

# الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Ibn Khaldoun–Tiaret  
Faculté des Sciences de la Nature et de la vie



Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'études  
En vue de l'obtention du diplôme de Master académique  
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie (D04)  
Filière : Biotechnologie  
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

Melle : LAOUMIR Nacéra

Melle : MAACHOU Bochra

Melle : GUENOUNI Fatima

Thème

**Contribution à l'étude de l'effet bactéricide  
de l'argile sur les *Staphylococcus aureus***

Soutenu publiquement le : 15/09/2020

Jury :

Garde :

Président : Mr. Hocine Laredj .

MCA

Encadreur : Mr. HADJ SAID Aissa .

MCA

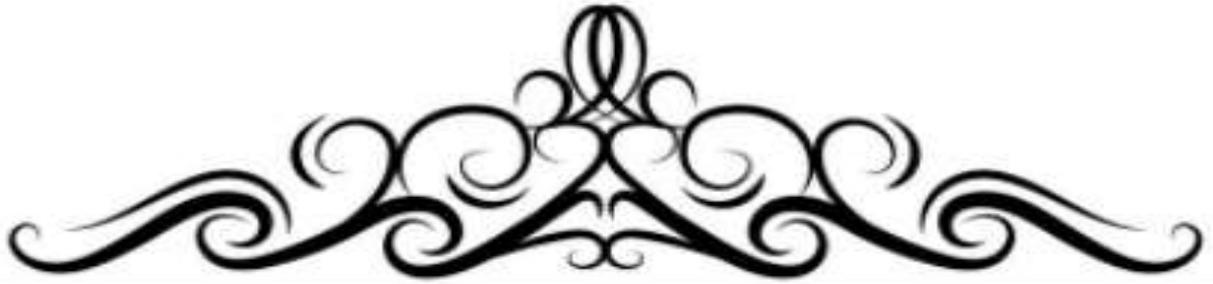
Co-encadreur : Mr. BENBEGUARA Mourad .

MCA

Examinatrice : Mm. Moulay Meriem .

MCA

Année universitaire 2019/2020



*Remerciements*



# Remerciements

Avant tout, nous remercions Le BON DIEU « **ALLAH** » le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce modeste travail. Nous tenons à exprimer ici nos sincères remerciements et gratitude à notre promoteur Monsieur **HADJ SAID AISSA**, qui nous a aidées dans la réalisation de ce travail par ses précieux conseils, son soutien, ses encouragements, sa disponibilité tout au long de la réalisation de cette étude.

Aussi, on tient vivement à remercier notre co-promoteur Monsieur **BENBEGUARA MOURAD** pour les efforts qu'il a fournis durant notre recherche et pour ses informations et ses orientations qui ont contribué dans la bonne marche de ce travail.

Aussi, on tient vivement à remercier **Mme. MOULAY**, qui nous a aidé dans la réalisation de ce travail par ses précieux conseils, son soutien, ses encouragements, sa disponibilité tout au long de la réalisation de cette étude.

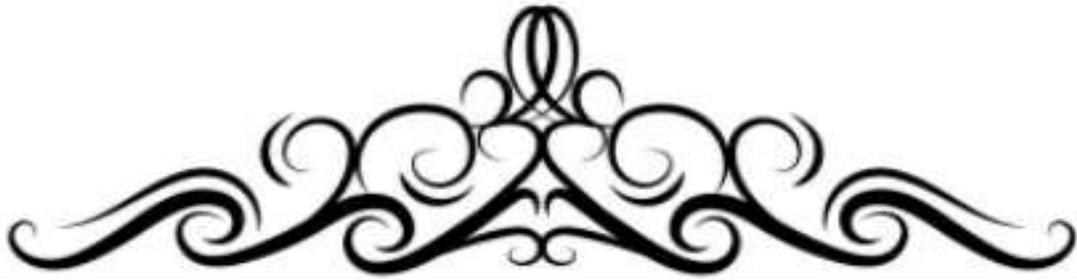
Nous adressons nos grands remerciements et considérations au président du jury :  
**Mr. Hocine**

Nous remercions chaleureusement tous les personnes du laboratoire de microbiologie de la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, de l'Université Ibn Khaldoun -Tiaret, **khaira** et **zahra** pour leurs accueils, leurs suivi et qui ont rendu la tâche plus facile et plus agréable et ont contribué à la réussite de cet humble projet de fin d'études.

