République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الدكتور يحيى فارس المدية

Université Docteur Yahia Fares Médéa

كلية العلوم الطبيعية والحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de Fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de Master II en sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Evaluation de l'activité antagoniste des bactéries productrices des bactériocines sur les *Acinetobacter spp*

Présenté par :

M^r^ Benzerrouk Yacine et M^r^ Boukhalfa Djaafar

Soutenue le 22/06/2022 Devant le jury composé de :

M^r^ Benhafri Nadir	MAA	Université de Médéa	Président
M^me^ Zergoug Amina	MCB	Université de Médéa	Examinatrice
M^me^ Bouherama Amina	MCB	Université de Médéa	Encadreur
M^r^ Djouadi Samir	MCA	Université de Bab ezzouar	Co-promoteur

Année Universitaire : 2021/2022

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À mes parents :

Qui depuis mon plus jeune âge ont toujours fait leur maximum, en consacrant temps et argent, pour m'éveiller et m'encourager dans mes passions. C'est grâce à vous et pour vous que j'ai fait mon mémoire. Aucun mot sur cette page ne saurait exprimer ce que je vous dois, J'espère qu'un jour, Je pourrai leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu leur prête bonheur et longue vie.

À ma chère sœur Yasmine,

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je te souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, te protège et te garde.

En témoignage de mon amitié sincère :

À tous mes amis qui font partie de ces personnes rares par leur gentillesse et leur amitié et leur inlassable soutien ; À tous mes collègues, À Tous ceux ou celles qui ont participé de prés ou de loin à la réalisation de ce modeste travail et que j'ai omis involontairement de citer.

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection.

Yacine



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À mes parents :

Qui depuis mon plus jeune âge ont toujours fait leur maximum, en consacrant temps et argent, pour m'éveiller et m'encourager dans mes passions. C'est grâce à vous et pour vous que j'ai fait mon mémoire. Aucun mot sur cette page ne saurait exprimer ce que je vous dois, J'espère qu'un jour, Je pourrai leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu leur prête bonheur et longue vie.

En témoignage de mon amitié sincère :

À tous mes amis qui font partie de ces personnes rares par leur gentillesse et leur amitié et leur inlassable soutien plus particulièrement : Zibari Karim

À Tous ceux ou celles qui ont participé de prés ou de loin à la réalisation de ce modeste travail et que j'ai omis involontairement de citer.

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection.

Djaafar



Remerciements

Nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et les moyens afin de pouvoir accomplir ce travail.

Nous tenons à remercier particulièrement notre promotrice **Madame Bouharma Amina** Maitres de conférences classe B à l'université Médéa pour avoir orienté et enrichi notre travail, pour sa disponibilité, ses précieux conseils ainsi que son souci du détail, qui ont abouti à la réalisation de ce mémoire.

Nos vifs remerciements s'adressent également à **Monsieur Benhafri Nadir.** Maitre assistant classe A à l'université Médéa qui nous fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Nos gratitudes s'adressent également à **Madame Zergoug Amina.** Maitre assistante classe B à l'université Médéa, d'avoir accepté d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

On remercie également tous les membres du laboratoire de Biologie del'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, de Bab ezzouar, notamment **Monsieur Djouadi Samir.**
le Co-promoteur, pour sa gentillesse et sa disponibilité.
Nous remercions également toute l'équipe pédagogique de l'université deMédéa et les intervenants professionnels responsables de notre formation.

Nos remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes qui nous ont soutenus de près ou de loin au cours de la réalisation de ce mémoire.

Yacine et Djaafar

Liste des Tableaux

Tableau I : Principaux facteurs de virulences rapportées chez *A.baumannii* ……. 6

Tableau II : Classes d'antibiotiques avec l'année d'apparition…… 8

Tableau III : Classification originale des bactériocines proposée par Klaenhammer ……. 13

Tableau IV : Exemples de bactériocines selon leur classification, leurs espèces productrices et leur spectre d'activité……. 17

Tableau V : Les bactéries lactiques productrices de bactériocines et les aliments fermentés associés ……..... 22

Tableau VI : Taxonomie des sept isolats du *Bacillus*…… 24

Tableau VII : Classification des antibiotiques utilisés pour l'étude de l'antibiogramme… 31

Tableau VIII : Effet de la trypsine à différentes concentration sur les 4 isolats *Bacillus*… 42

Tableau IX : Mise en évidence de La résistance des 4 isolats aux antibiotiques……. 43

Tableau X : Résultats de la Caractérisation des isolats alfa – alfa rhizosphérique…….. 45

Tableau XI : Les résultats de croissance sur les différents substrats…… 51

Tableau XII : Résultats du profil biochimique de l'isolat galerie API20E……. 53

Tableau XIII : Résultats de la sensibilité des isolats testés aux différentes concentrations des antibiotiques…… 56

Tableau XIV : Mise en évidence de l'activité antagoniste des sept isolats de *Bacillus* vis-à-vis des *Acinetobacter spp* par la méthode directe en spot…….. 57

Tableau XV : Mise en évidence de l'activité antagoniste des 4 isolats de *Bacillus* vis-à-vis des *Acinetobacter spp* par méthode de diffusion sur gélose. …… 58

Tableau XVI : Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits bruts de bactériocines vis-à-vis des *Acinetobacter spp* par la méthode de diffusion sur gélose……. 60

Tableau XVII : Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits bruts de bactériocines vis-à-vis des *Acinetobacter spp* par la méthode de diffusion surgélose. 61

Tableau XVIII : Mise en évidence de l'activité antagoniste des sept isolats de *Bacillus* vis-à-vis des *Acinetobacter spp* par la méthode directe en spot…… 62

….

Liste des Figures

N°	Titre	Page
01	Classification phylogénétique du genre *Acinetobacter* basée sur l'alignement de séquences (950) des protéines appartenant au génome	2
02	Ultrastructure *d'Acinetobacter baumannii* sous microscope électronique à transmission avec un grossissement de 43000 X	3
03	Aspect des colonies *d'Acinetobacter baumanii* sur milieu Drigalski additionné d'antibiotiques	4
04	Aspect muqueux (a) et rugueux (b) des colonies *d'Acinetobacter baumanii* sur milieu Tryptine Soja Agar.	4
05	Cibles bactériennes et mécanisme de résistance aux antibiotiques	8
06	le mécanisme d'action des bactériocines	15
07	la galerie API 20^{E}	30
08	Méthode de la détermination de la CMB (Concentration minimales bactéricides) des espèces étudiées	35
09	Aspects morphologique des colonies (A) *Bacillus siamensis, (B) Bacillus pumilus, (c) zhangzhovenis, (D) Bacillus velezensis* cultive sur milieu TSA 1/10	39
10	Observation microscopique des souches (A) *Bacillus subtilis subspp inquosor, (B) Bacillus tropicus, (c) Bacillus velezensis, (D) Bacillus tynensis* a un grossissement x40 après coloration de gram.	39
11	Observation microscopique des endospores des isolats de *Bacillus spp* à un grossissement X100	40
12	Observation microscopique des différents modes de regroupement des cellules des isolats de *Bacillus spp* à un grossissement X100	40
13	Tolérance des isolats de *Bacillus spp*. testés à différentes valeurs de pH	41
14	Tolérance des isolats de *Bacillus spp.* testés à différentes températures	42
15	Aspect morphologique des colonies obtenues après ensemencement sur milieu TSA après 48h d'incubation à 30°C.	44
16	Aspect macroscopique des colonies des bactéries sur Hektoen (A) et les isolats d'*Acinetobacter* après repiquage (A).	46
17	Mise en évidence de la réaction gazeuse catalysée par l'enzyme Catalase	46
18	Mise en évidence de l'enzyme cytochrome oxydase	47
19	Mise en évidence de la mobilité des isolats avec fermentation du mannitol sur milieu Mobilité-Mannitol	47
20	Observation microscopique à un grossissement X100 après la coloration de Gram.	48
21	Aspect macroscopique des colonies des bactéries du genre *Acinetobacter* sur (A) TSA ; (B) Mac Conkey ; (C) LB ; (D) milieu Hinton ; (E) Hektoen	49
22	culture d'*Acinetobacter* sur gélose au sang cuit.	50
23	Aspect morphologique des isolats incubés à température 44°C.	52
24	Profil biochimique de l'isolat A10 sur la galerie API20E	53
25	Résultat de test de l'antibiogramme	55
26	Mise en évidence de l'activité antagoniste par le test de spot direct	57
27	Aspect des zones d'inhibition formées par le surnageant vis-à-vis de *A,baumanii*	59

Liste des Abréviations

Acb : Complexe *A.calcoaceticus-A.baumannii*

ADN : Acide désoxyribonucléique

Api : Analytical Profile Index

Ata: *Acinetobacter* trimeric autotransporter

ATB : Antibiotique

BfmRS : Système de régulation

CASFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie

E. coli : Escherichia-coli

H_2S : Hydrogène sulfuré

h : Heure

kDa : Kilodalton

LDC : Décarboxylase pour la lysine

LB : Milieu bouillon lysogène

LAB : Acide lactic bactéria

ml : millilitre

MRS : Milieu De Man, Rogosa et Sharpe

OMS : Organisation mondiale de la santé

ODC : Décarboxylase pour l'ornithine

OMV: Outer membrane vesicule

OmpA: Outer membrane protein A

PAD : Phénylalanine désaminase

PLP : Protéine de liaison des pénicillines

pH : Potentiel hydrogène

SCCmec *: Staphylococcal cassette chromosome mec*

T2SS: The type II secretion system

TSA : Gélose trypticase soja

TSB : Bouillon tryptone soja aussi appelé gélose trypto-caséïn-soja

SARM *: Staphylococcus aureus* multi-résistantes à la méthicilline

Résumé

L'émergence sans cesse croissante de bactéries résistantes face à l'appauvrissement des ressources thérapeutiques et à l'absence d'avancée dans le domaine des antibiotiques, mettent en avant l'importance de trouver de nouvelles solutions.

36 bactéries du genre *Acinetobacter* ont été isolées à partir du sol rhizosphérique des plantules de *Medicago sativa* L. cultivé dans le sud de l'Algérie (W. El Menea) sur la base des caractéristiques culturelles. La caractérisation phénotypique et biochimique nous permet de retenir 5 isolats probablement appartenant au genre *A.baumanii*. Les 5 isolats ont montré une multi résistance vis-à-vis des 6 antibiotiques testés par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

Les 5 isolats d'*Acinetobacter* ont fait l'objet d'un test antagoniste avec sept isolats de *Bacillus sp* : [(*1) Bacillus safensis, (2) zhangzhouensis, (3) pumilus, (4) toyonensis , (5) velezensis, (6) siamensis* et *(7) tropicus*]. Les résultats ont montré que quatre de nos isolats à savoir : *B safensis, zhangzhouensis, pumilus* et *toyonensis* ont montré une activité antagoniste vis-à-vis des isolats *d'Acinetobacter.* Les 4 isolats ont montré une capacité à produire des bactériocines qui ont présenté un effet fortement inhibiteur sur la croissance des bactéries d'*Acinetobacer* quelque soit les conditions de l'environnement.

Mots clés : *Bacillus spp, Acinetobacer spp,* bactériocine, antagonisme

Abstract

The continual emergence of resistant bacteria face to depleting therapeutic resources and the lack of progress in antibiotics' field, highlights the importance of generating new solutions. 36 bacteria of the genus *Acinetobacter* were isolated from the rhizospheric soil of *Medicago sativa* L. seedlings grown in southern Algeria (W. El Menea) based on cultural characteristics. The phenotypic and biochemical characterization has allowed us to retain 5 isolates probably belonging to the genus *A.baumani*. The 5 isolates has shown multiple resistance against the 6 tested antibiotics by Agar diffusion method. The 5 Acinetobacter isolates were antagonistically tested with seven *Bacillus sp : [(1) Bacillus safensis, (2) zhangzhouensis, (3) pumilus, (4) toyonensis , (5) velezensis, (6) siamensis et (7) tropicus*]. The results have shown that four of our isolates : B *safensis, zhangzhouensis, pumilus and toyonensis* showed antagonistic activity towards Acinetobacter. 4 isolates showed an ability to produce bacteriocins with a strong inhibitory effect on the growth of *Acinetobacer bacteria* in all environmental conditions

Key words: *Bacillus spp, Acinetobacer spp,* bacteriocin, antagonism

.

الملخص

إن الظهور المتزايد باستمرار للبكتيريا المقاومة في ظل الافتقار للموارد العلاجية و عدم إحراز تقدم في مجال المضادات الحيوية يدفع إلى محاولة إيجاد حلول جديدة. تم عزل 36 بكتيريا من جنس *Acinetobacter* من تربة الغلاف الجذوري لشتلات *Medicago sativa L.* المزروعة بالمنيعة بجنوب الجزائر على أساس الخصائص الفلاحية. سمح لنا التوصيف الظاهري و الكيميائي الحيوي بالحصول على خمس عزلات تنتمي إلى جنس *A. baumanii* حيث أظهرت العزلات الخمس مقاومة متعددة للمضادات الحيوية الستة المختبرة بطريقة الانتشار في وسط "آغار". تم إخضاع العزلات الخمسة ل *Acinetobacter* لاختبار مضاد مع سبعة عزلات أخرى ل [(1) *Bacillus sp :* *Bacillus safensis, (2) zhangzhouensis, (3) pumilus, (4) toyonensis , (5) velezensis, (6) siamensis et (7) tropicus].* أظهرت النتائج أن أربعة من عزلاتنا: B safensis , zhangzhouensis, pumilus , toyonensis أبدت نشاطا مضادا ضد عزلات *Acinetobacter.* العزلات الأربعة أظهرت قدرة على إنتاج مبيدات جرثومية قادرة على تثبيط قوي لنمو بكتيريا *Acinetobacer* مهما كانت الظروف البيئية.

الكلمات الأساسية: *Bacillus spp* ، *Acinetobacer spp*، جرثومي ، العداء

Sommaire

Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des abréviations
Résumé
Abstract
Sommaire
Introduction

Chapitre 1 : Rappels Bibliographiques

I. Le genre *Acinetobacter*…….. 1
1. Historique…….. 1
2. Taxonomie……. 1
3. Caractérisation phénotypique…….. 3
3.1. Caractères morphologiques…… 3
3.2. Caractères culturaux……... 4
3.3. Caractères biochimiques……. 5
4. Pathogénicité des *Acinetobacter*……... 5
II. Resistance aux antibiotiques……. 7
1. Les Antibiotiques……... 7
2. Mécanismes d'action des antibiotiques……. 8
3. Résistance aux antibiotiques……..... 9
3.1. Mécanismes de résistance……... 9
3.2. Multirésistance…… 10
3.3. Formation de biofilm bactérien et l'antibiorésistance…… 10
III. Bactériocines……... 11
1. Définition…….. 11
2. Classification……. 12
2.1. Bactériocines de la classe I –Lantibiotiques…….. 13
2.2. Bactériocine de la classe Π……. 13
2.3. Bactériocine de la classe ΠI…… 13
2.4. Bactériocines de la classe IV……..... 14
3. Mécanisme d'action……... 15
4. Domaines d'applications……... 18
4.1. Typage bactérien……. 18
4.2. Domaine alimentaire……... 18
4.3. Domaine médical…… 19
4.4. Domaine vétérinaire…… 20
4.5. Domaine agricole…… 21
5. Diversité des bactéries productrices de bactériocines…….. 21

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

I. Matériel…….. 24
1. Matériel non biologique ……... 24
2. Matériel biologique …….. 24
2.1. *Bacillus spp*…… 24
2.2. Rhizosphère……... 24
II. Méthodes……... 25
1. Caractérisation des isolats *Bacillus spp*……. 25
1.1. Revivification des isolats *Bacillus spp*……... 25
1.2. Caractérisation physiologique…… 25
1.2.1. Température…… 25
1.2.2. pH…… 25
1.2.3. Digestion enzymatique…… 25
1.2.4. Antibiogramme…… 26
2. Isolement des bactéries du genre *Acinetobacter spp*……. 26

2.1. Préparation des solutions mère …….. 26
3. Identification phénotypique ……..... 26
3.1. Identification morphologique …… 27
3.1.1. Observation coloniale…….. 27
3.1.2. Observation cellulaire.……..... 27
3.2. Test catalase…… 27
3.3. Test oxydase …….. 28
3.4. Catabolisme des substrats carbonés…….. 28
3.5. Mannitol mobilité……... 28
3.6. Thermorésistance…… 29
3.7. Test hémolyse……. 29
4. Identification biochimique……. 29
5. L'étude de la sensibilité des bactéries d'*Acinetobacter* aux antibiotiques…… 30
6. Mise en évidence de l'activité antagoniste…… 31
6.1. Test des spots……..... 31
6.1.1. Test différé……... 31
6.1.2. Test direct…… 32
6.1.3. Test de diffusion……..... 32
7. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales …… 33
7.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice…… 33
7.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide……... 34
8. Effet des paramètres environnementaux sur l'activité antagoniste…….. 36
9. Purification et caractérisation des bactériocines…… 36
9.1. Purification avec la méthode de dialyse……. 36
9.1.1. Préparation de l'extrait de culture…… 36
9.1.2. Précipitation au sulfate d'ammonium……..... 36
9.2. Purification avec la méthode adsorption-désorption…….. 37
9.3. Caractérisation…… 37
9.3.1. Activité antagoniste.…… 37

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

1. Caractérisation des *Bacillus spp.* ……..... 38
1.1. Vérification de la pureté des isolats ……... 38
1.2. Tolérance au pH……..... 40
1.3. Tolérance aux températures…… 41
1.4. Digestion enzymatique……... 42
1.5. Antibiogramme ……..... 43
2. Collection et purification des bactéries du genre *Acinetobacter spp* …… 44
2.1. Dénombrement …….. 44
2.2. Sélection des *Acinetobacter spp*…… 44
2.2.1. Aspect morphologique des *Acinetobacter spp*…… 46
2.2.2. Catalase…… 46
2.2.3. Oxydase……... 47
2.2.4. Mabilité…… 47
2.2.5. Observation cellulaire ……. 48
2.2.6. Caractérisation morphologique…… 49
2.2.7. Hémolyse……. 50
2.2.8. Fermentation des substrats carbonés……... 51
2.2.9. Thermorésistance……. 52
2.2.10. Identification biochimique par galeries API20E……... 53
3. Résistance aux antibiotiques……..... 54
4. Mise en évidence de l'activité antagoniste ……... 57
4.1 Test de spot direct…… 57
4.2 Test de diffusion……..... 58
5. Activité antagoniste des bactériocines……... 59
5.1. Mise en évidence de l'activité antagoniste des bactériocines vis-à-vis de l'*Acinetobacter*…… 59
5.2. Effet de pH et salinité sur l'activité antagoniste des bactériocines ……... 60

6. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales 62
6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice 62

Conclusion et perspective
Références bibliographiques
Annexes

Introduction

INTRODUCTION

La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. L'utilisation massive et inappropriée d'antibiotique dans le traitement des infections a été rapidement suivie par l'émergence des souches multirésistantes et la perte d'antibiotiques efficaces compromettra notre capacité à lutter contre les maladies infectieuses et à gérer les complications courantes chez les patients vulnérables subissant une chimiothérapie pour le cancer, la dialyse pour l'insuffisance rénale et la chirurgie, notamment la transplantation d'organes, pour lesquels la capacité à traiter les infections secondaires est cruciale.(**Nabti, 2020**).

Les infections provoquées par les bactéries à Gram négatif multirésistantes sont devenues un problème majeur de santé publique au cours de ces vingt dernières années dans les pays en voie de développement (**Adeli S, Salehi 2012**).

Acinetobacter est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Moraxellaceae*. Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont ubiquitaires (eau, sol, végétaux, etc.). Chez l'homme, les *Acinetobacter* font partie de la flore saprophyte cutanée de la peau saine et sont souvent retrouvés dans les localisations humides (creux axillaires, aines, espaces interdigitaux). Depuis quelques décennies, les bactéries du genre *Acinetobacter* ont été impliquées dans de nombreuses maladies infectieuses. Bien qu'elles soient principalement associées aux infections nosocomiales, elles ont également été impliquées dans des cas d'infections acquises communautaires. Leur grande résistance à de nombreux antibiotiques rend le traitement de ces infections difficile (**Garrouste-Orgeas *et al*., 2008**).

À l'heure actuelle, *Acinetobacter baumanii* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les infections humaines. C'est un germe pathogène d'infection opportuniste chez l'homme (**Dumitrescu et *al*,.2010**). Il présente un des taux de mortalité le plus élevé, particulièrement chez les patients les plus fragiles (patients immunodéprimés et ceux traités avec des antibiotiques à large spectre).

Pour cette raison, le développement de nouvelles stratégies de traitement pour les infections causées par *Acinetobacter baumannii* est nécessaire ; ce qui force la communauté scientifique à développer des méthodes alternatives à l'utilisation d'antibiotiques. Une des solutions face à ce dilemme est basée sur l'utilisation des bactériocines par plusieurs groupes de recherche, comme voie d'avenir afin de réduire l'utilisation des antibiotiques (**Reid et Burton, 2002**).

Les bactériocines sont des polypeptides antibactériens synthétisés dans le processus de métabolisme qui possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis de large éventail de bactéries pathogènes (**Narendrakumar et *al.*,2017**). Les propriétés inhérentes telles que la faible toxicité, la puissance, la disponibilité de peptides à spectre large et étroit de bactériocines impliquent une alternative viable aux antibiotiques (**Cotter et *al.*, 2013**).

Au regard de cette impasse thérapeutique et dans ce contexte les objectifs assignés de notre travail consistent à réaliser:

- Etude de la densité et diversité des bactéries du genre *Acinetobacter* à partir de la rhizosphère de la luzerne.
- Recherche et identification des *Acinetobacter baumannii* par des techniques physiologique et biochimique.
- Caractérisation phénotypique des bactéries appartenant au genre *Bacillus.*
- La mise en évidence de l'activité inhibitrice des *Bacillus* vis-à-vis des bactéries du genre *Acinetobacter* à travers la production des bactériocines.
- La purification des bactériocines et la détermination de leurs spectres d'activité.

Rappels bibliographiques

I. Le genre *Acinetobacter*

1. Historique

L'histoire du genre *Acinetobacter* a débuté avec le microbiologiste néerlandais (MartinusWillem Beijerinck) qui a isolé en 1911, une souche bactérienne dénommée *Micrococcus calcoaceticus* à partir d'un prélèvement de sol enrichi dans un milieu minimum contenant l'acétate et le calcium (**Beijerinck, 1911**). La caractérisation de cette souche a été poursuivie avec Brisou et Prévot en1954. Le nom *Acinetobacter* a été proposé pour séparer les bactéries immobiles des bactéries mobiles du genre *Achromobacter* (**Brisou et Prevot,1954**).

En 1971, suite aux travaux de Baumann et ses collaborateurs (**Baumann *et al.*, 1968**), le genre *Acinetobacter* a été réservé uniquement pour les espèces à oxydase négative. En1984, le genre *Acinetobacter* a été officiellement inclus dans la taxonomie mondiale après son apparition sur la liste approuvée des espèces bactériennes (Approved Lists of Bacterial Names) et dans le manuel Bergey's de Bactériologie systématique (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) (**Jung et Park,2015**). Dans l'édition de 1974, le Bergey's Manual of systematic bacteriology liste le genre *Acinetobacter* en ne citant qu'une seule espèce : *Acinetobacter calcoaceticus*. Cependant, une description détaillée des espèces appartenant à ce genre n'a pas été prévue avant 1986 où seules deux espèces ont été dénommées *A.calcoaceticus* pour les souches oxydant le glucose et *A.lwoffii* pour les souches n'oxydant pas le glucose (**Seifert et Dijkshoorn, 2008 ;Jung et Park,2015**).

