite refroidi à une température plus basse (généralement 0 à 1 minute entre 50°C et 65°C), permettant aux amorces d'ADN spécifiques (courtes séquences d'ADN complémentaires à la séquence cible) de se lier aux brins d'ADN simple hélice, à proximité des régions que l'on souhaite amplifier.
- **L'extension** : À une température optimale pour l'activité de la polymérase (généralement 2 à 60 secondes entre 72°C et 75°C), une enzyme appelée ADN polymérase synthétise de nouveaux brins d'ADN complémentaires à partir des amorces, en utilisant les brins d'ADN ou d'ARN cibles comme matrice. Ce processus produit deux brins d'ADN double hélice, chacun contenant une séquence cible.

Ces trois étapes sont répétées de manière cyclique, générant ainsi un doublement exponentiel de la quantité d'ADN ou d'ARN cible à chaque cycle. En conséquence, le PCR permet de produire rapidement et efficacement des millions de copies de séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN à partir d'échantillons contenant de très faibles quantités de matériau génétique (David & Urlotte, 2002 ; Poitras & Houde, 2002) (Figure 2).

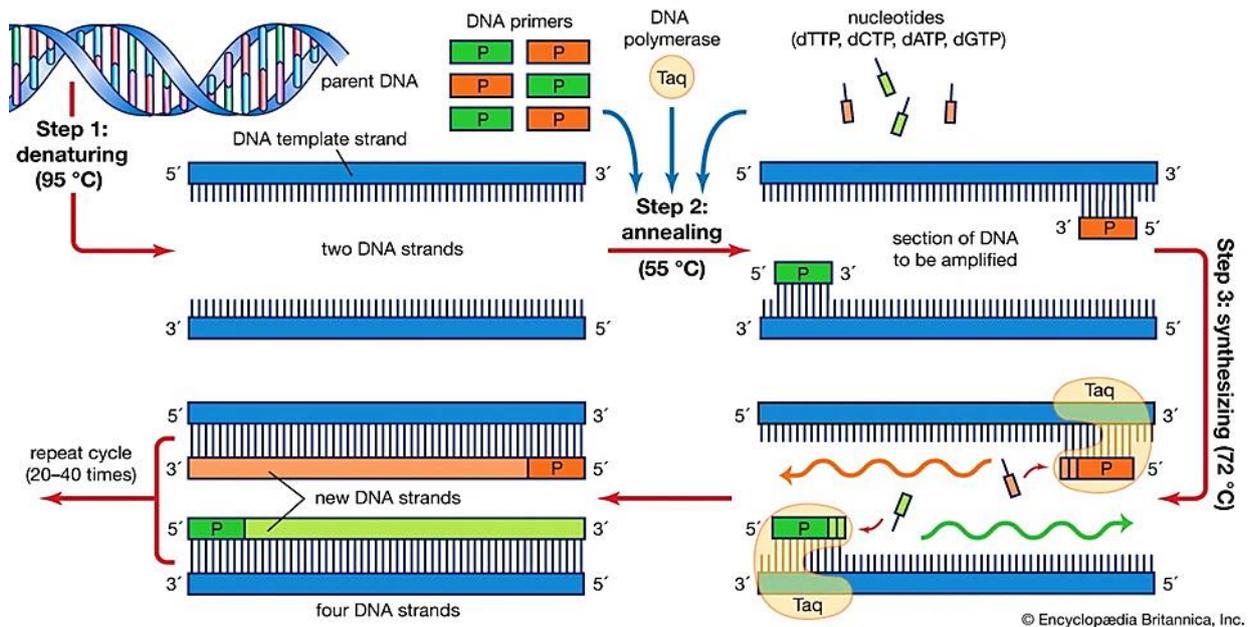


Figure 2 : Le processus en trois étapes de la réaction en chaîne par polymérase (The Editors of Encyclopædia Britannica, 2024).

- **La PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR)**

La PCR en temps réel (qPCR) est une technique moléculaire utilisée pour détecter, caractériser et quantifier les acides nucléiques pour diverses applications. Il s'agit d'une réaction cyclique où le gène cible est amplifié et quantifié. Il nécessite un thermocycleur doté d'un système optique pour recevoir la fluorescence et un logiciel informatique pour l'analyse des données. La fluorescence produit un signal direct proportionnel à la quantité de produit PCR. Le concept amorce est basé sur l'alignement de plus d'un million de séquences d'ADNr et d'ARNr provenant de bactéries 16S. Le concept a été développé à partir de séquences RefSeq issues des bases de données GenBank. La PCR en temps réel a été utilisée pour semi-quantifier l'expression de l'ARN m à partir de gènes contenant des amorces SYBR et un ADNc adéquat (Valones *et al.*, 2009 ; Dariush *et al.*, 2019).

- **PCR multiplexe**

Le protocole de PCR multiplex (multiplex PCR) vise à amplifier plusieurs amplicons simultanément en utilisant au moins trois amorces par réaction de PCR. Les produits de PCR ne pourront alors rivaliser qu'avec la polymérase, les dNTP et éventuellement, le marqueur d'ADN. Différents types d'ADN reconnus par un même couple d'amorces peuvent également être amplifiés. la PCR peut être effectuer multiplex en point final (les produits de PCR étant généralement distingués par leur taille ou la présence d'un site de restriction), ou en temps réel pour plusieurs cibles différentes en mesurant la température de fusion des amplicons PCR avec

des colorants d'ADN double brin conventionnels tels que SYBR Green. Il a de nombreuses applications qualitatives telles que la détection de souches virales, de mutations, etc... (Rajtak *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2017).

- **La transcriptase réverse RT-PCR**

C'est une méthode qui utilise l'ARN comme matrice et comme deuxième étape pour la détection et l'amplification de l'ARN. L'ARN est transcrit inversement en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide de la transcriptase inverse. La qualité et la pureté de la matrice d'ARN sont cruciales pour le succès de la RT-PCR. La première étape consiste à synthétiser un hybride ADN/ARN, qui est ensuite converti en ADNc selon la procédure standard PCR. L'ARN est simple et instable, ce qui rend son travail difficile. L'ARN est généralement la première étape de la qPCR, qui quantifie les transcrits d'ARN dans un échantillon biologique (<https://www.enzo.com/note/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr/>).

- **Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)**

Le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) est une méthode d'identification d'espèces bactériennes à l'aide de colorations numériques basées sur les variations des séquences d'ADN. Cette méthode basée sur la PCR utilise des enzymes de restriction pour reconnaître et diviser l'ADN amplifié en fragments de différentes longueurs. Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose pour générer un motif de bande unique pour chaque espèce bactérienne. Les différences dans les modèles de bandes indiquent la diversité des espèces bactériennes. Cette technique est cruciale pour étudier l'épidémiologie moléculaire des maladies infectieuses, car elle permet de déterminer la source de l'infection et les espèces bactériennes impliquées. Dans le cas de la résistance nosocomiale de *Staphylococcus aureus* à la méticilline (SARM), la PCR-RFLP a identifié trois nouveaux isolats de SARM sur la base de nouveaux modèles RFLP (Duarte *et al.*, 2019).

- **Le pulsotypage ou PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)**

Le typage de biologie moléculaire appelé pulsotypage ou PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) est une méthode de typage en laboratoire qui implique l'extraction de l'ADN total bactérien de la souche étudiée et sa digestion par une enzyme appelée macro-restriction. Ensuite, une électrophorèse en champs pulsé de l'ADN extrait et digéré est performée. Une fois que les différentes étapes de la PFGE sont achevées, une empreinte génétique apparaît comme un code barre. L'empreinte génétique obtenue est ensuite analysée à l'aide d'outils de bioinformatique selon un protocole d'analyse et d'interprétation standard

(<https://www.adria.tm.fr/gestion-maitrise-risques-microbiologiques/caracterisation-moleculaire-disolats-microbiens/pulsotypage/>).

L'objectif du pulsotypage est d'établir une comparaison entre des souches microbiennes de la même espèce en se basant sur leurs empreintes génétiques. Cette technique de typage peut être utilisée dans la pratique pour surveiller et/ou éclaircir des problèmes de contamination dans le domaine industriel. L'évaluation de la persistance ou non d'une souche dans les produits et/ou l'environnement de production peut être effectuée à différentes échelles de temps (semaines, mois, années) (Kong *et al.*, 2016).

b. Le séquençage

Le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T prenant part à la structure de l'ADN. La lecture de cette séquence permet d'étudier l'information biologique contenue par celle-ci et d'identifier les gènes, les régions régulatrices et les variations génétiques, ainsi que de comprendre les mécanismes moléculaires des maladies, de retracer l'évolution des espèces et de concevoir des traitements médicaux personnalisés (Hori *et al.*, 2007).

- **Le séquençage de Sanger**

Le séquençage de Sanger, également connu sous le nom de séquençage par terminaison de chaîne, est une méthode de séquençage de l'ADN développée par Frederick Sanger et ses collègues en 1977. Cette technique a considérablement amélioré les procédures de séquençage, surpassant la méthode de Maxam-Gilbert et restant aujourd'hui la principale méthode utilisée dans les laboratoires. La technique consiste à amplifier l'ADN cible par PCR et à le dénaturer pour obtenir un ADN simple et elle repose sur la synthèse enzymatique de l'ADN, avec l'utilisation de désoxyribonucléotides (dNTP) et de didésoxyribonucléotides (ddNTP) marqués radioactivement ou fluorescent. Lorsque les ddNTP sont incorporés dans la chaîne d'ADN en croissance, ils arrêtent la synthèse de manière aléatoire à chaque position, produisant ainsi une série de fragments d'ADN de différentes longueurs. En séparant ces fragments selon leur taille à l'aide de techniques de gel d'électrophorèse, il est possible de déterminer la séquence d'ADN par l'utilisation des différents logiciels qui se transforme en un chromatographe, qui est un graphique représentant l'intensité du signal (généralement mesurée en fluorescence) en fonction de la position le long de la séquence d'ADN (Hori *et al.*, 2007) (Figure 3).

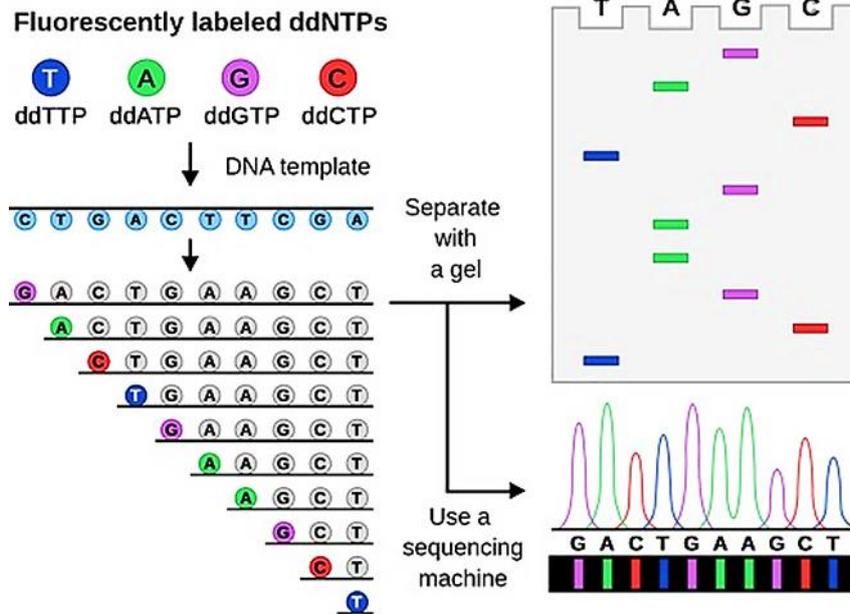


Figure 3 : Présentation schématique de la méthode Sanger (terminaison de chaîne) pour le séquençage de l'ADN
(Labster Theory pages)

- **Séquençage du génome entier (WGS)**

Le séquençage du génome complet d'une bactérie est une méthode complexe qui permet de déterminer l'ordre exact des nucléotides dans l'ensemble du matériel génétique d'une bactérie. Le début de ce processus est la préparation de l'échantillon, où l'ADN bactérien est extrait et purifié de l'échantillon biologique. Par la suite, on divise l'ADN en petits morceaux et on ajoute des adaptateurs d'ADN aux extrémités des fragments. Lorsque les fragments d'ADN sont amplifiés, ils sont séquencés à l'aide de diverses méthodes, comme le séquençage Sanger ou le séquençage par synthèse. On regroupe ensuite les séquences obtenues afin de reconstruire le génome bactérien complet à l'aide de logiciels spécialisés. Après avoir assemblé le génome, les gènes et autres éléments fonctionnels sont repérés et annotés, ce qui permet d'avoir une meilleure compréhension de la structure génétique de la bactérie. Finalement, on procède à des analyses bioinformatique afin d'interpréter les données et de comparer le génome bactérien séquencé à d'autres séquences génomiques disponibles. Ce processus joue un rôle crucial dans de nombreux secteurs, tels que la recherche biomédicale, l'agriculture et la biotechnologie, car il renferme des données essentielles sur la génétique et la fonction des bactéries (Finn & Coll, 2017 ; Salzburg, 2018).

- **Le ribotypage**

L'analyse de séquences de l'ARN ribosomique (ARNr) est une méthode de biologie moléculaire utilisée en microbiologie pour identifier et caractériser les microorganismes, en particulier les bactéries. Dans cette approche, il est initialement nécessaire d'extraire l'ADN des cellules bactériennes, puis de développer les gènes codant pour l'ARNr (généralement 16S, 23S et parfois 5S) par PCR. Par la suite, des enzymes de restriction digèrent l'ADN amplifié, ce qui donne naissance à des fragments de différentes tailles. Par électrophorèse sur gel, ces fragments sont divisés, transférés sur une membrane et associés à une sonde spécifique de l'ADN ribosomique (Figure 4). L'identification des fragments hybridés révèle un motif de bandes spécifique à chaque microorganisme, connu sous le nom de "ribotype". Cette méthode est particulièrement bénéfique pour identifier les espèces bactériennes, assurer la traçabilité des souches dans les enquêtes épidémiologiques et classer phylogénétiquement, même si elle est techniquement complexe et relativement coûteuse (Srwa *et al.*, 2023) (Figure 4).

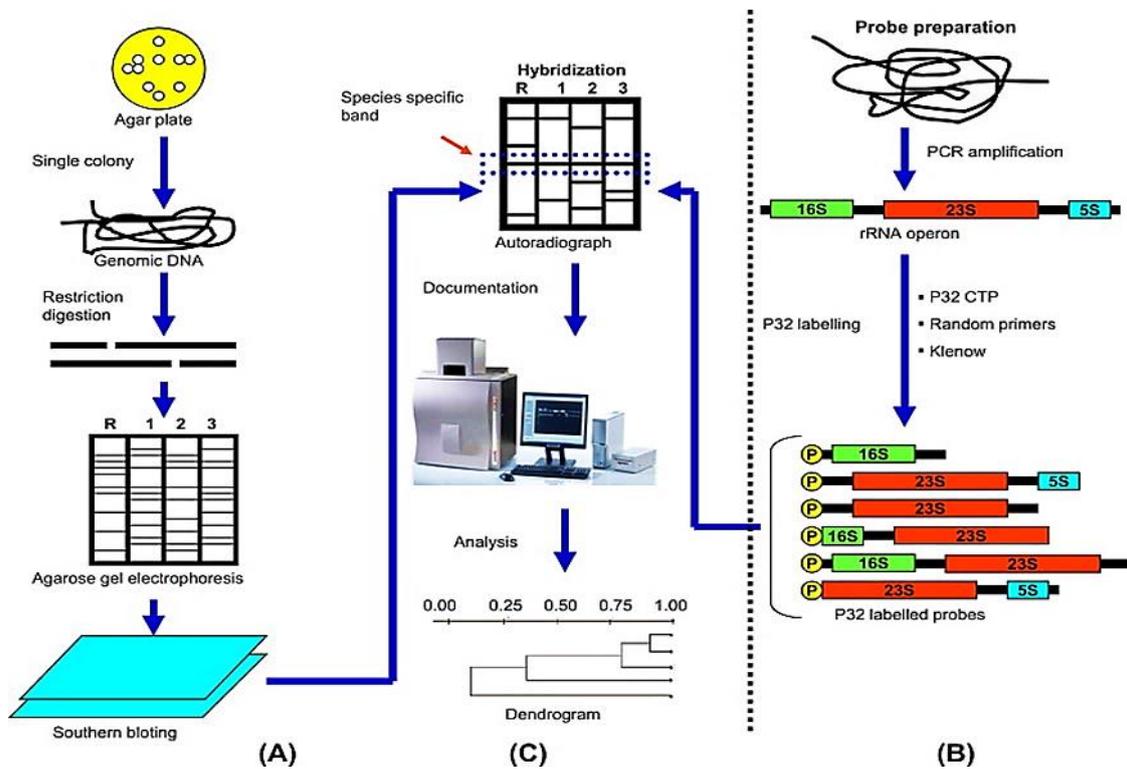


Figure 4 : la méthode de ribotypage (Ayhan *et al.*, 2021)

• Séquençage à haut débit

Le séquençage à haut débit, aussi appelé séquençage de nouvelle génération (NGS), est une technique de pointe qui permet de séquencer rapidement et efficacement les nucléotides d'un échantillon d'ADN ou d'ARN. La vitesse et la capacité de séquençage ont été considérablement améliorées grâce à cette méthode révolutionnaire par rapport aux techniques classiques.

Le séquençage à haut débit permet de séquencer simultanément des millions ou même des milliards de fragments d'ADN ou d'ARN, à la différence des méthodes de séquençage classiques qui séquençaient un seul fragment d'ADN à la fois. Cela est réalisé à l'aide de plateformes automatisées qui effectuent des séquençages simultanés sur une échelle massive.

Différentes méthodes sont utilisées pour le séquençage à haut débit, comme le séquençage par synthèse (Illumina sequencing), le séquençage par ligation (SoliD de Thermo Fisher), le séquençage par nanopores (Oxford Nanopore Technologies), etc. Chacune de ces approches présente ses propres bénéfices, contraintes et applications particulières.

Le séquençage à haut débit se distingue par sa capacité à générer des données à grande échelle à un coût relativement bas par base, son niveau élevé d'automatisation, sa rapidité et sa polyvalence dans divers domaines tels que la recherche biomédicale, la génomique clinique, l'agriculture, la biologie de l'évolution et d'autres (Goodwin *et al.*, 2016 ; Mardis, 2017).

➤ Séquençage Illumina

Les technologies de séquençage à haut débit les plus couramment employées sont le séquençage Illumina, également appelé séquençage par synthèse) (Figure 5). IL est basé sur le concept de la synthèse de l'ADN en temps réel par fluorescence (Metzker, 2010). Les étapes de ce processus comprennent :

- **Préparation des librairies**

Le séquençage de nouvelle génération requiert une préparation méticuleuse de l'acide nucléique en amont de la réaction de séquençage pour garantir des résultats fiables. Plusieurs trousseaux sont disponibles sur le marché pour la préparation de librairie de fragments d'ADN. La fragmentation de l'ADN consiste à découper l'ADN en morceaux de taille précise, habituellement compris entre 200 et 600 paires de bases. Les extrémités des fragments d'ADN sont réparées et des adaptateurs spécifiques sont ajoutés à chaque extrémité. Ces adaptateurs renferment les séquences requises pour être liées aux surfaces d'un Support solide sur lequel se fait le séquençage 'Flow cell' et par la suite amplifiées (Hodges *et al.*, 2009 ; Meyer & Kircher, 2010).

- **Génération d'amplifiants par ponts (bridge PCR, amplification clonale)**

Dans ce processus, l'attachement des fragments d'ADN à la surface du Flow Cell marque le début d'une série d'étapes cruciales. Les adaptateurs présents aux extrémités des fragments se lient spécifiquement aux séquences complémentaires revêtant la surface du Flow

Cell. Une fois fixés, les fragments d'ADN se plient, formant des structures en pont qui se connectent aux séquences complémentaires adjacentes. Cette configuration permet d'initier une amplification par PCR, déclenchant la multiplication exponentielle des fragments. Ainsi, des clusters de molécules d'ADN identiques se forment, chacun renfermant des milliers de copies d'un fragment unique. Cette amplification en clusters constitue une étape cruciale avant le début effectif du séquençage, assurant une abondance de matériel génétique à analyser (Hodges *et al.*, 2009 ; Meyer & Kircher, 2010).

- **Séquençage par synthèse (SBS)**

L'étape cruciale de l'incorporation des nucléotides marqués constitue le cœur du processus de séquençage. À chaque cycle de séquençage, des nucléotides A, T, C et G, chacun marqué d'une fluorescence distincte, sont ajoutés aux brins d'ADN en croissance. Ces nucléotides marqués sont ensuite détectés par un signal fluorescent unique à chaque base, permettant ainsi leur identification. Un laser excite les fluorophores des nucléotides incorporés, tandis qu'une caméra capture les images fluorescentes, révélant le nucléotide ajouté à chaque position du cluster d'ADN. Après cette détection, les fluorophores sont chimiquement retirés, préparant ainsi les brins pour l'ajout du nucléotide suivant lors du cycle suivant. Ce processus de séquençage itératif permet une lecture précise de la séquence d'ADN, base par base, au sein de chaque cluster, offrant ainsi une vision détaillée du génome étudié (Hodges *et al.*, 2009 ; Meyer & Kircher, 2010).