On tient vivement à remercier tous les enseignants de la faculté SNV qui ont contribué à notre formation durant nos études et particulièrement notre chef de spécialité de la biotechnologie microbienne Monsieur **SASSI**.

En fin on profite de l'occasion pour remercier tous ceux qui ont participé de loin ou de près à l'élaboration de ce mémoire.





*Dédicaces*



# Dédicace

*Je dédie ce mémoire ....  
A mes très chers parents*

*A ma chère mère **MESSOUDA**, pour ses conseils, ses sacrifices  
et son*

*Courage et qui, sans elle je ne serai pas là OÙ je suis aujourd'hui.*

*A mon cher père **L'HADJ ABDELKADER***

*A notre promoteur **HADJ SAID AISSA***

*A notre Co-promoteur **BENBAGUARA MOURADE** et Mm  
**.MOULAY***

*A mes sœurs **Fatima, Amina, Aya, Wissem, Sara, Om el kheir** et  
sa fille **Lodjine***

*A mes frères **Benaissa, Mohamed** et les jumeaux **Ziyad** et **Iyad***

*A mes chères amies **Chaima chahrazad, Bochra, fatima,....***

*A toute ma famille paternelle et maternelle*

# Nacéra





# Dédicace

*Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.*

*Je dédie ce mémoire*

*A mon père, **BENAISSA***

*Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras. Pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils. J'espère que cette mémoire sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle soit l'accomplissement de tous tes efforts.*

*A ma mère, **KHADRA***

*Pour son affection, sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son écoute permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie. Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous **MES CHERS PARENTS** que je le dois, que Dieu vous garde.*

*A ma petite sœur : de cœur **Imen** que j'aime plus que tout ma confidente ma perle rare que Dieu le protège et le garde*

*A mes chers frères : **Hamid , Youcef , Mohamed , Hossem , Aymen et Ilyes .***

*A mes proches amies : **Fatima Zohra ; Khalida ; Atika et Salima .***

*A mes chères tantes : **KHARROUBI Habiba et MAACHOU Zahra.***

*A **Nacera et Fatima** pour tout les souvenirs pendant les années d'études ensemble.*

*A Mr **Tadje abdelkader**, pour son encouragement, ses conseils et les aides précieux.*

## Bochra





# Dédicace

*Tout d'abord je remercie Allah (mon dieu) de m'avoir donné la capacité, la volonté et de la patience pour réaliser ce travail.*

*Ce mémoire est dédié*

*A mes chers parent Abd elhadî et Om elsheikh, qui m'ont toujours poussé et motivé dans mes études, je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère votre bénédiction m'accompagne toujours.*

*A tous mes frères et mes sœurs*

*A tous mes amies qui m'ont encouragé : Nacéra, Bochra, Ghanía, Slíman*

*A tous ceux que j'aime et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Fatíma





*Sommaire*



# Sommaire

## Table de matière

Liste des abréviations .....	I
Liste des tableaux .....	II
Liste des figures .....	III
Liste des annexes.....	IV
Introduction.....	1

## Chapitre I : Matériels et méthodes

1.1/ Objectif du travail .....	03
1.2/ Lieu et période de travail .....	03
1.3/ Matériel et méthodes .....	03
1.3.1/ Matériels .....	03
1.3.1.1/ Matériel biologique.....	03
1.3.1.2/ Matériel minéral .....	03
1.3.1.3/ Matériels, appareillages et produits utilisés .....	03
1.3.2/ Méthodes .....	04
1.3.2.1/ Protocole expérimental .....	05
1.3.2.2/ Protocole réalisé.....	06
1.4/ Repiquage de la bactérie sur le milieu Chapman .....	06
1.4.1/ Observation microscopique.....	07
1.4.1.1/ Coloration du gram .....	07
1.5/ Recherche des <i>Staphylococcus</i> à coagulase positive .....	07
1.5.1/ Repiquage de <i>Staphylocoque</i> sur le milieu BP.....	07
1.5.2/ Ré-identification des souches .....	08
A. Test catalase .....	08
1.6/ Etude des caractères biochimiques.....	09
1.7/ Standardisation de Mc Farland .....	11
1.8/ Antibiogramme .....	11