La première étude taxonomique moderne du genre *Acinetobacter* a été réalisée par Bouvet et Grimont en1986. Ils ont fourni une description de plusieurs espèces y compris *Acinetobacter baumannii, haemolyticus, johnsonii et junii* et ont modifié la description d'*A.calcoaceticus* et *d'A.lwoffii* en se basant sur des tests biochimiques, les besoins nutritifs des souches ainsi que sur des preuves d'hybridation ADN-ADN (**Bouvet et Grimont, 1986**).

2. Taxonomie

La taxonomie du genre *Acinetobacter* a ainsi été confuse en raison du manque de marqueurs biochimiques capables de distinguer les espèces bactériennes. Depuis la description des premiers membres du genre *Acinetobacter,* plusieurs espèces ont été rapportées (Fig.1). le genre bactérien est formé actuellement de 71 espèces dont 53 portent des noms propres et officiels (**Atrouni et *al.*, 2017**).

Il convient de noter que la taxonomie de ce genre reste encore un défi aujourd'hui, surtout que les analyses phénotypiques utilisées en pratique courante dans les laboratoires de routine ne sont pas capables de détecter des différences minimes au niveau de certaines espèces (**Peleg et *al*.,2008**).

C'est le cas du complexe *A.calcoaceticus-A.baumannii* (Acb) qui comprend 6 espèces phénotypiquement très proches: *A.baumannii*, *A.pittii*, *A.nosocomialis* et *A.calcoaceticus* (**Chan et*al*., 2012**) ainsi que les nouvelles espèces *A.seifertii et A.dijkshoorniae* (**Cosgaya et *al*., 2016; Nemec et *al*., 2015**).

Le genre *Acinetobacter* appartient actuellement au domaine des *Bacteria*, phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Pseudomonodales* et la famille des *Moraxellaceae* (**Doughari *et al*., 2011**).

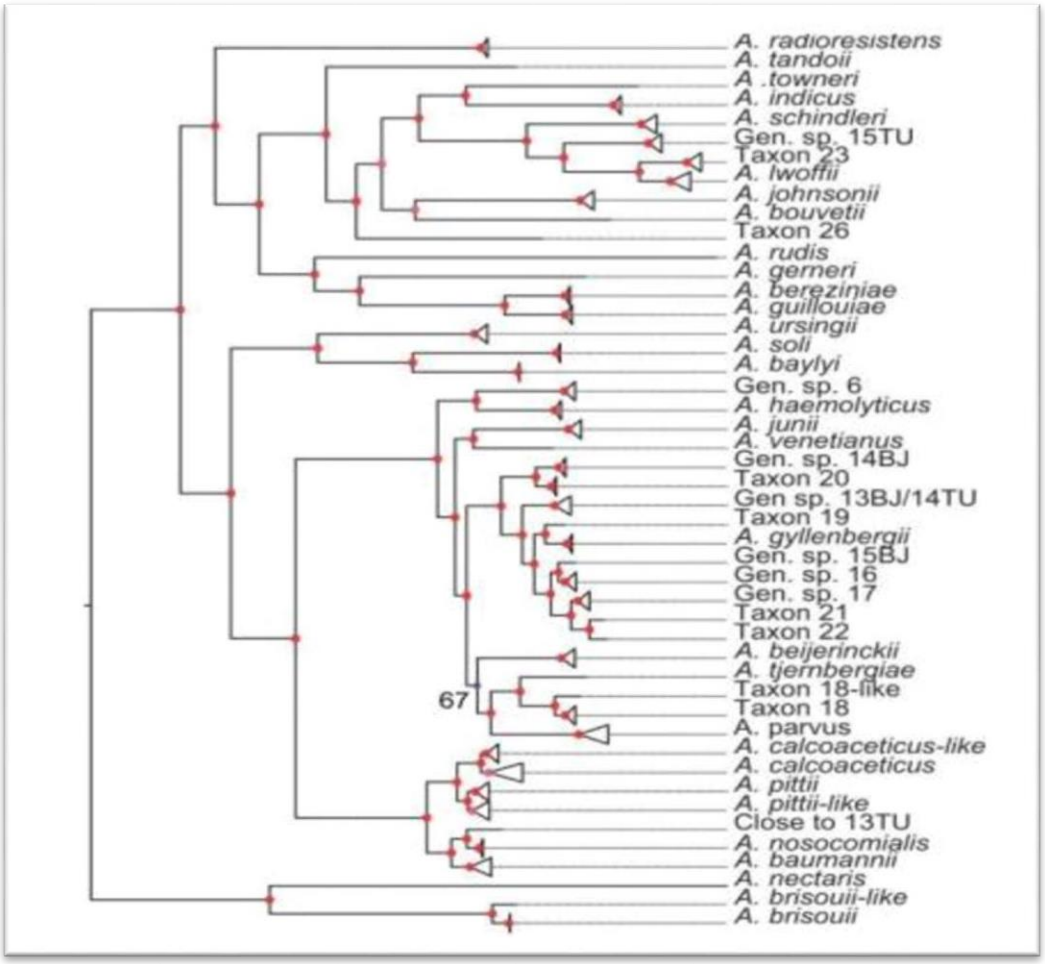


Figure 1*:* Classification phylogénétique du genre *Acinetobacter* basée sur l'alignement de séquences (950) des protéines appartenant au génome.

Les triangles représentent des groupes de taxon qui appartiennent à la même espèces, l'arbre a été enraciné en utilisant deux génomes de deux genre les plus proches *Moraxella* et *Spychrobacter* (**Touchon *et al*., 2014**)

3. Caractérisation phénotypique

Les espèces du genre *Acinetobacter* sont des bactéries ubiquitaires dont de nombreuses sources peuvent en être l'origine : les sols, l'eau, les produits destinés à la consommation, les environnements des eaux usées et les hôpitaux (**Alouache et *al.*, 2012 ; Berlau et al., 1999b**). Cette diversité d'habitat a donné aux représentants du genre *Acinetobacter* une grande diversité de caractères.

3.1.Caractères morphologiques

Le genre *Acinetobacter* comprend des bacilles ou des coccobacilles dont la structure de la paroi cellulaire est typique des bactéries Gram négatif. Cependant, ces bactéries résistent parfois à la décoloration de Gram en retenant le crystal violet et peuvent donc être mal identifiées, comme des cocci Gram positif (**Doughari *et al.*,2011**).

Il s'agit des bactéries sporulées, parfois capsulées, souvent groupées en paires mais aussi en chaînes de longueur variable (Fig.2). Dans la phase exponentielle de croissance, leur diamètre varie typiquement de 0,9 à 1,6 µm et leur longueur de 1,5 à 2,5 µm. Elles deviennent plus coccoides dans la phase stationnaire (**Doughari *et al.*,2011; Jung et Park, 2015**). Bien que ces bactéries soient généralement considérées comme immobiles, une mobilité de type « mouvement par tremblement » ou « twitching motility » a été remarquée notamment sur des supports semi-solides (**Roca *et al.*,2012**).

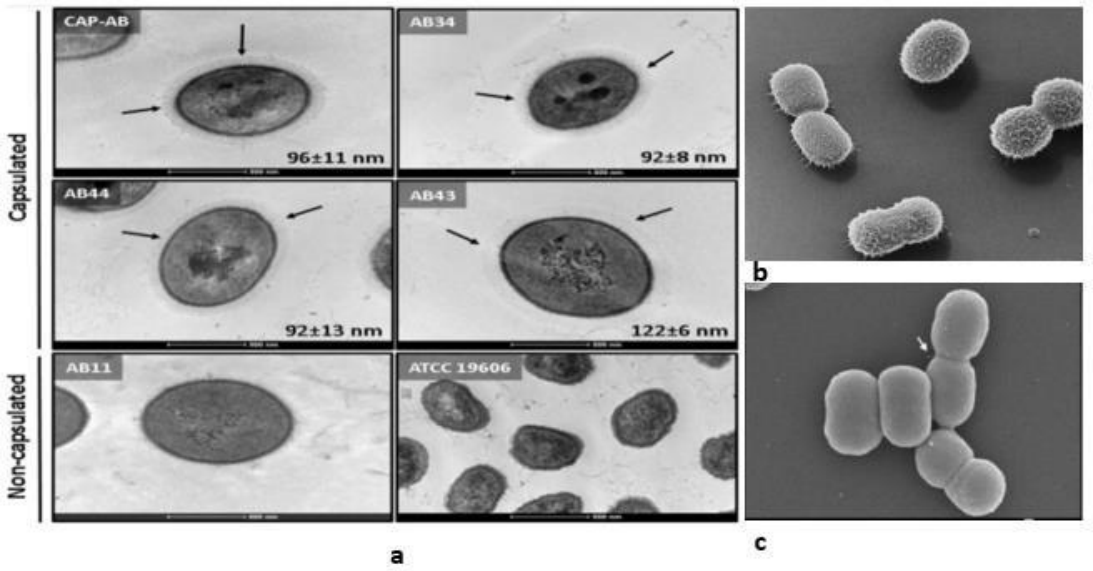


Figure 2: Ultrastructure *d'Acinetobacter baumannii* sous microscope électronique à transmission avec un grossissement de 43000 X (a) et structure des *Acinetobacters* groupées en paire (b) et en chaine (c).

3.2.Caractères culturaux

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont facilement cultivables sur la plupart des milieux de cultures ordinaires tels que la gélose nutritive (**Kurcik-Trajkovska, 2010**). La culture des colonies des *Acinetobacter* sur gélose de Drigalski donne des colonies arrondies à bords lisses (Fig.3a) alors que sur CHROMagar, les colonies présentent une coloration rouge (Fig.3b).

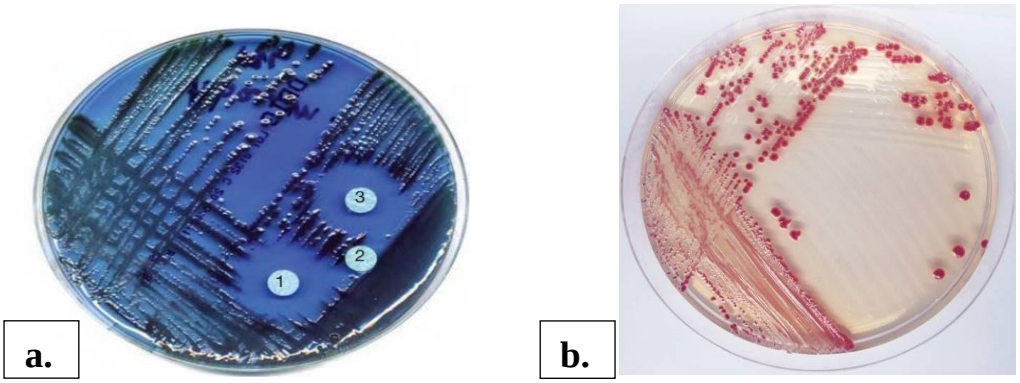


Figure 3. Aspect des colonies *d'Acinetobacter baumanii* sur milieu Drigalski additionné d'antibiotiques (1,2,3) (a) et sur milieu CHROMagar (b)(**Hidri et al.,2011**).

Les souches capsulées sont facilement identifiables en culture, elles présentent un aspect muqueux (Fig.4a) alors que les souches non capsulées sont plus petites et présentent un aspect rugueux (Fig.4b).

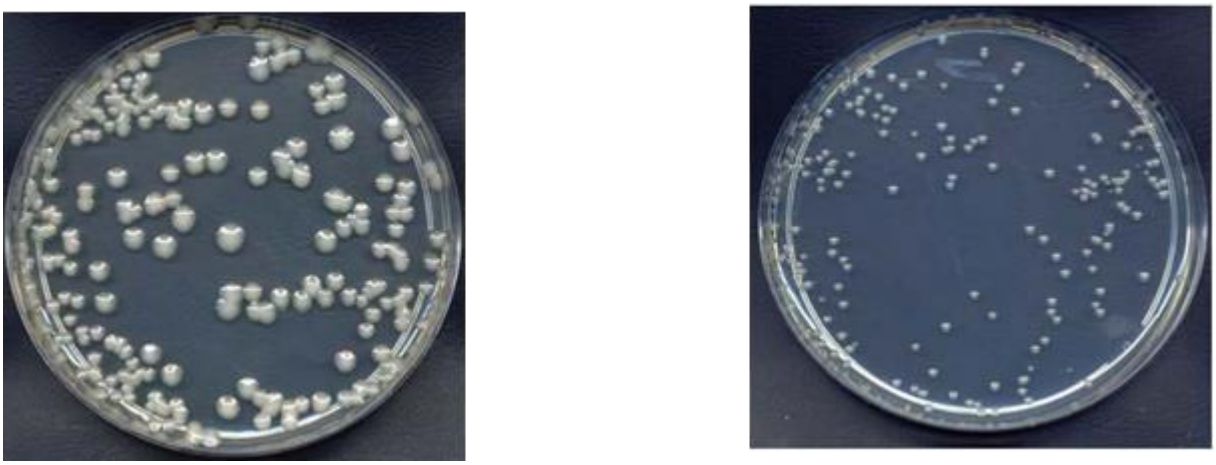


Figure 3: Aspect muqueux (a) et rugueux (b) des colonies *d'Acinetobacter baumanii* sur milieu Tryptine Soja Agar (**Hidri et al.,2011**).

La plupart des espèces se multiplie à des températures d'incubation de 20 à 37°C, avec des températures optimales de croissance situées entre 33 et 35°C (**Doughari et *al.*,2011**). Les isolats cliniques d'*Acinetobacter* présentent une bonne croissance à une température de 37°C et certaines souches peuvent se développer à des températures élevées (44°C) comme c'est le cas d'*A. baumannii* (**Seifert et Dijkshoorn, 2008**).

3.3.Caractères biochimiques

L'ensemble des *Acinetobacter* sont des bactéries présentant des réactions de catalase positive et d'oxydase négative, et n'ont pas la capacité de métaboliser les sucres par les voies fermentaires (**Kurcik-Trajkovska, 2010;Vaneechoutte et *al*.,2011**).

Les caractères biochimiques sont utilisés pour une identification au niveau espèce des bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* non hémolytiques et non protéolytiques. Cependant cette classification n'est pas déterminantes vu la complexité des caractères biochimiques des *Acinetobacter spp* (**Nemec et *al*.,2011**).

La majorité des tests biochimiques utilisés habituellement en bactériologie clinique sont négatifs : Indole, réduction des nitrates en nitrites, décarboxylase pour la lysine (LDC), décarboxylase pour l'ornithine (ODC), production d'hydrogène sulfuré (H_2S), bêta-galactosidase et DNase. Les tests de l'uréase, l'hydrolyse de la gélatine ou la phénylalanine désaminase (PAD) donnent quant à eux des réponses variables (**Doughari et *al.*, 2011; Hawkey et Bergogne-Berezin,2006**). Peu de caractères de la galerie 20E sont positifs, il s'agit du glucose, du melibiose et de l'arabinose (**Brady et *al*, 2010**).

4. Pathogénicité des Acinetobacters

Les représentants du genre *Acinetobacter* ont été considérés pour longtemps comme étant faiblement pathogènes. Mais la description de pneumonies communautaires graves à *Acinetobacter* a montré un pouvoir pathogène important (**Joly-Guillou ,2005**).

Le séquençage complet des génomes, le développement des outils de manipulation des génomes pour créer des mutants (Transcriptome/Proteome) ainsi que l'utilisation des modèles animaux ont joué un rôle crucial dans l'identification et la compréhension des facteurs contribuant à la pathogenèse des *Acinetobacters* (Tableau.I).

Tableau I. Principaux facteurs de virulence rapportés chez *A.baumannii (***Al Atrouni 2019***)*

Facteurs de virulenc	**Molécules**	**Rôle**
Protéine de la membrane externe	OmpA	Induction de l'apoptose des cellules cibles, adhérence et Invasion des cellules épithéliales, Formation de biofilm, mobilité de surface, survie dans le sérum
Lipopolysacharide		Evasion de la réponse immunitaire de l'hôte, déclenchement de la Réponse inflammatoire
Capsule		Evasion de la réponse immunitaire, croissance dans le sérum
Phospholipases	C/D	Survie dans le sérum, dissémination de la bactérie, apoptose des cellules cibles.
Protéines liant lespénicillines	PLP 7/8	Biosynthèse de peptidoglycane, stabilité cellulaire ,croissance dans Le sérum
Les systems de sécrétion	OMV	Transfert des facteurs de virulence et des matériels génétiques dans le Cytoplasme des cellules.
	T2SS	Production de lipases, virulence atténuée en cas des mutations
	Ata	Adhérence, formation des biofilms
Acquisition de fer	Sidérophore	Survie chez l'hôte, apoptose cellulaire
Formation de biofilms		Survie en milieu hospitalier sur les Surfaces biotiques et abiotiques
Quorum sensing		Survie chez l'hôte, formation des biofilms
Antibiorésistance		La croissance des bactéries dans le biofilm plus résistant.

II. Résistance aux antibiotiques

1. Les Antibiotiques

Les antibiotiques représentent l'une des principales innovations de la médecine au vingtième siècle. Ils ont permis de révolutionner le traitement de certaines maladies infectieuses comme les pneumonies, la tuberculose ou la peste, en réduisant considérablement le nombre de décès liés à ces maladies (**O'Neill, 2016**).

Les antibiotiques agissent à l'échèle moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie, par définition l'ATB est toute substance naturelle d'origine biologique élaborée par un organisme vivant, substance chimique produite par synthèse ou substance semi synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule d'origine naturelle ayant les propriétés suivantes : activité antibactérienne, activité en milieu organique ,une bonne absorption et bonne diffusion dans l'organisme (**Mohamedi 2019**).

Les antibiotiques sont des agents dont la toxicité sélective résulte d'un mode d'action spécifique au niveau de la synthèse de la paroi bactérienne, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines ou acides nucléiques, ils inhibent la croissance des micro-organismes ou les détruisent sans affecter l'hôte infecté. Ils peuvent être produits de manière naturelle par des champignons comme le *Penicillium* et le *Cephalosporium* ou des bactéries comme *Streptomyces* et le *Bacillus* ou obtenus par synthèse et hémisynthèse comme les céphalosporines afin d'augmenter l'affinité de la cible bactérienne ou modifier les propriétés pharmacocinétiques de ces produits (**Nauciel et Vildé, 2005**).

De nombreuses familles d'antibiotiques ont été découvertes et utilisés en santé humaine Tableau.II). Actuellement, il existe sept classes majeures d'antibiotiques bactériens utilisés en milieu clinique : Les β-lactamines, les glycolipides, les aminoglycosides, les aminosides, les quinolones, les macrolides et les sulfamides.

Tableau II: Classes d'antibiotiques avec l'année d'apparition

Antibiotiques	Classe	Première année d'utilisation en santé humaine
p-aminophénylsulfamide	Sulfamides	1937
Pénicilline	β-lactamines	1943
Streptomycine	Aminosides	1947
Tétracycline	Cyclines	1952
Méticilline	β-lactamines	1960
Acide nalidixique	Quinolones	1964
Gentamicine	Aminosides	1967
Vancomycine	Glycopeptides	1972
Céfotaxime	β-lactamines	1981
Linézolide	Oxazolidinones	2000
Daptomycine	Glycolipopeptides	2003
Ceftolozane-tazobactam	β-lactamines	2017

2. Mécanismes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques perturbent les mécanismes essentiels de la vie cellulaire (réplication, transcription, traduction, synthèse de la paroi…) ce qui limite la croissance bactérienne (effet bactériostatique) ou tue les bactéries (effet bactéricide) (Fig.5).

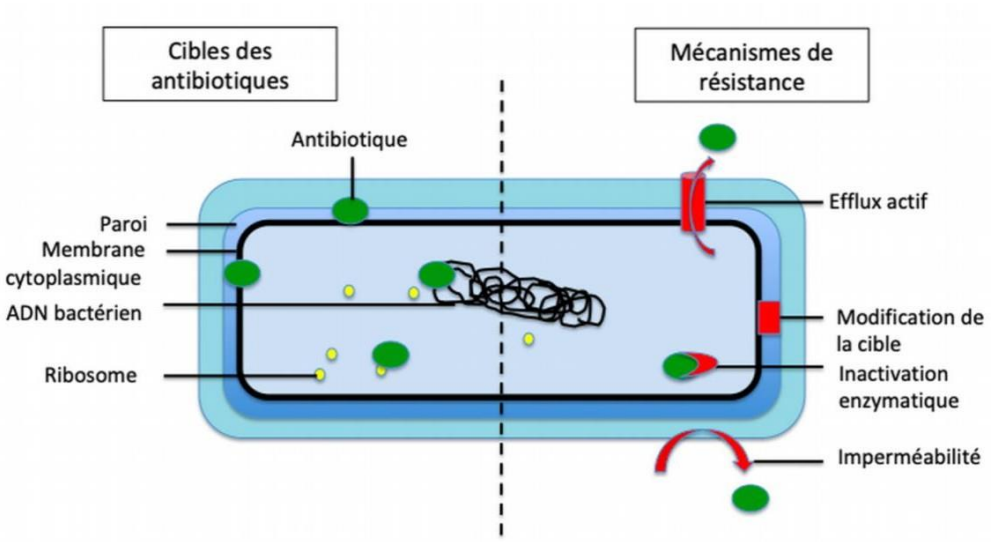


Figure 4 : Cibles bactériennes et mécanisme de résistance aux antibiotiques (**Emilie Cardot Martin 2019**).

Les principaux sites d'action des antibiotiques sont la paroi bactérienne, le ribosome, l'ADN bactérien, la membrane cytoplasmique. Les quatre principaux mécanismes de résistance sont l'imperméabilité, l'inactivation enzymatique, la modification de la cible de l'antibiotique et l'efflux actif (***Cavallo et al.*, 2004**).

3. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques - ou antibiorésistance - est définie par l'inefficacité du traitement antibiotique sur l'infection bactérienne ciblée (**Urekasante vidal 2019**).

La résistance d'une bactérie aux antibiotiques peut être naturelle, elle concerne alors toutes les souches d'un genre ou d'une espèce et détermine le phénotype sauvage de résistance. Elle est alors portée par le chromosome et se transmet verticalement lors de la division cellulaire. La résistance d'une bactérie peut également être acquise. Elle est alors retrouvée dans une proportion plus ou moins importante des souches d'une espèce et est variable dans le temps. Dans ce cas, la transmission est verticale ou horizontale (entre bactéries via des éléments génétiques mobiles) (***G.vallet et al.*,2008**) Chaque année, c'est près de 700 000 décès qui sont attribués à l'antibiorésistance dans le monde (**OMS, 2018**).

3.1. Mécanismes de résistance

Il existe quatre principaux mécanismes de résistance : imperméabilité bactérienne, modification de la cible, inactivation de l'antibiotique, efflux actif. (**Guerin-Faublee, 2010), (Scott, 2009)**.

L'imperméabilité bactérienne est impliquée dans la résistance naturelle des bacilles à Gram négatif aux glycopeptides (vancomycine), molécules de grande taille ne pouvant pas entrer dans les porines de la membrane externe de ces bactéries (**Guillemot et *al*., 2006**).

La modification de la cible de l'antibiotique entraine une perte d'activité de celui-ci, un exemple incontournable est la résistance acquise de *Staphylococcus aureus*. La bactérie possède une nouvelle protéine de liaison des pénicillines (PLP), la PLP2A ayant très peu d'affinité pour les β-lactamines. La PLP2A est codée par le gène *MecA*, inclus dans un élément génétique mobile intégré dans le chromosome et appelé en anglais staphylococcal cassette chromosome mec ou SCCmec. (**Hiramatsu, K et *al* .,2001**).

Le troisième mécanisme d'action et qui est très répandu est l'inactivation enzymatique de l'antibiotique (**Davison et *al.*, 2000**). Par exemple, la bactérie *E. coli* peut acquérir des gènes de résistance codant des enzymes nommées β-lactamases et capables d'hydrolyser le noyau β-lactame des β-lactamines, les transformant en produits inactifs. (**Madec et *al.*, 2012)**.

Les systèmes de pompes à efflux permettent également d'éliminer l'antibiotique en dehors de la bactérie. Ce mécanisme de résistance est particulièrement impliqué dans les résistances naturelles et acquises de *P. aeruginosa* aux antibiotiques. (**Cabot G et *al.*,2011**).