- **Analyse des données**

Une fois les séquences obtenues, l'étape suivante du processus de séquençage consiste à les aligner contre une séquence de référence existante ou à les assembler de novo pour créer une séquence complète. Ce processus permet de localiser les variations, telles que les mutations, les insertions ou les délétions, en comparant les séquences obtenues avec la séquence de référence. Ces variations, appelées variants, sont alors identifiées, fournissant ainsi des informations précieuses sur les différences génétiques entre l'individu étudié et la référence génomique. Une fois les variants détectés, les résultats sont visualisés et interprétés à l'aide de logiciels bioinformatique spécialisés (Real time analysis, Hi seq, Casava), offrant ainsi une compréhension approfondie des implications biologiques et médicales des variations observées dans le génome analysé (Hodges *et al.*, 2009 ; Meyer & Kircher, 2010).

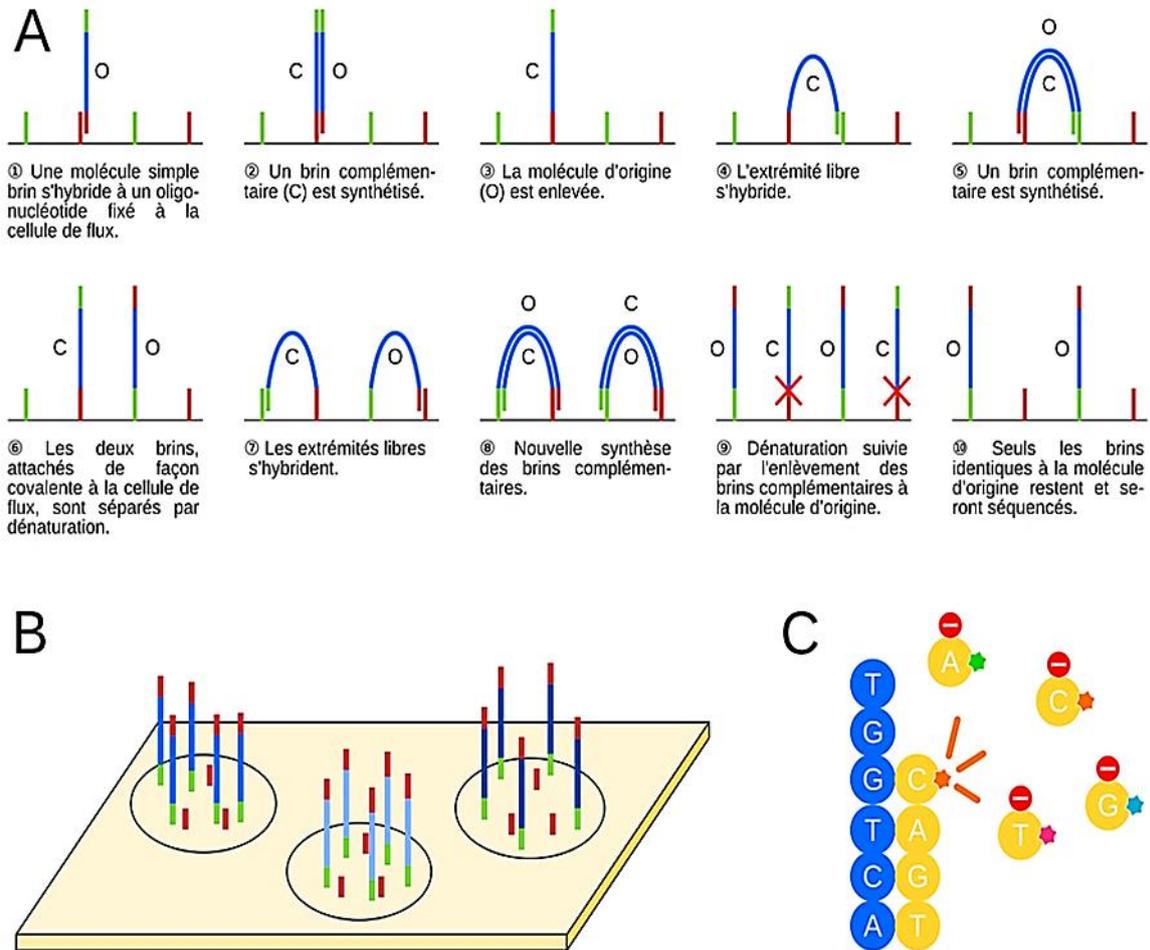


Figure 5 : Le principe de la technologie Illumina. (A) Représentation schématique du processus d'amplification en pont (bridge amplification) des clusters sur la cellule de flux (flow Cell, trait noir). Les adaptateurs et les oligonucléotides complémentaires présents sur la cellule de flux sont indiqués en rouge et vert, les fragments d'ADN à séquencer en bleu. La molécule s'étant initialement fixée à la cellule de flux, et les brins dont la séquence est identique, sont notés O ; les brins complémentaires sont notés C. À l'étape 9, les brins complémentaires à la molécule d'origine sont éliminés par clivage chimique d'un nucléotide modifié dans l'oligonucléotide « rouge » fixé à la cellule de flux (croix rouges). (B) Différentes molécules d'ADN sont amplifiées puis séquencées en même temps sur une même cellule de flux. (C) Réaction de séquençage. Une polymérase synthétise un brin complémentaire (jaune) au brin situé sur la cellule de flux (bleu) en incorporant des nucléotides qui portent des groupes fluorescents (bleu, rose, orange, ou vert) et un groupe « stop » qui bloque la polymérisation. S'ensuit une étape d'imagerie afin d'identifier le nucléotide incorporé. Ensuite, les groupes fluorescents et « stop » sont enlevés et le processus se répète (Combemorel & van Dijk, 2021).

6) Isolement de bactéries non cultivable ou difficilement identifiable

a. La culturomique

La culturomique en microbiologie est une approche qui vise à étudier la diversité microbienne des bactéries non cultivable dans des conditions de laboratoire spécifiques (Lagier

et al., 2018). Elle consiste en une combinaison de la culture de communautés microbiennes et du séquençage génétique afin d'analyser les bactéries capables de se développer dans des conditions particulières (Lagier *et al.*, 2012). Contrairement aux méthodes qui se focalisent exclusivement sur l'ADN microbien, la culturomique utilise des bactéries vivantes, ce qui permet de favoriser la croissance de certaines espèces ou de sélectionner des espèces minoritaires en éliminant les populations dominantes, en enrichissant les cultures avec des facteurs de croissance spécifiques ou en utilisant des antibiotiques pour éliminer les bactéries indésirables (Lagier *et al.*, 2012 ; Morgan & Huttenhower, 2012).

Grâce à cette méthode, les microbiologistes ont la possibilité d'étudier la diversité des microbes dans divers milieux tels que le sol, l'eau, le corps humain, etc. Elle offre également la possibilité d'isoler et d'identifier des nouvelles espèces bactériennes, ce qui peut aider à approfondir notre compréhension de la microbiologie et de son rôle dans divers écosystèmes (Floyd *et al.*, 2010). Dans le domaine de la culturomique, la démarche débute par la collecte d'échantillons de microbiote, qui sont dilués, homogénéisés et aliquotés, suivis de prétraitements tels que la pasteurisation ou l'enrichissement. Par la suite, les aliquotes sont disposées dans différents milieux de culture, qu'ils soient sélectifs ou non. Les conditions de culture sont sélectionnées afin d'identifier les microbes de niches spécifiques, encourager la croissance des microbes exigeants ou limiter celle des microbes omniprésents afin de favoriser le développement et réaliser un séquençage génétique de microbes moins fréquents.

On utilise des techniques telles que la pasteurisation afin de choisir les sporogènes, l'incubation dans des milieux complexes et l'utilisation d'antibiotiques et de phages pour diminuer les concentrations de certains microorganismes.

D'autres méthodes comprennent l'utilisation de coculture avec une incubation prolongée afin de d'identifier les microbes à croissance lente. Les chercheurs peuvent améliorer la croissance et l'isolement des microorganismes en aménageant stratégiquement les milieux de culture et en incorporant différents éléments nutritionnels tels que les glucides, les composés azotés, les vitamines et les minéraux.

La coculture est une méthode qui permet d'explorer les interactions complexes entre les différentes espèces de microbes, ce qui facilite la croissance de microbes qui ont des besoins nutritionnels complexes grâce à des relations symbiotiques et des interactions métaboliques bénéfiques, telles que la production de quinine (Hye *et al.*, 2024) . En utilisant la spectrométrie de masse MALDI-TOF et le séquençage de l'ADNr 16S, elle associe ces conditions de culture afin de détecter les bactéries pures issues d'écosystèmes complexes (Lagier *et al.*, 2018). La

recherche sur le microbiome repose sur l'utilisation de cultures bactériennes pures, qui permettent d'analyser les interactions entre l'hôte et les microbes, ainsi que les interactions entre microbes-microbes. Les informations recueillies permettent d'appréhender la structure et l'activité des communautés microbiennes dans différents environnements (Figure 6).

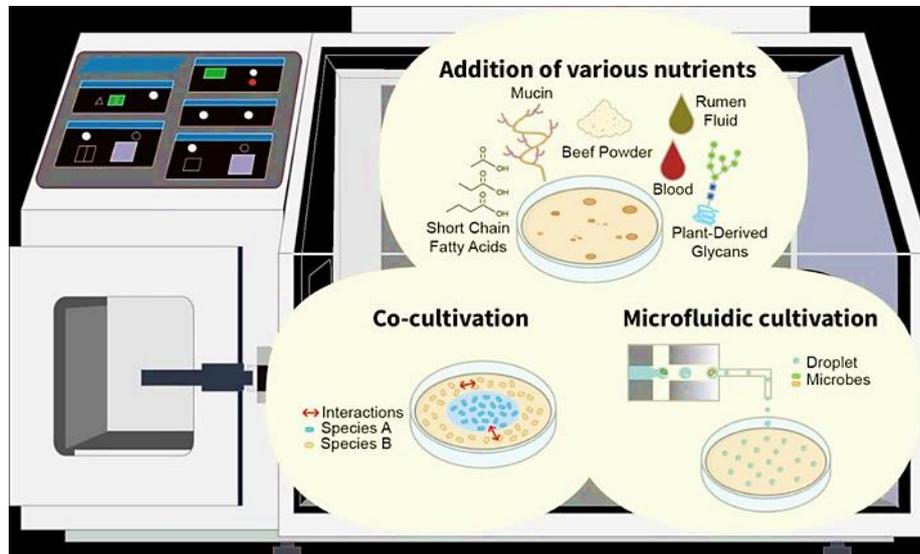


Figure 6 : Méthodes de culture avancées pour isoler les microbes (Lagier *et al.*, 2018).

b. La métagénomique

La métagénomique en microbiologie consiste à analyser les données génomique et génétique déduites d'échantillons environnementaux. Cela permet d'analyser l'ensemble du matériel génétique de cet échantillon sans nécessiter de culture en laboratoire.

Cette méthode est particulièrement bénéfique pour étudier les bactéries qui ne peuvent pas être cultivées. En métagénomique, il existe deux méthodes principales de séquençage : la métagénomique ciblée (ou metabarcoding) et la métagénomique globale (ou shotgun). Le processus de métagénomique ciblée consiste à séquencer un gène particulier, tel que le gène de l'ARN 16S, qui est commun à plusieurs espèces, afin d'identifier les différentes bactéries présentes.

La métagénomique globale consiste à fragmenter l'ensemble de l'ADN de l'échantillon en petits fragments et les séquencer à l'aide d'un séquenceur haut débit. D'où le nom de Shotgun sequencing et réassemblés afin de reconstruire les génomes des organismes présents (Boisvert *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2015).

Le terme métataxonomique a été employé pour les données de séquençage ciblées et le terme métagénomique pour les données de séquençage shotgun. Il y a quatre étapes

principales dans le processus de métagénomique : l'échantillonnage et l'extraction de l'ADN, le séquençage à haut débit, l'analyse et la visualisation (Nguyen *et al.*, 2023) (figure7).

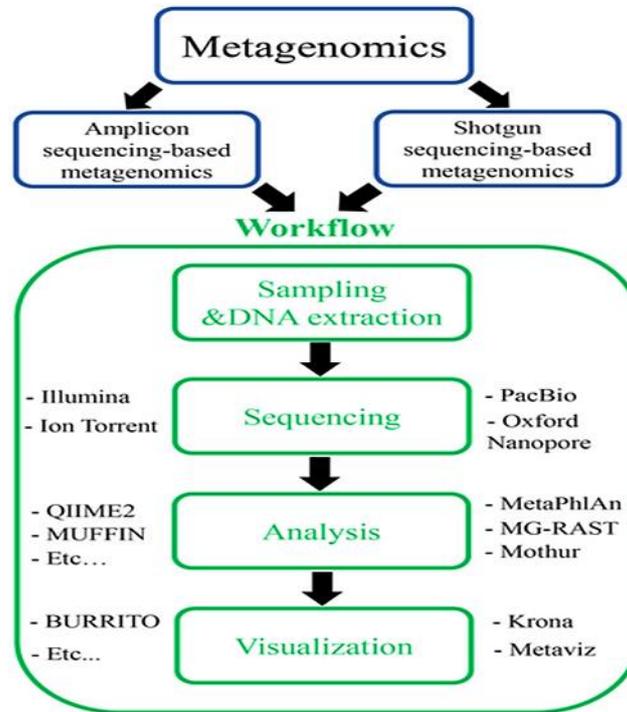


Figure 7 : Classification (rectangles bleus) et flux de travail (rectangles verts) du méta génomique à l'aide de différentes plateformes de séquençage et outils bioinformatique (Nguyen *et al.*, 2023).

Les études métagénomiques présentent fréquemment une succession d'étapes, où les étapes précédentes influencent les résultats des étapes suivantes. La collecte des échantillons pour la recherche métagénomique se fait directement sur le terrain, il est donc nécessaire de prévenir toute contamination provenant d'autres sources.

Il est également important de procéder à l'extraction de l'ADN avec précaution afin de réduire les impuretés de l'ADN de l'hôte. Les études comparatives sur l'efficacité de ces méthodes d'extraction d'ADN ont été lancées en raison de la disponibilité de divers protocoles et kits tels que le kit de purification Pure Link Microbiome TM (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) et le kit Zymo BIOMICS 96 Magbead DNA (ZymoBIOMICS, Irvine, CA, USA).

Dans cette méthode, le séquençage à haut débit, également connu sous le nom de NGS, joue un rôle crucial. Grâce à des méthodes comme illumina, il est possible de produire rapidement de grandes quantités de données génomiques et d'atteindre une longueur de lecture allant jusqu'à 300 pb. De plus, les plates-formes PacBio et ONT peuvent réaliser des lectures longues de plus de 1000 Pb. Les données métagénomiques sont traitées selon les étapes

suivantes après l'étape de séquençage : Vérification de la qualité des lectures, assemblage/classification, profilage taxonomique/fonctionnel et visualisation des données. Ces données sont ensuite utilisées par les programmes bioinformatiques pour rassembler les petits fragments d'ADN séquencés. Ces programmes permettent de chevaucher les portions homologues de ces petits fragments pour former des fragments plus grands appelés contigs ou mappées à des génomes de référence (Nguyen *et al.*, 2023).

L'outil Ray est un exemple de ce genre de programme qui permet de regrouper les fragments en un nombre limité des contigs tout en minimisant le nombre d'erreurs (Boisvert *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2015).

Des recherches d'homologie pour les séquences de ces contigs pourront être réalisées en utilisant les bases de données existantes telles que MetaGeneBank, Ani-mal Metagenome DB, Marine Metagenomics Portal MGnify et Terrestrial Metagenome DB. Finalement, tous les résultats sont représentés visuellement afin de fournir des informations sur la composition microbienne ou les éventuels rôles des microbes (Nguyen *et al.*, 2023).

c. Vérification et analyse de nouveaux organismes ou NOVA (Novel Organism Verification and Analysis)

C'est une approche bioinformatique sophistiquée conçue pour détecter et analyser des organismes nouveaux ou inconnus à partir de données de séquençage génomique. Cette méthode combine des techniques de séquençage de nouvelle génération avec des analyses bioinformatiques avancées pour explorer la diversité microbienne dans différents environnements avec un nouvel algorithme qui a été développé pour les détecter et les identifier, son principe repose sur l'analyse de séquences génétiques. Cela permet une identification plus rapide et plus précise des espèces bactériennes, facilitant ainsi la recherche en microbiologie, le diagnostic des maladies et la surveillance de la résistance aux antibiotiques.

L'algorithme de vérification des nouveaux organismes (NOVA) est une série d'étapes biochimiques et analytiques généralement effectué à l'aide de technologies de séquençage à haut débit. Cela commence par la collecte de données génétiques à partir d'échantillons environnementaux ou cliniques, suivi d'un prétraitement pour éliminer les erreurs et construire des séquences plus longues et plus continues.

Ces séquences sont ensuite comparées aux bases de données existantes pour trouver des correspondances exactes ou partielles avec des séquences connues. Les séquences qui ne correspondent à aucun organisme connu sont considérées comme potentiellement nouvelles.

Pour le confirmer, l'algorithme analyse ces séquences dans un contexte phylogénétique, en comparant leurs relations évolutives avec celles d'organismes précédemment catalogués. Les résultats sont ensuite vérifiés par des bioinformaticiens et d'autres experts en biochimie et en microbiologie, et des tests supplémentaires peuvent être effectués pour valider les caractéristiques des espèces bactériennes nouvellement identifiées.

NOVA utilise des algorithmes avancés d'apprentissage automatique et de traitement des données pour améliorer la précision et la rapidité de ces analyses, permettant ainsi la découverte de nouvelles espèces bactériennes et une meilleure compréhension de la diversité microbiologique. Les nouvelles espèces bactériennes identifiées grâce à NOVA sont publiées dans des revues scientifiques, soumises à un examen critique par d'autres experts et collaborées avec d'autres laboratoires pour reproduire les analyses et les expériences. Cette approche méthodique et en plusieurs étapes garantit que les espèces bactériennes nouvellement identifiées sont authentiques et scientifiquement valides, contribuant ainsi de manière significative à la compréhension de la biodiversité microbiologique (Muigg *et al.*, 2024 ; Toshniwal, 2024).

1.4.3. L'analyse bioinformatique des séquences

La bioinformatique des séquences génétiques est une discipline qui combine la biologie et l'informatique pour étudier et interpréter les informations contenues dans les séquences d'ADN, d'ARN et de protéines. Cette analyse est cruciale pour comprendre la structure, la fonction et l'évolution des gènes et des protéomes. La bioinformatique, née avec la création des premières bases de données de séquences génétiques dans les années 1980, propose des algorithmes et des logiciels pour exploiter efficacement ces données. Ces outils permettent la manipulation, le stockage, la visualisation et l'analyse de séquences nucléotidiques et protéiques, offrant de nouvelles perspectives en génétique et en biologie moléculaire. Pour comprendre les différentes étapes d'analyse, il est nécessaire de définir plusieurs termes utilisés en bioinformatique (David, 2001 ; Lesk, 2017). Voici un aperçu de quelques-unes de ces notions :

- Les bases de données

Les bases de données sont des systèmes de stockage permettant de conserver et de gérer des données variées telles que des chiffres, des dates et des mots, qui peuvent être retraitées informatiquement pour produire des informations. Une base de données biologique peut inclure des informations bibliographiques (comme des articles) et des données génomiques

(comme des séquences nucléiques ou protéiques). Il est crucial de distinguer une base de données d'une banque de données. Une banque de données peut être vue comme une base de données, mais elle contient des informations biologiques hétérogènes (incluant des virus, champignons, animaux, etc.), tandis qu'une base de données est généralement plus spécifique. Parmi les exemples de bases de données, on peut citer Medline, WorldCat, GenBank et EMBL (Beroud, 2010-2011).

- **L'alignement des séquences**

L'alignement de séquences est une technique fondamentale en bioinformatique qui permet de comparer deux ou plusieurs séquences génétiques ou protéiques afin de déterminer leur similarité et leurs différences. Ce processus est crucial pour comprendre l'évolution, la structure et la fonction des molécules biologiques. Deux approches principales sont utilisées : l'alignement global, qui aligne les séquences sur leur intégralité en introduisant éventuellement des gaps pour les faire correspondre, et l'alignement local, qui identifie les régions de similarité maximale, même si elles ne couvrent qu'une partie des séquences. Les algorithmes d'alignement attribuent des scores aux correspondances de caractères et aux gaps, puis recherchent l'alignement optimal en maximisant le score total. Cette méthode est largement utilisée pour identifier des domaines fonctionnels, des motifs conservés et des mutations, fournissant ainsi des informations précieuses pour la recherche en biologie moléculaire et évolutive (David, 2001).