## Sommaire

1.8.1/ Méthode des disques des ATB .....	12
1.8.1.1/ Application des disques .....	12
1.8.2/ Méthode des puits de diffusion .....	13
1.8.2.1/ Mode opératoire.....	13
1.8.2.2/ Expression des résultats .....	13
1.9/ Détermination de CMI.....	13
1.9.1/ Préparation des dilutions .....	14
1.9.2/ Méthode des spots.....	14

## Chapitre II : Résultats et discussion

1/ Identification des souches .....	15
1.1/ Etude macroscopique.....	15
1.2/ Etude microscopique .....	16
2/ Ré-identification des souches.....	16
A. Test catalase.....	16
3/ L'activité antibactérienne d'argile sur <i>les Staphylococcus aureus</i> .....	17
3.1/ Effet antibactérien de certaines argiles minérales in vitro .....	17
3.2/ Argiles utilisées dans la curation de diverses affections en côte d'ivoire : étude de l'effet antibactérien .....	18
Conclusion .....	20
Références bibliographiques .....	21
Annexe	
Résumés	



*Liste des abréviations*



## Liste des abréviations

---

- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **ATB** : Antibiotique
- **ATCC** : American type culture collection
- **Bac12** :Barium Chlorine
- **BP** : Baird Parker
- **CMB** : Concentration minimale bactéricide
- **CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- **DNase** : Désoxyribonucléase
- **DO** : Densité optique
- **Ech** : Echantillons
- **GN** : Gélose nutritive
- **GO** : Gélose ordinaire
- **H<sub>2</sub>O** : L'eau
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène
- **H<sub>2</sub>S** : Le sulfate d'hydrogène
- **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique
- **Hcl** : Chlorure d'hydrogène
- **MDR-staph** :Multi Drug résistance *Staphylococcus aureus*
- **MH** : Mueller Hinton
- **Nacl** : Chlorure de sodium
- **S.aureus** : *Staphylococcus aureus*
- **SARM** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline
- **SCN** : *Staphylococcus* à coagulase négative
- **SCP** : *Staphylococcus* à coagulase positive



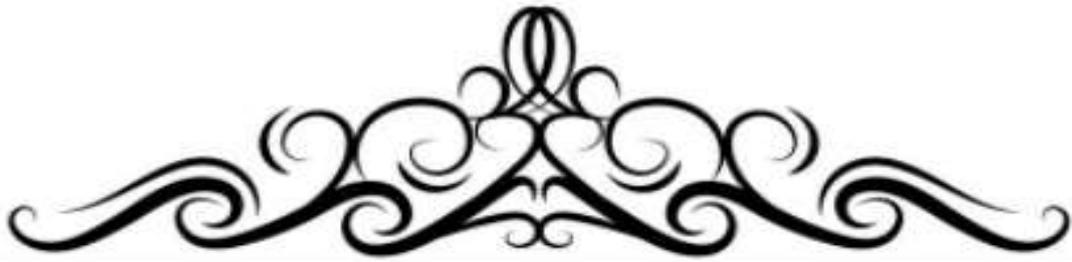
*Liste des tableaux*



## Liste des tableaux

---

	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
<b>01</b>	Matériels de laboratoire et les milieux de cultures utilisés	<b>04</b>
<b>02</b>	Les tests biochimiques	<b>10</b>
<b>03</b>	Composition minéralogique des matériaux argileux	<b>18</b>