Les antibiotiques exercent inéluctablement une pression de sélection environnementale sur les populations bactériennes. Cette sélection de bactéries résistantes et pré-existantes peut avoir lieu en situation pathologique, au sein d'un foyer infecté (**Veyssiere, 2019**).

3.2. Multirésistance

Une bactérie est considérée comme étant multirésistante aux antibiotiques quand elle résiste à trois familles d'antibiotiques ou plus (**Magiorakos et *al.*, 2012**). **Siegel et *al* (2007**) ont désigné une bactérie multirésistante quand elle résiste à une ou plusieurs familles d'antibiotiques. Cette définition est souvent utilisée pour les souches bactériennes d'une grande importance en santé publique. Leur résistance est très souvent accompagnée de phénomènes de résistances croisées ou de co-résistances (**Clemente et *al.*, 2015**).

3.3. Formation de biofilm bactérien et l'antibiorésistance

Les biofilms sont définis comme des agrégats organisés de microorganismes pouvant contenir jusqu'à 100 millions (10^8) à (10^{10}) de cellules par gramme de matière déshydratée, la majorité des bactéries sont capables de former des biofilms à partir de quelques bactéries individuelles, Il s'agit de phénomènes parfaitement coordonnés et génétiquement programmés (**Aumeran et *al.*,2020**).

Exemple l'*A.baumannii* a une capacité remarquable à survivre et prospérer en milieu hospitalier en raison de ses interactions avec différents types de surface y compris les surfaces abiotiques telles que les meubles, les draps et les équipements médicaux (cathéters, équipements respiratoires) (**Peleg et *al.*, 2008**). Un tel comportement est concordant avec sa capacité à survivre de longues périodes sur ces surfaces sèches.

En outre, cette bactérie est capable de coloniser les surfaces biotiques telles que les cellules épithéliales humaines (**McConnell et *al.*,2013; Roca et *al.*, 2012**). L'adhérence d'*A.baumannii* aux surfaces biotiques et abiotiques aboutit à la formation des biofilms.

Ces derniers sont définis comme des communautés bactériennes associées à une surface et enfermées dans une matrice extracellulaire contenant des carbohydrates, des acides nucléiques, des protéines et autres macromolécules, au sein des quelles les bactéries deviennent plus résistantes aux antibiotiques que leurs similaires planctoniques (**Gaddy et Actis, 2009**).

Par conséquent, la formation de ces biofilms est un facteur de virulence qui contribue à la pathogénicité d*'A.baumannii* (**McConnell et *al.*, 2013**). Ce processus est régulé par une large gamme de facteurs bactériens tels que les pili, les protéines de la membrane externe (OmpA), la production d'exopolysaccharides, le système de régulation à deux composants BfmRS (**Choi et *al.*, 2009; Gaddy et Actis, 2009; Loehfelm et *al.*, 2008; Tomaras et *al.*, 2003, 2008**), mais également d'autres facteurs cellulaires et environnementaux, y compris les molécules de signalisation du quorum sensing, la température, la lumière et la disponibilité en fer (**McConnell et *al.*, 2013**).

III. Bactériocines

Le terme « bactériocine » a été utilisé pour la première fois en 1953 pour décrire le prototype de bactériocine à Gram négatif, la colicine (**Jacob et al.,1953**). Cependant, la première référence à l'inhibition méditée par la bactériocine remonte à plus de 130 ans lorsque Pasteur et Joubert (1877) ont signalé l'inhibition de *Bacillus anthracis* par des bactéries isolées à partir d'échantillons d'urine.

1. Définition

Les bactériocines sont des composés de nature protéique avec une longueur inférieure à 10 acides aminés ou jusqu'à 688 résidus produits par diverses bactéries Gram positives et Gram négatives par voie ribosomique (**Sidhu et Nehra, 2017**), avec un mode d'action bactéricide ou bactériostatique contre des espèces phylogénétiquement apparentés et/ou non apparentés qui partagent la même niche microbienne (**Pacheco-Canoa et *al.*, 2014 ; Jaya Chitra et Siva Kumar, 2018**). Ils sont produits et secrétés à l'extérieure de la cellule productrice et régulés par des gènes qui peuvent être codés par des chromosomes ou des plasmides (**Bharti et *al.*, 2015**).

La formation de bactériocines est un mécanisme de défense naturel que les bactéries utilisent pour concurrencer les micro-organismes dans le même environnement surpeuplés et privés de nutrition (**Chikindas et *al.*, 2018**). Cette capacité antimicrobienne est une caractéristique héréditaires, toutes les souches peuvent synthétiser une ou plusieurs substances bactériocinogènes strictement définies et spécifiques (**Alexander et *al.*, 2017**). Selon Cotter et *al*. (2005), entre 30 et 99% des procaryotes (Bactéries et Archaea) produisent au moins une bactériocine (**Barbosa et *al.*, 2015**), par exemple, la production de deux bactériocines synergiques a été rapportée pour plusieurs espèces d'*Enterococcus* : les entérocines L50A et L50B, les entérocines 1071A et 1071B (**Batdorj et *al.*, 2005**) et certaines souches de *Lactobacillus β plantarum* sont capables de produire plus d'un peptide avec un effet antibactérien synergique (**Barbosa et *al.*, 2015**).

2. Classification

Avec la découverte et la caractérisation continues de nouvelles bactériocines, il est devenu évident qu'une classification devrait être établie (**Rebuffat, 2011**).

Les bactériocines diffèrent entre elles par leur structure primaire, leur structure tridimensionnelle, leur mode d'export et leur mécanisme d'action (**Makhloufi et *al.*,2011**). Cette forte divergence a rendu leur classification assez difficile et plusieurs classifications ont été proposées. Les classifications des bactériocines proposées jusqu'à présent ne prennent en compte que les bactériocines produites par les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif. Par contre, la classification en fonction des organismes producteurs prend en compte tous les microorganismes producteurs (bactéries à Gram positif, bactéries à Gram négatif et les archées) de peptides antimicrobiens assimilables aux bactériocines (**Taale et *al.*,2016**).

Klaenhammer (1993) a proposé une classification des bactériocines en quatre classes (Tab.III). Cette classification a été révisée et des modifications ont été apportées par **Cotter et *al* (2005) puis par Rea et *al* en (2011)**.

Tableau III: Classification originale des bactériocines proposée par Klaenhammer (1993)

Groupe	Description	Caractéristiques distinctives
Classe I	Bactériocines à modification post-traductionnelle	Contient les acides aminés inhabituels lanthionine, b-méthyl lanthionine et résidus déhydratés.
Classe II	Peptides non-modifiés	Petits (<10kDa) peptides thermostables Stables à la chaleur.
Classe III	Protéines non-modifiés	Grandes protéines (>30kDa)thermolabiles
Classe IV	Protéines complexes	Contiennent des fragments lipidiques ou glucidiques.

2.1. Bactériocines de la classe I –Lantibiotiques

Les lantibiotiques sont des peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et ayant subi des modifications post-traductionnelles (**Willey et Van Der Donk, 2007**). Les lantibiotiques contiennent des acides aminés inhabituels formés post-traductionnellement, telles que la lanthionine, la β-méthyllanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine (**Carine et *al*., 2009**).

La classe des lantibiotiques comprend des protéines susceptibles de subir certaines modifications par leur biosynthèse, en raison de la présence d'une séquence de peptides signaux cela permettra la reconnaissance, le transport et le maintien du peptide inactif (**Gonzalez-Perez et *al*., 2018**).

2.2. Bactériocine de la classe II

Les bactériocines de la classe II sont des petits peptides cationiques, hydrophobes et thermostables (**Elayaraja et *al*., 2014**). Protéines de poids moléculaire inférieur à 10 kDa sans modifications post-traductionnelles. Cette classe est constituée de protéines qui n'ont pas de modifications inhabituelles et ne nécessitent aucun effecteur pour le transport, semblables à la classe I (**Gonzalez-Perez et *al*., 2018**).

2.3. Bactériocines de la classe III

Les bactériocines de la classe III sont des protéines de taille supérieure à 30 kDa sans modifications post-traductionnelles. Ceux-ci peuvent exercer un mécanisme d'action lytique et non-lytique. Contrairement aux bactériocines de classe I et II, celles de classe III sont thermolabiles (**Gonzalez-Perez et *al*., 2018**).

La structure et le mode d'action des bactériocines de la classe III se différent complètement des autres bactériocines produites par les bactéries lactiques. Cette classe renferme quatre bactériocines (**Nigotova et *al.*,2007**) : l'helveticin, l'enterolysinA, la zoocinA, la millericinB produites par *Lactobacillus helveticus, Spreptococcus zooepidemicus, Streptococcus milleri* (**Papagianni, 2003**).

2.4. Bactériocines de la classe IV

Les bactériocines de la classe IV sont plus complexes composées de protéines et portant une (ou plusieurs) composantes non-protéique, lipidique et/ou oligosaccharidique (**Klaenhammer, 1993**).

Ces bactériocines circulaires sont uniques parmi les autres bactériocines linéaires par leur cyclisation formée par la ligature de leur extrémité N-terminale à l'extrémité C- terminale via une liaison amide. Ils sont principalement synthétisés par voie ribosomique en tant que molécules linéaires puis cyclisées en post-traduction après le clivage du peptide leader. Ce peptide leader est considéré comme le pivot dans l'étape de cyclisation (**Fernandez et *al.*, 2008**). Ils ont un poids moléculaire de 5,5 à 7,5 kDa et une chaîne peptidique de 35 à 70 acides aminés. L'entérocine AS-48 isolée de *Enterococcus faecalis subsp* est la première bactériocine isolée de ce groupe qui a été purifiée et étudié de manière approfondie (**Galvez et *al.*, 1989**).

L'entérocine AS-48 est une protéine globulaire de 70 acides aminés composée de cinq α-hélices constituées d'acides aminés hydrophobes qui forme le noyau de la structure globulaire hautement hydrophobe. Cette hydrophobie du noyau joue un rôle crucial en s'insérant dans les régions hydrophobes de la bicouche lipidique de la cellule membrane et déclenche son activité antimicrobienne par cette membrane action (**Sanchez-Barrena et *al.*, 2003**).

Ces bactériocines sont reclassées comme des bactériolysines qui sont des polypeptides hydrolytiques ; ramenant la classification des bactériocines à trois classes, basées sur des caractéristiques biochimiques et génétiques (**Güllüce et *al.*, 2013**).

3. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action spécifique des bactériocines n'est pas clair. En général, de nombreux sont supposés interagir avec la surface de la membrane bactérienne de leur hôte cible, principalement par des forces électrostatiques (**Kyriakou et *al*., 2016**).

Le mode d'action diffère d'un bactériocine à un autre, cependant, certaines bactériocines sont capables d'altérer la formation de la paroi cellulaire, compromettre la résistance de l'enveloppe cellulaire (**Bastos, 2015**), après liaison avec le récepteur spécifique de la cellule cible le lipide II, les bactériocines inhibent la synthèse du peptidoglycane et perturbant l'organisation de la couche lipidique de la membrane cytoplasmique pour former des pores (**Hanafya et *al*., 2016**). Et provoquent ainsi une fuite membranaire de composés intracellulaires vitaux de faible poids moléculaire telles que des protons, des ions potassium et des ions phosphate, entrainant des effets néfastes sur la cellule cible, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire (**Sharon Edith et *al*., 2017**).

Une fois à l'intérieur des cellules cibles, ces molécules peuvent se lier aux acides nucléiques pour empêcher l'expression des gènes et interrompre la biosynthèse cellulaire (**González-Pérez et *al*., 2018**).

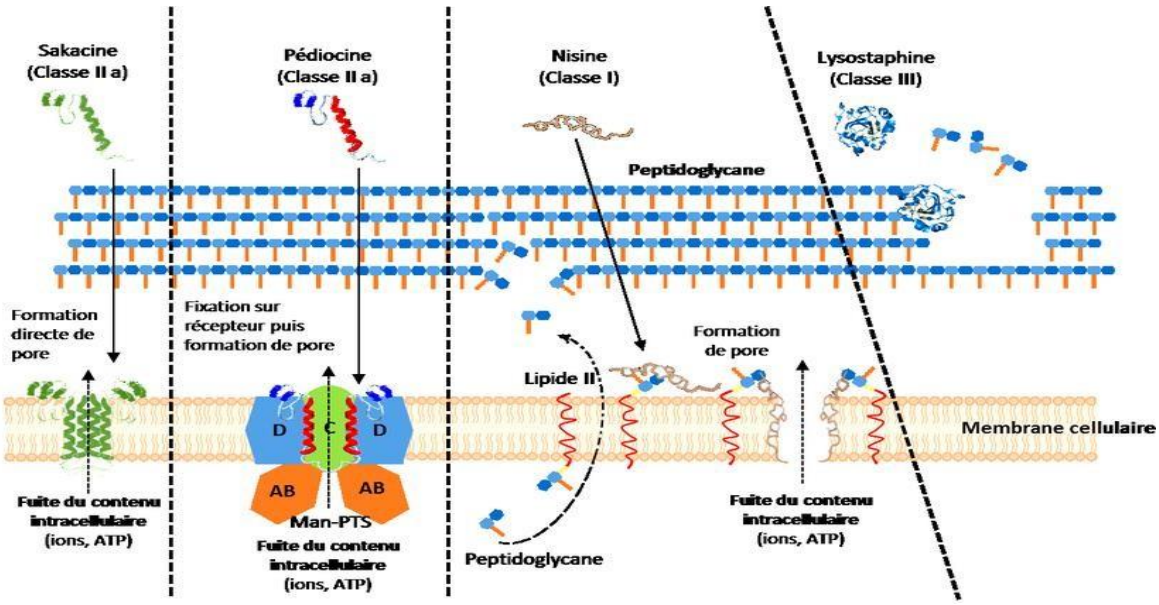


Figure 5: le mécanisme d'action des bactériocines (**Fernandez, 2014**).

Généralement, les bactériocines des bactéries lactiques inhibent des bactéries Gram positives phylogénétiquement proches, cependant certains travaux ont montré que certaines bactériocines ont aussi une activité contre des bactéries Gram négatives telles que *Escherichia coli, Salmonella typhimurium* et même contre des espèces de *Campylobacter jejuni* (**Gong et *al.*, 2010 ; Svetoch et Stern, 2010**).

Par ailleurs, les bactériocines n'agissent pas de la même manière contre les espèces cibles, en effet, des chercheurs ont montré l'affinité des bactériocines pour des espèces et des souches spécifiques.

De plus, la composition de la paroi en phospholipides et le pH influencent les concentrations minimales inhibitrices de chaque bactériocine (**Chen et *al.*,1997**). Aussi, l'état physiologique de la bactérie productrice et les conditions expérimentales notamment, la concentration et la pureté de la bactériocine, la concentration de la cellule cible et le milieu de culture, peuvent influencer l'action des bactériocine (**Jasniewski,2008**).

La combinaison de plusieurs bactériocines permet d'augmenter leur activité et leur spectre d'action (**Dortu et Thonart, 2009**), de la même manière, la combinaison de bactériocines avec d'autres molécules tel que les agents chélateurs permet d'augmenter son action (**Bover-Cid et *al.*,2008**).

Tableau IV: Exemples de bactériocines selon leur classification, leurs espèces productrices et leur spectre d'activité

Bactériocines	Genre de la bactérie productrice	Spectre d'activité
Classe I		
Acidocine J1132	Lactobacillus	*Listeria innocua, S. aureus,*
Lactacine	Lactobacillus acidophilus	*Enterococcus, Lactobacillus, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Escherichia coli et Clostridium perfringens Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, L. monocytogenes, L. innocua, , Bacillus spp et Clostridium spp.*
Nisine	Lactococcus lactis.	*Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Listeria, Staphylococcus spp, Inhibe la croissance de Bacillus spp et Clostridium spp et leur spores.*
Classe Iia		
Acidocine	Lactobacillus acidophilus	*Enterococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Listeria . monocytogenes.*
Curvacine A	Lactobacillus. curvatus	*Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus, Streptococcus, L. monocytogenes et L. innocua.*
Entérocine A	Enterococcus faecium	*Enterococcus, Pediococcus, Lactobacillus, L. monocytogenes et L. innocua.*
Mesentéricine Y105	Leuconostoc mesenteroides	*Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, L. monocytogenes, L. innocua et L. ivanovii*
Pediocine PA-1	Pediococcus acidilactici	*Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Carnobacterium, Pediococcus, Streptococcus, L. monocytogenes, L. innocua, L. ivanovii, Staphylococcus spp, B. cereus et Clostridium spp.*

4. Domaines d'applications

Les bactériocines sont habituellement reconnues comme garanties, sont sensibles aux protéases digestives et ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes (**Wijaya et *al.*, 2006**). Elles ont une grande tolérance aux variations de pH et aux traitements thermiques. Leur spectre antimicrobien peut être large ou étroit, elles peuvent donc cibler sélectivement des bactéries pathogènes ou altérantes sans inhiber les bactéries indispensables et ont un mode d'action bactéricide (**Gálvez et *al.*, 2007**). Les bactériocines doivent cependant être considérées comme un moyen de préservation complémentaire à ceux déjà existant (**Deegan *et al.*, 2006**).

4.1. Typage bactérien

Le pouvoir inhibiteurs des bactériocines de certaines souches pathogènes est largement utilisé dans l'identification d'espèces de différents genres bactériens. La plupart des méthodes sont basées sur l'inhibition de la souche témoins de l'activité inhibitrice. Cependant, l'utilisation des bactériocines a permis de différencier les souches de Shigella (**Pitt et Gaston1995;Merino et *al.*,2000**).

4.2. Domaine alimentaire

L'utilisation des bactériocines dans le domaine alimentaire est due à leur large spectre d'activité, la non toxicité et leur dérivabilités par les enzymes digestives (**Ryan et *al.*,1998**). Du fait qu'elles sont des substances naturelles, l'emploi des bactériocines a permis d'avoir des produits plus sains et réduirait l'utilisation des agents chimiques de conservation (**Harlander,1993**).

Ces dernières années, l'application des bactériocines dans la technologie a gagné une grande attention. En effet, de nombreuses bactériocines ont montré leurs effets synergiques ou même additionnels lors de leur utilisation en combinaison avec d'autres agents antimicrobiens, incluant des agents conservateurs chimiques, des composés phénoliques naturels (**Grande et *al.*,2007**).

Ces molécules bioactives sont incorporées dans les aliments soit directement sous forme purifiée ou semi- purifiée (nisine) ou sous forme de concentré (pédiocine) soit indirectement en appliquant la souche productrice dans le produit alimentaire (production in situ), comme elles peuvent être immobilisées par encapsulation ou adsorption. A l'heure

actuelle, seule la nisine est acceptée comme additif alimentaire (**Ghalfi et *al.*, 2006 ; Dortu et Thonart, 2009**).

L'utilisation de la technologie des barrières *Hurdle Technology* qui consiste en une combinaison de bactériocines avec d'autres méthodes de conservation des aliments a donné des résultats prometteurs (**Milles et *al.*, 2011**). La combinaison des bactériocines avec des traitements physiques, tels que le traitement à haute pression et dans un champ électrique, offre une conservation plus efficace des produits alimentaires, fournissant ainsi une barrière complémentaire aux formes les plus résistantes telles que les endospores bactériennes (**Galvarez et *al.*,2007**).

4.3. Domaine médical

Les bactériocines servent aussi comme agents de thérapie naturelle. Les recherches s'intensifient en direction de substances dotées d'activités antibactériennes capables d'aider à la lutte contre les souches multi-résistantes. A ce titre, les bactériocines produites par les bactéries lactiques semblent être des molécules de choix (**Nettles et Barefoot, 1993**). Leur activité antimicrobienne importante in vitro et in vivo, la variété de spectres d'activité qu'elles offrent, leur faible toxicité, et la capacité de certains probiotiques à en produire in vivo chez l'homme font que ces peptides antimicrobiens peuvent constituer une alternative aux antibiotiques (**Cotter et *al.*, 2013**).

Les bactériocines de la classe IIa présentent un groupe important de peptides antimicrobiens qui peuvent être utilisés en médecine avec les antibiotiques dans le traitement des maladies infectieuses ou comme des agents antiviraux. Ces molécules ont une activité inhibitrice contre les bactéries à Gram positif nuisibles et pathogènes comme *Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus et Listeria monocytogenes* (**Drideret *al* .,2006**).

Les souches de *staphylococcus aureus* multi-résistantes à la méthicilline (SARM) constituent depuis longtemps un problème majeur, en raison d'infections nosocomiales cutanées (**Taylor et *al.*, 1992**). Or, plusieurs bactériocines ont montré des effets bactéricides contre ces SARM, notamment, la lacticine 3147 (**Galvin et *al.*, 1999**) et la mersacidine (**Sass et *al.*, 2008**). Il s'agit là d'une voie de recherche prometteuse, bien qu'une récente étude ait démontré que les *staphylocoques* ont pu développer des mécanismes de résistance pour échapper à l'activité bactéricide de ces peptides antimicrobiens **(Joo et Otto, 2015**).

Une autre étude a permet de prévenir le développement de *listériose* chez des patients à risque, par l'administration d'un probiotique, *L.salivarius* UCC118, produisant la bactériocine UCC118 de classe IIb (**Cotter et *al.*, 2013**).

L'épidermine produite par *Staphylococcus epidermidis* est active vis-à-vis de *Propioni bacterium acnes,* germe responsable de l'acné (**Allgaier *et al.*,1986**), c'est un lantibiotique qui est utilisé dans la thérapie pour remplacer l'usage habituel de l'érythromycine et de la vitamine A. Cette application a montré plusieurs avantages tels que l'absence de résistance aux lantibiotiques et leur faible coût de production par rapport aux antibiotiques.

Xie et *al*. (2011) ont rapporté que le Koumiss (produit chinois à base de lait fermenté) est efficace dans le traitement de la tuberculose et des maladies cardiovasculaires et contribue à l'amélioration de l'immunité, et que ces propriétés sont attribuées aux bactériocines produites par les bactéries lactiques indigènes.

Tong et *al.* (2010) ont démontré que la nisine participe dans la prévention et le traitement des caries dentaires en inhibant les microorganismes en cause. La nisine est aussi utilisée dans le traitement des ulcères gastriques vu sa stabilité aux pH acides et son activité contre *Helicobacter pylori.* Les bactériocines LA-1, YIT9029 et DCE471 produites par *Lb. johnsonii, Lb. caseiet Lb. Amylovorus* respectivement manifestent également une activité inhibitrice contre *Helicobacter pylori* (**Smaoui, 2010**).

4.4. Domaine vétérinaire

L'utilisation des antibiotiques chez les animaux de consommation comme promoteurs de croissance dans les élevages ou encore en prévention des maladies contribue au développement de résistance (**Oliver, 2011**). Les Antibiotiques avec un très large spectre d'action, peuvent agir sur la moitié de la flore naturelle trouvée dans le rumen des bovins alors que les bactériocines sont par contre extrêmement spécifiques, ce qui permet, par exemple, de cibler seulement les bactéries qui dégradent des protéines alimentaires ou seulement celles qui produisent du méthane. Un autre avantage qui s'ajoute, tient au fait que les bactériocines sont des protéines non toxiques qui se digèrent facilement. Comme elles sont digérées par l'animal, il n'y a aucun risque qu'il reste des résidus dans la viande ou le lait. Par contre, les antibiotiques classiques ne sont pas digestibles, sont très toxiques et doivent être manipulés et administrés avec précaution. (**Philipps et coll. 2004**).

Plusieurs études ont démontré l'utilisation potentielle des bactéries probiotiques productrices des bactériocine comme des additifs dans les aliments des animaux.