- **FASTA**

Le format FASTA est un format de fichier texte utilisé en bioinformatique pour stocker des séquences biologiques telles que des séquences d'ADN, d'ARN ou de protéines. Chaque séquence est généralement précédée d'une ligne d'en-tête débutant par le caractère ">" et pouvant contenir des informations telles qu'un identifiant ou un nom de séquence. La séquence elle-même est ensuite écrite sur une ou plusieurs lignes, où les acides nucléiques ou les acides aminés sont notés par des lettres conformément à la nomenclature de l'IUPAC. Des lignes de commentaires peuvent également être incluses avant ou après la séquence. Le format FASTA est largement utilisé en bio-informatique en raison de sa simplicité, de sa lisibilité et de sa compatibilité avec de nombreux outils et langages de programmation (Pearson, 1990).

- Exemple de séquence d'ADN en format FASTA

```
>17seq101 CTX-M-15 (COL20170060)
```

```
TGCAGTCTAATTCTTCGTGAAATAGTGATT
```

TTTGAAGCTAATAAAAAACACACGTGGAA

TTTAGGGACTATTCATGTTGTTGTTATTTCG

- **BLAST**

L'outil de recherche en ligne BLAST, également appelé « Basic Local Alignment Search Tool », est largement utilisé par le NCBI pour repérer des zones d'homologie entre diverses séquences biologiques (nucléotide ou protéine). Il s'agit d'un algorithme de recherche rapide et sensible qui permet de saisir une séquence de gènes d'intérêt qui sera comparée à une banque de séquences nucléotidiques ou protéiques. La base de données de séquences biologiques du NCBI est très vaste et les séquences de requêtes sont comparées pour trouver les plus proches.

L'utilisation d'un membre de la suite des programmes BLAST est appelée nucléotide BLAST. L'interface de BLAST renferme un peu trop d'informations, même pour les scientifiques qui l'utilisent souvent. On peut réaliser la comparaison en examinant certains paramètres présents sur la feuille des résultats dans les champs suivants : La valeur E (ou "E-value") est un nombre indiquant combien de fois une correspondance aléatoire est attendue dans une base de données. Plus cette valeur est faible, plus la correspondance est significative. Le pourcentage d'identité (ou "Percent Identity") quantifie la similarité entre la séquence de requête et la séquence cible, avec une correspondance d'autant plus significative que ce pourcentage est élevé. La couverture de la requête (ou "Query Cover") représente la proportion de la séquence de requête couverte par la séquence cible, une couverture de 100 % signifiant que la séquence cible couvre entièrement la séquence de requête (Charlebois, 2007 ; Newell *et al.*, 2013).

- **L'arbre phylogénétique**

C'est une représentation graphique des relations évolutives entre différentes espèces ou groupes taxonomiques, illustrant les hypothèses sur les liens de parenté et les trajectoires évolutives basées sur des données morphologiques, génétiques ou moléculaires. Les principales caractéristiques d'un arbre phylogénétique incluent les nœuds, qui sont les points de branchement représentant les ancêtres communs, les branches, qui relient les nœuds et représentent les lignées évolutives descendant des ancêtres communs, et les feuilles ou extrémités, qui sont les bouts des branches représentant les espèces ou groupes actuels. Les arbres phylogénétiques peuvent être enracinés, avec un nœud racine indiquant l'ancêtre commun ultime et la direction de l'évolution, ou non enracinés, montrant les relations entre les entités sans indiquer un ancêtre commun ultime.

Ces arbres sont essentiels pour comprendre la biodiversité, les processus évolutifs et les relations entre les organismes. Ils permettent d'identifier les traits ancestraux et dérivés, aidant les scientifiques à reconstituer l'histoire évolutive de la vie sur Terre. Des outils informatiques et des algorithmes spécialisés, basés sur les séquences d'ADN ou de protéines, sont souvent utilisés pour construire des arbres phylogénétiques (Wiley & Lieberman, 2001).

- **MEGA**

MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) est un logiciel de bioinformatique utilisé pour l'analyse des séquences génétiques et la construction d'arbres phylogénétiques, largement employé en biologie moléculaire, génomique et évolution. Il permet d'aligner des séquences d'ADN, d'ARN ou de protéines, d'utiliser diverses méthodes pour construire des arbres phylogénétiques, et d'effectuer des analyses évolutives telles que l'estimation des distances évolutives et la détection de sites sous sélection.

MEGA dispose d'une interface conviviale, prend en charge de nombreux formats de fichiers de séquences, et inclut des outils statistiques pour évaluer la robustesse des résultats. Puissant et polyvalent, il est gratuit et régulièrement mis à jour, la dernière version est MEGA 11, offrant une gamme complète de fonctionnalités pour l'analyse des séquences génétiques et la visualisation des relations évolutives (Kumar *et al.*, 2018).

- **CLUSTAL**

Est un logiciel de bioinformatique utilisé pour effectuer des alignements multiples de séquences d'ADN, d'ARN ou de protéines. Il permet de comparer et d'aligner plusieurs séquences pour identifier les régions conservées et les variations entre elles, facilitant ainsi l'analyse des relations évolutives et fonctionnelles. CLUSTAL est apprécié pour sa précision et sa capacité à gérer de grands ensembles de données, offrant divers algorithmes d'alignement et des options pour ajuster les paramètres selon les besoins spécifiques des utilisateurs. Il est largement utilisé en biologie moléculaire, en génomique et en bioinformatique, et est disponible sous différentes versions, telles que CLUSTALW et CLUSTAL Omega, chacune offrant des améliorations en termes de vitesse et de performance (Thompson, 1994).

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

2. Cadre d'étude

Notre travail porte sur la caractérisation phénotypique d'isolats bactériens inconnus. La partie pratique a eu lieu au niveau du laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Chaabet Erssas, pôle des laboratoires de recherche (Université Constantine 1-Frères Mentouri), sur une période allant du 10 février 2024 à la fin du mois de mai de la même année.

2.1. Souches bactériennes environnementales

Les isolats bactériens utilisés dans cette étude ont été préalablement isolés à partir des tissus végétaux infectés et conservés soit dans des tubes de gélose inclinés à 10°C, soit à -20°C dans des tubes Eppendorf contenant un bouillon de culture additionné de glycérol.

2.2. Réactivation des souches

La revivification a été faite dans le bouillon LB à 37°C ou à 28°C selon le type de l'isolat bactérien. Ensuite, ils ont été ensemencés sur des milieux gélosés LB et King B à une température adéquate pendant 24h à 48h.

2.3. Purification des souches bactériennes

- **Ensemencement avec des stries en surface** : avec des stries effectuées sur la surface des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé (Figure 8).
- **Ensemencement en surface avec étalement par billes en verre** : Sur les boîtes de Pétri, un milieu gélose King B est ensemencé avec des billes (Glass beads, Carolina Biological Supply, USA) stériles et incubé à une température de 28°C pour obtenir les colonies bien isolées (Figure 9). Les souches sont purifiées à l'aide de 4 repiquages successifs jusqu'à ce que les cultures aient été homogènes et toutes les colonies ont été identiques.



Figure 8 : Purification d'une souche sur milieu gélose (gélose King B) par la technique des stries.



Figure 9 : Ensemencement en surface avec étalement par billes en verre.

2.4. Identification des souches

2.4.1. Caractères cultureux et morphologiques

1) Étude macroscopique

L'examen macroscopique permet de décrire l'aspect des colonies (la forme, taille, contour, pigmentation, surface...) en utilisant un microscope (Optech, Optical Technology). L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température de l'incubation.

1) Étude microscopique

En se basant sur la morphologie des cellules bactériennes et leur mode d'association observés par microscope optique.

➤ La coloration de Gram

Constitue une technique microbiologique utilisée pour différencier les bactéries en fonction de la structure de leur paroi cellulaire en bactérie à Gram positif (retiennent le colorant violet) et en Gram négatif (ne retiennent pas colorant et apparaissent en rose), elle permet également de classifier leur forme en bâtonnets ou en coques, tout en fournissant des indications sur leur mode de regroupement. La coloration de Gram a été exécutée selon le protocole standard. Les observations ont été effectuées au microscope trinoculaires à camera (Optech, Optical Technology) (Annexe 2).

➤ Le test à la potasse (test KOH)

C'est une méthode rapide et simple pour déterminer si des bactéries sont Gram positif ou Gram négatif, sans avoir besoin de réaliser une coloration de Gram traditionnelle. Elle repose sur la réaction des parois cellulaires des bactéries avec une solution de KOH (hydroxyde de potassium). Si un filament visqueux se forme entre l'anse et la lame, cela indique que les cellules bactériennes se sont lysées et ont libéré de l'ADN, ce qui est caractéristique des bactéries Gram négatif. Si aucun filament ne se forme, cela indique que les cellules bactériennes ne se sont pas lysées, ce qui est caractéristique des bactéries Gram positif.

2.4.2. Caractère biochimique

1) Test de catalase

Le test de catalase est une technique qui permet de détecter la présence de l'enzyme catalase dans une souche bactérienne. Certaines bactéries génèrent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est extrêmement nocif lors de leur respiration aérobie. Il est dégradé grâce à cette enzyme en eau (H_2O) et en oxygène (O_2).

Procédure

Une colonie bactérienne est prélevée à l'aide d'une boucle de platine et déposée sur une lame de verre en suite quelques gouttes de peroxyde d'hydrogène (l'eau oxygénée) (H_2O_2) sont ajoutées à la colonie. S'il y' aura une formation de bulles de dioxygène (O_2) cela indique un résultat positif pour la présence de l'enzyme catalase (ASM Protocols, 2024).

2) Test oxydase

L'oxydase, ou cytochrome oxydase, est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes. Elle catalyse une réaction d'oxydoréduction utilisant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons. Les bactéries possédant l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N, N, N, N-tétraméthyl-1,4-phénylènediamine, un composant du réactif utilisé pour détecter le cytochrome oxydase en bactériologie, produisant ainsi des produits de couleur violette (Forbes *et al.*, 2024).

Procédure

Un disque d'oxydase est déposé sur une lame porte-objet propre. Ensuite, une colonie bactérienne est déposée avec précaution sur le disque. S'il y a un développement d'une coloration bleue à violette dans les 10 à 60 secondes, on indique un résultat positif, mais s'il y

a une absence de développement de coloration dans les 10 à 60 secondes on indique un résultat négatif (Forbes *et al.*, 2024).

3) Test mannitol mobilité

Il s'agit d'une gélose molle emballée en tubes (SARL EquiProLab) qui offre la possibilité d'analyser la fermentation du mannitol et la migration des bactéries. Ce milieu semi-solide comprend notamment du mannitol et du rouge de phénol en tant qu'indicateur de pH. L'ensemencement a été réalisé par piqûre centrale jusqu'au fond des tubes à l'aide d'une pipette Pasteur. Le mannitol est utilisé lorsque l'indicateur coloré change de couleur de rouge à jaune, ce qui correspond à la couleur du milieu. Dans cette situation, le caractère mobile est caractérisé par un trouble qui envahit toute la largeur de la gélose de part et d'autre de la piqûre centrale, tandis qu'une bactérie immobile ne se développe que le long de la piqûre centrale.

4) Milieux sélectifs

La technique de stries a été utilisée pour l'ensemencement des milieux sélectifs et la lecture a été réalisée après 24 heures d'incubation à une température de 37°C.

a. Milieu BCP lactose (Bromocrésol-pourpre)

Il s'agit d'une gélose lactosée au bromocrésol-pourpre (Biokar), employée pour l'isolement des entérobactéries. Toutefois, plusieurs espèces de bactéries qui ne font pas partie de cette famille peuvent se développer dans ce milieu non inhibiteur. Les espèces qui fermentent le lactose sont distinguées de celles qui ne le fermentent pas. En présence de pourpre de bromocrésol, la fermentation du lactose en acide se manifeste par un changement de couleur de bleu violacé à jaune (Jung & Hoilat, 2021).

La lecture des résultats

- Les germes lactose-négatif donnent des colonies de couleur bleue.
- Les germes lactose-positif donnent des colonies jaunes.

b. Milieu Mac Conkey

Le milieu Mac Conkey est un milieu de culture différentiel et sélectif utilisé principalement pour l'isolement et l'identification des bactéries à Gram négatif, en particulier les entérobactéries. Ce milieu permet également la différenciation entre les bactéries lactose

positives (fermentatives de lactose) et lactose négatives (non fermentatives de lactose). Ce milieu contient plusieurs composants (Allen, 2005 ; Jung & Hoilat, 2021) :

- **Sels Biliaires** : Inhibe la croissance des bactéries Gram positif, permettant ainsi la sélection des bactéries Gram négatif.
- **Cristal violet** : Empêche la croissance des bactéries Gram positif.
- **Lactose** : Source de sucre fermentable qui permet de différencier les bactéries en fonction de leur capacité à fermenter le lactose.
- **Rouge neutre** : Indicateur de pH qui vire au rouge en milieu acide, ce qui est un résultat de la fermentation du lactose.

La lecture des résultats

- Colonies roses/rouges (lactose +) : Indiquent que les bactéries fermentent le lactose, produisant de l'acide qui abaisse le pH du milieu et vire l'indicateur rouge neutre au rouge.
- Colonies incolores ou pales (lactose -) : Indiquent que les bactéries ne fermentent pas le lactose. Ces colonies apparaissent incolores ou transparentes parce qu'aucun acide est produit pour changer le pH.
- Absence de croissance : Cela suggère que les bactéries sont à Gram positif ou ne tolèrent pas les sels biliaires ou le cristal violet présents dans le milieu.
- Fermentation du lactose : Les bactéries qui fermentent le lactose produisent des acides qui abaissent le pH du milieu, entraînant un changement de couleur du milieu de rouge à jaune autour des colonies LF.

5) Test phénylalanine désaminase

Le milieu phénylalanine (Glenthams Life Science, Royaume-Uni) est un milieu de culture qui permet de tester la capacité des microorganismes, en particulier les bactéries, à dégrader l'acide aminé phénylalanine en acide phénylpyruvique par l'enzyme phénylalanine désaminase. Ce test est particulièrement utile pour l'identification et la différenciation de certaines espèces bactériennes (Annexe 3).

Procédure

Les colonies bactériennes suspectes sont inoculées sur la surface du milieu phénylalanine sous forme de stries ou de piqûres. Le milieu inoculé est incubé à 35-37°C pendant 18 à 24 heures. Après l'incubation, quelques gouttes de solution de chlorure ferrique (FeCl_3) à 10% sont ajoutées sur la surface du milieu, Si l'organisme produit l'enzyme

phénylalanine désaminase, la phénylalanine sera dégradée en acide phénylpyruvique, qui réagit avec le chlorure ferrique pour former un complexe vert (Annexe 3).

6) Le milieu M.E.V.A.G. prêt à l'emploi

Le milieu de culture M.E.V.A.G./Gélose prêt à l'emploi (SARL EquiProLab, Algérie) est un milieu de culture spécifique destiné à enrichir et à distinguer les bactéries en fonction de leur aptitude à fermenter ou à oxyder les glucides. Pour les tests de fermentation et d'oxydation, ce milieu est principalement employé afin de déterminer la voie métabolique utilisée par les bactéries pour décomposer les glucides (Annexe 4).

Protocole pour l'utilisation du milieu M.E.V.A.G./Gélose prêt à l'emploi

- **Préparation du milieu**

Faire fondre le contenu de 2 tubes de M.E.V.A.G dans un bain d'eau bouillante. Puis refroidir à 44-47°C. Enfin ajouter aseptiquement des gouttes de solution stérile de glucose pour obtenir une concentration finale de 1%.

- **Inoculation**

Inoculer chaque tube par piqûre centrale avec un fil de platine prélevé dans une culture bactérienne de 18 à 48 heures.

- **Couche de vaseline**

Faire fondre de la vaseline stérile, puis verser une couche de vaseline fondue (10-15 mm) sur l'un des tubesensemencés et refroidir immédiatement.

- **Incubation**

Incuber les tubes (un ouvert sans vaseline, un fermé avec vaseline) à 37°C, lire les résultats après 24 heures (ou plus pour certaines bactéries).

- **Lecture et interprétation**

- **Bactéries Fermentatives** : Acidification rapide dans les deux tubes (milieux jaunes).
- **Bactéries Oxydatives** : Acidification lente et superficielle dans le tube ouvert, aucune acidification dans le tube fermé.
- **Bactéries Inactives** : Peu ou pas de culture, aucune acidification.

2.4.3. Identification par la galerie API 20 E

Un système standardisé appelé API 20 E (Biomerieux, France) permet d'identifier les *Enterobacteriaceae* et d'autres bacilles à Gram négatif en utilisant 20 tests biochimiques miniaturisés et une base de données spécifique. Ce dispositif comprend 20 tests en forme de cupules qui renferment un milieu réactionnel déshydraté. Pendant la période d'incubation, les réactions se manifestent par des changements de couleur spontanés ou visibles par l'ajout de réactifs. Les résultats des tests sont interprétés à l'aide d'un logiciel ou d'un tableau fourni par le fabricant, permettant ainsi une identification précise de l'espèce (Annexe 5).

- **Préparation de la galerie**

Pour préparer une boîte d'incubation, le fond et le couvercle sont réunis, puis l'eau est répartie dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Ensuite la galerie est déposée stérilement dans la boîte d'incubation. Enfin, la référence de la souche est inscrite sur la languette latérale de la boîte.

- **Préparation de l'inoculum**

Pour obtenir une suspension bactérienne de 0,5 McFarland à partir d'une colonie prélevée sur un milieu gélose, un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile est préparé, une colonie isolée est prélevée avec une anse stérile et suspendue dans le tube. La suspension a été bien mélangée pour être homogénéisée. Ensuite la turbidité de cette suspension est comparée visuellement avec celle d'un étalon 0,5 McFarland, en tenant les tubes contre une carte de Wickerham. La densité a été ajustée en ajoutant soit plus de bactéries, soit plus d'eau distillée, jusqu'à ce que la turbidité corresponde à celle de l'étalon.

- **Incubation de la galerie**

Pour l'incubation de la galerie, la suspension bactérienne est homogénéisée. Les tubes et les cupules sont remplis pour les tests CIT, VP et GEL, tandis que pour les autres tests, uniquement les tubes sont remplis. Ensuite, deux gouttes d'huile de paraffine sont ajoutées pour recouvrir les tests ODC, ADH, LDC, H₂S et URE. Le couvercle est placé sur la galerie et incubé à une température de 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Lecture des résultats**

Après l'incubation, les réactions dans chaque compartiment sont observées et notées. Des réactifs peuvent être ajoutés (TDA, VP1, VP2, Nit 1, Nit 2, Kovacs (JAMES) et la poudre du Zn) à certains compartiments pour révéler des réactions finales.

Les résultats des réactions biochimiques sont comparés à une base de données ou à un tableau de référence pour identifier l'organisme testé. Un code numérique peut être généré en fonction des résultats observés, qui est ensuite comparé à une base de données pour obtenir l'identité probable de l'organisme

2.4.4. Outils et procédures moléculaire

1) Extraction de l'ADN bactérien

Pour extraire l'ADN bactérien des souches suivantes : OK7, OK 8, OK 38'a et OK43 les bactéries sont cultivées dans un milieu approprié jusqu'à obtenir une culture dense. Ensuite un volume suffisant de chaque culture est prélevé et centrifugé à 5000 rpm pendant 10 minutes (Sigma 2-16 PK, Allemagne) pour récupérer le culot bactérien. Le culot est résuspendu dans un tampon de lyse contenant des agents chaotropiques et des détergents (SDS) pour déstabiliser les membranes cellulaires et libérer le contenu cellulaire. Ensuite des enzymes lytiques, la protéinase K (Sigma-Aldrich, Japan) est ajoutée pour dégrader les parois cellulaires et les protéines. Le mélange est incubé pendant 30 minutes à 1 heure à une température généralement 37°C. Après l'incubation, une solution de phénol-chloroforme est ajoutée et centrifugée pour séparer les phases aqueuses et organiques. La phase aqueuse contenant l'ADN est récupérée et l'ADN est précipité en ajoutant de l'alcool isopropylique ou éthanol froid. Une autre centrifugation est effectuée de nouveau pour récupérer le peloton d'ADN et il est rincé avec de l'éthanol à 70%, et laissé sécher à l'air libre. Enfin le pellet d'ADN est dissous dans un tampon TE ou de l'eau distillée stérile, et stocké à -20°C jusqu'à utilisation (Wilson, 2001).

2) Electrophorèse sur gel d'agarose

Pour réaliser une électrophorèse sur gel d'agarose, une solution d'agarose est préparée en dissolvant l'agarose dans un tampon TBE (Bio-Rad), généralement à une concentration de 0,8% à 2%, en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer. La solution est chauffée dans un four à micro-ondes jusqu'à dissolution complète de l'agarose. La solution est laissée refroidir légèrement avant de la verser dans un moule à gel avec un peigne pour former des puits. Le gel est laissé solidifier à température ambiante pendant environ 30 minutes. Une fois le gel est solidifié, le peigne est retiré délicatement et le gel est placé dans une cuve

d'électrophorèse. La cuve est remplie avec le tampon d'électrophorèse (TBE) jusqu'à ce que le gel soit complètement immergé. Les échantillons d'ADN est mélangé avec un colorant de charge (loading dye) (Bio-Rad) et chargé dans les puits du gel à l'aide d'une micropipette à 5-20 μ l. un marqueur de poids moléculaire (ladder) (Bio-Rad) est également inclus pour permettre l'estimation de la taille des fragments d'ADN (Figure 10).