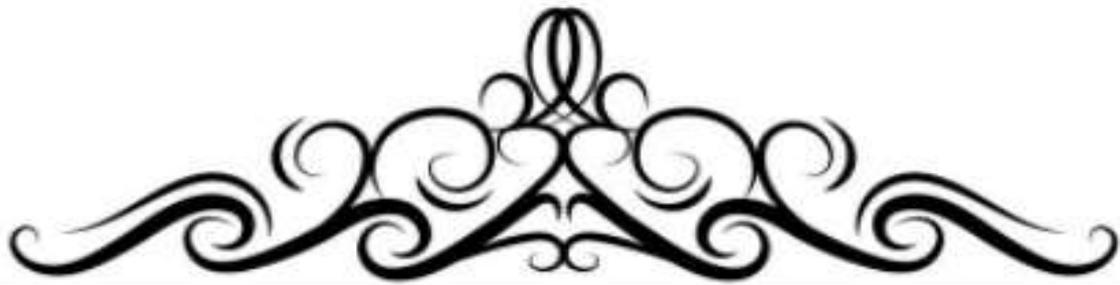
*Liste des Figures*



## Listes des figures

---

	<b><i>Titre</i></b>	<b><i>Page</i></b>
<b>01</b>	Organigramme récapitulatif du protocole expérimental.	<b>05</b>
<b>02</b>	Organigramme récapitulatif du protocole réalisé	<b>06</b>
<b>03</b>	Repiquage de <i>Staphylococcus aureus</i> sur le milieu Baird Parker	<b>08</b>
<b>04</b>	Test de la catalase	<b>09</b>
<b>05</b>	Préparation des dilutions	<b>14</b>
<b>06</b>	Aspect macroscopique des colonies caractéristiques de <i>S.aureus</i> sur milieu Chapman	<b>15</b>
<b>07</b>	Aspect macroscopique des colonies caractéristiques de <i>S.aureus</i> sur milieu BP	<b>15</b>
<b>08</b>	Aspect microscopiques des <i>S.aureus</i> (coloration du Gram)	<b>16</b>
<b>09</b>	Mise en évidence de la catalase chez les <i>S.aureus</i>	<b>16</b>
<b>10</b>	Effet antibactérien des argiles minérales utilisées contre l'isolat <i>S- aureus</i> .	<b>17</b>
<b>11</b>	Effet des argiles sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> après 24h d'incubation	<b>18</b>
<b>12</b>	Test de la coagulase	<b><i>Annexe 03</i></b>
<b>13</b>	Test d'ADN ase.	<b><i>Annexe 03</i></b>
<b>14</b>	Mise en évidence de la coagulase chez les <i>S.aureus</i>	<b><i>Annexe 03</i></b>
<b>15</b>	Mise en évidence de l'ADNase chez les <i>S.aureus</i>	<b><i>Annexe 03</i></b>



*Liste des annexes*



## Liste des annexes

---

<b><i>Annexe n=</i></b>	<b><i>Titre</i></b>
<b><i>01</i></b>	Composition des milieux de cultures
<b><i>02</i></b>	Composition des réactifs
<b><i>03</i></b>	Ré-identification des souches (les tests qui ne sont pas terminés)



# *Introduction*



## Introduction

---

L'impact des maladies infectieuses ne cesse de croître dans le monde. Cela est dû généralement au phénomène de l'antibio-résistance (MERAH et al, 2010). Le nombre de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques a considérablement augmenté, y compris les *Staphylocoques*. Cette tendance alarmante implique la nécessité d'identifier et d'évaluer de nouveaux agents antibactériens. Il est rapporté que les minéraux géologiques naturels possèdent des propriétés antibactériennes, ce qui pourrait donner l'espoir de nouveaux composés thérapeutiques. Il a été démontré que l'argile est capable à ça (MOOSAVI, 2017), sachant que ces derniers ne présentent pas généralement des effets secondaires, et compte parmi ces minéraux les plus convoité, en raison de ses propriétés inhibitrices et thérapeutiques (MERAH et al, 2010).