4.5. Domaine agricole

La protection des plantes contre les microorganismes phytopathogènes ainsi que la préservation des semences, sont les objectifs de l'exploitation des bactériocines en agriculture. Dans ce cas, des substances antibactériennes et substances antifongiques seront associées afin de lutter contre les ravageurs phytopathogènes. Plusieurs travaux scientifiques, montrent les effets bénéfiques des souches bactériocinogéniques sur la croissance et la protection des plantes contre les agents phytopathogènes. **Hafeez et *al.*, (2005)**, montrent que la souche *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae LC-31 produise une bactériocine qui joue un rôle important dans la compétition interspécifique et intraspécifique et qui est très important pour la préparation des biofertilisants.

D'autre part, **Hammami et *al.*, (2009**), montrent que la souche *Bacillus subtilis* 14 B et leur bactériocine peuvent réduire le pourcentage d'infection des plantes par *Agrobacterium tumefaciens*. **Jung et *al.*, (2011**), ont démontré que les bactériocine de classeIId (thuricin 17 et bacthuricin F4), purifies à partir des souches *Bacillus* sont capables d'induire les enzymes reliées au système de défense chez le soya. De même, **Panda et *al.*, (2014)**, indiquent que les bactéries appartenant au genre *Brevibacillus* sont capables de synthétiser des bactériocines et elles peuvent être de bon candidats de lutte biologique.

Le genre *Streptomyces* a fait l'objet de nombreuses recherches comme antagoniste en vue d'une éventuelle utilisation comme agent de contrôle biologique de certaines maladies phytopathogènes. En effet, plusieurs espèces de *Streptomyces* ont été utilisés comme des agents de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes (**Gnanamangai et Ponmurugan, 2012; Bubici et *al.*, 2013**).

Depuis quelques années la protection biologique connaît un regain d'intérêt, La lutte biologique contre les microorganismes phytopathogènes en utilisant des microorganismes antagonistes s'est déjà révélée comme une alternative aux fongicides de synthèse. En effet, des résultats très encourageants ont été rapportés par plusieurs auteurs (**Saraf et *al.*, 2011; Liu et *al.*, 2014**).

5. Diversité des bactéries productrices des bactériocines

Les bactéries lactiques sont capables de synthétiser une grande variété d'agents inhibiteurs dont les cibles peuvent être différentes Le pouvoir antimicrobien de ces

Microorganismes, est l'une des propriétés technologiques les plus recherchées en industrie alimentaire, médicale (pharmaceutique) et agricole. Ces activités antimicrobiennes sont essentielles à l'innocuité et à la conservation des aliments fermentés, (**Klaenhammer et *al*., 1994**).

Tableau V: Les bactéries lactiques productrices de bactériocines et les aliments fermentés associés (**Settanni et Corsetti, 2008**).

Souche productrice	Bactériocine	Source	Références
***Enterococcus feacalis* T33**	Bactériocine T33 et 4	Sorgho(blé égyptien)	Hartnett *et al.* (2002)
***Enterococcus faecium* BFE900**	Enterocine 900	Olives noirs	Frank *et al.* (1996)
***Lactobacillus amylovorus* DCE 471**	Amylovorine L471	Liqueur de maïs Frais	De Vuyst *et al.* (1996)
***Lactobacillus plantarum* LPCO10**	Plantaricine S et T	Olives verts	Jiminez-Diaz *et al.* (1993)
***Lactobacillus plantarum* KF66**	Bactériocine KF66	Jus de pamplemousse	Kelly *et al.* (1996)
***Lactobacillus plantarum* 423**	Plantaricine 423	Bière de Sorgho	Van Reenen *et al.* (1998)
***Lactobacillus plantarum* ST194BZ**	Bactériocines ST194BZ(a) et ST194BZ(b)	Boza	Todorov et dicks, (2005)
***Lactococcus lactis* subsp *cremoris* R**	Lactococcine R	Radis	Yildirim et Johnson, (1998)
***Lactococcus lactis* BH5**	Lactacine BH5	Kimchi	Hur *et al.* (2000)
***Lactococcus lactis* subsp *lactis* M30**	Nisine Z	Germes de Haricots	Cai *et al.* (1997)
***Lactococcus lactis* KF30 et KF31**	Lactacine 3147	Orge	Settanni *et al.* (2005)
***Lactococcus lactis* subsp *lactis* LJH80 et NCK400**	Nisine	Choucroute	Harris *et al.* (1992)

Les bactéries Gram positif (*Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus, Streptococcus)* et les bactéries Gram négatif (*Escherichia coli, Serratia, Klebsiella*) synthétisent des bactériocines (**Cintas et *al.* 1998 ; Nes et *al.* 2007 ; Oppergård et *al.* 2007**) qui sont des peptides antimicrobiens, passant par des modifications post-traductionnelles ou non et qui sont immunisées contre leur propre production (**Rea et *al.* 2011**).

Les bactériocines produites par les Gram négatif (colicines et microcines) possèdent un spectre d'activité plus étroit que celles produites par les bactéries à Gram positif. Le plus souvent, le producteur et les souches sensibles appartiennent à la même famille ou à la même espèce ; (**Šmarda et Šmajs 1998**) elles diffèrent entre elles par leurs structures et leurs modes d'action (**Makhloufi 2011**).

Mokdad et coll. (2020) ont rapporté que *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* a montré une importante activité inhibitrice vis-àvis de *L.monocytogenes, L.innocua, L.ivanovii, S.aureus, B.thermosphacta, M. luteus, L. sakei, E. coli, P. aeruginosa*.

Matériel et Méthodes

I. Matériel

1. Matériel non biologique

Durant notre stage de fin d'étude nous avons utilisé des appareils (Annexe 1), des milieux de culture (Annexe 2) et des solutions (Annexe 3).

2. Matériel biologique

2.1.Bacillus spp

Pour la réalisation de notre étude nous avons utilisé des souches qui ont été isolé à partir d'un sol rhizosphérique des plantules d'orge commun cultivé *Ex situ* dans les conditions de salinité (200 mM de NaCl) au niveau du laboratoire de Biologie moléculaire- Université de recherche de Wageningen-Pays Bas sous des conditions de température et d'humidité similaire aux conditions de la région d'El Ménéa. Les 7 souches sélectionnées appartenant au genre *Bacillus* et qui ont été identifié sur le plan génomique à l'aide du séquençage de l'ARN16S (TableauVI. Identité des isolats).

Tableau VI. Taxonomie des sept isolats du *Bacillus.*

Code	Emplacement	Identité
1	A71	*Bacillus safensis*
2	A68	*Bacillus zhangzhouensis*
3	A67	*Bacillus pumilus*
4	A69	*Bacillus toyonensis*
5	B17	*Bacillus velezensis*
6	A51	*Bacillus siamensis*
7	B29	*Bacillus tropicus*

2.2. Rhizosphère

Le sol rhizosphérique que nous avons utilisé pour l'isolement des *Acinetobacter* a été obtenu à partir des racines des plantes de la luzerne (*Medicago sativa* L.) Cultivés au niveau de la station de recherche de la FSB-USTHB ((30°37'00.8"N, 2°52'47.0"E), W.El Menia-Algérie.

Les racines collectées ont été coupées et placées dans des tubes Corning contenant 25 ml d'une solution tampon phosphate additionné de 200ul.L^{-1} de Silwet L77. Après transfert des racines le sol en suspension est considéré comme sol rhizosphérique. 1 ml de cette suspension a été transféré dans des cryotubes contenant 1 mL de glycérol 80%, et puis conservé à une température de -20°C pour les isolements des communautés bactériennes cultivables.

II. Méthodes

1. Caractérisation des isolats *Bacillus spp*.

1.1. Revivification des isolats *Bacillus spp*

La revivification des isolats a été réalisée sur milieu de culture liquide TSB et mis à incubation pendant 48h à 25°C sous agitation (150rpm). Après formation du trouble, un ensemencement par stries a été réalisé sur TSA et puis incubé pendant 48h à 25°C.

1.2. Caractérisation physiologique

Pour une caractérisation physiologique de nos isolats, nous avons retenu un ensemble de critères, il s'agit de : Température, pH et la digestion enzymatique.

1.2.1. Température

Pour étudier l'effet de la température d'incubation sur la croissance de nos isolats, les cultures bactériennes ont été ensemencé par stries sur le milieu TSA et incubées pendant 24-48h à des températures différentes : 4°C, 10°C, 25°C, 50°C et 60°C.

1.2.2. pH

Afin de tester la capacité de nos isolats à se développer en milieu alcalin et / ou acide, le milieu TSA a été préparé puis ajusté par l'addition de HCl 1% et du KOH 1% pour obtenir une gamme de valeur de pH: 2, 4, 7,10 et 12.

1.2.3. Digestion enzymatique

La détermination de la nature de l'effet des agents responsables des activités antagonistes est effectué par l'étude de l'enzyme protéolytique « Pepsine » (40UI/mg). Le surnagent des souches sélectionnées antagoniste récupérer après centrifugation ont été ajoutés à l'enzyme à une concentration de 1mg/ml ajusté à une valeur de pH de 6.5. L'ensemble a été incubé à 37 °C pendant 1h sous agitation (150 rpm) puis la réaction enzymatique a été arrêté par une incubation à 65 °c pendant 10 min (**TenBri et al, ;1994**).

1.2.4. Antibiogramme

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée selon la méthode de diffusion en milieu gélosé. L'interprétation des résultats a été effectuée selon les recommandations du comité d'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Les disques antibiotiques qui ont été testés sont les suivants :

- FusidicAcid (10µg)
- Céfoxitine (30µg)
- Erythromycin (15 µg)
- Amoxicilline (25 µg)
- Ampicillin (µg10)
- Vancomycin (30 µg)

2. Isolement des bactéries du genre *Acinetobacter spp.*

2.1. Préparation des solutions mère

Afin de pouvoir isoler des bactéries appartenant au genre *Acinetobacter spp*. Une série des dilutions allant à 10^{-4} a été réalisé à partir de la suspension rhizosphérique (Stock glyécerol) des trois plantes. 50µl de chaque dilution ont été déposé sur des boîtes Pétri contenant le Hektoen, puis laisser à incuber pendant 24-48H et à 28±2°C. Le dénombrement de la microflore bactérienne totale a été réalisé après 24-48H d'incubation à 25°C, en multipliant le nombre des colonies comptées (x) par le facteur de dilution (1/d) et par l'inverse du volume ensemencé (V), selon la loi de Kass.

Le nombre total des bactéries (N) a été exprimé par $UFC.ml^{-1}$. Seules les colonies présentant une coloration verdâtre ont été choisies et une série de repiquages successifs a été effectuée suivant la méthode des stries d'épuisement jusqu'à l'obtention de cultures pures. L'ensemble des isolats pures obtenues à partir du sol rhizosphérique du l'orge ont été nommé par le code (OR) suivi d'un numéro.

3. Identification phénotypique

La détermination de l'identification des bactéries isolées comme étant appartenant au genre *Acinetobacter* a été réalisée à l'aide d'un ensemble des tests phénotypiques. Il s'agit de : la morphologie de la colonie sur différents milieux de culture (TSA -Mac Conkey- Hinton Miller – Hektoen et LB), la coloration de Gram, la motilité, les réactions d'oxydase et de catalase, le catabolisme des sucres (Glucose, fructose, arabinose), le test d'hémolyse, la thermorésistance et une identification biochimique à l'aide des galeries API 20E.

3.1. Identification morphologique

3.1.1. Observation coloniale

Les colonies qui ont été ensemencé par stries et puis obtenues sur les différents milieux solides (TSA -Mac Conkey- Hinton Miller – Hektoen et LB) ont été observées d'abord à l'œil nu. L'étude macroscopique permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification, elle est basée sur les éléments d'identification donnés par **Joffin et Leyral (2006**): la forme, la taille, l'opacité, l'élévation et l'aspect de contour et de surface

3.1.2. Observation cellulaire

L'observation à l'état frais permet d'explorer la mobilité des cellules bactériennes et le mode de groupement et de faire une approche de leur morphologie (**Bousseboua, 2002**). Une petite goutte d'eau physiologique stérile à été déposée au centre d'une lame stérile, puis une partie d'une colonie bactérienne jeune (18H) à été prélevée par l'anse flambée et dissociée dans la goutte, une lamelle stérile a été ensuite appliquée sur la goutte en évitantla formation des bulles d'air. L'observation microscopique a été réalisée à l'objectif X40 puis X100 (**Joffin et Leyral, 2005**).

L'identification morphologique des colonies à l'état fixé consiste à une observation microscopique après coloration de Gram (Danois Gram en 1884). La coloration de Gram est une coloration différentielle de base permet de distinguer deux grands groupes bactériens en fonction de la composition de leurs parois et de leurs affinités aux différents colorants : des bactéries à Gram positifs colorées en violette et Gram à négatifs en rose, et elle permet aussi de déterminer la forme, la taille, l'arrangement, la nature biochimique de la paroi des cellules bactériennes, la vérification de la pureté de l'isolat et permet de visualiser les endospores bactériennes, leurs formes et leurs positionnements.

3.2. Test catalase

La catalase est une enzyme antioxydante présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle empêche l'accumulation de l'eau oxygénée (H_2O_2) dans la cellule bactérienne dont l'action serait létale. Elle décompose l'eau oxygénée en eau et en oxygène selon la réaction : $H_2O_2 \rightarrow H_2O + ½\ O_2$.

Le test consiste à déposer sur une lame propre et sèche une goutte d'eau oxygénée, dans laquelle un petit prélèvement d'une colonie bactérienne jeune a été dissocié à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Un résultat positif se traduit par un dégagement immédiat des bulles de gaz (O_2) (**Meyer et *al.*, 2004**).

3.3. Test oxydase

L'oxydase ou cytochrome oxydase est une enzyme (phényléne diamine oxydase) présente dans certaines chaines respiratoires cytochromiques bactériennes. Le test consiste à mettre sur une boite de Pétri, un disque pré-imprégné d'un réactif incolore (la NN- diméthyl-paraphénylène diamine) et l'imbiber avec de l'eau physiologique stérile, ensuite une colonie jeune a été prélevée avec une pipette Pasteur bouclée, et déposée sur le disque.

Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette après quelques secondes (**Joffin et Leyral, 2006**).

3.4. Catabolisme des substrats carbonés

L'étude de l'utilisation des substrats carbonés comme seul source de carbone a été réalisé sur milieu minimum. Le substrat carboné (Glucose, Fructose, Arabinose) a été ajouté au milieu minimum avant autoclavage. Les isolats ont été ensemencés par stries et incubées à une température de 28°C pendant 48H. La lecture positive se manifeste par la croissance de l'isolat à la surface du milieu gélosé.

3.5. Mannitol mobilité

Le milieu de culture Mannitol-Mobilité a été utilisé pour l'identification présomptive des souches bactérienne est mise en œuvre pour l'étude de la fermentation du mannitol, la mobilité et la réduction du nitrate (enzyme respiratoire). Le test a été procédé par l'ensemencement de la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur par piqûre centrale, jusqu'au fond du tube de gélose. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 H.

La fermentation du mannitol se traduit par un virage de la couleur du milieu de culture au jaune et les bactéries mobiles envahissent le milieu de culture à partir du point d'ensemencement (**Merlet N. ;et *al* 2009**).

3.6. Thermorésistance

L'évaluation de la thermorésistance de nos isolats a été réalisée par ensemencement des isolats par stries sur milieu TSA puis incubés à une température de 44°C pendant 48h. La formation des colonies à la surface du milieu indique une thermorésistance de l'isolat.

3.7. Test hémolyse

La gélose au sang frais, comme son nom l'indique, est constituée d'une base nutritive non sélective à laquelle a été ajoutée 5% de sang frais. Elle convient à la culture de certaines bactéries exigeantes, et permet de mettre en évidence le pouvoir hémolytique de certaines bactéries. Le sang frais utilisé est, au préalable, défibriné pour éviter qu'il ne coagule. C'est presque exclusivement du sang de cheval ou de mouton.

Cette étude repose sur l'aspect du milieu autour des colonies, cet aspect dépend de 2 phénomènes :

- la lyse des hématies par les toxines bactériennes, Le milieu devient plus ou moins transparent. (Transparence totale dans le cas d'une hémolyse complète ou léger trouble dans le cas d'une hémolyse partielle)

-la digestion plus ou moins complète de l'hémoglobine libérée, La couleur du milieu dépendra du niveau de digestion de l'hémoglobine, il est (jaune clair) quand la digestion est complète et il présente une coloration verdâtre lorsque la digestion de l'hémoglobine est incomplète.

4. Identification biochimique

La galerie API 20 E est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires et non fastidieux (ex. *Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium, Moraxella, Vibrio, Aeromonas,* etc.), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

La première étape consiste à préparer la boite de la galerie par une répartition de 5ml de l'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Après on dépose stérilement la galerie dans la boite d'incubation. Ensuite, c'est la préparation de l'inoculum. Pour cette étape on prélève à l'aide d'une pipette pasteur 1 à 4 colonies de morphologie identique qui sont de cultures jeunes et on la verse dans 2 ml de l'eau distillée stérile. Après avoir homogénéisé notre suspension on passe au remplissage des tubes de la galerie (Fig. 7), pour les tests CTI et VP et GEL on remplit le tube et la cupule et pour les autres tests on remplit uniquement les tubes. Certains tests nécessitent l'anaérobiose (ADH, LCD, ODC, URE, H2S), pour créer cette dernière on remplit leur cupule avec de l'huile de paraffine. Au finale on ferme la boite d'incubation et on la place dans l'étuve a 37°C pendant 18 à 24 heures. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture, et l'identification est obtenue à l'aidedu catalogue analytique.

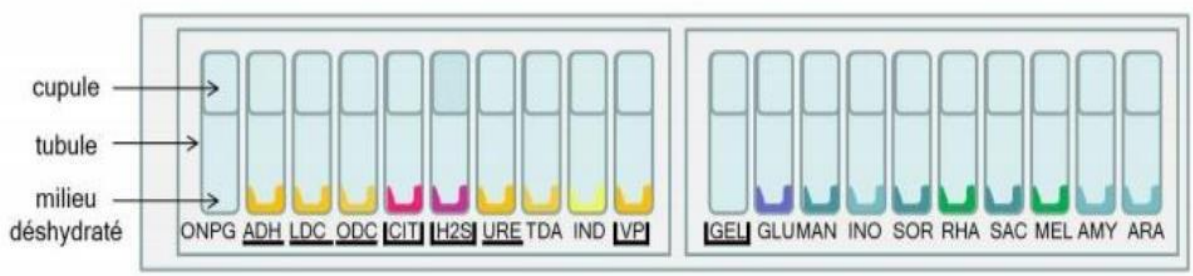


Figure 7: La galerie API 20 E

5. L'étude de la sensibilité des bactéries d'*Acinetobacter* aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques à été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé Mueller-Hinton selon les normes et les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie (CASFM, 2008). Des colonies bien isolées et parfaitement identiques d'une culture jeune (18H) ont été raclé à l'aide d'une anse de platine à partir d'un milieu d'isolement approprié, puis l'anse a été déchargé dans 5 à 10ml d'eau physiologique stérile, puis la suspension bactérienne a été homogénéisé au vortex. L'écouvillon déchargé de l'inoculum est frotté sur la totalité de la surface gélosée, en stries serrées en répétant l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60°C à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même puis l'ensemencement est finie par son passage sur la périphérie de la gélose. A l'aide d'une pince bactériologique

Stérile, les disques d'antibiotique (tab. VII) ont été pressés sur la gélose. Puis les boites ont été incubées à 37°C pendant 24H. Après la période d'incubation les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec précision et comparés avec des valeurs critiques.

Tableau VII Classification des antibiotiques utilisés pour l'étude de l'antibiogramme

Famille	Antibiotique	Symbole	Charge du disque µg
Fusidanines	Fusidic Acid	FC	10
Bêta-lactamines	Céfoxitine	CX	30
Macrolides	Erythromycine	E	15
Aminopénicilline	Amoxicilline	AMX	25
Aminopénicilline	Ampicilline	AMP	10
Glycopeptides	Vancomycine	VA	30

6. Mise en évidence de l'activité antagoniste

Le principe de l'activité antagoniste est basé sur la diffusion de l'agent antagoniste (antimicrobienne) dans des milieux liquides et solides pour inhiber la croissance des microorganismes pathogènes.

6.1. Test des spots

C'est une méthode réalisée sur milieu solide et qui permet la recherche d'antagoniste de plusieurs souches à la fois. La mise en évidence de l'activité antagoniste sur milieu solide soit directement (simultanément) ou indirectement (différée) et sur milieu liquide (Test de diffusion).

6.1.1. Test différé

Une culture jeune (18 h) des souches productrices a été ensemencée par spot sur la surface du milieu TSA 1/10, suivi par incubation pendant 8H à 30°C. Après incubation, une surcouche (5mL) d'une gélose molle (TSB+75%Agar) contenant des isolats d'Acinetobacter spp (10^7cellules/mL) est ajoutée à la surface. Une fois la gélose est solidifiée, les boites ont été incubées à 30°C pendant 24h.

Une activité positive se traduit par l'apparition des zones d'inhibition autour des colonies (**Mami et al.,2008 ; Riley et Chavan ;2007**).

6.1.2. Test direct

Dans une boite de Pétri, 0.1mL d'une culture jeune d'*Acinetobacter spp* (12-16h) a été coulée. Les boites ont été laissé à sécher. Par la suite, une culture jeune des isolats producteurs a été ensemencée en spot. Après incubation de 18h à 30 °C, la production de bactériocines a été révélé par la présence d'une zone claire autour de la culture des isolats productrices (**Riley et Chavan ;2007**).

6.1.3. Test de diffusion

Le test de diffusion permet l'étude de l'activité antagoniste des isolats producteurs en milieu liquide. Une suspension bactérienne des isolats producteurs a été réalisée par inoculation d'une jeune (18h) dans des milieux TSB. Après incubation à 30°C pendant 24h, une centrifugation à 10.000 tr/m pendant 10min à 4°C, le pH du surnageant a été ajusté (6- 8) avec du NaOH 5M. Le surnageant a été par la suite stérilisé par filtration (0.20 µm).

Le culot a été récupéré dans un volume (xxxµl) dans un tampon de lyse ou tampon de sonication (Annexe-Tris-HCl 50mM, pH7.EDTA1mM). La solution a été soniqué, puis centrifugé à 13.000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est récupéré.

Une surcouche de gélose molle (0.75% Agar) contenant la souche d'*Acinetobacter* (10^7 cellules.mL^{-1}) est coulée sur un milieu TSB. Des puits de 5 à 6 mm ont été réalisé en raison de 5 à 6 puits par boite, ont été creusés puis remplis par le filtrat surnageant préparé (50µl) puis ont été incubées à 4°C pendant 2h pour permettre une bonne diffusion du surnageant puis mise à incubation à 30°C pendant 24h.

La lecture de l'activité antagoniste se fait par mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du puit, exprimée en mm (**Puizani et *al*.,1992**).

7. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales

7.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antibiotique, en antifongique et /ou en principes composés actifs nécessaires pour inhiber la croissance d'un microorganisme (**Denis et *al*., 2011**).

La détermination de la CMI a été réalisée par la technique de microdilution en milieu liquide. Une colonie jeune de chaque isolat des *Acinetobacter spp*. a été ensemencée dans 10 ml de TSB et incubée pendant 24h à 30°C sous agitation (150 rpm) en vue d'obtenir les inocula. Des prises de 200µl de chaque inoculum ont été introduites respectivement dans 2 ml de chaque antibiotique dilué dans le TSB à différente concentrations (0%, 20%, ……100%). L'ensemble a été laissé incubée pendant 24h à 30°C sous agitation (150 rpm) (**Moroh et *al*., 2008**).

La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI à été effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance du microorganisme étudié. La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. Par conséquent c'est le premier tube où la valeur di sera égale à df (di = df).

$$S = \frac{d_f - d_i}{D_f - D_i} 100.$$

Le taux de survie du microorganisme sera mesuré au spectrophotomètre réglé à 560 nm comme suit :

Avec : -S : Taux de survie du microorganisme en %.

-df-di : différence de densité optique dans la solution phénolique ensemencée avant et après incubation à 37°C durant 18 heures.