Les électrodes de la cuve d'électrophorèse sont branchées à une source de courant et la tension est réglée généralement entre 80 et 120 volts. Les fragments d'ADN ont migré à travers le gel pendant 30 minutes à 1 heure, en surveillant la migration du colorant de charge. Une fois l'électrophorèse est terminée, le gel a été trempé dans une solution de bromure d'éthidium pendant environ 15 minutes, puis il a été rincé brièvement dans de l'eau distillée. Le gel a été examiné sous une lumière UV pour visualiser les bandes d'ADN fluorescentes, et une image a été capturée à l'aide d'un système de documentation de gel (Green & Sambrook, 2012).

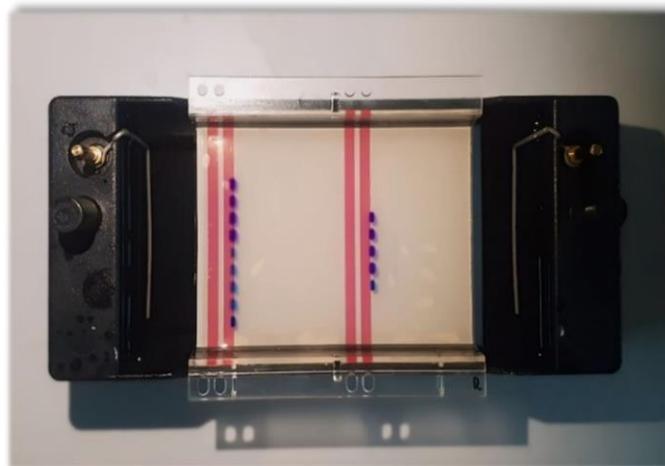


Figure 10 : ADN bactérien mélangé avec le colorant de charge chargé dans les puits.

3) PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase)

Pour réaliser une réaction de polymérase en chaîne (PCR) sur de l'ADN bactériens déjà extraits. Le mélange réactionnel de PCR a été préparé dans un tube PCR stérile, en ajoutant les composants suivants pour une réaction de 50 μ L : 2 μ L d'ADN matrice, 1 μ L d'amorce sens (forward primer), 1 μ L d'amorce antisens (reverse primer), 4 μ L de chaque dNTP, 10 X tampon de PCR avec 5 μ L de $MgCl_2$, 0.2 U/ μ l de la Taq polymérase (Bio-Rad, USA), le mélange a été complété avec de l'eau ultrapure stérile 31.80 μ L. Ensuite les tubes PCR sont placés dans un thermocycleur de la marque (Biometra TOne, Allemagne), les étapes suivantes sont

programmées : une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 minutes, suivie de 30 cycles comprenant une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, une hybridation à une température optimale spécifique aux amorces (généralement entre 55-60°C) pendant 30 secondes, et une élongation à 72°C pendant 1 minute par kb d'ADN. La réaction a été terminée avec une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes et les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à leur analyse. Les produits PCR sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose pour vérifier la taille et la quantité des fragments amplifiés. En assurant d'utiliser des pointes de pipette stériles pour chaque réactif afin d'éviter toute contamination croisée. La température d'hybridation est optimisée pour chaque paire d'amorces afin d'assurer la spécificité de l'amplification (Saiki *et al.*, 1985).

2.5. Conservation des souches

Les souches pures identifiées sont conservées de la manière suivante en fonction de la durée de conservation souhaitée :

➤ Conservation à court terme

Les souches pures identifiées sontensemencées sur une gélose King B inclinée et incubées à 37°C pour certaines souches et les autres sont incubées à une température de 28 °C pendant 24 heures pour obtenir une culture jeune. Après incubation ces cultures sont conservées à 4°C.

➤ Conservation à long terme

Après avoir cultivé les souches pendant 16 heures, les colonies sont transférées dans des tubes Eppendorf contenant du milieu King B avec 30% de glycérol comme agent cryoprotecteur. La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée par agitation au vortex, puis les échantillons sont stockés au congélateur à -20°C, assurant ainsi une viabilité prolongée des souches.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

3. Identification des souches :

Ce travail a pour but d'identifier des isolats bactériens inconnus de différentes sources. Après repiquage des souches non pures sur les milieux gélose King B et LB, l'aspect macroscopique et microscopique sont étudiés pour confirmer la pureté des isolats.

3.1. Étude des caractères cultureux et morphologiques :

3.1.1. L'aspect macroscopique :

Les différents isolats avaient différents aspects macroscopiques, ils montrent divers aspects de colonies. La plupart des colonies ont des formes circulaires avec un contour régulier et de couleurs de beiges à blanchâtres, soient de taille variable et avec une surface lisse, parmi lesquelles on trouve des colonies à contour irrégulier avec des différentes couleurs. Il y a aussi des colonies avec une couleur rougeâtres (Figure 11) (Tableau).

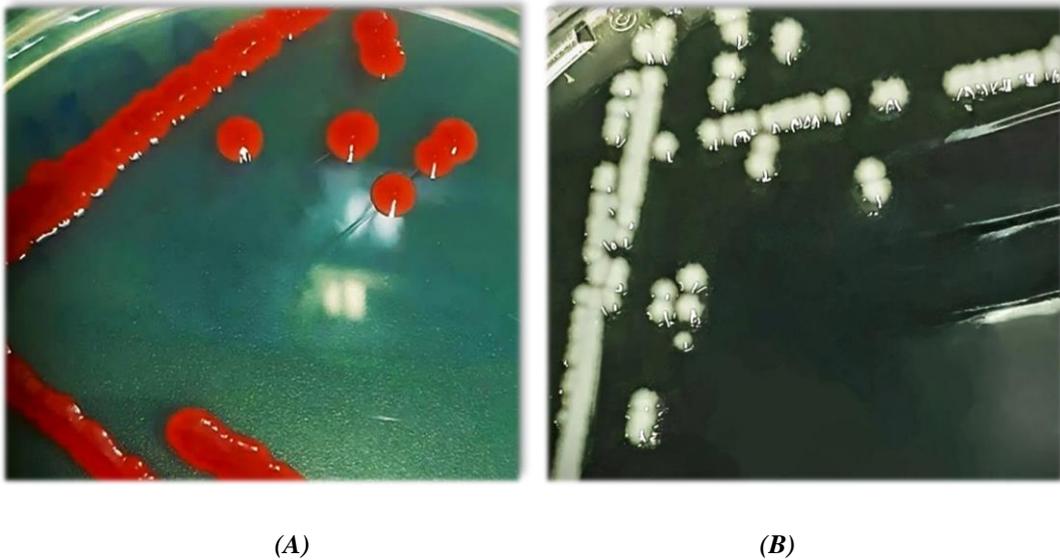


Figure 11 : Aspect macroscopique des Colonies bactériennes pures.

(A) : Colonies de l'isolat OK43 de couleur rouge ; (B) : Colonies de l'isolat OK6 de couleur blanche

Tableau 3 : Description macroscopique des souches étudiées.

Souche	Taille	Forme	Contour	Relief	Surface	Couleur
OK1	Moyenne	Circulaire	Régulier	Convexe	Lisse	Blanche
OK6	Petite	Circulaire	Régulier	Convexe	Lisse	Blanche
OK7	Grande	Irrégulière	Irrégulier	Ondulé	Rugueuse	Beige opaque
OK8	Grande	Circulaire	Régulier	Bombé	Lisse	Blanche
OK9a	Petite	Circulaire	Régulier	Bombé	Lisse	Jaune clair
OK9b	Ponctiforme	Circulaire	Régulier	Bombé	Lisse	Beige
OK11	Petite	Circulaire	Régulier	Bombé	Lisse	Beige
OK24	Grande	Circulaire	Régulier	Convexe	Lisse	Beige
OK25a	Moyenne	Circulaire	Régulier	Bombé	Lisse	Beige
OK25b	Ponctiforme	Irrégulière	Irrégulier	Convexe	Lisse	Jaune claire
OK27	Moyenne	Irrégulière	Irrégulier	Convexe	Lisse	Beige claire
OK27'	Ponctiforme	Circulaire	Régulier	Convexe	Lisse	Blanche
OK30	Petite	Circulaire	Régulier	Convexe	Lisse	Beige
OK33	Petite	Circulaire	Régulier	Bombé	Lisse	Blanche
OK38a	Petite	Circulaire	Régulier	Concentrique	Lisse	Jaune
OK38c	Moyenne	Circulaire	Régulier	Convexe	Lisse	Beige
OK38a	Moyenne	Circulaire	Régulier	Lobé	Lisse	Beige
OK38b	Ponctiforme	Circulaire	Régulier	Convexe	Lisse	Beige
OK43	Grande	Irrégulière	Irrégulier	Bombé	Lisse	Rouge
BBC5Ba	Ponctiforme	Circulaire	Régulier	Convexe	Lisse	Beige
BC52Bb	Moyenne	Circulaire	Régulier	Concentrique	Lisse	Beige claire
BC2Ba	Ponctiforme	Circulaire	Régulier	Bombé	Lisse	Jaune claire
BC2Bc	Ponctiforme	Circulaire	Régulier	Convexe	Lisse	Beige
BC2Ca	Grande	Circulaire	Régulier	Concentrique	Liss	Jaune
BC2Cc	Grande	Irrégulière	Irrégulier	Elevé	Rugueuse	Beige

3.1.2. L'aspect microscopique :

L'étude microscopique repose sur les critères de la coloration de Gram : le Gram positif ou négatif, la forme (bacille, coccobacille, Cocci ...) et le test à la potasse pour confirmer les résultats de la coloration de Gram (Tableau 4). Après la coloration de Gram les 25 souches ont été pure à 100% et les résultats du test KOH (à concentration de 3%) sont les même que les résultats de la coloration de Gram. Les souches à Gram positif on ne détecte pas la formation du filament mais, les souches à Gram négatifs on le détecte (Figure 12).

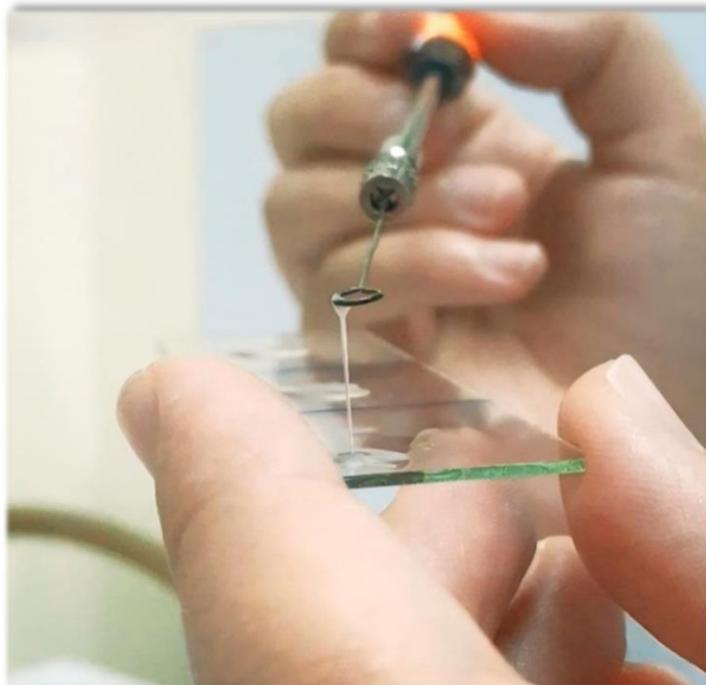


Figure 12 : Test KOH formation d'un filament qui indique une souche à Gram négatif.

Après coloration de Gram de ces souches pures, l'observation microscopique à l'objectif à immersion montre des Bacilles, Coccobacilles, et des Cocci à Gram positif ainsi que à Gram négatif, de plus des tétracoques à Gram positif. Dont 6 souches sont des Bacilles à Gram positif, 8 souches sont des Cocci à Gram positif et 3 souches sont des Coccobacilles à Gram positif de plus nous avons 2 tétracoques à Gram positif. En ce qui concerne le groupe des souches à Gram négatif, 2 souches qui sont des Bacilles, 3 souches sont des Coccobacilles et 1 souche qui est Cocci à Gram négatif.

Tableau 4 : Description microscopique des souches étudiées.

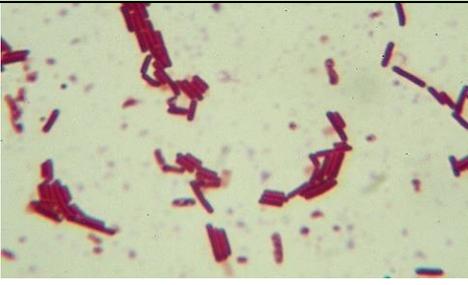
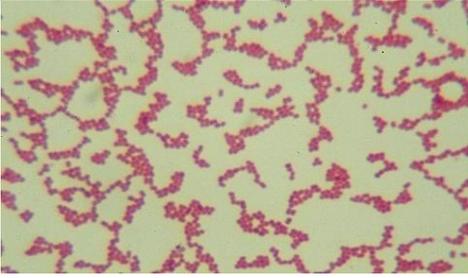
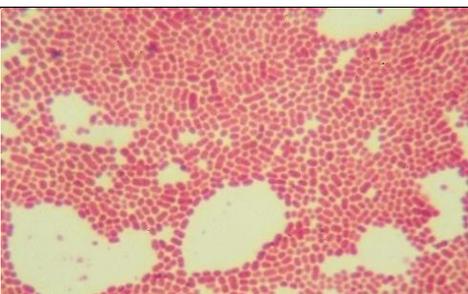
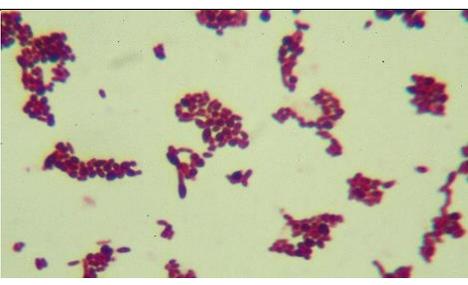
Souche	KOH	Gram	Morphologie cellulaire	Observation microscopique
OK1	-	+	Bacille	
OK6	+	-	Cocci	
OK7	+	-	Bacille	
OK8	+	-	Coccobacille	
OK9a	-	+	Bacille	

Tableau 4 : Description microscopique des souches étudiées (Suite).

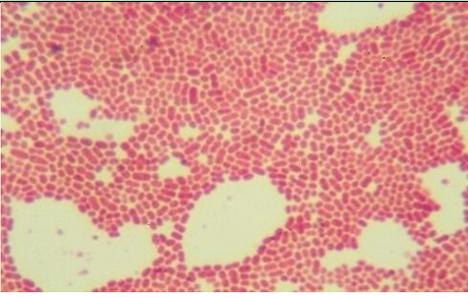
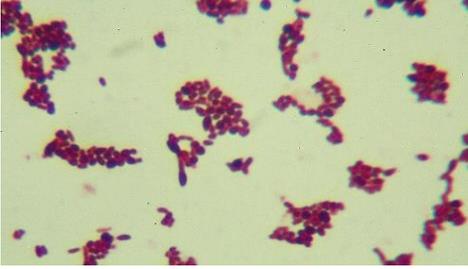
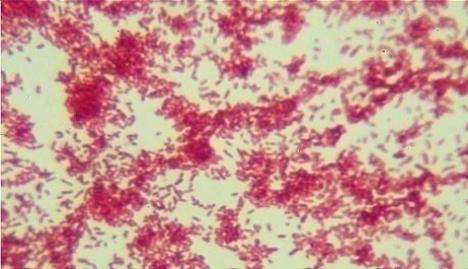
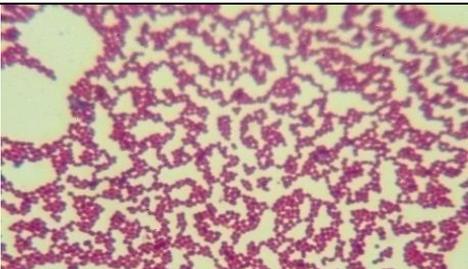
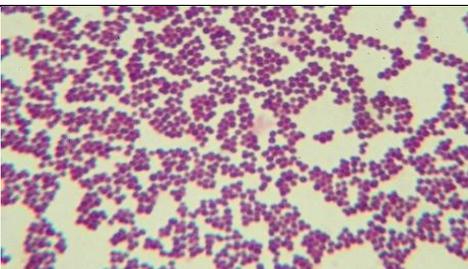
Souche	KOH	Gram	Morphologie cellulaire	Observation microscopique
OK8	+	-	Coccobacille	
OK9a	-	+	Bacille	
OK9b	+	-	Coccobacille	
OK11	-	+	Cocci	
OK24	-	+	Cocci	

Tableau 4 : Description microscopique des souches étudiées (Suite).

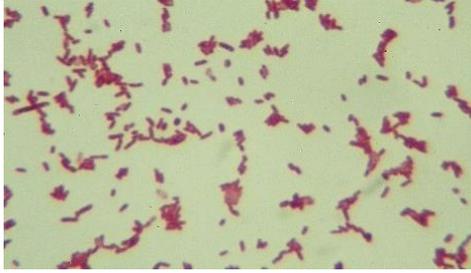
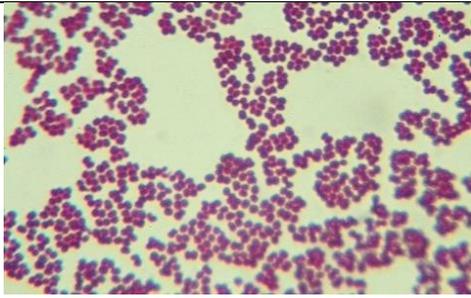
Souche	KOH	Gram	Morphologie cellulaire	Observation microscopique
OK25a	-	+	Coccobacille	
OK25b	-	+	Cocci	
OK27	-	+	Bacille	
OK27'	-	+	Coccobacille	
OK30	-	+	Bacille	

Tableau 4 : Description microscopique des souches étudiées (Suite).

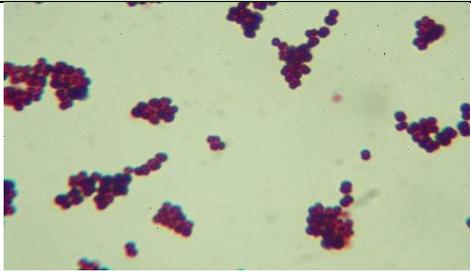
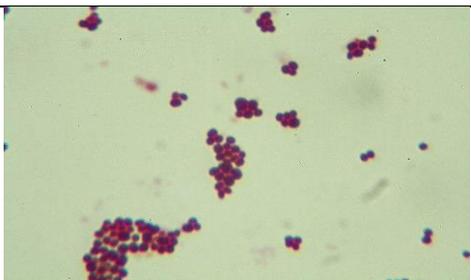
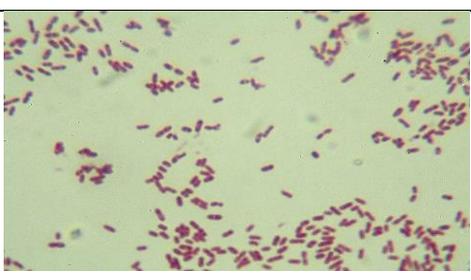
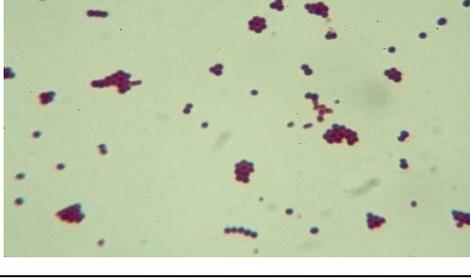
Souche	KOH	Gram	Morphologie cellulaire	Observation microscopique
OK33	-	+	Cocci	
OK38a	-	+	Bacille	
OK38c	-	+	Cocci	
OK38'a	+	-	Bacille	
OK38'b	-	+	Cocci	

Tableau 4 : Description microscopique des souches étudiées (Suite).