Déjà en 1928, le *Staphylocoque* a joué un rôle dans la découverte des antibiotiques. En effet, l'observation fortuite d'Alexander Fleming sur des colonies de *Penicillium* a conduit à l'amélioration de la santé mondiale. Il a remarqué que le champignon *Penicillium* (qui avait contaminé les boîtes de cultures accidentellement) avait inhibé la croissance d'une culture bactérienne qui se trouve être une souche de *staphylocoque*. De cette observation découlent la purification et la production du premier antibiotique utilisé en thérapeutique : la pénicilline G (ROBERT, 2013).

Les souches bactériennes présentent de nombreux mécanismes de résistance, surtout en cas d'utilisation prolongée ou répétitive d'antibiotiques au niveau local ou général. La sélection et l'émergence de souches bactériennes résistantes, voire multi résistantes, sont devenues l'un des sujets les plus préoccupants de la thérapeutique (DRUGEON et al, 2012).

*S. aureus* est présent chez l'homme sur plusieurs sites corporels. On le repère sur la surface de la peau et des muqueuses, mais il colonise principalement les fosses nasales, les glandes de la peau, le cuir chevelu, les mains, la bouche, les dents et le périnée (DAVID, 2013), L'un des agents pathogènes infectieux les plus courants, est devenu une menace sanitaire menaçant dans le monde entier (CAFLISCH et al, 2018).

Ce qui est inquiétant, c'est que l'augmentation des infections des hôpitaux et des communautés causées par *MDR-Staph* conduit à l'urgence de découvrir et de développer de nouveaux agents antibactériens. *MDR-SA* a émergé comme les souches bactériennes les plus redoutables d'antibiotiques disponibles qui incluent la méthicilline, la vancomycine (glycopeptide), la daptomycine (lipopeptide), le lenzolid (oxazolidinone), le tizidolid), Dalbavancide (lipog), oritavancine (glycopeptide), ceftaroline (antibiotique  $\beta$ -lactame), ceftobiprole et carbapénèmes. Par conséquent, la découverte et le développement de nouveaux agents antibactériens pour contrôler divers mécanismes de résistance est une étape essentielle dans la lutte contre la résistance de plusieurs antibiotiques et médicaments (SRIKANTH et al, 2019).

## Introduction

---

Pour cette raison, dans notre travail nous avons utilisé l'argile comme un nouvel agent antibactérien du fait de leurs propriétés physico-chimiques, (tel que le gonflement et la capacité d'échange cationique, la plasticité et la thixotropie) de leur variété et de leur abondance (KHATEM, 2017).

L'argile est une roche sédimentaire à texture très fine, composée en grande partie de minéraux spécifiques, en général des silicates d'aluminium plus ou moins hydratés, à structure feuilletée (phyllo silicates) ou fibreuse (sépiolite et palygorskite), ce qui explique leurs qualités d'adsorption et leur plasticité (BENALI et al, 2017).

L'argile est utilisée pour absorber les liquides ou engluer des bactéries, virus, champignons, toxines... en cataplasmes externes ou internes (BENALI et al, 2017).

Plusieurs études rapportent en effet, l'utilisation de ceux-ci comme protecteurs gastro-intestinaux, laxatifs ( grâce à la sépiolite, la palygorskite et les smectites telles que la montmorillonite et la saponite qui sont des minéraux argileux qui peuvent réduire l'acidité gastrique principalement par adsorption de protons à la surface du minéral). Anti- diarrhéiques (grâce à la palygorskite, la sépiolite, les smectites, et la kaolinite qui sont largement utilisés comme anti-diarrhéiques parce qu'elles ont une grande capacité d'adsorption, et sont non toxiques. Les minéraux argileux utilisés contre la diarrhée agissent en réduisant la quantité du liquide qui arrive dans le côlon à partir de l'intestin grêle et peuvent adsorber ou neutraliser les entéropathogènes en causant la suppression de la diarrhée et le compactage des matières fécales). Et comme protecteurs dermatologiques (dans ce cas les minéraux argileux peuvent être administrés par voie topique en tant que protecteurs dermatologiques anti-inflammatoires ainsi qu'anesthésiques locaux). Les smectites en particulier interviennent dans la fabrication de nombreux cosmétiques : savons, shampoings, pommades, crèmes et dentifrices où elles remplacent les matières grasses (BENALI et al, 2017).