-Df-Di : différence de densité optique sans extraits de Menthe avant et après incubation à 37°C durant 18 heures (**Kra et *al*., 2001 ; Zrihi et *al*., 2007**)

7.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide

La concentration minimale bactéricide (CMB) d'une espèce représente la plus petite concentration en antibiotique, en antifongique et /ou en principes composés actifs qui laisse 0,01% au moins de survivant de l'inoculum initial après incubation (**Moroh et *al.*, 2008**). On considère que si la CMB est ≤ à 4 CMI l'antibiotique est bactéricide et donc très efficace et au contraire si la CMB > à 10 CMI, on le considère comme peu efficace, donc bactériostatique.

Pour sa détermination, le tube témoin (inoculum) a été dilué à l'eau physiologique jusqu'à 10^{-4}. Cette dilution représente 0,01% de survie du microorganisme. Elle est ensemencée par strie de 5 cm sur une Gélose TSA puis incubée à 30°C pendant 24 h (Fig.8). Le nombre de colonies de bactéries obtenu sur la strie de la dilution 10^{-4} est comparé à celui de chaque tube expérimental contenant l'inoculum, également ensemencé sur le même milieu de culture en strie incubé à 30 °C durant 18 à 24 h. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de colonies présent sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10-4 correspondra à la CMB.

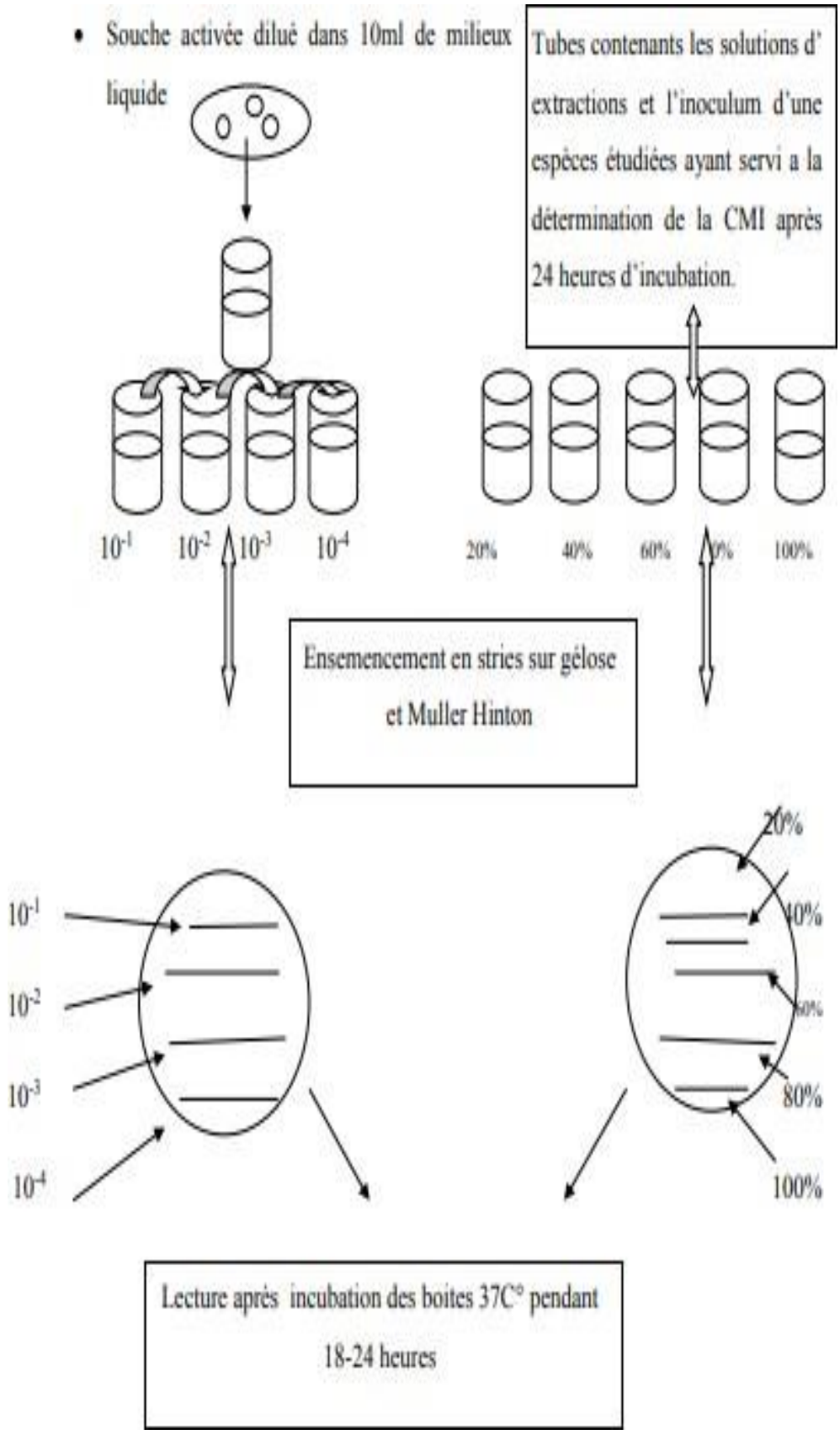


Figure 8: Méthode de la détermination de la CMB (Concentration minimales bactéricides) des espèces étudiées

8. Effet des paramètres environnementaux sur l'activité antagoniste

Effet du pH et la salinité ont été évalué sur la production des bactériocines. Les isolats producteurs de bactériocines ont été inoculés dans le TSB à différentes conditions de pH (5 et 8) et de salinité (100mM et 200 mM de NaCl) puis incubés à 25°C pendant 24h sous agitation (150 rpm).

Les suspensions bactériennes ont été testées pour leur activité antagoniste par le test de spot.

9. Purification et caractérisation des bactériocines

Pour la purification des bactériocines nous avons utilisé deux protocoles

9.1. Purification avec la méthode de dialyse

9.1.1. Préparation de l'extrait de culture

A partir d'une préculture de 5mL de la souche productrice, 200mL de TSB ont été ensemencé et incubé à 30°C pendant 18h en raison de 0.1%. Les cellules bactériennes ont été éliminées par centrifugation à 8000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le surnageant obtenu a été filtré sur une membrane de porosité de 0.45µm.

Le pH du filtrat obtenu a été ajusté à 5.5-6.5 avec une solution de NaOH 1M. La solution obtenue a été nommée « Fraction A » dont l'activité antagoniste a été quantifiée par le test de la dilution critique et le test de diffusion.

9.1.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

La précipitation est une méthode à la fois de purification et de concentration des bactériocines basées sur les précipitations par les sels minéraux (**Culter, 2004**).

Le sulfate d'ammonium 80% a été ajouté progressivement à la fraction A à 4°C et sous agitation douce. Après précipitation, le surnageant a été laissé sous agitation très douce à 4°C pendant une nuit.

9.2. Purification avec la méthode adsorption-désorption

Cette méthode de purification a été rapportée par **Yang et *al*. (1992**) basée sur la propriété d'adsorption des bactériocines au niveau de la paroi des cellules productrices. Le degré de cette adsorption dépend du pH. Ainsi, près de 93 à 100% des bactériocines sont adsorbées à des pH voisins de 6.0.

Le protocole de **Tulini et *al*., 2010**, garde le même principe, une amélioration a été apportée au fait que l'extraction se fait en 2 temps à partir de la même culture.

100 ml de culture lactique préparée à partir de 5 % de préculture préalablement réalisée depuis les isolats lactiques, suivant leurs conditions optimum de culture. Le pH de la culture a par la suite été ajusté à 6,0 et celle-ci réincubée. Le culot obtenu par centrifugation à 6000 rpm / 20 min est conservé et a été lavé deux fois avec un tampon phosphate à 5 mM pH 6,0, puis remis en suspension dans 50 ml d'une solution à pH 1,4 additionné d'un volume de 500 µl de surfactant le tween 80.

La suspension cellulaire a été centrifugée une seconde fois à 6000 rpm / 20 min, le surnageant est cette fois ci collecté. Le culot cellulaire restant a encore été ajouté au surnageant initial du bouillon de culture et l'extraction a une fois de plus été répétée de la même manière. Les surnageants obtenus après les extractions ont été combinés (**Tuliniet *al*., 2010)**.

9.3. Caractérisation

9.3.1. Activité antagoniste

L'activité antagoniste des bactériocines purifiées partiellement a été testée par le test de diffusion. Aussi, une détermination de la CMI a été réalisée selon les protocoles cités précédemment.

Résultats et Discussion

1. Caractérisation des *Bacillus spp.*

1.1. Vérification de la pureté des isolats

Les isolats revivifiés sur milieu TSA ont fait l'objet d'une vérification de leur pureté. Pour cela un ensemble de test a été réalisé, il s'agit de : L'aspect macroscopique des colonies, la coloration de Gram, la forme et le mode de regroupement, la formation des endospores et la sporulation.

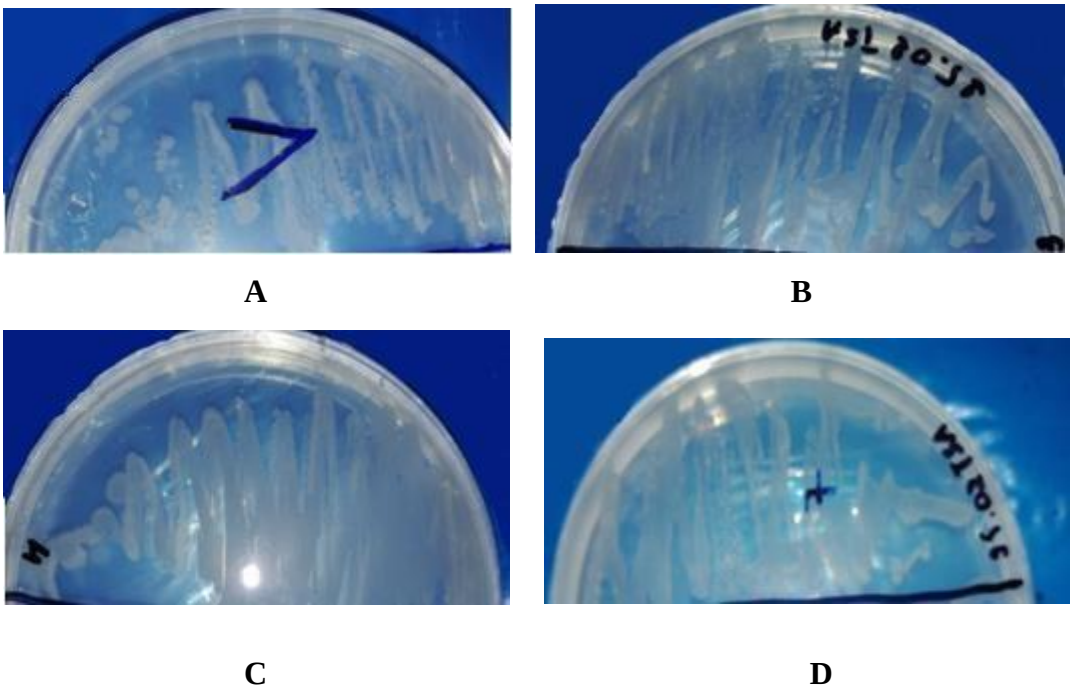
L'observation des caractères culturaux de nos sept isolats a été réalisée après culture sur TSA pour 24 h et à 25°C (Fig.9). L'allure de nos colonies bactériennes va du régulier à l'irrégulier et à élévation convexe, de couleur beige ou blanchâtre et ne montrent pas de pigmentation ou de fluorescence naturelle. Certaines colonies sont crémeuses alors que d'autres sont visqueuses, elles présentent un aspect lisse ou rugueux et une opacité variée entre opaque, transparente et translucide et qui peut avoir une relation avec l'excrétion de polysaccharides (**Bertin et *al*., 2013**).

L'examen microscopique a montré aussi que tous nos isolats sont des Gram positive (Fig.10) avec une forme de bacille et un mode de regroupement isolé, mais certaines ont présenté un mode de regroupement diplobacilles et / ou regroupés en courte chaine (Fig.11).

L'observation microscopique des cellules bactériennes a montré que les isolats possèdent des endospores (Fig.12) non déformantes en position centrale, subterminale ou terminale dans le corps bactérien.

L'ensemble de nos résultats et observations sont similaires avec celles décrites dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology et avec les travaux de **Wafula et *al.*, (2014**); **Demirkan et *al.*, (2014) et Mebarki et Benakli (2018**) qui ont montré que les souches du genre *Bacillus* ont une forme de bacille, Gram positif et forment des spores non déformantes.

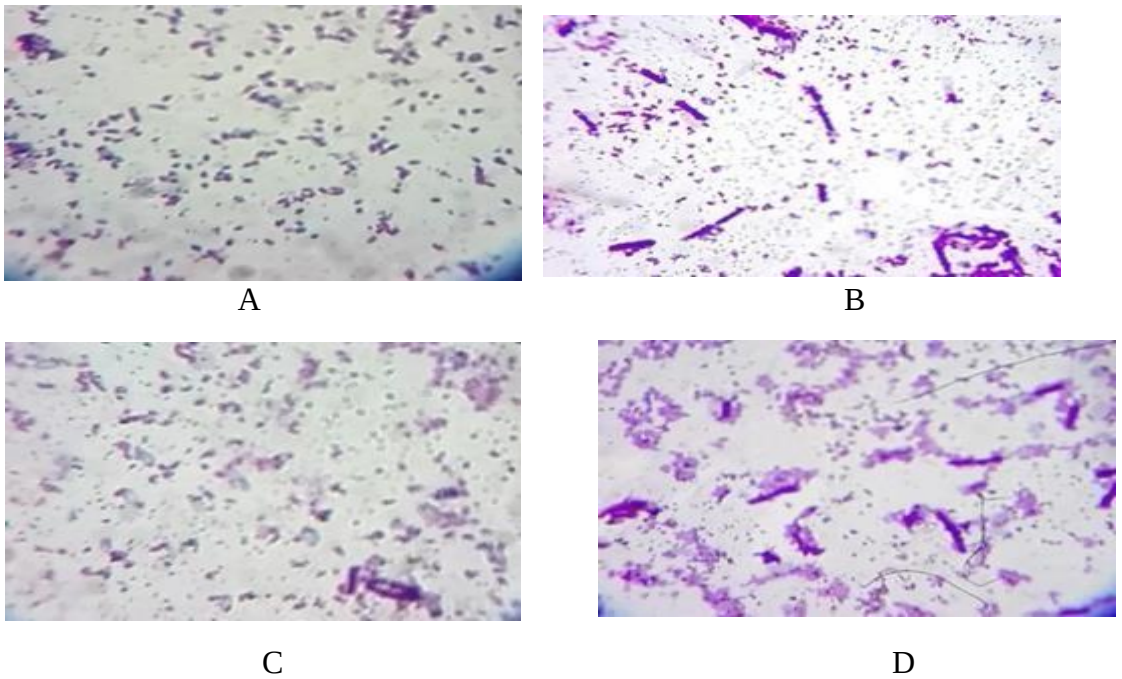
La prolifération sur milieu TSA de nos isolats après un traitement thermique de 80°C pendant 60 min nous a permis de dire que l'ensemble de ces isolats sont considérés comme étant des thermorésistants. D'après **Cazemier et *al.*, (2001**), la résistance aux fortes températures serait due à trois facteurs principaux, la déshydratation du protoplaste, la minéralisation et l'adaptation thermique. Les deux derniers facteurs induisant une augmentation de la déshydratation, c'est celle-ci qui serait à l'origine de la thermorésistance des spores (Sugiyama, 1951). La sporulation est une caractéristique principale des bactéries appartenant au genre *Bacillus* (**Vinter, 1987**).



A **B**

C **D**

Figure 09. Aspects morphologique des colonies (A) *Bacillus siamensis, (B) Bacillus pumilus, (c) zhangzhovenis, (D) Bacillus velezensis* cultive sur milieu TSA 1/10.



A B

C D

Figure 10 .Observation microscopique des souches (A) *Bacillus subtilis subspp* inquosor, (B) *Bacillus tropicus*, (c) *Bacillus velezensis*, (D) *Bacillus tynensis* a un grossissement x40 après coloration de gram.



A **B** **C**

Figure 11. Observation microscopique des endospores des isolats de *Bacillus spp* à un grossissement X100

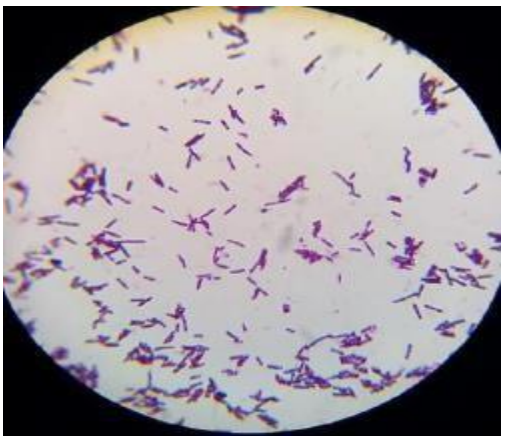


Figure 12. Observation microscopique des différents modes de regroupement des cellules des isolats de *Bacillus spp* à un grossissement X100.

1.2. Tolérance au pH

Le pH est l'un des facteurs d'influence évidents de l'activité microbienne et des populations dans le sol (**Woyessa et Assefa, 2011**).

L'effet de la variation de la gamme de pH (Fig.13) sur nos isolats a montré que toutes nos souches peuvent croître aux pH acide (2 et 4), pH neutre (7) et pH alcalin (10 et 12) à l'exception de *B.zhangzhovenis* qui n'a pas pu croitre à pH 12.

Cette capacité de croitre de nos isolats aux différents pH peut être expliquée par l'existence d'un bon potentiel de tolérer sur une plage de pH large. Cette particularité à été confirmée par les résultats des travaux de **Lugtenberg et *al* (2013**) sur la tolérance des espèces *Bacillus spp* et ce qui leur confère une adaptation aux différents types de sol.

L'intolérance de *B.zhangzhovenis à croitre à* pH=12 a été déjà signalée par les travaux de Yang Liu et *al* (2016) qui ont déterminé son pH optimal qui varie entre 6 et 9.

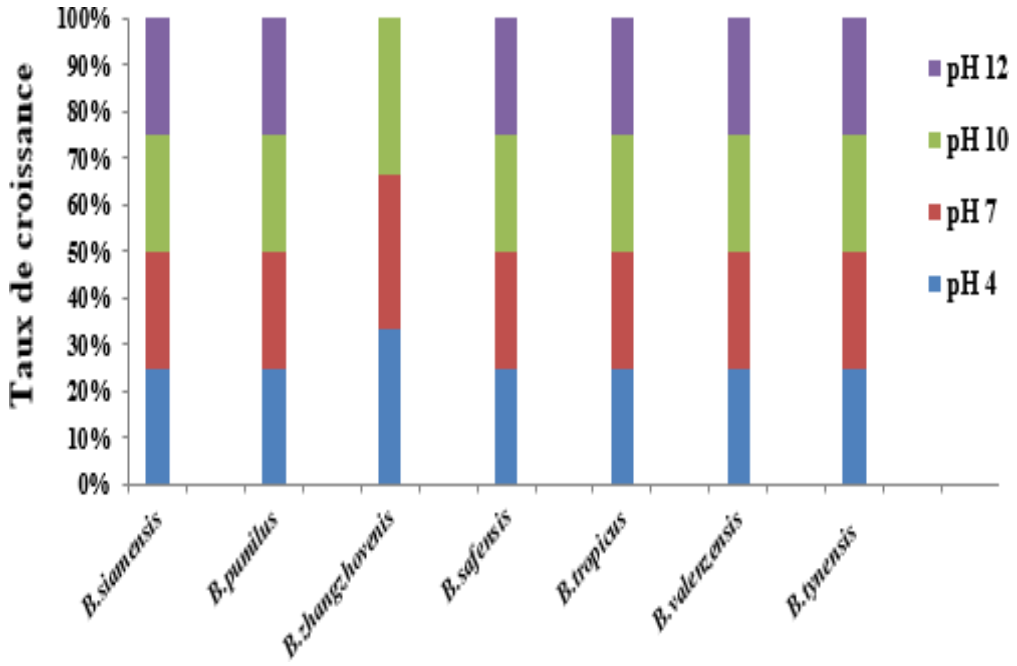


Figure 13. Tolérance des isolats de *Bacillus spp*. testés à différentes valeurs de pH

1.3. Tolérance aux températures

La variation de la température est un facteur important pouvant affecter l'équilibre hormonal des plantes (Lovley, 1995). Cependant, certains micro-organismes bénéfiques peuvent influencer la réponse des plantes aux stress abiotiques tels que la sécheresse et les températures élevées (**Grover et *al.*, 2011**). Par conséquent, la nécessité de découvrir des espèces capables de pousser dans des conditions extrêmes de haute température est importante pour les inclure dans le système de revégétalisation en zone aride.

Nos isolats ont donné un résultat positif dans une plage de températures allant de [4°C-60°C], à l'exception la souche *Bacillus pumilus* qui ne peut pas proliférer à 60°C(Fig.10). Ces souches peuvent être considérées comme des thermotolérants (**Sakali et Yamanami., 2006**). les travaux de **Praveen Kumar et *al.*, (2014)** ont démontré que la plupart des souches de *bacillus* spp. qui ont été isolée à partir des zones arides pouvaient tolérer les températures élevée (50°C). Cela pourrait être dû à leur capacité de former des endospores par *Bacillus spp*. **Yang L et *al* (2016)** ont montré que la souche *Bacillus pumilus* peut se développer à intervalle de température allant entre 8°C et 45°C.

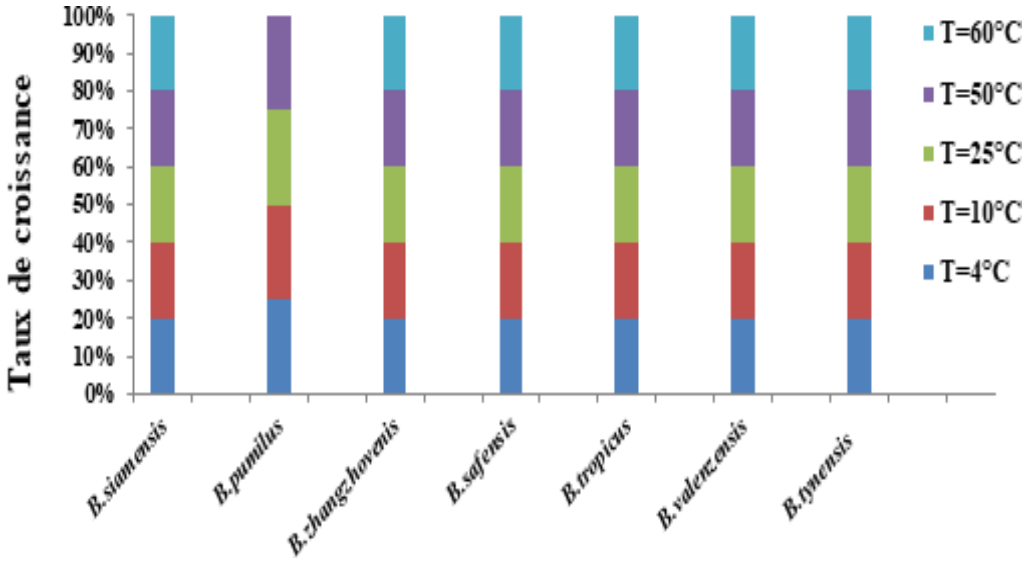


Figure 14. Tolérance des isolats de *Bacillus spp*. Testés à différentes températures

1.4. Digestion enzymatique

Avec 4 isolats *Bacillus* ajouté à des concentrations différentes de l'enzyme protéolytique « trypsine » , L'ensemble a été incubé à 37 °C pendant 1h sous agitation (150 rpm) puis la réaction enzymatique a été arrêté par une incubation à 60 °c pendant 10 min .