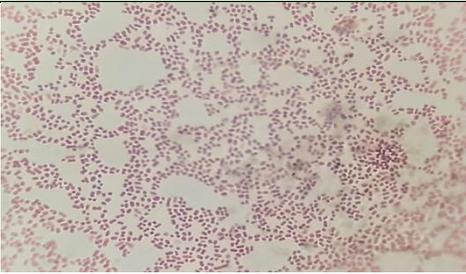
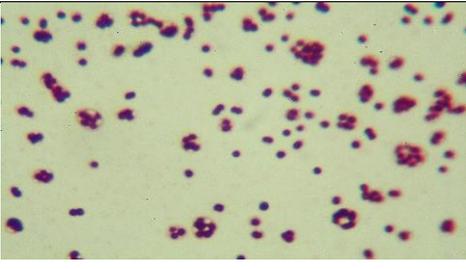
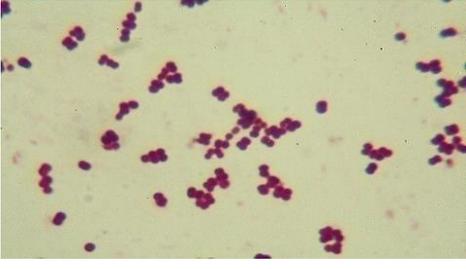
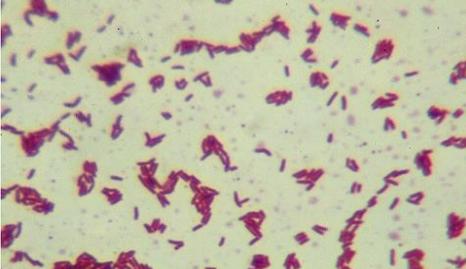
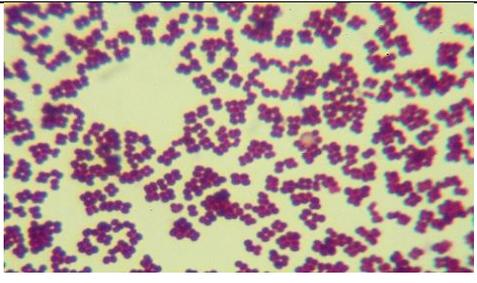
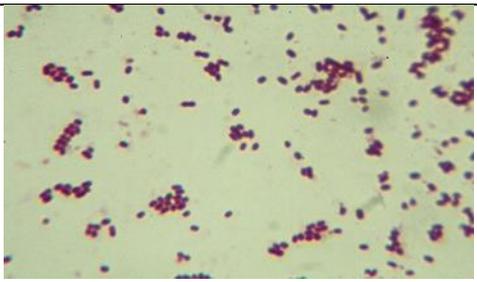
Souche	KOH	Gram	Morphologie cellulaire	Observation microscopique
OK43	+	-	Coccobacille	
BC52Ba	-	+	Cocci	
BC52Bb	-	+	Tétracoque	
BC2Ba	-	+	Bacille	
BC2Bc	-	+	Cocci	

Tableau 4 : Description microscopique des souches étudiées (Suite).

BC2Ca	-	+	Tétracoque	
BC2Cc	-	+	Coccobacille	

La figure ci-dessous présente la répartition des souches étudiées en deux groupes : les souches à Gram positif et les souches à Gram négatif selon le pourcentage de chaque forme cellulaire. Les souches à Gram positif constituent 76 % des souches étudiées, tandis que les souches à Gram négatif ne représentent que 24 %.

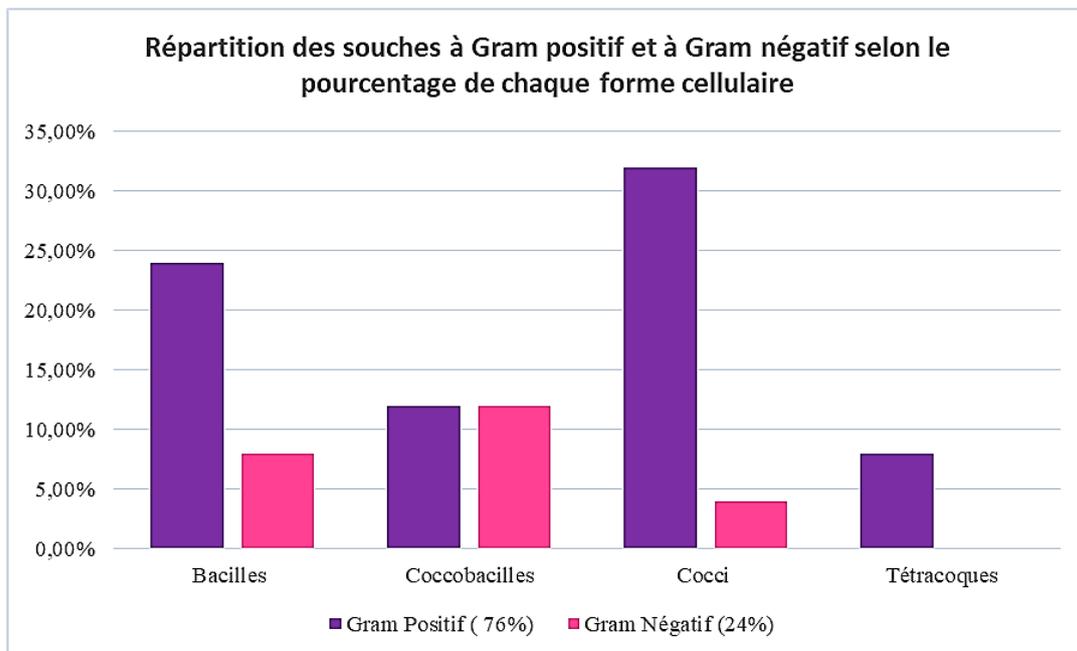


Figure 13 : Répartition des souches à Gram positif et à Gram négatif selon le pourcentage de chaque forme cellulaire.

3.2. Étude des caractères biochimiques

3.2.1. Tests de catalase, oxydase et Mannitol Mobilité

La majorité des bactéries testées pour la production d'une catalase ont décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz, sauf quatre souches sont catalase négatives (OK30, OK 8a, OK38'a, BC2Cc). Parmi les souches isolées 11 ont été oxydase positive et 14 souches ont été oxydase négative (Tableau 5) (Figure 14).

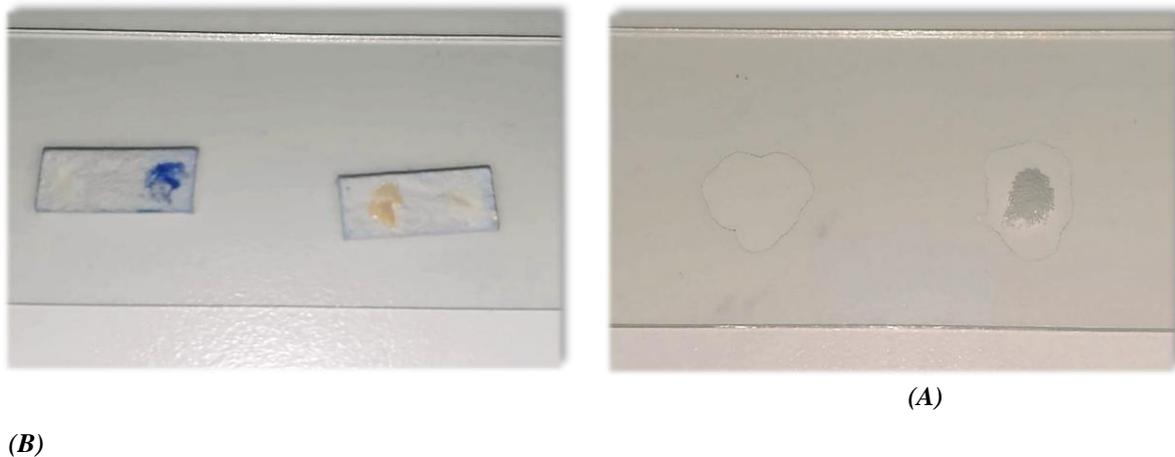


Figure 14 : Résultats négatifs et positifs des tests catalase et oxydase.

(A) : Test oxydase une absence et un développement de coloration violette ; (B) : Test catalase, une absence et un dégagement des bulles de gaz.

Après l'ensemencement du test Mannitol Mobilité montre que 16 souches ne fermentent pas le Mannitol, alors que 9 souches ont un virage de couleur du milieu qui a été observé et qui indique la fermentation du sucre. En outre, la formation de voile au niveau de la pique centrale montre que 20 souches sont mobiles alors que 5 souches sont immobiles par absence de voile (Figure 15).

3.2.2. Les milieux sélectifs

1) Le milieu BCP

L'utilisation du milieu BCP permet de déterminer les souches qui fermentent le lactose de celles qui ne le fermentent pas, cela se manifeste par un changement de couleur de bleu violacé à jaune, et aussi il est employé pour l'isolement des entérobactéries mais il permet le développement d'autres souches qui n'appartiennent pas à cette famille.



Figure 15 : Test mannitol mobilité, tube positif et tube négatif.

Il est constaté que 7 souches (OK11, OK9a, OK24, BC52Bb, OK38'b, OK8, OK9b) qui possèdent la capacité de fermenter le lactose, notamment 18 souches qui ne le fermentent pas (BC52Ba, OK1, OK43, OK38a, OK38'a, OK6, OK38c, OK7, OK25b, BC2Bc, OK33, OK27, OK30, OK25a, BC2Ca, OK27', BC2Ba, BC2Cc) (Figure 16).

2) Le milieu Mac Conkey

Ce milieu différentiel et sélectif est utilisé pour l'isolement et l'identification des souches à Gram négatif et qu'ils sont soupçonnés être des entérobactéries (OK, OK7, OK9b, OK38'a, OK43), et pour la différenciation entre les souches qui fermentent le lactose et qui ne le fermentent pas. Une croissance de trois souches (OK8, OK9b, OK43) ce qui indique qu'elles sont des entérobactéries et l'absence de croissance des souches (OK7 et OK38'a) qui indique que bien qu'elles soient des bactéries à Gram négatif mais elles ne peuvent pas croître sur la gélose Mac Conkey nécessitant des conditions nutritionnelles spécifiques. Un virage de couleur est constaté dans les boîtes de deux souches (OK8 et OK9b) ce qui indique la fermentation du lactose (Figure 17).

3) Test phénylalanine désaminase

L'utilisation du milieu phénylalanine (Figure 18) pour tester la capacité des bactéries, à dégrader l'acide aminé phénylalanine en acide phénylpyruvique par l'enzyme phénylalanine désaminase pour les souches OK8, OK9b et OK43. Après l'ajout du chlorure ferrique (FeCl_3) à 10% des résultats négatifs sont obtenues et qui se manifestent par l'absence du virage de couleur vert

Tableau 5 : Les caractères biochimiques des souches étudiées.

Souche	Oxydase	Catalase	Test mannitol	
			Mannitol	Mobilité
OK1	-	+	+	+
OK6	-	+	-	+
OK7	+	+	+	+
OK8	-	+	-	+
OK9a	-	+	+	+
OK9b	-	+	-	+
OK11	+	+	-	+
OK24	-	+	+	+
OK25a	-	+	+	+
OK25b	-	+	-	+
OK27	+	+	-	-
OK27'	+	+	-	+
OK30	+	-	-	-
OK33	-	+	-	+
OK38a	+	-	-	-
OK38c	+	+	+	+
OK38'a	+	-	-	+
OK38'b	-	+	-	+
OK43	-	+	+	+
BC52Ba	+	+	-	-
BC52Bb	+	+	-	+
BC2Ba	-	+	-	+
BC2Bc	-	+	-	+
BC2Ca	+	+	+	-
BC2Cc	-	-	+	+

- Souche fermente le mannitol : (+) ; présence de virage de couleur.
- Souche ne fermente pas le mannitol : (-) ; absence de virage de couleur.
- Souche mobile : (+)
- Souche immobile : (-)

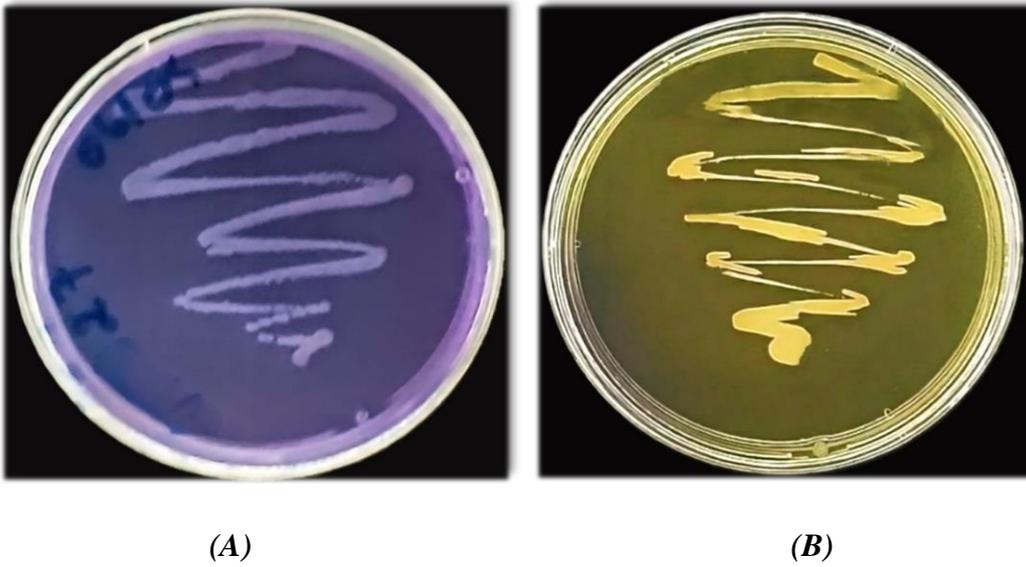


Figure 16 : La croissance des bactéries sur milieu BCP, absence et présence du virage de couleur.

(A) : Bactérie non fermentative du lactose ; (B) : Bactérie fermentative du lactose.



Figure 17 : Croissance bactérienne et virage de couleur sur le milieu gélose Mac Conkey.

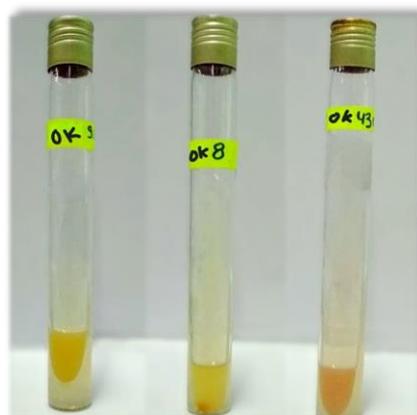


Figure 18 : Test phénylalanine désaminase, absence du virage de couleur.

4) Le milieu M.E.V.A.G.

Le milieu de culture M.E.V.A.G./Gélose prêt à l'emploi est utilisé pour enrichir et différencier les bactéries selon leur capacité à fermenter ou oxyder les glucides, afin de déterminer leur voie métabolique des 3 souches suspectées des entérobactéries (OK8, OK9b, OK43). Après 24 heures d'incubation des résultats positifs sont remarqués dans les trois tubes contenant l'huile de vaseline des souches (OK8, OK9b et OK43) et des résultats négatifs dans les tubes sans l'huile de vaseline cela indique que les trois souches sont fermentatives des glucides.



Figure 19 : Comparaison des résultats de test M.E.V.A.G entre tubes positifs et tubes négatifs.

3.3. Identification par la galerie API 20E

Les résultats des tests biochimiques sur les galeries API 20E sont regroupés dans le tableau (tableau 6).

La souche OK8 appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, cette bactérie est catalase positive et oxydase négative, ODC négatif, mobilité positive et VP, ADH et TDA, Uréase, H₂S négatives, lactose positive, capables de fermenter le glucose. Après l'analyse des résultats de la galerie API 20 E par le logiciel « UPBM le Lab » la souche OK8 est identifiée *Yersinia pseudotuberculosis* (Figure 20).

La souche OK9b appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, cette bactérie est catalase positif et oxydase négative, lactose positive, mobilité positive, H₂S négatif, ODC négatif, capables de fermenter le glucose. Après l'analyse des résultats de la galerie API 20 E, la souche OK9b est identifiée *Yersinia enterocolitica* (Figure 21).

La souche OK43 appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, cette bactérie est catalase positive et oxydase négative, VP positif et ADH, TDA, URE sont négatifs, H₂S négatif, lactose négatif, mannitol positif, mobilité positive, capables de fermenter le glucose. Après l'analyse des résultats la souche OK43 est identifiée *Serratia marcescens* (Figure 22).

3.4. Identification des souches selon les Clés dichotomiques

Les souches OK11, OK38c, BC52Ba, BC52Bb, BC2Ca sont des Cocci à Gram positif, oxydase, catalase positive et elles sont suspectées d'être *Micrococcus sp.*

Les souches OK25b, OK33, OK24, OK38'b, BC2Bc sont des Cocci à Gram positif, oxydase négatif et catalase positif et elles sont suspectées d'être *Staphylococcus sp.* (Figure 23).

La souche OK6 qui est apparait sous microscope sous forme de Cocci à Gram négatif et qui a une oxydase négative est suspectée d'être *Acinetobacter* (Figure 24).

Les souches OK1, OK9a, OK25a, OK27, OK27', BC2Ba sont des bacilles à Gram positif avec une catalase positive et elles sont suspectée d'être *Bacillus*. Les souches OK30, OK38a, BC2Cc sont Bacilles à Gram positive avec une catalase négative elles sont suspectée d'être *Lactobacillus* (Figure 25).

Les souches OK7, OK38'a sont des Bacilles à Gram négatif avec une oxydase positive et elles sont suspectée d'être de la famille des *Pseudomonadaseae* et non pas *Vibrionaceae* selon la forme sous microscope et les tests biochimiques effectués. Bien que la souche OK7 présente des caractères des bactéries du genre *pseudomonas* mais elle n'a pas pu croitre sure la gélose Mac Conkey cela a mené à soupçonner qu'elle s'agit d'une bactérie d'une même espèce qui a une mauvaise croissance sur le même milieu comme *Pseudomonas stutzeri* (Lalucat et al., 2006).

Les souches OK8, OK9b, OK43 sont Bacille à Gram négatif avec une oxydase négative et elles sont suspectées d'être de la famille des *Enterobacteriaceae* (Figure 26).

Puisque les souches OK8, OK9b, OK43 sont des Bacilles à Gram négatif avec une oxydase négative et elles sont suspectées d'être de la famille des *Enterobacteriaceae*, les souches OK8 et OK9b qui fermentent le lactose, mobiles, dépourvu de l'enzyme phénylalanine désaminase, de H₂S négatif et ODC positif pour OK9b et négatif pour OK8, elles sont suspectées d'être *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* respectivement en ordre. Notamment la souche OK43 qui ne fermente pas le lactose et est suspectée d'être *Serratia* (Figure 27).

Tableau 6 : Les résultats des tests biochimiques des bacilles à Gram négatif.

Test	Souche	OK8	OK9b	OK43
ONPG β -galactosidase (Ortho NitroPhenyl- β D-Galactopyranosidase)		-	-	-
ADH Arginine Di Hydrolase		-	-	-
LDC Lysine Décarboxylase		-	+	+
ODC Ornithine Décarboxylase		-	+	+
CIT, utilisation du citrate		-	+	+
H ₂ S production		-	-	-
ADH Arginine Di Hydrolase		-	-	-
UREase		-	-	-
TDA Tryptophane Désaminase		-	-	-
Production du l'Indole		-	-	-
VP, production d'acétoin (Voges Proskauer)		-	-	+
Gélatinasse		+	+	+
Fermentation / oxydation (GLUcose)		+	+	+
Fermentation/ oxydation (MANnitol)		-	-	+
Fermentation / oxydation (INOsitol)		-	-	+
Fermentation / oxydation (SORbitol)		-	+	+
Fermentation / oxydation (RHAmnose)		-	+	-
Fermentation / oxydation (SACcharose)		-	+	+
Fermentation / oxydation (MELibiose)		+	+	+
Fermentation / oxydation (AMYgdalin)		-	+	+
Fermentation / oxydation (ARABinose)		+	+	+
Cytochrome –Oxydase		-	-	-
NO ₂ production		-	-	+
Réduction à N ₂ gaz		+	+	+
Mobilité		+	+	+
Croissance (MacConkey)		+	+	-
Fermentation: Avec l'huile		+	+	+
Oxydation: Sans l'huile		-	-	-

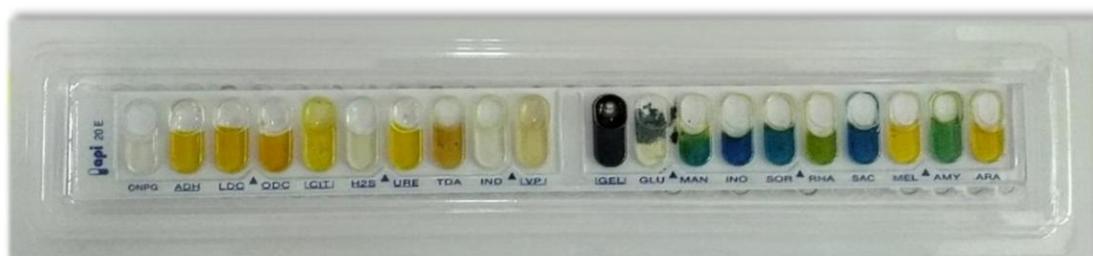


Figure 20 : Profil sur API 20 E de la souche OK8.



Figure 21 : Profil sur API 20 E de la souche OK9b.



Figure 22 : Profil sur API 20 E de la souche OK43.