L'argile pourrait être un véritable substitut d'antibiotiques qui n'entraînerait pas de résistance comme les antibiotiques (BENALI et al, 2017).

Dans cette optique et afin de vérifier en partie cette hypothèse, nous avons réalisé un travail dont l'objectif était d'évaluer le pouvoir antibactérien de l'argile bentonite de Maghnia in vitro et son effet bactéricide sur *les Staphylococcus aureus*.



*Matériels et méthodes*



## 1.1/ Objectif du travail :

- Evaluation le pouvoir antibactérien de l'argile bentonite de maghnia in vitro et son effet bactéricide sur les *Staphylococcus aureus*.

## 1.2/ Lieu et période de travail

Les travaux présentés dans cette étude ont été effectués au sein du laboratoire de microbiologie au niveau de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ibn Khaldoun- Tiaret. Durant le mois du mars 2020.

## 1.3/ Matériels et méthodes :

### 1.3.1/ Matériels

#### 1.3.1.1/ Matériel biologique

- Une souche de référence : *Staphylococcus aureus* ATCC25922

#### 1.3.1.2/ Matériel minéral

- Argile

L'argile (Bentonite) utilisée au cours de notre étude provient du gisement de Hammam Boughrara. Situé à 25 Km au nord-est de Maghnia et ses réserves actuelles d'argile sont estimées de 8,2 millions de tonnes. L'échantillon est exploité actuellement par l'entreprise nationale de fonderie (ENF) (GUENOUN et GADA, 2017).

#### 1.3.1.3/ Matériels, appareillages et produits utilisés

Le matériel et les milieux de culture nécessaires à la réalisation de ce travail sont représentés dans le **tableau 01**.

**Tableau 01** : Matériels de laboratoire et milieux de culture utilisés

Verreries et appareillages	Produits et milieux de culture
<p><b><u>Verreries et autres</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Béchers</li> <li>-Eprouvette graduées</li> <li>-Boîtes de pétri</li> <li>-Pipettes Pasteur</li> <li>-Flacons</li> <li>-Tubes à essais</li> <li>-Verre de montre</li> <li>-Micro-pipettes</li> <li>-Ecouillons</li> <li>-Pincés</li> <li>-Anse d'ensemencement</li> <li>-Cloche de durham</li> <li>-Barreaux magnétiques</li> <li>- Seringues</li> <li>-Papier Wattman</li> <li>-Lames</li> <li>-Lamelles</li> </ul> <p><b><u>Appareillages</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Autoclave (<b>Wolf</b>)</li> <li>-Etuve (<b>Memmert</b>)</li> <li>-Stérilisateur</li> <li>-Bain marie (<b>Memmert</b>)</li> <li>-Balance électrique (<b>sartorius</b>)</li> <li>-Agitateur magnétiques(<b>Stuart</b>)</li> <li>-Microscope</li> <li>-Réfrigérateur (<b>IRIS</b>)</li> <li>-Bec bunsen</li> </ul>	<p><b><u>Milieux de culture</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Baird Parker</li> <li>-Chapman</li> <li>-Gélose ADNase</li> <li>-Eau physiologique</li> <li>-TSI</li> <li>-Mannitol mobilité</li> <li>-Citrate de simmon</li> <li>-Gélose nutritive</li> <li>-Gélose ordinaire</li> </ul> <p><b><u>Produits</u></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></li> <li>-Eau distillée</li> <li>-NaOH</li> <li>- Disques d'antibiotiques</li> <li>-plasma de lapin</li> <li>- Jaune d'œuf</li> <li>-Violet de gentiane</li> <li>-Lugol</li> <li>- Alcool</li> <li>-Fuchsine</li> <li>-Huile d'émersion</li> </ul>

**NB** : La composition des différents milieux de cultures et des tests biochimiques sont données dans l'**annexe 01**

## 1.3.2/ Méthodes

### 1.3.2.1/ Protocole expérimental

La démarche expérimentale suivie au cours de cette étude est illustrée dans l'organigramme ci-dessous (**figure 01**) :