L'enzyme à faible concentration a un impact négatif sur la croissance de l'isolat 1(*Bacillus safensis*) avec l'augmentation de la concentration de l'enzyme la croissance tend vers zéro. La même chose a été noté avec l'isolat 2 *(Bacillus zhangzhouensis*) ,et 3 (*Bacillus pumilus)* ; Bien que l'enzyme à différentes concentration a un effet négatif sur la croissance de l'isolat 4 *(Bacillus toyonensis)* à des concentrations de 0.75mg/ml et 1mg/ml de l'enzyme trypsine nous avons noté une croissance de la bactérie

Tableau VIII. Effet de la trypsine à différentes concentration sur les 4 isolats *Bacillus*

	1	2	3	4
T 0	**0.569**	**0.718**	**0.790**	**0.565**
A (2.5mg)	**0.202**	**0.000**	**0.056**	**0.086**
B (0.5mg)	**0.000**	**0.134**	**0.075**	**0.007**
C (0.75mg)	**0.000**	**0.000**	**0.026**	**0.117**
D (1mg)	**0.000**	**0.000**	**0.000**	**0.153**

1 -2 -3-4 …… bactéries productrice bactrocine

A-B-C-D…… enzyme trypsine différent concentration

1.5. Antibiogramme

Le principe consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'une concentration connue d'antibiotiques sur une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. La résistance de nos isolats aux antibiotiques a été testée avec 06 antibiotiques de cinq familles différentes (Tabl.IX. Fusidic Acid de la famille des Fusidanines, Céfoxitine de la famille des Bêta-lactamines, Amoxicilline et Ampicilline de la famille des Aminopénicilline, Erythromycine de la famille des Macrolides et Vancomycine de la famille des Glycopeptides.

les résultats obtenus comme présenté dans le tableau IX ont montré que 4 isolats d'*Acinetobacter* obtenus à partir du sol rhizosphérique du alfa - alfa sur 36 isolats testés sont sensibles à la vancomycine et sont résistant aux 4 autre antibiotiques.

Tableau IX. Mise en évidence de La résistance des 4 isolats aux antibiotiques

	FusidicAcid (10µg)	**Céfoxitine (30µg)**	***Erythromycin (15 µg)***	***Amoxicilline (25 µg)***	***Ampicillin (µg10)***	***Vancomycin (30 µg)***
1	R	R	R	R	R	S 0.8
2	R	R	R	R	R	S 0.9
3	R	R	R	R	R	S 0.8
4	R	R	R	R	R	S 0.8

2. Collection et purification des bactéries du genre *Acinetobacter*

2.1. Dénombrement

Le dénombrement de la microflore totale des bactéries cultivable de la rhizosphère de la luzerne sur milieu TSA a été effectué après une incubation de 48h à 30°C. Nous avons pu dénombrer 286 colonies soit l'équivalent de $6*10^6$UFC.ml^{-1}(Fig. 15).

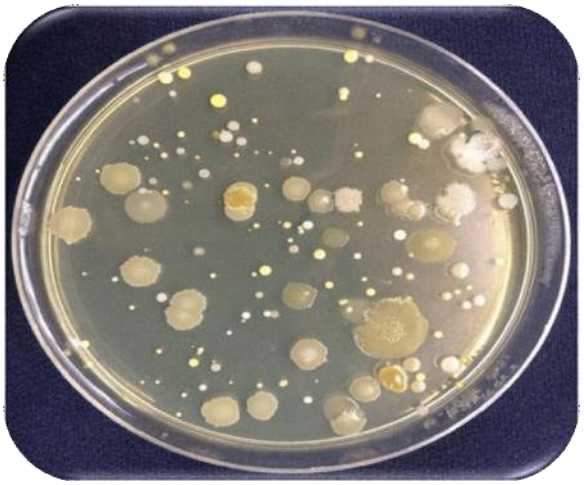


Figure 15 Aspect morphologique des colonies obtenues après ensemencement sur milieu TSA après 48h d'incubation à 30°C.

La densité bactérienne trouvée dans notre sol rhizosphérique est jugée comme étant faible par comparaison au nombre des communautés bactériennes cultivables dans 1 g de sol rhizosphérique qui peut arriver à 10^9 bactéries (**Hoorman et Islam, 2010**). Cette comparaison reste injuste car il faut prendre en considération un ensemble de facteur qui peuvent influencer la densité bactérienne d'un sol rhizosphérique tel que, le genre de la plante, la nature des rhizodépôts (**Badri *et al.*,2013**), la nature du sol, le climat de la région (**Karimi et *al.*, 2018**) et la communauté microbienne du sol (**Finnegan, 2005**).

2.2. Sélection des *Acinetobacter spp*

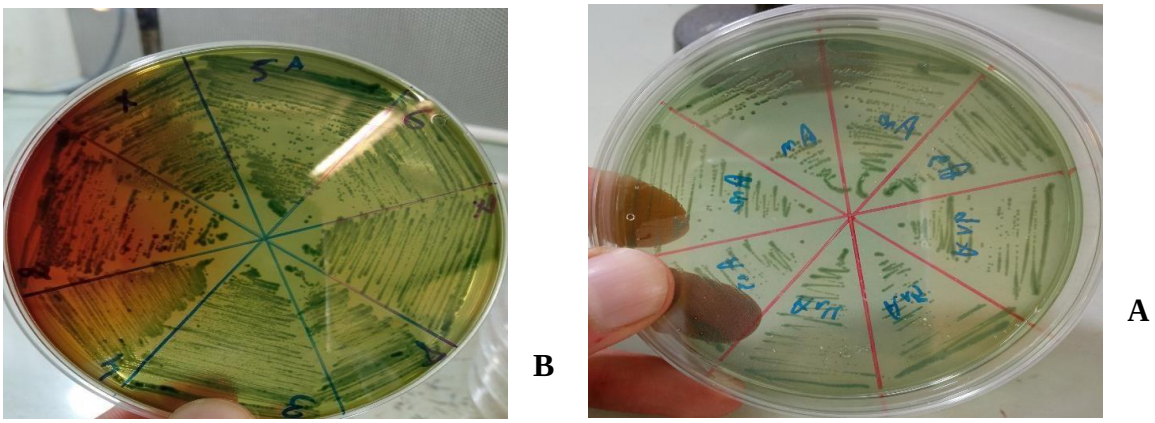
La sélection des bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* à partir de notre collection de souche a été réalisée en se basant sur six critères caractérisant ce genre, il s'agit de la couleur verte des colonies, de la réaction négative d'oxydase, la réaction positif au test catalase et pour la coloration de Gram, une forme coccobacilles avec une réaction négative, aussi la mobilité par le test d'examen des colonies à l'état frais

Tableau X. Résultats de la Caractérisation des isolats alfa – alfa rhizosphérique

	Gram	***mobilité***	***Forme***	***Regroupement***	***catalase***	***oxydase***
1	+	+	Bacille	En chaine	-	-
2	+	-	Cocci	En amas	+	+
3	-	-	Bacille	En chaine	-	+
4	-	-	Cocci	En chaine	++	-
5	-	-	Cocci	En amas	++	+
6	-	-	Cocci-bacille	En chaine	+	-
7	-	-	Cocci	En chaine	+++	+
8	-	-	Cocci-bacille	En chaine	+++	+
9	-	-	Cocci	En chaine	++	-
10	-	-	Cocci	En chaine	+	-
11	-	+	Cocci-bacille	En chaine	-	-
12	-	-	Cocci	En chaine	+	-
13	-	-	Cocci	En amas	++	-
14	-	+	Bacille	En amas	++	+
15	-	-	Cocci	En amas	+	-
16	-	-	Cocci-bacille	En amas	-	+
17	-	-	Bacille	En amas	+++	+
18	-	-	Bacille	En amas	+	+
19	-	-	Bacille	En chaine	+	-
20	-	-	Bacille	En chaine	+++	-
21	-	-	Bacille	En amas	++	+
22	-	-	Cocci	En chaine	++	+
23	-	-	Bacille	En chaine	+++	+
24	-	-	Bacille	En amas	+++	+
25	-	-	Bacille	En amas	+++	-
26	-	-	Cocci	En amas	++	-
27	-	+	Bacille	En chaine	+++	+
28	-	+	Bacille	En chaine	-	+
29	-	-	Cocci-bacille	En chaine	+	-
30	-	-	Cocci-bacille	En amas	+	-
31	+	-	Bacille	En chaine	-	-
32	-	-	Cocci-bacille	En amas	++	-
33	-	+	Cocci-bacille	En chaine	-	-
34	-	-	Cocci-bacille	En amas	+	-
35	-	-	Cocci	En amas	+	-
36	-	-	Bacille	En amas	+	-

2.2.1. Aspect morphologique des *Acinetobacter spp*

L'ensemble des colonies présentant une coloration verdâtre obtenues sur le milieu Hektoen ont été soumise à un repiquage successif sur le même milieu. Nous avons retenu 36 colonies (Fig. 16).



B **A**

Figure 16. Aspect macroscopique des colonies des bactéries sur Hektoen (A) et les isolats d'*Acinetobacter* après repiquage (A).(prise personnelle)

2.2.2. Catalase

Pour le test catalase, 29 isolats ont montré une réaction positive, traduite par la formation de bulbes après l'ajout de la suspension bactérienne à l'H2O2 (Fig. 17).



A B

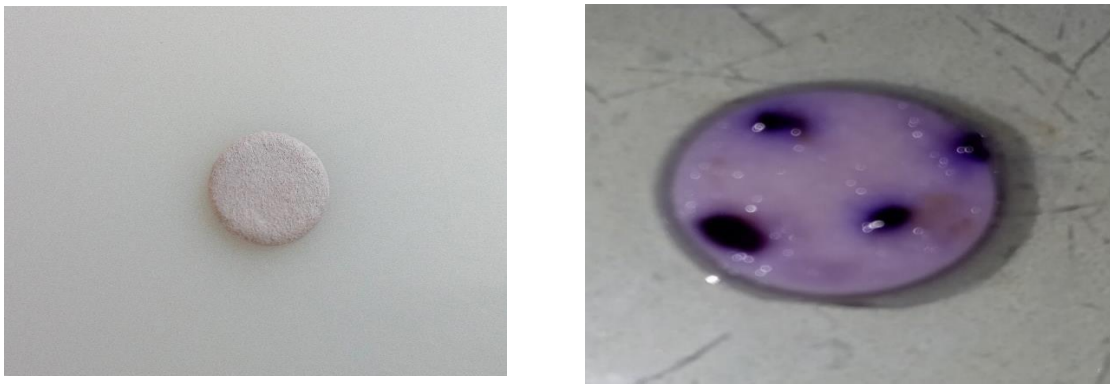
Figure 17. Mise en évidence de la réaction gazeuse catalysée par l'enzyme Catalase (A) catalase –, (B) catalase + (prise personnelle)

La catalase est une enzyme présente chez la plus part des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatifs. Elle décompose l'eau oxygénée formée, en eau et en dioxygène. Elle est considérée comme un moyen de survie dans les sols salins (Kim et al., 2005). D'après les travaux de Baumann et al. (1968) 100% des *Acinetobacters.spp* provenant des zones semi-aride et tropicale ont montré un résultat positif pour la catalase.

2.2.3. Oxydase

Les isolats qui ont montré une catalase positive ont été testés pour l'oxydase. Le test oxydase est considéré comme critère d'identification phénotypique clé pour les bactéries appartenant au genre *Acinetobact*er car elles sont toutes oxydases négatives, il permet de mettre en évidence la capacité d'une bactérie à produire le cytochrome oxydase, qui est une enzyme intervenant à la fin de la chaine respiratoire pour catalyser la fixation d'hydrogène et des électrons sur l'oxygène (**Joffin et Leyral,2006**).

Nos résultats ont montré que 21 isolats sont des oxydases négatives. La réponse négative est traduite par l'apparition d'une couleur jaune sur le disque d'oxydase (Fig. 18).



A **B**

Figure 18. Mise en évidence de l'enzyme cytochrome oxydase.
(A) Disque oxydase avec une réaction négative, (B) Disque oxydase avec une réaction positive.
(Prise personnelle)

2.2.4. Mobilité

La détermination de la mobilité de nos isolats à l'état frais a été confirmée par un ensemencement sur le milieu de culture mannitol-mobilité par piqure centrale.

Les résultats obtenus montrent que 30 isolats sur les 36 isolats testés sont immobiles et mannitol négative (Fig. 19).

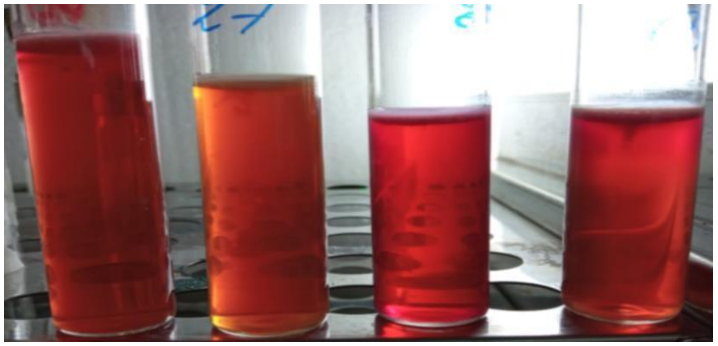


Figure 19. Mise en évidence de la mobilité des isolats avec fermentation du mannitol sur milieu Mobilité-Mannitol. (Prise personnelle)

La mobilité est un caractère très connue qui peut être utilisé comme un critère pour différencier les *Pseudomonas spp*. des Acinetobacter Spp, les deux groupes bactériens dominant sur le milieu Hektoen. En effet, l'immobilité est un caractère très connu chez les *Acinetobacter* (**Euzéby, 2004**).

Nos résultats sont conformes avec les études réalisées par **Brisou et coll (1954**) qui onttrouvé que la majorité de bactéries *Acinetobacter spp* sont mannitol négatif.

2.2.5. Observation cellulaire

Les observations microscopique réalisées sur des cellules à l'état frais à un grossissement X40 à partir des cultures jeunes (24h) ont montré que toutes 15 isolats sont des bacilles immobiles de tailles différentes et qui se trouvent isolés.

L'observation des cellules fixées et colorées par la technique de coloration de Gram (La technique de la coloration de Gram : **(annexe IV)** à des grossissements X40 et X100 à l'immersion (Fig. 20), nous a permis de constater que 09 isolats sont des coccobacilles à Gram négatif. Nos résultats sont similaires avec les travaux de description des bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* (**Baumann et al.,1968**).

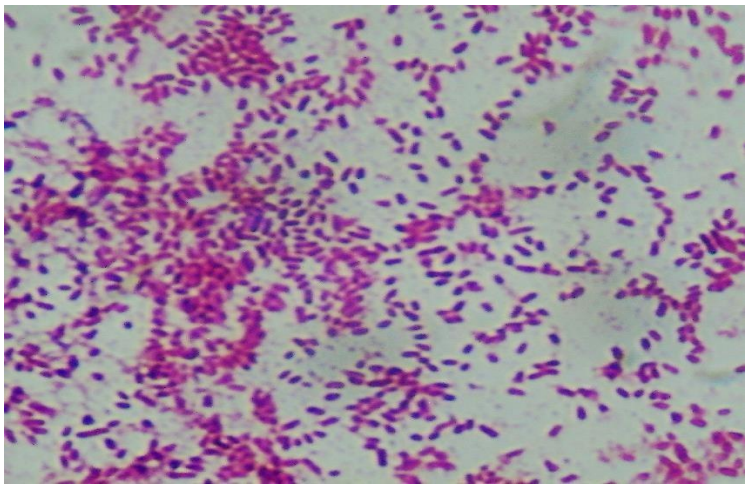
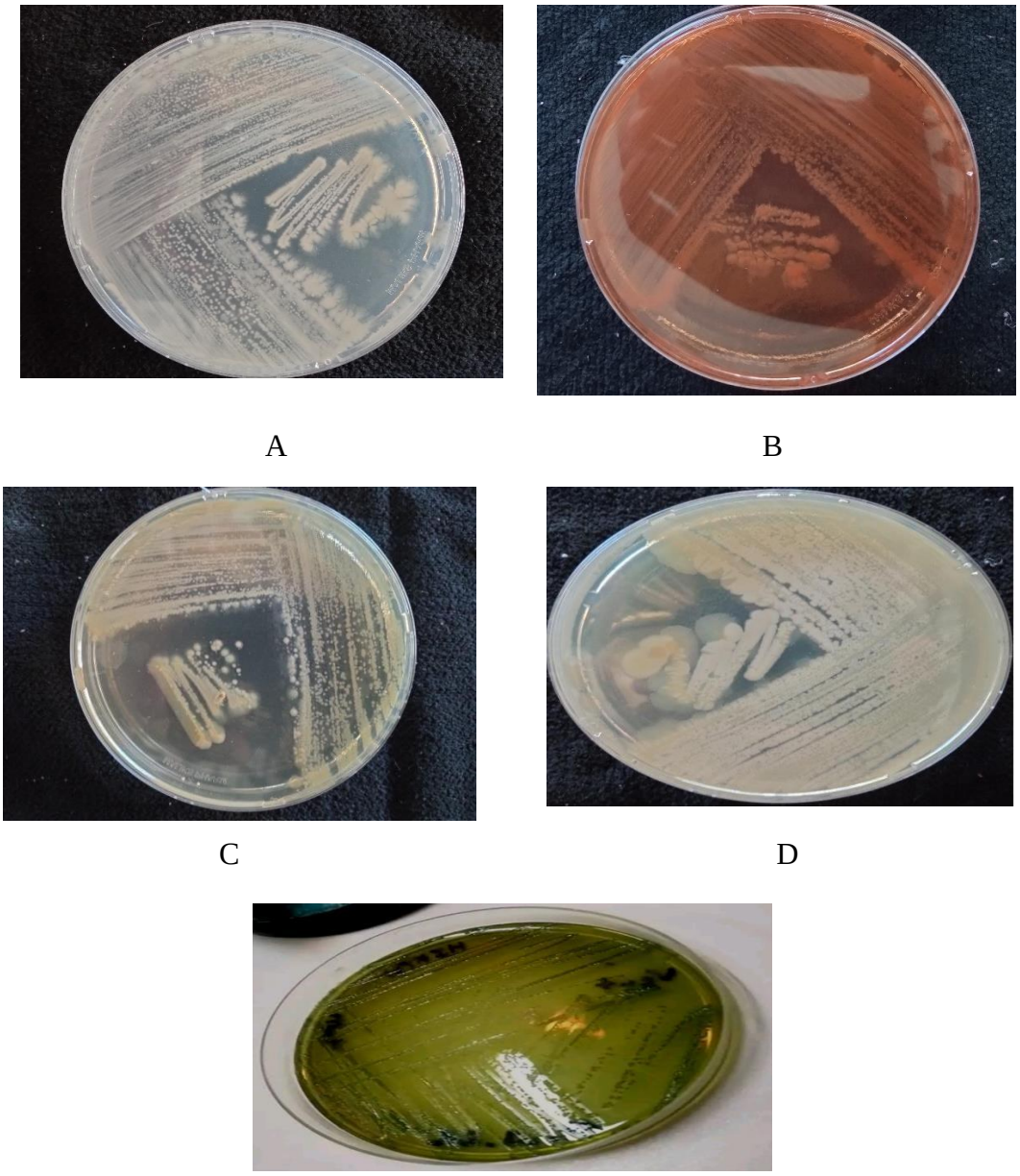


Figure 20. Observation microscopique à un grossissement X100 après la coloration de Gram.

2.2.6. Caractérisation morphologique

L'aspect macroscopique a été réalisé sur les isolats retenus comme étant appartenant au genre *Acinetobacter* selon les résultats des tests précédents.

L'observation à l'œil nu de l'aspect morphologique de nos isolats a été réalisé après une culture sur différents milieux de culture, il s'agit de : TSA -Mac Conkey- Miller Hinton – Hektoen et LB) et une incubation à 30°c pendant 24h (Fig. 21).



A B C D E

Figure 21 : Aspect macroscopique des colonies des bactéries du genre Acinetobacter sur (A) TSA ; (B) Mac Conkey ; (C) LB ; (D) milieu Hinton ; (E) Hektoen .

(Prise personnelle)

L'observation nous a permis de constater que les isolats se développe bien sur les milieux ordinaires (TSA) les colonies sont rondes, légèrement convexes, translucides lisses, de couleur blanc jaunâtre et d'aspect butyreux, à bord régulier, atteignant de 1 à 4 mm de diamètre en 24 heures à 30°C

Sur Hektoen les colonies d'*Acinetobacter* apparaissent petites, lisses, arrondies, circulaires, convexes ayant une coloration bleu-vert (absence de la fermentation du lactose) dégageant une odeur caractéristique.

Sur gélose au sang, les colonies apparaissent généralement non pigmentées, lisses ou muqueuses, opaques, de couleur blanche ou crémeuse, avec un diamètre de 1-2 mm après24h d'incubation à 30°C. Sur le milieu Leeds (LB) les colonies apparaissent rondes, plates brillantes et opaques à bord régulier de couleur roses.

2.2.7. Hémolyse

La culture sur une gélose au sang, les colonies présentent une coloration verdâtre lorsque la digestion de l'hémoglobine est incomplète (Fig. 22).

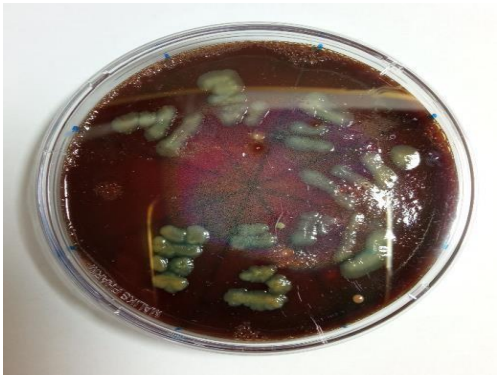


Figure 22 : culture d'*Acinetobacter* sur gélose au sang cuit.

Sur gélose au sang, les colonies apparaissent généralement non pigmentées, lisses ou muqueuses (lorsque la capsule est présente), opaques, de couleur blanche ou crémeuse, avec un diamètre de 1-2 mm après 18-24h d'incubation à 37°C. Par ailleurs, certaines espèces n'appartenant pas au complexe *A.calcoaceticus-A.baumannii* présentent un caractère hémolytique (**Bergogne-Bérézin, 2008**).

2.2.8. Fermentation des substrats carbonés

Les résultats de croissance de nos isolats d'*Acinetobacter* sur les différents substrats testés comme unique source de carbone, d'énergie sont présentés dans le tableau XI.

Les résultats obtenus ont montré qu'avec le glucose, arabinose et le fructose, les 36 isolats d'*Acinetobacter* ont été incapables de se croitre alors que lorsque le substrat est la caséine ou le tryptophane tous les isolats ont pu l'utiliser comme substrat de croissance.

L'utilisation des substrats comme seule source de carbone dépend d'un côté de la présence des enzymes de dégradation et de l'espèce d'un autre côté. En effet, Dans la « Approved List of Bacterial Names », la définition de bactéries comme étant des *Acinetobacters* est basée sur le fait que certains *Acinetobacter* peuvent acidifier le glucose tandis que d'autres non (**Peleg et *al*., 2008)**.