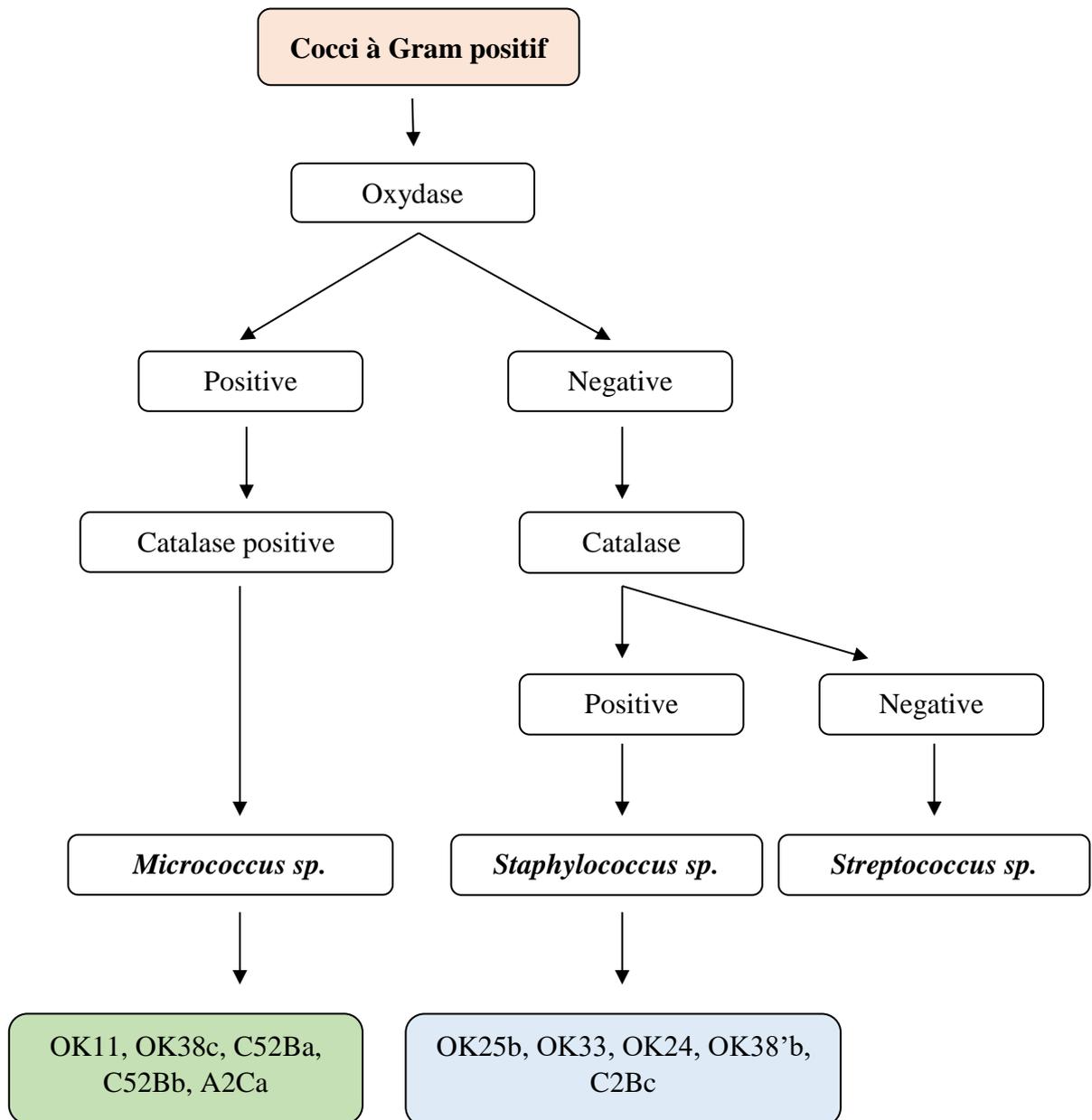


Figure 23 : Clés dichotomiques de différenciation des Cocci à Gram positif

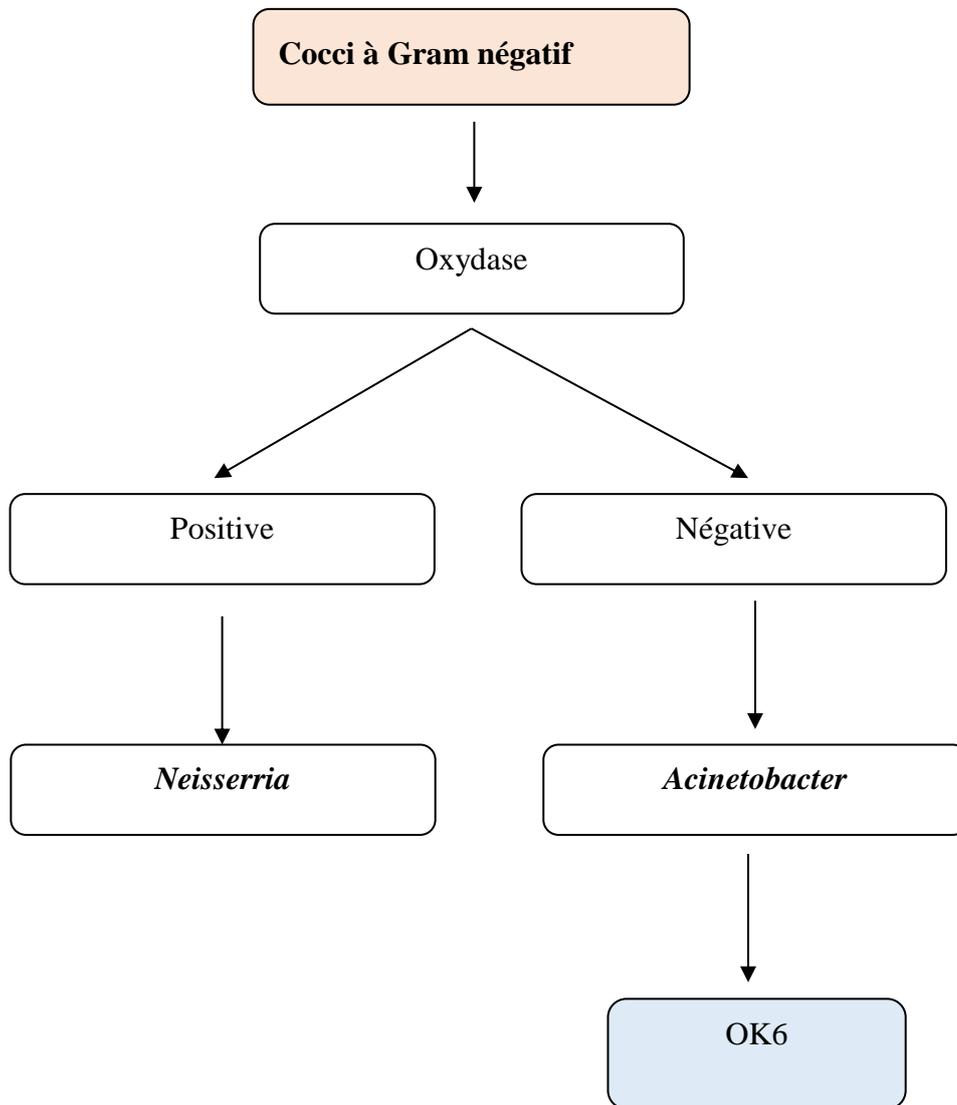


Figure 24 : Clés dichotomiques de différenciation des Cocci à Gram négatif

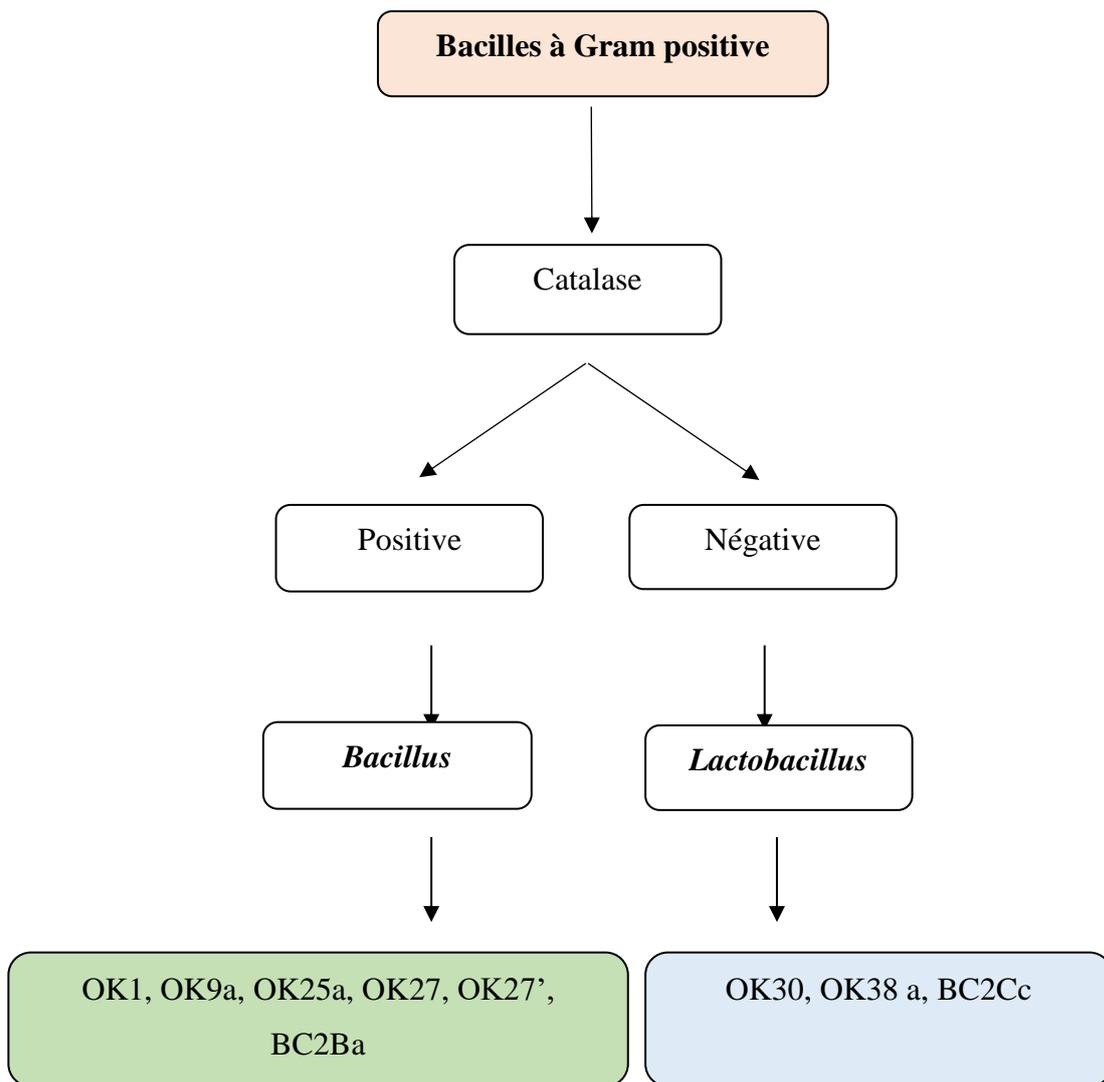


Figure 25 : Clés dichotomiques de différenciation des Bacille à Gram positif.

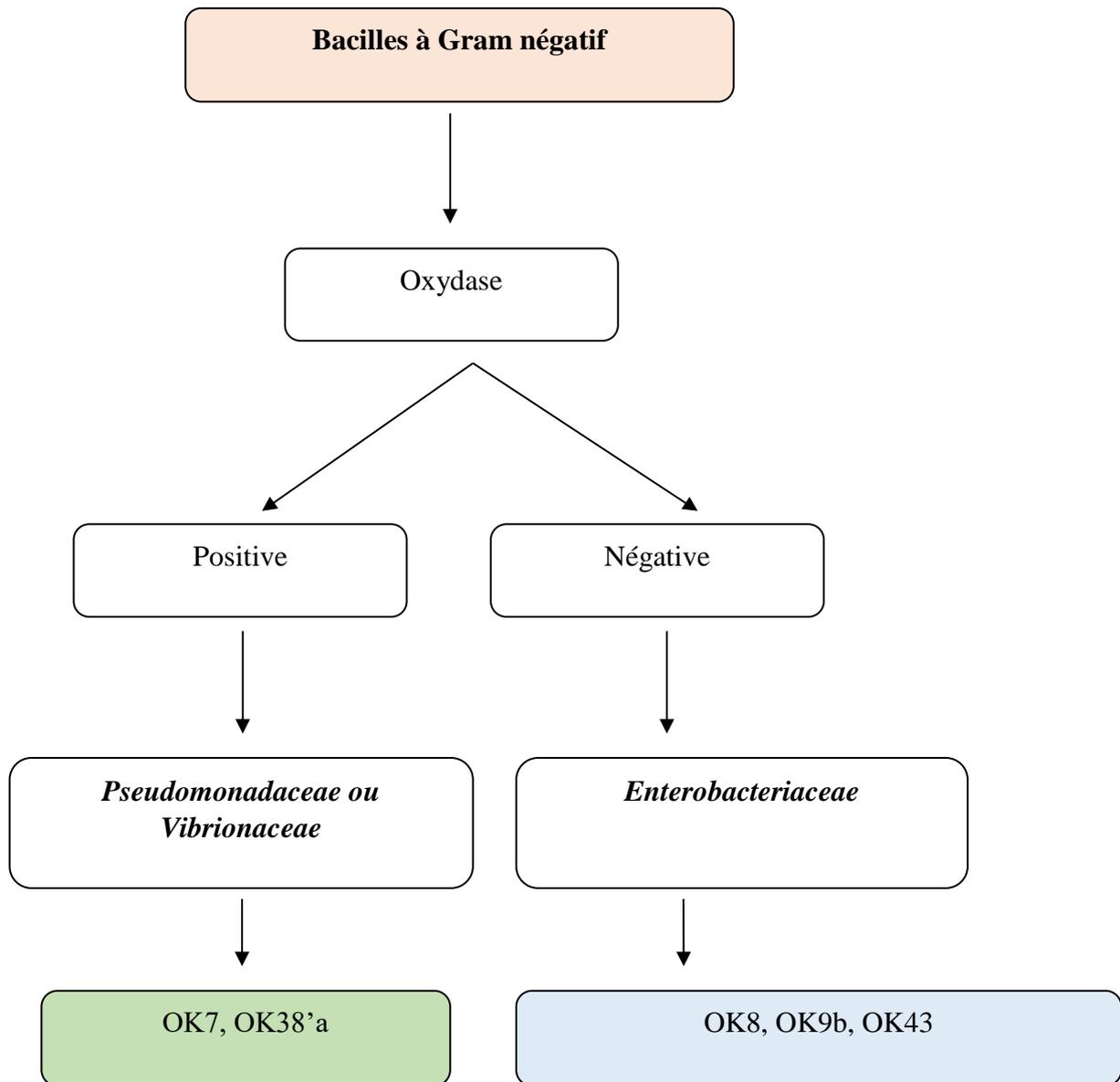


Figure 26 : Clés dichotomiques de différenciation des Bacille à Gram négatif.

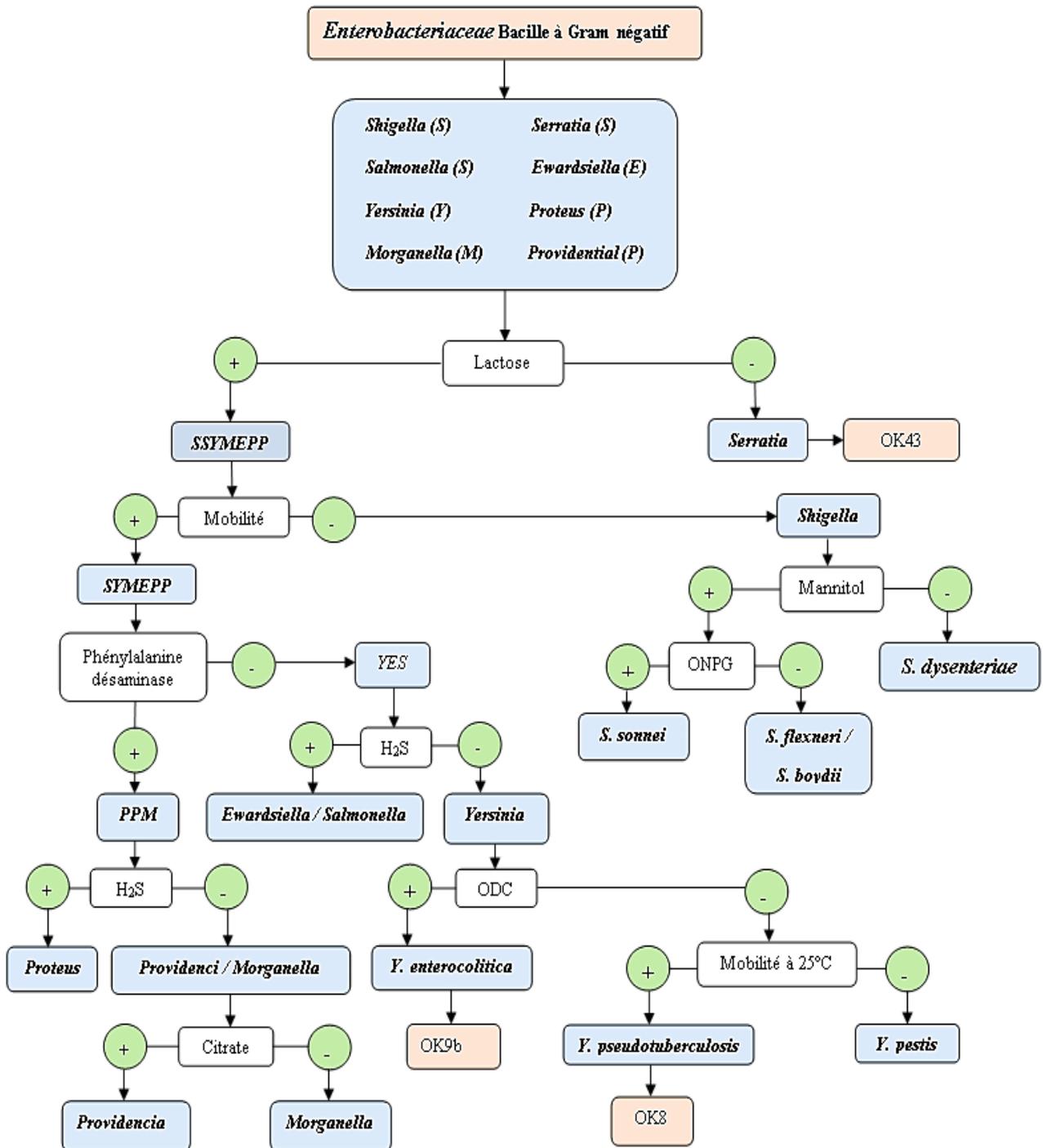


Figure 27 : Clés dichotomiques pour le classement des Entérobactérie.

Tableau 7 : Identification présomptive des souches étudiées.

Gram et forme cellulaire	Souche	Famille/Genre/espèces suspectée
Bacille à Gram négatif	- OK7, OK38'a - OK8, OK9b, OK43 - OK8 - OK9b - OK43	- <i>Pseudomonadaceae</i> - <i>Enterobacteriaceae</i> - <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> - <i>Yersinia enterocolitica</i> - <i>Serratia</i>
Bacille à Gram positif	- OK1, OK9a, OK25a, OK27, OK27', BC2Ba - OK30, OK38a, BC2Cc	- <i>Bacillus</i> - <i>Lactobacillus</i>
Cocci à Gram positif	- OK11, OK38c, BC52Ba, BC52Bb, BC2Ca - OK25b, OK33, OK24, OK 38'b, BC2Bc	- <i>Micrococcus sp.</i> - <i>Staphylococcus sp.</i>
Cocci à Gram négatif	- OK6	- <i>Acinetobacter</i>

Les bactéries pathogènes pour les plantes, proviennent de diverses sources environnementales et peuvent causer des maladies spécifiques avec des symptômes variés, se trouvent couramment dans les sols, les eaux et les végétaux, ainsi que dans les intestins des animaux. Elles peuvent être transférées aux plantes via des matières fécales utilisées comme engrais ou par la contamination de l'eau d'irrigation. Bien que principalement pathogènes pour les humains et les animaux, ces bactéries peuvent parfois être impliquées dans des maladies végétales, provoquant des signes de pourriture des racines et des tiges etc.

Les *Pseudomonadaceae*, *Pseudomonas stutzeri* ou d'autres bactéries qui peuvent être présentes dans l'environnement, notamment *Pseudomonas syringae*, qui sont responsables de maladies foliaires et de chancres. *Pseudomonas syringae* produit des toxines et des enzymes qui dégradent les tissus végétaux, entraînant des taches brunes et des chancres sur les feuilles, les tiges et les fruits, ainsi qu'une chute prématurée des feuilles (Hirano & Upper, 2000).