Tableau XI : Les résultats de croissance sur les différents substrats

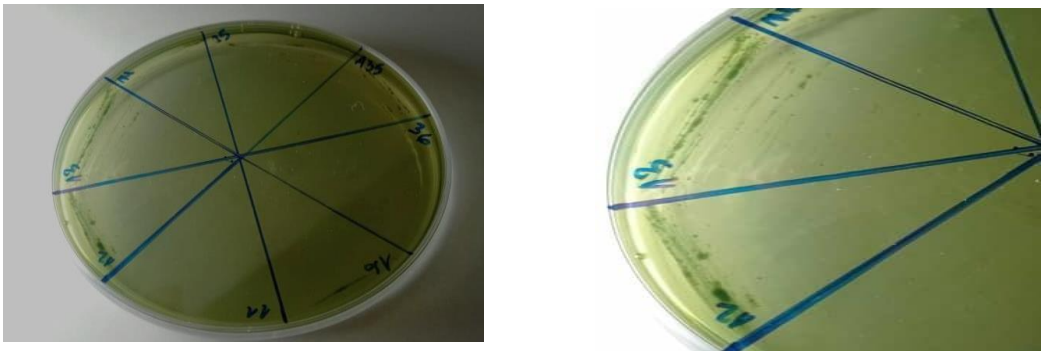
	fructose	***Glucose***	***arabinose***	***Milieu LB***	***Milieu caseine***
1	-	-	-	+	+
2	-	-	-	+	+
3	-	-	-	+	+
4	-	-	-	+	+
5	-	-	-	+	+
6	-	-	-	+	+
7	-	-	-	+	+
8	-	-	-	+	+
9	-	-	-	+	+
10	-	-	-	+	+
11	-	-	-	+	+
12	-	-	-	+	+
13	-	-	-	+	+
14	-	-	-	+	+
15	-	-	-	+	+
16	-	-	-	+	+
17	-	-	-	+	+
18	-	-	-	+	+
19	-	-	-	+	+
20	-	-	-	+	+
21	-	-	-	+	+
22	-	-	-	+	+
23	-	-	-	+	+
24	-	-	-	+	+
25	-	-	-	+	+
26	-	-	-	+	+
27	-	-	-	+	+
28	-	-	-	+	+

29	-	-	-	+	+
30	-	-	-	+	+
31	-	-	-	+	+
32	-	-	-	+	+
33	-	-	-	+	+
34	-	-	-	+	+
35	-	-	-	+	+
36	-	-	-	+	+

- Il y a une croissance + y'a pas de croissance

2.2.9. Thermorésistance

La température a une importance majeure dans le métabolisme et la croissance des microorganismes (**Berry ey Foegeding, 1997**). L'incubation de nos 36 isolats à une température de 44C° nous a permis de constater 5 isolats ont pu se développer à cette température (Fig.23).



A B

Figure 23 : Aspect morphologique des isolats incubés à température 44°C.
(Prise personnelle)

Pour une température de 44°C tous les isolats ont montré un taux de croissance élevé, donc ce sont des thermophiles (**Delarras, 2014**). Il a été trouvé que la croissance optimum d'*Acinetobacter johnsoniia* été obtenue à 40°C indiquant une meilleure adaptation du microorganisme à ces conditions. Les travaux de **Seifert et Dijkshoorn (2008**) ont montré que Les isolats cliniques d'*Acinetobacter* présentent une bonne croissance à une température de 37°C et certaines souches peuvent se développer à des températures élevées allant jusqu'à 40°C. Selon **Vegasa et Nieves (2005**) le genre *Acinetobacter* se développe facilement dans une gamme de température de 25-37°C. Par ailleurs, **Hirdi (2012)** a trouvé que *A,baumanii* est considéré comme souche thermotorésistante qui résiste jusqu'a 44°C. Cela nous a permis une orientation dans notre étude et considéré les isolats résistantes à 44 °C comme appartenant à *A,baumanii.*

2.2.10. Identification biochimique par galeries API20E

L'identification biochimique par la galerie API20E a été réalisée sur les 5 isolats qui ont montré une thermorésistance à 44°C. Après incubation, la lecture de la galerie (Fig.24-Tab.XII) a été réalisée en se référant au tableau de lecture. La galerie API20E nous a permis d'affiner nos résultats dans l'identification des souches.

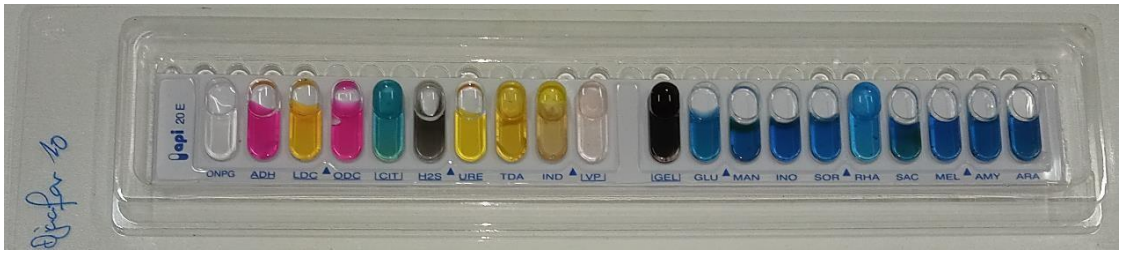


Figure 24 . Profil biochimique de l'isolat A10 sur la galerie API20E

Tableau XII : Résultats du profil biochimique de l'isolat galerie API20E

-Négatif **+ positive**

	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
10	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
13	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
35	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Les cinq isolats testés ont montré une réaction négative pour la majorité des tests et peu de réactions sont positives. Cette réaction nous a permis de confirmer l'identification de nos isolats comme appartenant au genre *Acinetiobacter*. Les résultats évocateurs d'*Acinetobacter.spp* sont la réaction positive du glucose, du malibiose et de l'arabinose.

Les tests classiques sont le plus souvent négatifs :

- Absence de décarboxylase pour la lysine [LDC (-)], l'ornithine [ODC(-)] et l'arginine [ADH (-)].
- Absence de désaminase pour la phénylalanine et le tryptophane.
- Absence de thiosulfate réductase [H_2S (-)], de tryptophanase [IND(-)], de désoxyribonucléase et de bêta-galactosidase [ONPG (-)].
- Absence de gélatinase [GEL (-)].
- Absence de nitrates réductase [NIT (-)]

le test de l'uréase, donne des réponses variables (**Doughari et al.,2011 ;Hawkey et Bergogne-Berezin,2006)**.

3. Résistance aux antibiotiques

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose TSA. Les diamètres critiques sont définis pour chaque antibiotique par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM). Les tests de sensibilité aux antibiotiques représentent la dernière étape de diagnostic microbiologique, ils permettent de dresser le profil de résistance d'une souche bactérienne, donnée nécessaire à l'antibiothérapie.

Le principe consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'une concentration connue d'antibiotiques sur une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. La résistance de nos isolats aux antibiotiques a été testée avec 06 antibiotiques de cinq familles différentes (Tabl.VII). Fusidic Acid de la famille des Fusidanines, Céfoxitine de la famille des Bêta-lactamines, Amoxicilline et Ampicilline de la famille des Aminopénicilline, Erythromycine dela famille des Macrolides et Vancomycine de la famille des Glycopeptides.

les résultats obtenus comme présenté dans le tableau XIII ont montré que 7 isolats d'*Acinetobacter* obtenus à partir du sol rhizosphérique du alfa - alfa sur 36 isolats testés sont sensibles à la vancomycine et la Fusidic Acid, 4 isolats sensibles à l'Erythromycine et pratiquement tous les 36 isolats sont résistant à l' Amoxicilline et la Ampicilline.

Les 20 isolats sur 36 sont résistant à la Céfoxitine de la famille des Bêta-lactamines **;** La résistance aux bêta-lactamines chez les *Acinetobacters* est liée principalement à la production des ß-lactamases, mais des mécanismes de résistance non-enzymatiques sont également retrouvés (**Bonnin et *al.*, 2013b; Roca et al., 2012**). *Acinetobacter* comme toute autre bactérie à Gram négatif possède une membrane externe et une membrane cytoplasmique. Les ß-lactamases (ß-lactamases à large spectre, céphalosporinases et les carbapénèmases)se trouvent dans l'espace périplasmique (entre les deux membranes).

Les protéines liant les pénicillines (PLP) localisées au niveau de membrane cytoplasmique constituent la cible finale des ß-lactamines. Ces antibiotiques doivent traverser la membrane externe en passant par les porines (protéines de membrane externe, Outer membrane protein ou OMP). Une fois dans l'espace périplasmique, ils se lient aux PLP(s). Les ß-lactamines peuvent être excrétées activement en dehors de la structure bactérienne par des pompes efflux. *Acinetobacter* peut posséder des intégrons ou transposons, éléments génétiques sur le chromosome bactérien ou sur les plasmides, qui peuvent porter des cassettes multiples avec des gènes de résistance (ex: ß-lactamases à large spectre ou métallo-ß-lactamases) (**Munoz-Price and Weinstein, 2008**) ;Tandis que 16 isolats d' *Acinetobacter* sur 36 isolats testés présentent une croissance en présence des 6 antibiotiques testés donc les 16 souches sont considérés multirésistantes ; Les résultats obtenu ont montrés ainsi que les isolats d' *Acinetobacter* appartenant au sol rhizosphérique de la luzerne sont plus résistants aux (06 antibiotiques.

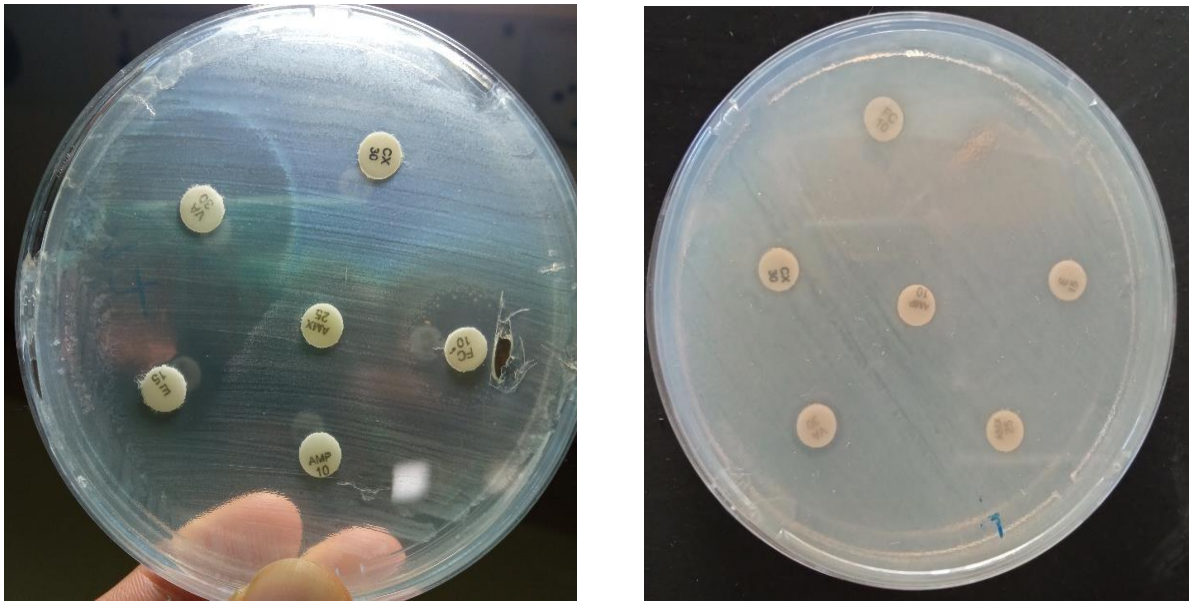


Figure 25 : Résultat de test de l'antibiogramme
(prise personnelle)

Les résultats obtenus (Tab. XIII) ont montré que les 36 isolats testés ont pu se développer en présence de la majorité des antibiotiques (Fig.25).

Tableau XIII : Résultats de la sensibilité des isolats testés aux différentes concentration desantibiotiques. R : résistante S : sensible

	FusidicAcid(10µg)	**Céfoxitine(30µg)**	***Erythromycin(15 µg)***	***Amoxicilline(25 µg)***	***Ampicilli n(µg10)***	***Vancomycin (30 µg)***
2	R	R	R	R	R	R
3	R	R	R	R	R	R
4	R	R	R	R	R	R
5	R	R	R	R	R	R
7	S	S	R	S	R	S
9	S	R	R	R	R	S
10	R	R	R	R	R	R
12	R	R	R	R	R	R
13	R	R	R	R	R	R
14	R	R	R	R	R	R
15	R	R	R	R	R	R
16	R	R	R	R	R	R
17	S	R	S	R	R	S
18	S	S	S	R	R	S
21	S	S	R	R	R	S
22	R	R	R	R	R	R
23	S	R	S	R	R	S
24	S	R	S	R	R	S
26	R	R	R	R	R	R
27	R	R	R	R	R	R
29	R	R	R	R	R	R
35	R	R	R	R	R	R
36	R	R	R	R	R	R

4. Mise en évidence de l'activité antagoniste

L'étude du spectre d'activité antagoniste des sept isolats de Bacillus [(*1) Bacillus safensis, (2) zhangzhouensis, (3) pumilus, (4) toyonensis , (5) velezensis, (6) siamensis* et *(7) tropicus*] contre nos isolats d'*Acinetobacter* a été réalisée selon deux méthodes. Une méthode directe qui permet d'étudier le spectre d'activité des *Bacillus* contre les *Acinetobacter spp*. et une méthode indirecte qui permet de mettre en évidence des éventuelles inhibitions des *Acinetobacter spp*. par des agents diffusibles contenues dans des surnageants de culture des *Bacillus spp*.

4.1. Test de spot direct

L'utilisation de la méthode directe par spot a montré la formation d'une zone claire autour des colonies (Tab.XIV). En effet, trois de nos isolats de *Bacillus spp*. (les isolats 2,3 et 4) ont montré une activité antagoniste vis-à-vis l'isolat (35) d'*Acinetobacter spp*. avec un maximum de diamètre de la zone d'inhibition a été noté avec l'isolat (3) *Bacillus pumilus* alors que le minimum a été obtenu avec l'isolat (4) *Bacillus toyonensi.* L'isolat *(2) Bacillus zhangzhouensis avec Bacillus pumilusont* montré aussi une activité antagoniste vis-à-vis l'isolat (13) d'*Acinetobacter spp.* et avec un maximum de diamètre de la zone d'inhibition a été donné par *Bacillus pumilus.* Seul l'isolat (1*) Bacillus safensisqui* a montré une activité antagoniste vis-à-vis l'isolat (12) d'*Acinetobacter sp.*

Tableau XIV. Mise en évidence de l'activité antagoniste des sept isolats de *Bacillus* vis-à-vis les *Acinetobacter spp* par la méthode directe en spot.

Codes *Acinetobacter spp.*	Code des isolats *Bacillus spp.*						
	1	2	3	4	5	6	7
12	10	-	-	-	-	-	-
35	-	12	23	5	-	-	-
13	-	10	15	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-

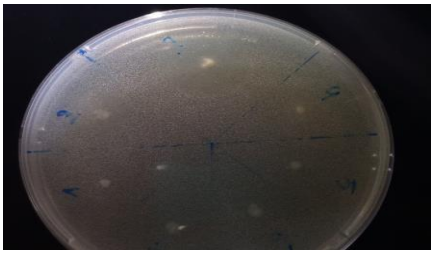


Figure 26 : Mise en évidence de l'activité antagoniste par le test de spot direct (Prise personnelle)

Les bactéries du genre *Bacillus* figurent parmi les microorganismes les plus étudiés pour lutter contre les phytopathogènes (Kefi et al., 2015). Ces bactéries Gram positif ubiquistes constituent en effet d'excellents candidats en vue d'une utilisation comme agents de lutte biologique. De nombreuses bactéries du genre *Bacillus* sont reconnues pour leur effet antagoniste contre plusieurs agents phytopathogènes via différents modes d'action) (Hinarejos et al., 2016; Kilani-Feki et al., 2016).

La méthode indirecte a permet de mettre en évidence des inhibitions des *Acinetobacter spp*. par des agents diffusibles contenues dans des surnageants de 4 cultures des *Bacillus spp*. a effet antagoniste positive ; En effet, les travaux de Chen et al (2017) ont montré des résultats meilleurs avec le test de diffusion. La présence de l'agent inhibiteur au niveau du surnageant des bactéries nous a poussé par la suite à faire une extraction des bactériocines

4.2. Test de diffusion

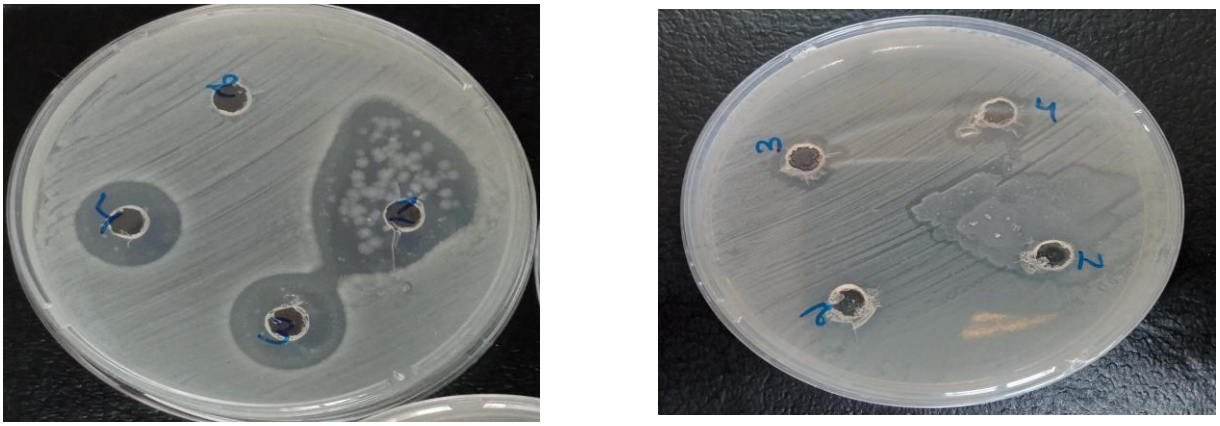
Les 4 souches de *Bacillus :B.safensis, B.zhangzhouensis , B.pumilus, B.toyonensis* Ont fait l'objet de test de diffusion.les résultats obtenus ont révélé une activité antimicrobienne de la part des *bacillus* vis à vs des 5 souches *Acinetobacters.* Cette activité se traduit par le développement d'une zone autour des colonies (Fig 27).

La comparaison des zones d'inhibition de la même colonie montre que par exemple, pour l'isolat 4 *(B.toyonensis)* le diamètre de la zone d'inhibition donné par le test de diffusion (8mm) est plus important que le diamètre de la zone d'inhibition donné par le test direct (5mm)

Tableau XV. Mise en évidence de l'activité antagoniste des 4 isolats de *Bacillus* vis-à-vis des *acinetobacters spp* par méthode de diffusion sur gélose.

Codes *Acinetobacter spp.*	Code des isolats *Bacillus spp.*			
	B1	B2	B3	B4
10	12	1	5	1
12	8	3	7	4
13	9	6	8	7
15	5	2	3	1
35	3	4	3	8

Cette augmentation de l'activité antagoniste entre l'utilisation de la colonie directement ou le surnageant indique que l'agent inhibiteur se trouve au niveau du surnageant et que probablement il s'agit d'un bactériocine.



A B

Figure 27. Aspect des zones d'inhibition formées par les surnageants des 4 isolats de Bacillus testé vis-à-vis l'isolat (code de l'isolat (A) et l'isolat xx (B). d'*Acinetobacter spp.*

Les bactéries testé appartiennent au genre Bacillus sont des Gram positive et ont montré une activité antibactériennes contre des isolats du genre Acinetobacter Gram négative. En effet, l'activité inhibitrice contre des bactéries à Gram négatif est un phénomène inhabituel et n'a jusqu'à présent été signalé que pour peu de bactériocines.

Les travaux **de Onda et *al*. (2003**) confirme que les bactéries Gram positif sont plus sensibles à l'effet bactéricide ou bactériostatique des bactéries lactiques où les bactériocines produites par ces dernières agissent sur les bactéries Gram positif en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires.

L'action antagoniste des isolats de *Bacillus spp* ne semble pas être spécifique de l'agent pathogène, et elle peut être à large spectre, agissant sur tous les isolats testés.

5. Activité antagoniste des bactériocines

5.1. Mise en évidence de l'activité antagoniste des bactériocines vis-à-vis des 5 isolats d'*Acinetobacter*.

Les bactériocines sont des peptides antibactériens qui présentent un spectre étroit envers des espèces pathogènes. A partir des 4 isolats de *Bacillus spp* testés positivement pour l'activité antagoniste, une extraction et purification partielle des bactériocines a été réalisée selon la méthode d'extraction d'adsorption.

Les 4 extraits bruts de bactériocines ont été codés comme suit : B1, B2, B3 et B4. Le B fait référence à la bactérie d'origine *Bacillus.* L'activité antagoniste des 4 bactériocines extraits a été réalisée selon la méthode de diffusion. Les résultats obtenus (Tab.XVI) ont montré que les 4 extraits de bactériocines ont une activité antagoniste vis-à-vis les 5 isolats *d'Acinetobacter.*

Tableau XVI. Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits brutes de bactériocines vis-à-vis les *Acinetobacter spp* par la méthode de diffusion sur gélose.

Le diamètre des zones d'inhibition est donné en mm.

Codes *Acinetobacter spp.*	Extrais des bactériocines brutes			
	B1	B2	B3	B4
12	20	22	24	21
35	21	21	14	13
13	24	22	24	13
15	19	12	25	12
10	24	24	23	22

Bien que les 4 extraits de bactériocine ont montré des diamètres de halo de la zone d'inhibition très élève, mais nous avons noté une activité antagoniste plus élevée pour un bactériocine par rapport à une bactérie du genre *Acinetobacter*. En effet, Le B3 a une activité plus élevée pour les isolats d'*Acinetobacter* 12,13 et 15. Aussi, le B1 a une activité plus élevée pour les isolats d'*Acinetobacter* 35,13 et 10.En revanche, le B4, a les plus petites zones d'inhibition quelque soit l'isolat d'*Acinetobacter* testé.

Les travaux de **Aunpad et Bangchang (2007**) ont montré la production d'une bactériocine pumiciline 4 par la bactérie *Bacillus pumilus* (souche WAPB4). Cette bactériocine est active sur les SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline) et les ERV (*Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine), ainsi que d'autres bactéries Gram positif. Cette activité a permet l'utilisation de *Bacillus pumilus* en Asie comme probiotique dans le produit « Biosubtyl® » (**Aunpad et Bangchang,2007**).

5.2. Effet de pH et salinité sur l'activité antagoniste des bactériocines

L'étude de l'effet du pH et la salinité sur l'activité antagoniste des bactériocines a pour but d'optimiser les conditions de production.

Les résultats obtenus (Tab.XVII) ont montré que les différents bactériocines ont montré une zone d'activité plus importante à un pH acide (pH=5) vis-à-vis de tous les isolats d'*Acinetobacter* testé à l'exception de l'isolat 13 ou l'activité antagoniste a montré une diminution importante sauf avec la bactériocine 4 ou la zone d'inhibition est supérieure au témoin.

La salinité de l'autre côté n'a pas vraiment affecté l'activité antagoniste exercée par les bactériocine. Elle montre une faible diminution avec l'augmentation de la concentration du sel dans le milieu de culture. En effet, la B3 a montré une diminution de l'activité antagoniste vis-

à-vis 3 isolats *d'Acinetobacter,* a savoir : 12,15 et 35. En contre partie, nous avons noté qu'avec l'isolat 13, le diamètre de la zone d'inhibition n'a pas été affecté sous conditions de salinité et cela pour les 4 bactériocines.

Tableau XVII. Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits brutes de bactériocines vis-à-vis les *Acinetobacter spp* par la méthode de diffusion sur gélose.

Le diamètre des zones d'inhibition est donné en mm.

Code de l'isolat	Bactériocine	Diamètre de l'halo de la zone d'inhibition (mm)				
		T	pH=8	pH=5	100mM NaCl	200mM NaCl
10	B1	24	13	25	21	13
	B2	24	12	30	20	21
	B3	23	13	30	26	22
	B4	22	13	24	21	6
12	B1	20	12	30	23	23
	B2	22	12	25	24	24
	B3	24	13	29	26	9
	B4	21	10	30	23	18
13	B1	24	10	3	22	22
	B2	22	11	3	24	23
	B3	24	13	2.8	26	24
	B4	13	12	30	21	26
15	B1	19	12	30	23	12
	B2	12	10	25	26	6
	B3	25	15	20	29	9
	B4	12	13	27	26	10
35	B1	20	18	28	19	12
	B2	21	11	24	16	3
	B3	14	13	21	21	4
	B4	13	14	27	23	12

6. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et des concentrations minimales

6.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La détermination de la concentration inhibitrice de chacune des 5 isolats *d'Acinetobacter* a été réalisé avec l'antibiotique Benzathine pénicilline et les 4 extraits de bactériocines (Tab.XIV).

Tableau XVIII. Taux de croissance des isolats après traitement par l'antibiotique et les bactériocines à différentes concentrations.

Les valeurs données sont les valeurs de la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 600nm

Code de l'isolat *Acinetobacter spp.*	**Concentration (%)**	**Absorbance**				
		ANB	**B1**	**B2**	**B3**	**B4**
10	0	1.028	0.520	0.300	0.261	0.331
	20	0.192	0.156	0.040	0.033	0.296
	40	0.094	0.118	0.065	0.015	0.183
	60	0.139	0.052	0.073	0.021	0.063
	80	0.063	0.071	0.047	0.112	0.132
	100	0.030	0.055	0.200	0.107	0.066
12	0	0.595	0.349	0.265	0.743	0.440
	20	0.109	0.094	0.122	0.206	0.296
	40	0.077	0.112	0.069	0.769	0.017
	60	0.133	0.030	0.041	0.035	0.067
	80	0.126	0.117	0.051	0.167	0.112
	100	0.130	0.054	0.161	0.131	0.023
13	0	0.568	0.328	0.224	0.331	0.224
	20	0.041	0.071	0.101	0.296	0.101
	40	0.093	0.069	0.128	0.183	0.128
	60	0.038	0.047	0.066	0.063	0.066
	80	0.074	0.066	0.047	0.132	0.047
	100	0.042	0.122	0.271	0.066	0.271
15	0	0.473	0.201	0.226	0.440	0.226
	20	0.021	0.075	0.042	0.296	0.042
	40	0.097	0.076	0.044	0.017	0.044

	60	0.060	0.107	0.060	0.067	0.060
	80	2.938	0.062	0.039	0.112	0.039
	100	0.052	0.101	0.095	0.023	0.095
35	0	0.592	0.329	0.240	0.479	0.240
	20	0.065	0.053	0.081	0.097	0.081
	40	0.067	0.065	0.058	0.017	0.058
	60	0.090	0.048	0.076	0.081	0.076
	80	0.048	0.168	0.056	0.119	0.056
	100	0.085	0.057	0.098	0.254	0.098

Dans la présente étude nous avons effectué une dilution en cascade dans du milieu TSB à obtenir une gamme de dilution de l'antibiotique essentielles Benzathine pénicilline, allant de 1000 µl, 800 µl, 600 µl, 400 µl, 200 µl, 0 µl.

Après 48 heures d'incubation des microplaques nous avons remarqué l'apparition d'un aspect clair dans certains puits, dans d'autres un dépôt (dans certain cas on observe un trouble) indiquant une croissance bactérienne.

La densité optique a été fixée à une absorbance d'environ 0,1 à 625 nm après avoir effectué des essais faisant intervenir différentes concentrations de cellules microbiennes (CA-SFM, 2014). En effet, la densité de l'inoculum des souches-tests est connue dans la littérature comme étant un facteur influençant la sensibilité de la technique (**Iwai et Omura, 1982; Brooks et *al.*, 1995; Madigan et *al.*, 1997)**. Concernant la concentration minimum bactéricide CMB qui est la comparaison de la dilution d'inoculum 10^{-4} aux différentes constatations d'antibiotique.

Les résultats obtenus illustrés dans le tableau (Tab.XVIII), ont fait ressortir pour les 5 isolats des concentrations minimums d'inhibition CMI et les concentrations minimum bactéricides CMB suivantes :

Pour les isolats 10 et 35, une CMI à 80% avec une densité optique respectivement de 0.063nm et 0.048nm et une CMB à 40 et 20% donc l'antibiotique est bactéricide, alors qu'on retrouve une CMI à 60% avec une densité optique de 0.038nm et une CMB à 80% pour l'isolat 13 ce qui montre que l'antibiotique est bactériostatique, tendis que pour les deux isolats 12 et 15 leurs CIM respectives est de 40% avec une densité optique de 0.077nm et 20 % avec une densité optique de 0.021nm avec une CMB à 40% donc l'antibiotique est bactéricide.

l'isolat 10 présente une sensibilité à des concentrations plus faible allant de 20 à 60% pour les 4 bactériocines testées (B1,B2,B3,B4).

l'isolat 12 présente une sensibilité à des concentrations allant de 60% pour les 4 bactériocines testées (B1,B2,B3,B4).

l'isolat 13 présente une sensibilité à des concentrations plus faible allant de 60 % pour les 3 bactériocines testées (B1,B2,B3) et 100% pour la B4.

l'isolat 15 présente une sensibilité à des concentrations plus faible allant de 40% pour B3 la 60 % pour les 3 bactériocines testées (B1,B2,B3) et 100% pour la B4.

l'isolat 35 présente une sensibilité à des concentrations plus faible allant de 40% pour B3 et 60 % pour B1 et 80% pour les 4 bactériocines testées (B2, B4).

Les 5 isolats *d'Acinetobacter* utilisés *(10-12-13-15-35)* ont présenté une sensibilité aux 4 bactériocines avec des zones d'inhibitions intéressantes, à des concentrations Varié allant de 40% à 100 %. En effet, une forte concentration de molécules bioactives libérées diffuse plus rapidement que la croissance de la souche-test ce qui conduit à une zone d'inhibition importante (**Koch, 1999**).

Les *Acinetobacters* présentent une résistance à une gamme d'antibiotiques de différentes familles essentiellement vis-à-vis les β lactamines tels que la pénicilline .Cependant, La majorité des souches secrètent une pénicillinase qui hydrolyse la pénicilline G ce qui explique la résistante aux pénicillines (**Clave, 2013**). Selon les diamètres des zones d'inhibitions obtenus, il en ressort que sur les 5isolats testés, 100% se sont révélé résistant avec des diamètres importants des zones d'inhibitions.

En général, les bactéries Gram négatives sont plus résistantes aux composés antibactériens que les bactéries Gram positives. Selon **Gupta, (2011**), plusieurs études ont prouvé que la membrane externe des bactéries Gram négatives (doubles membranes) contient beaucoup de mécanismes protecteurs contre des antibiotiques.

Les différentes valeurs de CMI obtenues nous permettent de constater que l'activité antibactérienne est en fonction des spécificités de la bactérie.

Conclusion

Conclusion

L'utilisation massive et répandue des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, a engendré un problème très épineux qui est la résistance des bactéries pathogènes aux traitements par les antibiotiques, une menace sans frontières (**Dumitrescuet *al.*, 2010**). La société scientifique encourage le traitement alternatif et évoque plusieurs pistes comme alternatives futures possibles dans un monde où les antibiotiques verraient leur force de frappe amoindrie.

Parmi ces pistes on peut citer : -Les adjuvants aux antibiotiques qui sont des molécules qui peuvent être utilisées pour prolonger la vie des antibiotiques existants. Ces adjuvants éliminent les mécanismes de défense que les bactéries développent vis-à-vis des antibiotiques. -des virus tueurs de bactéries (La phagothérapie : «bactériophages»), -des bactéries cannibales ou des molécules de combat venant tout droit de notre système immunitaire (certaines espèces bactéries s'attaquent également à leurs congénères par production de bactériocines).

Notre étude portant sur « Evaluation de l'activité antagoniste des bactéries productrices des bactériocines sur *les Acinetobacters spp*» a été fondée sur trois objectifs principaux. Le premier consistait à un isolement, caractérisation et identification des bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* associées à la rhizosphère des plantules de la luzerne. Le deuxième objectif a porté sur la mise en évidence de l'activité antagoniste des bactéries appartenant du genre *Bacillus sp.* via a vis les *Acinetobacter* isolés tandis que le troisième objectif consistait à l'extraction des bactériocines à partir des *Bacillus spp* et l'évaluation de leur capacité antagoniste vis-à-vis des *Acinetobacter.*

La caractérisation des sept isolats de *Bacillus spp* sur le plan macroscopique et microscopique nous a permis de confirmer leur pureté. Les sept isolats testé ont montré une tolérance aux différentes températures et pH testé en contre partie une sensibilité à l'enzyme digestive « pepsine » et une résistance aux antibiotique. L'Ensemble de ces tests nous a permis de les considéré partiellement comme étant des probiotiques.

La sélection primaire des isolats appartenant au genre *Acinetobacter* a été effectuée on se basant sur leurs caractères culturaux (colonies vertes sur le milieu Hektoen) nous a permis de retenir 36 isolats. Après réalisation du test oxydase et la coloration de Gram. Un résultat négatif aux trois tests retenus, nous a permis de sélectionner 36 isolats.

La thermorésistance à une température de 44°C nous a permis de sélectionner 5 isolats thermorésistants et qui peuvent avoir un caractère pathogène La galerie API 20 E nous a permis de s'assurer que notre sélection d'isolats appartient au genre *Acinetobacter*.

les résultats obtenus ont montré que 7 isolats d*'Acinetobacter* obtenus à partir du sol rhizosphérique du alfa - alfa sur 23 isolats testés sont sensibles à la vancomycine et la Fusidic Acid, 4 isolats sensibles à l'Erythromycine et pratiquement tous les 36 isolats sont résistant à l' Amoxicilline et la Ampicilline. Les 20 isolats sur 36 sont résistants à la Céfoxitine de la famille des Bêta-lactamines

L'évaluation de l'activité antagoniste des 7 isolats du genre *Bacillus* vis-à-vis des 5 isolats d'*Acinetobacter* retenus que soit par le test en spot direct ou le test de diffusion a montré que 4 isolats possèdent une activité antagoniste vis-à-vis des *Acinetobacter sp*, il s'agit de : [(*1) Bacillus safensis, (2) zhangzhouensis, (3) pumilus, (4) toyonensis , (5) velezensis, (6) siamensis*et *(7) tropicus*]

Les meilleurs résultats de l'activité antagoniste ont été obtenus lors du test des surnageant des 4 isolats par le test de diffusion. Ce résultat nous a permis de constater que l'agent inhibiteur qui se trouve au niveau du surnageant est une bactériocines.

Les 4 isolats [(*1) Bacillus safensis, (2) zhangzhouensis, (3) pumilus, (4) toyonensis*] ont été utilisés pour l'extraction et purification partielle des bactériocines. Les bactériocines obtenus ont montré une forte activité antagoniste vis-à-vis des 5 isolats d*'Acinetobacte*r.

Les quatre souches sont capables de croitre avec des concentrations de 2 et 4% de NaCl mais incapables de se multiplier avec une concentration de 6,5%, par contre elles se sont multipliées à PH= 4 et avec un PH de 9,6, aucune croissance n'a été enregistrée. On observe aussi leur croissance après un traitement thermique pendant 30minutes à 60°C donc ces souches sont thermorésistantes, L'enzyme à faible concentration a un impact négatif sur la croissance de l'isolat

Les résultats obtenus lors de cette étude laissent envisager plusieurs axes de recherche :

- Tester l'effet inhibiteur des surnageant de culture contre d'autres micro-organismes.
- Caractériser physico-chimiquement les bactériocines produites par les 4 isolats de *Bacillus spp*, ainsi que sa stabilité à travers le temps et la digestion enzymatique.
- Réalisation d'une étude de synergie avec des antibiotiques ou d'autres molécules bioactives.
- Réalisation d'une étude in vivo pour la détermination de la dose et initier une étude pharmacologique et toxicologique.

Références Bibliographiques

1- Al Dawodeyah HY, Obeidat N, Abu-Qatouseh LF, Shehabi AA. Antimicrobial resistance and putative virulence genes of Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with respiratory tract infection. Germs. (2018)

2- Almasaudi SB. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi journal of biological sciences. 2018;25(3):586-96.

3- AUCKENTHALER R. Activité antibactérienne. Spectre. Mode d'action. Cibles bactériennes In : Antibiothérapie en pratique clinique. BERGOGNE-BEREZIN E., DELLAMONICA P. Masson ,1995 :P17-32

4- Ahmad Al Atrouni Etude de l'épidémiologie moléculaire et de l'écologie d'Acinetobacter spp au Liban. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers; Université libannaise de Beyrouth, 2017. Français. NNT : 2017ANGE0004 . tel-01599268 .

5- BELLIFA S ; Evaluation de la formation du biofilm des souches de Klebsiella pneumoniae isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen 2014disponible sur http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/5692/1/bellifa-Samia.pdf consulté le 2/03/2022

6- Brisou J, Prevot A, editors. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group. Annales de l'Institut Pasteur; 1954.

7- Boisset S. Résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram positif [Internet]. [cité 2 févr2019].Disponible sur: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/du/grenoble/resistancegrampos-dutai-grenoble-2017-18-sboisset.pdf consulté le 2/03/2022

8- Cosgaya C, Marí-Almirall M, Van Assche A, Fernández-Orth D, Mosqueda N, Telli M, et al. *Acinetobacter dijkshoorniae sp. nov*., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus– Acinetobacter baumannii complex* mainly recovered from clinical samples in different countries. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2016;66(10):4105-11.

9- Dadgostar P. Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. Infect Drug Resist. 20 déc 2019;12:3903-10.
Treibich C, Lescher S, Sagaon-Teyssier L, Ventelou B. The expected and unexpected benefits of dispensing theexact number of pills. Plos One. 2017;12(9):e0184420.

10- Dortu C. Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. :19.

11-Denis, F., E. Bingen, C. Martin, M.C. Ploy and R. Quentin, 2011. Bacteriologie Medicale. 2nd Edn., Elsevier Masson, Paris, ISBN: 9782294725944, Pages: 640.

12- Encyclopædia. ANTIBIOTIQUES [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cité 2 févr 2019]. Disponible sur: http://www.universalis.fr/encyclopedie/antibiotiques/

13- L'émergence des résistances aux antibiotiques. [févr 2019].
Disponible sur: https://www.antibio-responsable.fr/antibioresistance/resistance-aux-antibiotiques

14- Hong J, Kim J, Quan L-H, Heu S, Roh E. Purification and Characterization of Pasteuricin Produced by Staphylococcus pasteuri RSP-1 and Active against Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus. Journal of Food Protection. nov 2018;81(11):1768-75.

15- Mazri R. Nouvelle approche des relations structures activités dans des molécules antibiotiques [en ligne]. thèse doctorat en science. Biskra : université mohamed khider biskra, 2015, 89p.
Disponible sur : http://thesis.univ- biskra.dz/1368/1/Chimi_d3_2015.pdf consulté le 21/03/2022

16- Meunier O, Exinger J, Kara F. ARM, ABRI, E.BLSE... ERG et EPC. Des BMR à l'émergence des BHRe. 2016;Haguenau.
Accessible à: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/groupe-atb/livret-bmr-bhre-bis.pdf. consulté le 2/03/2022

17-Mainardi, JL. Mécanismes d'action et de résistance aux antibiotiques. Faculté de Médecine, Université Paris- Descartes.
Accessible à: http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/formation/desc/desc2015-action-et- resistance-atb-mainardi.pdf.

18- Mathur H, Field D, Rea MC, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Fighting biofilms with lantibiotics and other groups of bacteriocins. npj Biofilms and Microbiomes [Internet]. déc 2018 [cité 2 févr 2019];4(1). Disponible sur: http://www.nature.com/articles/s41522- 018-0053-6

19-McConnell MJ, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS microbiology reviews. (2013).

20- D.MOHAMMEDI .Classification et mode d'action des antibiotiques
Disponible sur :
https://sofia.medicalistes.fr/spip/IMG/pdf/classification_et_mode_d_action_des_antibiotiques.pdf consulté le 14/03/2022

21- Naas T. Les modes de transmission des résistances bactériennes [en ligne]. Colloque L'antibiorésistancechez l'homme et l'animal. Faculté de Médecine Paris. 2014,
disponible sur : http://social-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Modes_de_transmission des_ resistances_ bacterienn es.pdf.

22- Nolte O. Antimicrobial resistance in the 21st century: a multifaceted challenge. Protein Pept Lett. avr 2014;21(4):330-5; Turner B. Tackling antimicrobial resistance and climate change. The Lancet. 8 déc 2018;392(10163):2435-6.

23- Plan EcoAntibio 1 (2012-2017): les 40 mesures contre l'antibiorésistance [Internet]. [cité 2 févr 2019]. Disponible sur: https://agriculture.gouv.fr/plan-antibioresistance-ecoantibio-les-40-mesures-ecoantibio-2012-2017

24- Plan Écoantibio: baisse de 37% de l'exposition des animaux aux antibiotiques | Alim'agri [Internet]. [cité 14 nov 2018]. Disponible sur: http://agriculture.gouv.fr/plan-ecoantibio- baisse-de-37-de-lexposition-des-animaux-aux-antibiotiques

25- Aunpad R, Na-Bangchang K. Pumilicin 4, A Novel Bacteriocin with Anti-MRSA and Anti-VRE Activity Produced by Newly Isolated Bacteria Bacillus pumilus Strain WAPB4. Current Microbiology. oct 2007;55(4):308-13.

26- La première bactériocine homologuée pour la conservation du poisson [Internet]. Actalia. 2017 [cité 2 févr 2019]. Disponible sur: http://www.actalia.eu/premiere-bacteriocine- homologuee-conservation-poisson

27- Résistance aux antibiotiques: un lien avec l'usage ancien de pénicilline dans les élevages - 30/11/2017 - ladepeche.fr [Internet]. [cité 2 févr 2019]. Disponible sur: https://www.ladepeche.fr/article/2017/11/30/2695116-resistance-antibiotiques-lien-usage- ancien-penicilline-elevages.html

28-Résistance aux antibiotiques ; Dossier réalisé en collaboration avec Jean-Luc Mainardi, unité 1138 Inserm/Sorbonne Université/Université Paris Descartes/Université Paris Diderot, équipe Structures bactériennes impliquées dans la modulation de la résistance aux antibiotiques , (2018)
Disponible sur : https://www.inserm.fr/dossier/resistance-antibiotiques/ consulté le 12/01/2022

29- WHO | No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections. WHO. World Health Organization;Accessible à: http://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/[2] O'Neil J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance.

30- OMS | De nouvelles données révèlent l'existence de niveaux élevés de résistance aux antibiotiques dans le monde [Internet]. WHO. [cité 2 févr 2019]. Disponible sur: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/fr/ consulté le 12/02/2022

31- Ure kasanté Vidal. La résistance aux antibiotiques[en ligne]..
Disponible sur : https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/antibiotiques/resistance antibiotiques.html; consulté le 15/02/2022

32- Van Staden ADP, Heunis T, Smith C, Deane S, Dicks LMT. Efficacy of Lantibiotic Treatment of Staphylococcus aureus-Induced Skin Infections, Monitored by In Vivo Bioluminescent Imaging. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. juill 2016;60(7):3948‑55.

33- Philippon A. Résistance bactérienne: définitions, mécanismes, évolution. (2016); Disponible sur:http://www.em-premium.com.doc- distant.univ-lille2.fr/article/181570/consulté le 2/03/2022

34- La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019 HAL Id:dumas-02432394 https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02432394

35- Shakibaie MR, Adeli S, Salehi MH. Antibiotic resistance patterns and extended spectrum beta-lactamase production among Aci- netobacter spp. Isolated from an intensive care Unit of a hospital in Kerman, Iran. Antimicrob Res Infect Control 2012

Annexes

Annexe 1 : Matériel non biologique (l'appareillage)

Appareillage	**Verreries**	**Autre matériel**
Autoclave (nüve)	Becher	Anse de platine
Bain marie (nüve)	Boite de pétrie	Papier aluminium
Balance de précision électrique (Kern)	Erlenmeyer	Papier parafilm
Etuve bactériologique (nüve)	Fiole	Pince en platine
Microscope optique (Motic)	Flacons	Cryotube
Réfrigérateur	Lames et lamelles	Tube Eppendorf
Congélateur	Tubes à essai	Spatule
Plaque chauffante agitante (Stuart)	pipette jaugée	Bec Bunsen
PH-mètre	Eppendorf	Gants jettable
Agitateur rotatif shaker vortex		Marqueurs
agitateur magnétique		Barreau aimanté
Spectrophotomètre		Micropipettes
Centrifugeuse		Portoir pour tubes
		Filtre 0.45 µm
		Seringue

Annexe 2 : Milieux de culture utilisés

Milieu de culture utilisé	Composition des milieux de culture
Solution tampon phosphate	(en grammes par litre d'eau distillée) • NaH2PO4.2H2O ..... 6.33g • NaH2OPO4… 10.96g
Milieu de culture liquide TSB	(en grammes par litre d'eau distillée) • Tryptone..... 15 g. • Peptone papaïnique de soja..... 5 g. • Chlorure de sodium ..... 5 g. • Agar..... 15 g. • pH final ..... 7,3 ± 0,2.
Milieu de culture Hektoen,	(en grammes par litre d'eau distillée) • Peptone.....12,00g • Chlorure de sodium..... 5,00g • Extrait de levure..... 3,00g • Thiosulfate de sodium ..... 5,00g • Sels biliaires N° 3..... 9,00g • Citrate ferrique ammoniacal ..... 1,50g • Lactose.....12,00g • Bleu de bromothymol .....0,065g • Saccharose..... 12,00g • Fuchsine acide .....0,10g • Salicine.....2,00g • Agar ..... 14,00g • pH final à 25°C ..... 7,5 ± 0,2
Mannitol et mobilité	(en grammes par litre d'eau distillée) • Mannitol.....2g • Pepton..... 20g • Nitrate K..... 1g • Rouge de phenol 4% .....4 ml • Agar..... 4 g
Milieu de culture TSA 1/10	(en grammes par litre d'eau distillée) • TSB..... 3g • Agar 15g
Composition gélose Mueller-Hinton (MH)	(en grammes et milligramme par litre d'eau distillée) • Hydrolysat acide de caséine (peptone)…17,5 g • Extrait de viande .....2,0 g • Amidon.....1,5 g • Calcium .....20 à 25 mg • Magnésium ..... 10 à 12,5 mg • Agar 15,0 g • pH .7,4 +/- 0,2

Composition gélose Mac Conkey	(en grammes par litre d'eau distillée) • Peptone.....20,0 g • Sels biliaires n°3 .....1,0 g • Cristal viole .....0,001 g • Lactos 10,0 g • Rouge neutre.....0,05 g • Chlorure de sodium.....5,0 g • Agar 15,0 g • pH 7,1
Gélose nutritive	(en grammes par litre d'eau distillée) • Extrait de viande .....1,0 g • Extrait de levure.....2,5 g • Peptone.....5,0 g • Chlorure de sodium.....5,0 g • Agar 15,0 g • pH 7,0
Gélose au sang	(en grammes par litre d'eau distillée) • TSB…….....3g • Agar…….. .....15g • Sang……. 15ml

Annexe 3: Liste des produits chimiques

produits chimiques	
Ethanol 96%	Extrait de levure
Eau oxygénée (10v)	Peptone
NaCl	Galerie API 20E (BioMérieux)
Chlorure de sodium	Huile d'immersion
Glycérole	Huile de paraffine
Magnésium	Eau ultra pure
NaOH 0.1M	Sulfate d'ammonium (NH4)2SO4
Violet de gentien (Pasteur)	Fishine
VP1(Pasteur)	TDA
VP2(Pasteur)	Lugol (Pasteur)
Covacs (Pasteur)	HCL

Annexe 4 : Coloration de Gram

La coloration de Gram	La technique
La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :	• Sur une lame, fixer à la chaleur une culture bactérienne ; • Recouvrir la lame avec la solution de violet de gentiane pendant une minute • Ajouter du lugol pendant 30 secondes ; • Décolorer avec de l'alcool 95°, puis • rincer à l'eau ; • Faire une contre coloration en utilisant la fuschine et laisser agir 20 à 30 secondes; • Laver à l'eau ; • Après séchage, soumettre la lame à une observation microscopique à immersion (x100). Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet et les bactéries à Gram négatif en rose.