Les *Enterobacteriaceae*, comme *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica*, contaminent le sol et l'eau. Ces bactéries provoquent des infections systémiques chez les plantes, se manifestant par le flétrissement, la décoloration des feuilles et la pourriture des racines, et causent également des maladies gastro-intestinales chez les humains, telles que des diarrhées, des douleurs abdominales et des fièvres (Bottone, 1999). *Serratia* notamment *Serratia marcescens*, présente dans l'eau et le sol, entraîne des nécroses racinaires, se traduisant

par la décomposition et la décoloration des racines, et des infections opportunistes, telles que des abcès et des infections urinaires chez les humains (Grimont & Grimont, 2006). Certaines espèces de *Bacillus*, bien que souvent bénéfiques, peuvent être phytopathogènes.

Bacillus, telles que *Bacillus cereus* cause des pourritures racinaires, visibles par la nécrose des racines et la dégradation des tissus racinaires, affectant la croissance des plantes (Stabb *et al.*, 1994). *Lactobacillus*, principalement bénéfique, peut parfois provoquer des fermentations indésirables en conditions humides, ce qui peut entraîner la décomposition des matières végétales et des odeurs désagréables.

Micrococcus spp. et *Staphylococcus spp.* présentes dans l'environnement, peuvent causer des infections opportunistes chez les humains, telles que des infections cutanées et des septicémies, bien que leur impact direct sur les plantes soit généralement limité (Kocur *et al.*, 2006).

Acinetobacter, fréquemment trouvée dans l'eau et le sol, est connue pour sa résistance aux antibiotiques et sa capacité à survivre dans des environnements hostiles. Cette bactérie peut causer des infections nosocomiales chez les humains, telles que des pneumonies et des infections de plaies, et affecte également les plantes en provoquant des flétrissements et des nécroses (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996).

Les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose des échantillons d'ADN extrait des isolats bactériens OK7 (puits 4), OK8 (puits 3), OK38'a (puits 2) et OK43 (puits 1) sont analysés afin de vérifier la qualité, l'intégrité de l'ADN génomique et l'efficacité de l'extraction. Les bandes observées sur le gel et leur image et traité par le logiciel « Image J » étaient bien définies comparant par celles de marqueur de taille, indiquant que l'ADN n'avait pas été dégradé durant l'extraction, avec une concentration déterminée d'après les résultats du « Image J » de 23,226 ng/μl pour l'isolat OK43, 16.603 ng/μl pour l'isolat OK38'a et 22,572 ng/μl pour l'isolat OK43. Cependant, certains échantillons présentaient des bandes supplémentaires plus petites qui n'apparaissent pas sur le gel à l'œil nu suggérant la présence de plasmides ou une possible dégradation partielle de l'ADN. L'intensité des bandes était généralement forte, indiquant une bonne concentration d'ADN, bien que quelques échantillons aient montré des bandes plus faibles ou qui n'apparaissent pas comme de l'isolat OK7, suggérant une faible concentration ou des pertes d'ADN pendant la purification (Figure 28).

Après avoir analysé les résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR des isolats bactériens OK7 (puits 4), OK8 (puits 3), OK 38'a (puits 2), OK43 (puits 1).

Les bandes observées pour OK8 (puits 3), OK38'a (puits 2), OK43 (puits 1) étaient bien définies et correspondaient à la taille attendue de 1500pb similaire de l'ADNr16S, indiquant que l'amplification PCR avait fonctionné correctement pour la plupart des échantillons. Par ailleurs, l'échantillon OK7 (puits 4) montrait une absence de bande, indiquant une faible amplification, possiblement due à une mauvaise qualité de l'ADN initial ou à des concentrations suboptimales de réactifs. Les résultats sont traités par le logiciel « image j » (Figure 29).

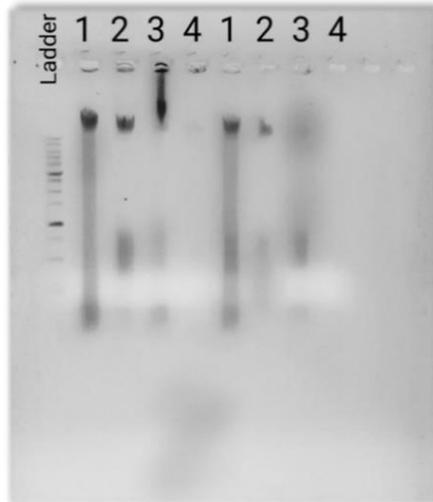


Figure 28 : Résultats de l'extraction d'ADN génomique après l'électrophorèse sur gel d'agarose traité par le logiciel image-j.

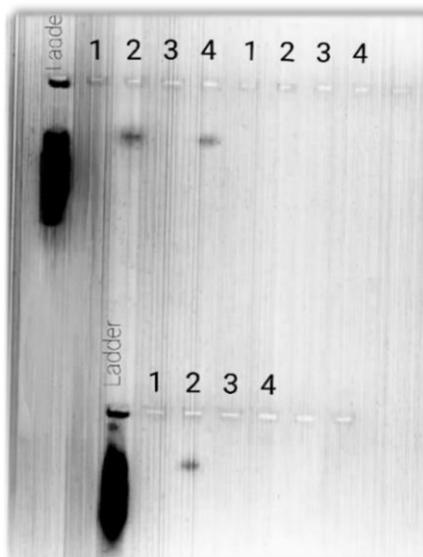


Figure 29 : Résultats après la PCR et la vérification par électrophorèse sur gel d'agarose traité par le logiciel Image-J.

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspective

L'intégration des méthodes conventionnelles et innovantes constitue l'approche optimale pour l'identification des microorganismes de même que bactéries phytopathogènes. Tandis que les méthodes innovantes permettent une identification rapide et préliminaire, les méthodes conventionnelles fournissent la validation nécessaire, assurant ainsi la fiabilité des résultats. Cette approche combinée permet non seulement d'améliorer la précision de l'identification mais aussi de faciliter une gestion plus efficace des maladies des plantes ou d'autres types de maladie et peut être bénéfique dans d'autres domaines.

Ce mémoire a montré le développement du conventionnel au l'innovant des techniques d'identification, en se concentrant sur l'analyse de 25 isolats bactériens phytopathogènes. Les résultats de cette étude montrent clairement que ces isolats incluent presque toutes les formes cellulaires entre les bacilles, les Cocci, les Coccobacilles ou même les tétracoques des deux groupes de Gram négatif et positif.

La détermination des caractères biochimiques par des milieux sélectifs et l'utilisation des galeries API 20 E et aussi l'utilisation des clés dichotomique pour l'identification de ces 25 isolats bactériens nous ont permis de les identifier respectivement la manière suivante : le groupe des Bacilles à Gram négatif comprend des bactéries suspectées d'être des familles *Pseudomonadaceae* et *Enterobacteriaceae* qui sont du genres *Yersinia* et *Serratia*. Quant au groupe des Bacilles à Gram positifs elles sont suspectées d'être *Bacillus* et *Lactobacillus*. En ce qui concerne le groupe des Cocci à Gram positif leurs caractères ont conduit aux espèces *Micrococcus sp.* et *Staphylococcus sp.*, alors que l'isolat ce qui apparait sous forme de Cocci à Gram négatif est suspecté d'être du genre *Acinetobacter*. L'extraction de l'ADN de trois bactéries a été couronnée de succès et l'amplification par PCR a confirmé la présence des fragments spécifiques pour chacune d'elles, tandis que pour la quatrième bactérie le résultat était négatif.

Les résultats de cette étude offrent des perspectives d'amélioration continue des techniques d'identification bactérienne et pour l'avenir, il serait possible d'entreprendre des études supplémentaires visant à approfondir l'intégration d'autres méthodes plus avancées pour analyser les données provenant de ces techniques combinées, ainsi que le développement de nouvelles technologies pour surmonter les limitations actuelles. Ces perspectives ouvrent la voie à une identification bactérienne encore plus rapide, précise et complète, contribuant ainsi à une meilleure compréhension et utilisation des microorganismes dans divers domaines.

*Références
Bibliographiques*

Références bibliographiques

- Aldhebiani, A. Y.** (2018). Species concept and speciation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(3), 437-440. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.04.013>.
- Al-Jahiz, Harun, A. M. & Halabi, M.** (847). Extraits de Kitâb Al-Hayawân, ouvrage d'al-Jahiz; tirés de Al-Djâhiz, Kitâb al-Hayawân, 7 volumes ed. Abdesselam Mohamed Harun, 2e édition, Mustapha Halabi. Egypte, 1960 : Dar al-Gîl, Dar al-Fikr, Beyruth, Liban, 1988.776-867
- Allen, M. E.** (2005). *Mac Conkey Agar Plates Protocols*. <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.2855>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410 p.
- Anhalt, J. & Fenselau, C.** (1975). Identification of *Bacteria* Using Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry publications*, 47(2), 219–225 p.
- ASM Protocols.** (2024). *American Society for Microbiology (ASM): "Catalase Test Protocol"*. Catalase Test Protocol - ASM (ASM.org).
- Ayhan, K., Coşansu, S., Orhan-Yamkan, E. & Gülseren, G.** (2021). Advance methods for the qualitative and quantitative determination of microorganisms. *Microchemical Journal*, 166, 106188. doi:10.1016/j.microc.2021.106188
- Bergogne-Bérézin, E. & Towner, K. J.** (1996). *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 148-165.
- Beroud, C.** (2010-2011). Bases de données et outils bio-informatiques utiles en génétique. 6 p.
- Boisvert, S., Laviolette, F. & Corbeil, J.** (2010). Ray: Simultaneous Assembly of Reads from a Mix of High-Throughput Sequencing Technologies. *Journal of Computational Biology* 17(11), 1519-1533.
- Bottone, E. J.** (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and Infection*, 1(4), 323-333.
- Bourgault, A. M. & Lamothe, F.** 1988. Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology. PMID: 3183000, PMCID: PMC266833. DOI: 10.1128/jcm.26.10.2144-2146.1988
- Bousseboua, H.** Elément de Microbiologie 2ème édition : Dépôt légal chapitre 6. (2991-2005), 160 p. ISBN9947-0-1062-7

- Branger, C., Lesimple, A., Bruneau, B., Berry, P., Lambert, N. & Hocquet, D.** (2007). Selective enrichment process of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a French hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 605-611.
- Butt, H. J., Cappella, B. & Kappl, M.** (2005). Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports*, 59(1-6), 1-152 p.
- Cappuccino, J. & Welsh, C.** (2014). *Microbiology: A Laboratory Manual, Global Edition*. 1st ed. Pearson Education.
- Charlebois, P.** (2007). Automatisation Des Etapes Informatiques Du Séquençage D'un Génome D'organite Et Utilisation De L'ordre De Gènes Pour Analyses Phylogénétiques. Québec. 23 p.
- Combemorel, P. & van Dijk, E.** (2021). La révolution de la génomique : les nouvelles méthodes de séquençage et leurs applications. <https://planetvie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/la-revolution-de-la-genomique-les-nouvelles-methodes-de> d'ungénome d'organite et utilisation de l'ordre de gènes pour analyses phylogénétiques.
- Dariush, G., Gholamhossein, R., Rouhollah, F., Mahmood, G. S., Abdolhossein, S., Mohsen, S. & Loghman, A.** (2019). The Application of Ultrasonic Vibration in Human Sperm Cryopreservation as a Novel Method for the Modification of Physicochemical Characteristics of Freezing Media. *Scientific Reports*, 9(1), 10066. doi:10.1038/s41598-019-46424-0
- Darwin, C.** (2018). L'Origine des Espèces et la sélection naturelle [archive], sur herodote.net, 27 novembre 2018, (consulté le 21 avril 2024).
- David, F. & Urlotte, T.** (2002). An Isothermal Amplification Methodes. *comptes-rendu de l'Académie des Sciences*, 321. 909-914 p.
- David, W.** (2004). *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis Cold Spring Harbor Laboratory SeriesG – Reference, Information and Interdisciplinary Subjects Series Mount, Bioinformatics 2ème édition: Cold Spring Harbor Lab Press*, chapitre 2. 39 p.
- De Candolle, M. A.P. (1813).** Théorie élémentaire de la botanique : ou, Exposition des principes de la classification naturelle et de l'art de décrire et d'étudier les végétaux », sur books.google.fr, (Page consulté le 2 mars 2024).
- Enghoff, H.** (2009). *What is taxonomy? An overview with myriapodological examples*. Natural History Museum of Denmark: University of Copenhagen, *Universitetsparken*. 1864 – 6417.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M.** (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926), 64-71
- Finn, R. D. & Coll.** (2017). InterPro en 2017 – au-delà des annotations de familles de protéines et de domaines. *Recherche sur les acides nucléiques*, 45(D1), 190-199 p.

- Floyd, E., Tiansong, W., Izard, J. & Paster, B. W.** (2010). Bacterial species diversity in human subgingival plaque. "*Journal of Bacteriology*", 192(19), 5002-5017 p.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S. & Bailey, W. R.** (2007). *Bailey & Scott's diagnostic microbiology* (12th ed.). Mosby. Foundations and Practical Relevance. chapitr 1. Vienna Wien, Austria: first edition Frank E. Zachos, 6 p. Doi: 10.1007/978-3-319-44966-1
- Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S.** (2007) *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th Edition, Mosby Elsevier, China, 842-855.
- Fox, A.** (2006). Mass Spectrometry: Identification and Biodetection, Lessons Learned and Future Developments. In *Identification of Microorganisms by Mass Spectrometry*; Editeurs : JohnWiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 23–37 p.
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., Kaushik, K. S., Salehi, B., Bevilacqua, A., ... & Rodrigues, C. F** (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms from Past to Present. *Microorganisms*, 7(5), 130. doi:10.3390/microorganisms7050130
- Garrity, G. M., Bell, J. A. & Lilburn, T. G.** (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (second Ed). New York: Springer. Génétique, Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, Univ.
- Gevers, D., Dawyndt, P., Vandamme, P., Willems, A., Vancanneyt, M., Swings, J. & De Vos, P.** (2006). Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1475), 1911–1916. doi:10.1098/rstb.2006.1915
- Goodwin, S., Pherson, J. D. & Combie, W. R.** (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333-351 p. doi:10.1038/nrg.2016.49
- Gram, H. C.** (1884). Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. (In German)
- Green, M. R. & Sambrook, J.** (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Grimont, P. A. D. & Grimont, F.** (2006). The genus *Serratia*. *The Prokaryotes*, 6, 219-244.
- Guo, M.T., Rotem, A., Heyman, J. A. & Weitz, D. A.** (2012). Droplet microfluidics for high-throughput biological assays. *Lab on a chip*, 12(12), 2146-55.
- Gupta, R.** (2015). Microbial culture media: a corner stone of microbiology. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 9(1), 1-10 p.
- Hansma, P. K. & Cleveland, J. P.** (2012). Atomic force microscopy. *Encyclopedia of biophysics*, 119-124 p.

- Hey, J.** (2009). Why Should We Care about Species? : *Nature Education* 2(5): 2.
- Hirano, S. S. & Upper, C. D.** (2000). *Bacteria* in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringaea* pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 624-653.
- Hodges, E., Rooks, M., Xuan, Z., Bhattacharjee, A., Gordon, B. G., Brizuela, L., Combie, W. R. & Hannon, G. J.** (2009). *Nature Protocols*, 4(6), 960-974.
- Hori, M., Fukano, H. & Suzuki, Y.** (2007). Amplification uniforme de plusieurs ADN par PCR en émulsion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(2), 323-328. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.11.037
<https://www.biologydiscussion.com/bacteria/bacterial-taxonomy/bacterial-taxonomy-meaning-importance-and-levels/54679>
- Hye, S. S., Yeon, B. Kim., Joon, Y. K., Seong, W. R. & Tae, W. W.** (2024). Advances in Culturomics Research on the Human Gut Microbiome: Optimizing Medium Composition and Culture Techniques for Enhanced Microbial Discovery. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34. (4), 757-764. <https://doi.org/10.4014/jmb.2311.11024>
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).** (2018). International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/>.
- Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F. & Donoghue, M. J.** (2007). "Taxonomy" Plant Systematics: A Phylogenetic Approach (3rd ed). Sunderland: Sinauer Associates.
- Jung, B. & Hoilat, G. J.** (2021). Article Stat Pearls: "MacConkey Medium". *Microbe Online*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/>
- Kaminski, T. S., Scheler, O. & Garstecki, P.** (2016). Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges, *Lab Chip Journal*, 16(12), 2168-2187. The Royal Society of Chemistry, <http://dx.doi.org/10.1039/C6LC00367B>
- Karas, M. & Hillenkamp, F.** (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry Publications*, 60(20), 2299_2301 p. <https://doi.org/10.1021/ac00171a028>
- Koch, R.** (1884). Die Ätiologie der Tuberkulose. [The etiology of tuberculosis by Dr. Robert Koch. From the Berliner Klinische Wochenschrift, Volume 19 (1882)] PMID: 6805152.
- Kocur, M., Martinec, T. & Schubert, K.** (2006). The genus *Micrococcus*. In *The Prokaryotes* (pp. 961-971). Springer, New York, NY.

- Kong, L. Y., Eyre, D., Walker, A. S., Corbeil, J., Wilcox, M. & Bourgault, A. M.** (2016). Comparison of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Whole Genome Sequencing in *Clostridium difficile* Typing. *Open Forum Infectious Diseases*, Volume 3, 2063. DOI: 10.1093/ofid/ofw172.1611 (Oxford Academic).
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K.** (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549 p. doi:10.1093/molbev/msy096.
- Kurhekar. & Jaya.** (2015). Role of taxonomy with reference to research in microbiology, *Biology discussion* [en ligne], (page consultée le 22 avril 2024).
- Labster Theory pages.** DNA sequencing, (page consultée le 7 juin 2024). https://theory.labster.com/dna_sequencing/
- Lagier, J. C., Armougom, F., Million, M., Hugon, P., Pagnier, I., Robert, C., Bittar, F., Fournous, G., Gimenez, G., Maraninchi, M., Trape, J. F., Koonin, E. V., La Scola, B. & Raoult, D.** (2012). Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(12), 1185-1193.
- Lagier, J. C., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M. & Fenollar, F.** (2018). Culturing the human microbiota and culturomics. *Nature Reviews Microbiology*. 16, 540–550 p. doi: 10.1038/s41579-018-0041-0
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., Garcia-Valdes, E. & Palleroni, N. J.** (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 510–547. doi:10.1128/mnbr.00047-05 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4449118/>
- Lapage, S. P., Sneath, P. H. A. & Lessel, E. F.** (1990). International Code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, Revision. editors. Washington (DC): *American Society for Microbiology Press*, (1992).
- Lapage, S. P., Sneath, P. H. A., Lessel, E. F., Skerman, V. B. D., Seeliger, H. P. R. & Clark, W.** (2019). International Code of Nomenclature of Bacteria. Nih.Gov; *American Society of Microbiology Press*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8817/>
- Laurin, M.** (2023). The Advent of PhyloCode: The Continuing Evolution of Biological Nomenclature, CRC Press, (1re éd). chap. 1.3 (« Linnaeus and His Followers before the Advent of the Rank-Based Codes »).226 p.ISBN 978-1-003-09282-7, DOI 10.1201/9781003092827
- Lavigne, J. P.** (2013). Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51, 257–270 p.

-
- LEEM_Plateforme**, (2019). <https://www.leem.org/publication/sante-2030-une-analyse-prospective-de-linnovation-en-sante> (page consultée le 06 Juin 2024).
- Lesk, A. M.** (2017). Introduction to Bioinformatics. *Oxford University Press*.
- Li, D., Lu, X., Song, Y., Wang, J., Li, D. & Xuan, X.** (2016). Sheathless electrokinetic particle separation in a bifurcating microchannel. *Biomicrofluidics*, 10(5), 054104. doi:10.1063/1.4962875.
- Li, J., Shi, X., Yin, W., Wang, Y., Shen, Z., Ding, S. & Wang, S.** (2017). A Multiplex SYBR Green Real-Time PCR Assay for the Detection of Three Colistin Resistance Genes from Cultured Bacteria, Feces, and Environment Samples. *Frontiers in microbiology*.
- Linnaeus, C.** (1735). *Systema Naturae*.
- Mardis, E. R.** (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature Protocols*, 12(2), 213-218 p. doi:10.1038/nprot.2016.182
- Mark, C.** (2023). Antonie van Leeuwenhoek. Traduit par Babeth Étienne-Cartwright. Word History in Cyclopeda, (page consulté le 18 avril 2024) <https://www.worldhistory.org/trans/fr/1-19505/antonie-van-leeuwenhoek/>
- Mark, J., Pallen, A., Telatin, A. & Oren, A.** (2021). The Next Million Names for *Archaea* and *Bacteria*, *Trends in Microbiology*. April 2021, 29. (4), p 289-298.
- Mayr, E.** (1996). What Is a Species, and What Is Not? : *Philosophy of Science*, 63(2), 262–277. doi:10.1086/289912. Médicale Virtuelle Francophone, p 3-6.
- Metzker, M. L.** (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31-46 p.
- Meyer, M. & Kircher, M.** (2010). Illumina Sequencing Library Preparation for Highly Multiplexed Target Capture and sequencing. *Cold spring Harbor Protocols*.
- Michael, H., Ross, P., Wojciech, P., Wolters, K. H., Lippincott, W. & Wilkins.** (2015). Histology: A Text and Atlas. 7 th edition.
- Morgan, X. C. & Huttenhower, C.** (2012). Chapter 12: Human microbiome analysis *PLOS Computational Biology*, 8(12), e1002808.
- Muigg, V., Helena, M .B. Seth-Smith, Kai-Manuel, A., Weisser, M., Hinić, V., Blaich, A., Roloff, T., Heininger, U., Schmid, H., Kohler, M., Graf, L., Dylan, M., Winterflood., Schlaepfer, P. & Goldenberger, D.** (2024). Novel Organism Verification and Analysis (NOVA) study: identification of 35 clinical isolates representing potentially novel bacterial taxa using a pipeline based on whole genome sequencing. *Journal of BMC Microbiology*, <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03163-7>.

- Naciri, M.** (2011) Université Mohammed V-Agdal, Faculté des Sciences de Rabat, Laboratoire de Zoologie et de Biologie générale . Les techniques de préparation des coupes pour les microscopies optique et électronique. *Histologie-Embryologie*.
- Newell, P. D., Fricker, A. D., Roco, C. A., Chandrangsu, P. & Merkel, S. M.** (2013). A Small-Group Activity Introducing the Use and Interpretation of BLAST. *Journal of microbiology & biology education*, 14(2), 238–243.
- Nguyen, N. N., Hoang, D. K. D., Kieu, T. L. T. & Nae, Y. L.** (2023). Metagenomics: An Effective Approach for Exploring Microbial Diversity and Functions, 12(11), 2140 p. <https://doi.org/10.3390/foods12112140>
- Pace, N. R.** (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276(5313), 734-740. doi:10.1126/science.276.5313.
- Pahlow, S., Meisel, S. & Cialla-May, D.** (2013). Medical applications of Raman spectroscopy. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry* .1-3 p.
- Palama, T. L., Canard, I., Rautureau, G. J. P., Mirande, C., Chatellier, S. & Elena-Herrmann, B.** (2016). Identification of bacterial species by untargeted NMR spectroscopy of the exo-metabolome. *The Analyst*, 141(15), 4558–4561. Doi : 10.1039/c6an00393a
- Paolozzi, L., Liébart, J. C., Arlat, M., Michel, D. & Harivony, R.** (2019). Introduction à la microbiologie -Microbiologie fondamentale et appliqué : Taxinomie des micro-organismes. Rue Paul Bert: 92240 Malakoff. 4-11 p.
- Pasteur, L.** (1861). On the Organized Corpuscles Existing in the Atmosphere. *Comptes rendus de l'Académie des sciences*.
- Patskovsky, S., Maisonneuve, M. & Kabashin, A. V.** (2014). Dark-field optical microscope based on subwavelength nanoslits. *Optics Letters*, 39(10), 3018-3021 p.
- Paul, A.** (2004). Singleton livre BACTERIOLOGIE Pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. (6^{ème} édition), traduit de l'anglais par Jean Dusart.
- Pawley, J. B.** (2006). *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (3rd ed.). Springer Science & Business Media.
- Pearson, W. R.** (1990). [5] Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology*, 63–98. Doi : 10.1016/0076-6879(90)83007-v
- Poitras, E. & Houde, A.** (2002). La PCR en temps réel : principe et application. *Review in Biology and Biotechnology*. Canada; 2(2), 2-11

-
- Prinzi, A. & Rodney, R.** (2020). How Chromagar™ Revolutionized Microbe Identification. *American Society for Microbiology, ASM*. <https://asm.org/articles/2020/september/how-chromagar-tm-revolutionized-bacterial-identifi>
- Rajtak, U., Leonard, N., Bolton, D. & Fanning, S.** (2011). A real-time multiplex SYBR Green I polymerase chain reaction assay for rapid screening of *salmonella* serotypes prevalent in the European Union. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(7), 769-780 p. doi:10.1089/fpd.2010.0768.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350-1354 p.
- Salzburg, S. L.** (2018). Annotation du génome de nouvelle génération : nous avons encore du mal à faire les choses correctement. *Biologie du génome*, 19(1), 1-3 p.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Santos, I. C., Smuts, J., Choi, W.-S., Kim, Y., Kim, S. B. & Schug, K. A.** (2018). Analysis of bacterial FAMES using gas chromatography – vacuum ultraviolet spectroscopy for the identification and discrimination of bacteria. *Talanta*, 182, 536–543. doi:10.1016/j.talanta.2018.01.074.
- Sastry, A. S. & Bhat, S. K.** (2016). *Essentials of Medical Microbiology*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers.
- Sauer, S. & Kliem, M.** (2010). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 8, 74–82 p.
- Singh, A. & Sharma, G. K.** (2013). Saini Biochemical and molecular characterisation of the bacterial endophytes from native sugarcane varieties of Himalayan region 3 Biotech, 3 (3), 205-212 p.
- Srwa, J., Rashid., Janet, Y., Nale., Andrew, D., Millard. & Martha, R. J.** (2023). Nouvelles associations de ribotypes : types de séquence et divers systèmes CRISPR-Cas dans des souches environnementales de *Clostridioides difficile* du nord de l'Irak. doi: 10.1093/femsle/fnad091
- Stabb, E. V., Jacobson, L. M. & Handelsman, J.** (1994). Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4404-4412.
- Tankeshwar, A.** (2021). Bacterial Culture Media: Classification, Types, Uses. *Microbe Online*, <https://microbeonline.com/types-of-bacteriological-culture-medium/>
- Tassy, P.** (2018). « WILLI HENNIG : La révolution cladistique [archive] », sur universalis.fr, 8 octobre 2013 (consulté le mars 2024).

The Code Online | International Commission on Zoological Nomenclature. (2020). Icnz.Org.<https://www.iczn.org/the-code/the-international-code-of-zoological-nomenclature/the-code-online>.

The Editors of Encyclopædia Britannica. (2024). Polymerase chain reaction also known as DNA amplification, PCR. <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680 p. doi:10.1093/nar/22.22.4673.

Toshniwal, P. P. (2024). New algorithm proves to be a powerful tool for detection and identification of novel bacterial organisms. *News Medical Life science*, <https://www.news-medical.net/news/20240110/New-algorithm-proves-to-be-a-powerful-tool-for-detection-and-identification-of-novel-bacterial-organisms.aspx> Univ. Laval, Québec, p 23-25.

Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., Souza, P. R. E. de, Carvalho, A. de A. T. & Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 1–11. Doi: 10.1590/s1517-83822009000100001

Venkateshaiah, A., Padil, V. V. T., Nagalakshmaiah, M., Waclawek, S., Černík, M. & Varma, R. S. (2020). Microscopic Techniques for the Analysis of Micro and Nanostructures of Biopolymers and Their Derivatives. *Polymers*, 12(3), 512. Doi : 10.3390/polym12030512

Wang, W. L., Xu, S. Y., Ren, Z. G., Tao, L., Jiang, J. W. & Zheng, S. S. (2015). Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World Journal Gastroenterology*, 21(3), 803-814 p.

What are the differences between PCR, RT-PCR, qPCR, and RT-qPCR?. (2023) <https://www.enzo.com/note/what-are-the-differences-between-pcr-rt-pcr-qpcr-and-rt-qpcr/> (Page consultée le 5 mai 2024)

Wieser, A., Schneider, L., Jung, J. & Schubert, S. (2012). MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93, 965–974.

Wiley, E. O., Bruce, S. & Lieberman. (2011). *Phylogenetics: Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*, second Edition, Hoboken, New Jersey. Published simultaneously in Canada ISBN: 978-0-470-90596-8. 87 p.

Wilson, K. (2001). Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 56(1), 2.4.1–2.4.5. doi:10.1002/0471142727.mb0204s56.

Windelspecht, M. (2002). Groundbreaking Scientific Experiments, Inventions, and Discoveries of the 17th century. Greenwood Publishing Group. ISBN 978-0-313-31501-5.

Woese, C. R. & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11), 5088–5090. doi:10.1073/pnas.74.11.5088

Zachos, F.E. 2016. *Species Concepts in Biology. Historical Development, Theoretical Foundations and Practical Relevance.* Springer International Publishing Switzerland, [place not stated]. xii+220 pp. ISBN 978-3-319-44964-7. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 55(3), 265–266. doi:10.1111/jzs.12166

Zhu, Q., Mai, U., Pfeiffer, W., Janssen, S., Asnicar, F., Sanders, J. G. & Knight, R. (2019). Phylogenomics of 10,575 genomes reveals evolutionary proximity between domains *Bacteria* and *Archaea*. *Nature Communications*, 10(1). doi:10.1038/s41467-019-13443-4

Zimmer, C. (2008). What Is a Species? This day, scientists struggle with that question. A better definition can influence which animals make the endangered list: *Scientific American*. <https://fr.scribd.com/document/472345872/What-is-a-species-Carl-Zimmer-2008>

Annexes

Annexes

Annexes 1 : les milieux de culture et KOH

- Milieu Gélose King B
 - Peptone de caséine.....10 g
 - Peptone de viande.....10 g
 - K₂ HPO₄.....1,5 g
 - Mg SO₄.....;.....1,5 g
 - Glycérol.....10 ml
 - Agar.....15 g
 - Eau distillée.....1000 ml
- Milieu Gélose Luria-Bertani (LB)
 - Tryptone.....10 g/l
 - Extraits de levure.....5 g/l
 - Na Cl.....10 g
 - Agar.....15 g
 - Eau distillée.....1000 ml
 - pH=7
- Milieu Bouillon Luria-Bertani (LB)
 - Tryptone.....1 g/l
 - Extraits de levure.....0,5 g/l
 - Na Cl.....1 g
 - Eau distillée.....100 ml
- Milieu Gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP)
 - Tryptone.....5 g/L
 - Extraits de viande.....3 g/l
 - Lactose.....10 g/L
 - Pourpres de bromocresol.....25 mg
 - Agar.....13 g
 - pH =.7
- Milieu Mannitol mobilité
 - Hydrolysats tryptique de caséine.....10 g
 - mannitol.....7,5 g
 - Rouges de phénol.....0,04 g

- Nitrate de potassium.....1,0 g
- Agar.....3,5 g
- PH =7,8
- Milieu Mac Conkey
 - Peptone20 g
 - Lactose10 g
 - Sels biliaires.....1,5 g
 - Cristal violet0,001 g
 - Rouge neutre 0,05 g
 - Chlorure de sodium.....5 g
 - Agar.....15 g
 - pH = 7,1
- KOH
 - KOH3 g
 - Eau distillée.....100 ml

Annexes 2 : Etapes de la coloration de Gram

Principe : Par la coloration différentielle de Gram, les bactéries Gram positif (Gram+) sont colorées en violet, les bactéries Gram négatif (Gram-) sont colorées en rose, ceci étant dû à une différence de composition de la paroi. Effectuée à partir d'un frottis ou un étalement.

Tableau 8 : Etapes de la coloration de Gram.

Etapes	Mode opératoire	Temps	Principe
Coloration primaire	- Verser le violet de Gentiane sur la lame - Jeter le colorant et rincer à l'eau.	1 min	Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes et toutes les bactéries sont colorées en violet.
Mordantage	- Verser la solution de Lugol - Jeter le Lugol et rincer à l'eau	1 min	Cette étape permet de stabiliser la coloration violette par la formation de complexe chimique entre le violet et le Lugol.
Décoloration	- Faire couler de l'alcool acétone Sur la préparation, puis rincer à l'eau.	30 sec	-L'alcool pénètre dans la bactérie, la coloration au violet. -De Gentiane disparaît les bactéries décolorées sont des bactéries Gram négatif. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.

Tableau 8 : Etapes de la coloration de Gram (Suite).

Étapes	Mode opératoire	Temps	Principe
Coloration secondaire	- Recouvrir la préparation de Fuschine Laver à l'eau.	1 min	- La Fuschine recoloré en rose les bactéries précédemment - Décolorées : les bactéries Gram-.
Séchage	- Sécher délicatement avec du Papier buvard.	1 min	/

Annexes 3 : Milieu phénylalanine

Principe : Ce milieu est utilisé pour la recherche de la phénylalanine désaminase. La phénylpyruvate donne une teinte verte en présence de Fer 3.

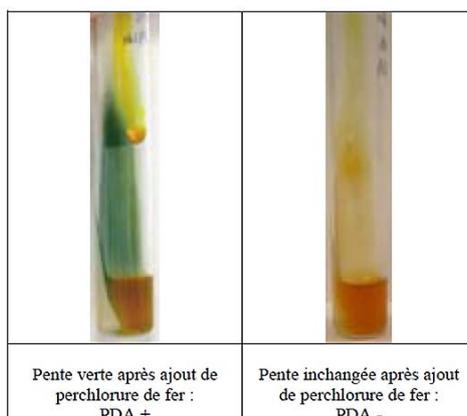
Composition

- L-phénylalanine.....1 g.l-1
- Extrait de levure.....3 g.l-1
- Chlorure de sodium.....5 g.l-1
- Phosphate bipotassique.....1 g.l-1
- Gélose.....12 g.l-1
- PH 7,3

Pratiquer l'ensemencement la pente.

La lecture s'effectue après 18 à 24 heures d'incubation à 37°C.

La lecture :



Pierre-Yves Guillaume

Professeur de biotechnologie génie biologique

Annexes 4 : Le milieu M.E.V.A.G./Gélose

Principe : Les bactéries peuvent utiliser les glucides par deux voies métaboliques différentes :

- **Voie Fermentative :** toutes les réactions peuvent avoir lieu en l'absence d'oxygène ; il se forme des catabolites de dégradation, en particulier des acides, qui s'accumulent dans le milieu et abaissent le pH.
- **Voie Oxydative :** l'oxygène est obligatoirement utilisé et peu de catabolites acides sont formés.

Le milieu MEVAG permet de tester l'acidité apparue par oxydation d'un glucide dans un milieu peu tamponné.

Utilisation

- Détermination de la Voie d'Attaque du Glucose
- Étude des Glucides attaqués par les bactéries oxydatives

Composition

- Macération de viande (500 g/l)..... 50 ml
- K Cl5 g
- Agar.....3 g
- Rouge de phénol (solution aqueuse à 0,2 %).....10 ml
- Eau distillée q.s.p.....1000 ml
- pH final à 25 °C7,0 ± 0,2

Annexes 5 : Galerie Api 20E

Principe: The API 20 E strip consists of 20 microtubes containing dehydrated substrates. These tests are inoculated with a bacterial suspension that reconstitutes the media. During incubation, metabolism produces color changes that are either spontaneous or revealed by the addition of reagents. The reactions are read according to the Reading Table and the identification is obtained by referring to the Analytical Profile Index or using the identification software.

Tableau 9 : Lecture de la galerie miniaturisée.

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
ONPG	2-nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.223	β-galactosidase (Ortho NitroPhenyl-βD-Galactopyranosidase)	colorless	yellow (1)
<u>ADH</u>	L-arginine	1.9	Arginine DiHydrolase	yellow	red / orange (2)
<u>LDC</u>	L-lysine	1.9	Lysine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
<u>ODC</u>	L-ornithine	1.9	Ornithine DeCarboxylase	yellow	red / orange (2)
<u>CIT</u>	trisodium citrate	0.756	CITrate utilization	pale green / yellow	blue-green / blue (3)
<u>H₂S</u>	sodium thiosulfate	0.075	H ₂ S production	colorless / greyish	black deposit / thin line
<u>URE</u>	urea	0.76	UREase	yellow	red / orange (2)
TDA	L-tryptophane	0.38	Tryptophane DeAminase	<u>TDA / immediate</u>	
				yellow	reddish brown
IND	L-tryptophane	0.19	INDole production	<u>JAMES / immediate</u>	
				colorless pale green / yellow	pink
<u>VP</u>	sodium pyruvate	1.9	acetoIn production (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>	
				colorless	pink / red (5)
<u>GEL</u>	Gelatin (bovine origin)	0.6	GELatinase	no diffusion	diffusion of black pigment
GLU	D-glucose	1.9	fermentation / oxidation (GLUcose) (4)	blue / blue-green	yellow / greyish yellow
MAN	D-mannitol	1.9	fermentation / oxidation (MANnitol) (4)	blue / blue-green	yellow
INO	inositol	1.9	fermentation / oxidation (INOSitol) (4)	blue / blue-green	yellow
SOR	D-sorbitol	1.9	fermentation / oxidation (SORbitol) (4)	blue / blue-green	yellow
RHA	L-rhamnose	1.9	fermentation / oxidation (RHAmnose) (4)	blue / blue-green	yellow
SAC	D-sucrose	1.9	fermentation / oxidation (SACcharose) (4)	blue / blue-green	yellow
MEL	D-melibiose	1.9	fermentation / oxidation (MELibiose) (4)	blue / blue-green	yellow
AMY	amygdalin	0.57	fermentation / oxidation (AMYgdalin) (4)	blue / blue-green	yellow
ARA	L-arabinose	1.9	fermentation / oxidation (ARABinose) (4)	blue / blue-green	yellow
OX	(see oxidase test package insert)		cytochrome-OXidase	(see oxidase test package insert)	

- (1) A very pale yellow should also be considered positive.
- (2) An orange color after 36-48 hours incubation must be considered negative.
- (3) Reading made in the cupule (aerobic).
- (4) Fermentation begins in the lower portion of the tubes, oxidation begins in the cupule.
- (5) A slightly pink color after 10 minutes should be considered negative.

- The quantities indicated may be adjusted depending on the titer of the raw materials used.

- Certain cupules contain products of animal origin, notably peptones.

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QTY (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
Nitrate reduction GLU tube	potassium nitrate	0.076	NO ₂ production	<u>NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min</u>	
			reduction to N ₂ gas	yellow	red
				<u>Zn / 5 min</u>	
			orange-red		yellow
MOB	API M Medium or microscope	-	motility	non-motile	motile
McC	MacConkey medium	-	growth	absence	presence
OF-F	glucose (API OF Medium)	-	fermentation : under mineral oil	green	yellow
OF-O			oxidation : exposed to the air	green	yellow

Année universitaire : 2023-2024	Présenté par : BOUFKHED Nedjla Rayene BOUZIT Wissam CHABANE Nihal
<i>Méthodes conventionnelles et innovantes d'identification des bactéries : identification présomptive de 25 bactéries phytopathogènes.</i>	
Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie Moléculaire des microorganismes.	
<p>L'identification bactériennes est cruciale pour la santé, l'agriculture, l'industrie alimentaire et la recherche scientifique. La taxonomie des procaryotes fournit un cadre pour classer et nommer ces microorganismes. Ce mémoire présente dans sa partie théorique, l'évolution des techniques d'identification, du conventionnel à l'innovant, en se basant sur l'application des méthodes telles que la culturomique, la microfluidique, la métagénomique et le séquençage nouvelle génération permettant une identification plus rapide et précise des bactéries cultivables et non-cultivables.</p> <p>Dans la partie pratique, une analyse phénotypique a été réalisée sur 25 isolats bactériens inconnus, préalablement isolés à partir de tissus infectés par des phytopathogènes. Les résultats montrent que ces bactéries couvrent presque toutes les formes cellulaires : bacilles, cocci, coccobacilles, ou même tétracoques des groupes Gram négatif et positif. La détermination des caractéristiques biochimiques a permis d'identifier les 25 isolats bactériens comme suit : le groupe des bacilles à Gram négatif comprend des bactéries suspectées des familles <i>Pseudomonadaceae</i> et <i>Enterobacteriaceae</i>, des genres <i>Yersinia</i> et <i>Serratia</i>. Les bacilles à Gram positif sont suspectés d'appartenir aux genres <i>Bacillus</i> et <i>Lactobacillus</i>. Les cocci à Gram positif ont été identifiés comme appartenant aux espèces <i>Micrococcus sp.</i> et <i>Staphylococcus sp.</i>, tandis que l'isolat sous forme de cocci à Gram négatif est suspecté d'appartenir au genre <i>Acinetobacter</i>.</p> <p>Une extraction de l'ADN génomique de 4 souches et l'amplification du gène de l'RNAr 16S par PCR sont réalisés. Les résultats soulignent l'importance de l'utilisation conjointe de différentes méthodes pour optimiser l'identification de ces bactéries, et proposent d'explorer des approches plus avancées dans le cadre de recherches futures. Cela pourrait ouvrir la voie à une identification plus rapide et plus précise de nos souches bactériennes.</p>	
Mots-clés : Identification bactérienne, culturomique, microfluidique, métagénomique, séquençage, PCR.	
Laboratoires de recherche : Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (U. Constantine 1 Frères Mentouri).	
Présidente du jury : Dr ABDELAZIZ Ouided (MCB- U. Constantine 1 Frères Mentouri).	
Encadrante : Dr BOUBEKRI Karima (MCA- U. Constantine 1 Frères Mentouri).	
Examinatrice : Dr MEZIANI Meriem (MCA- U. Constantine 1 Frères Mentouri).	