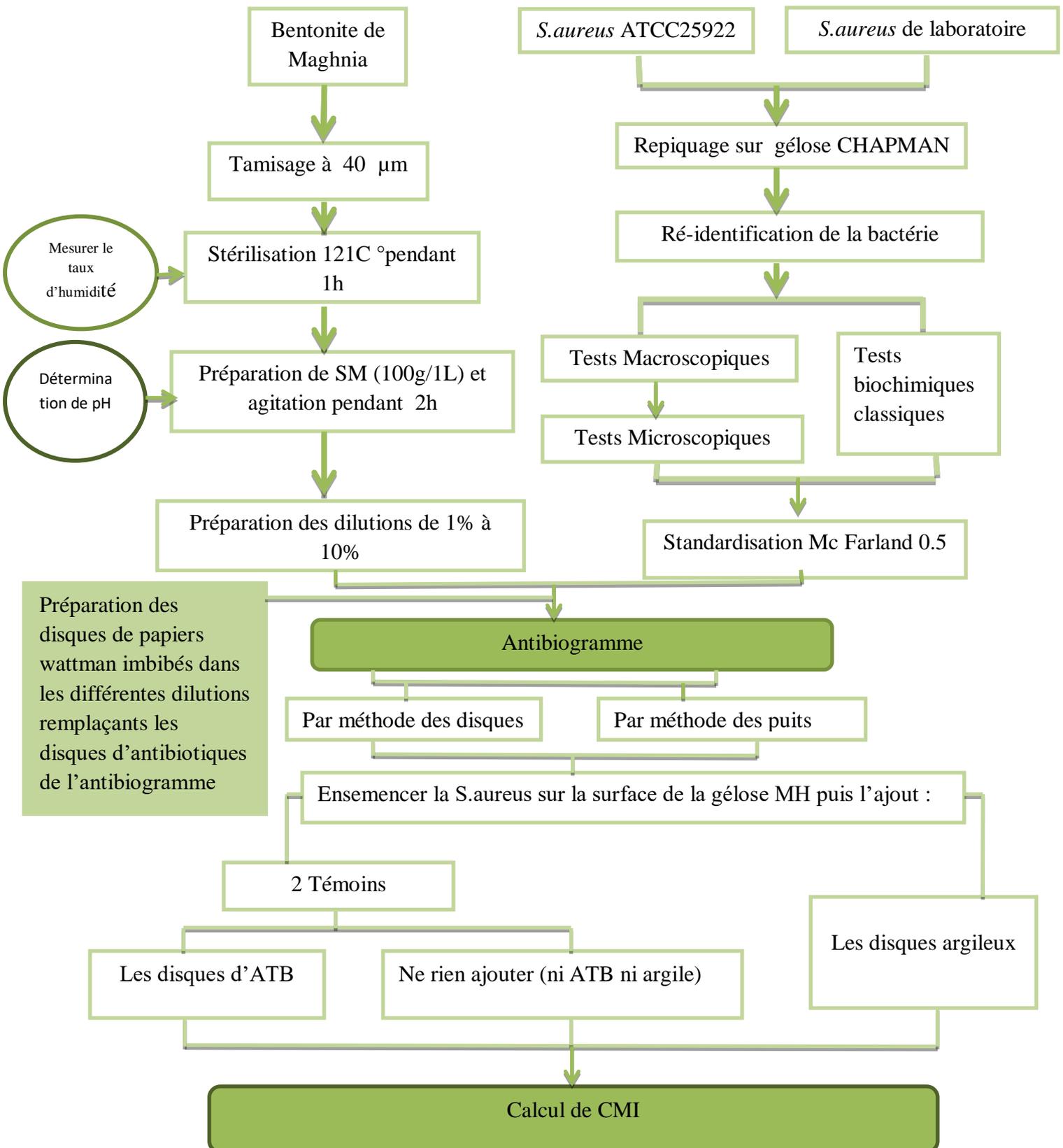
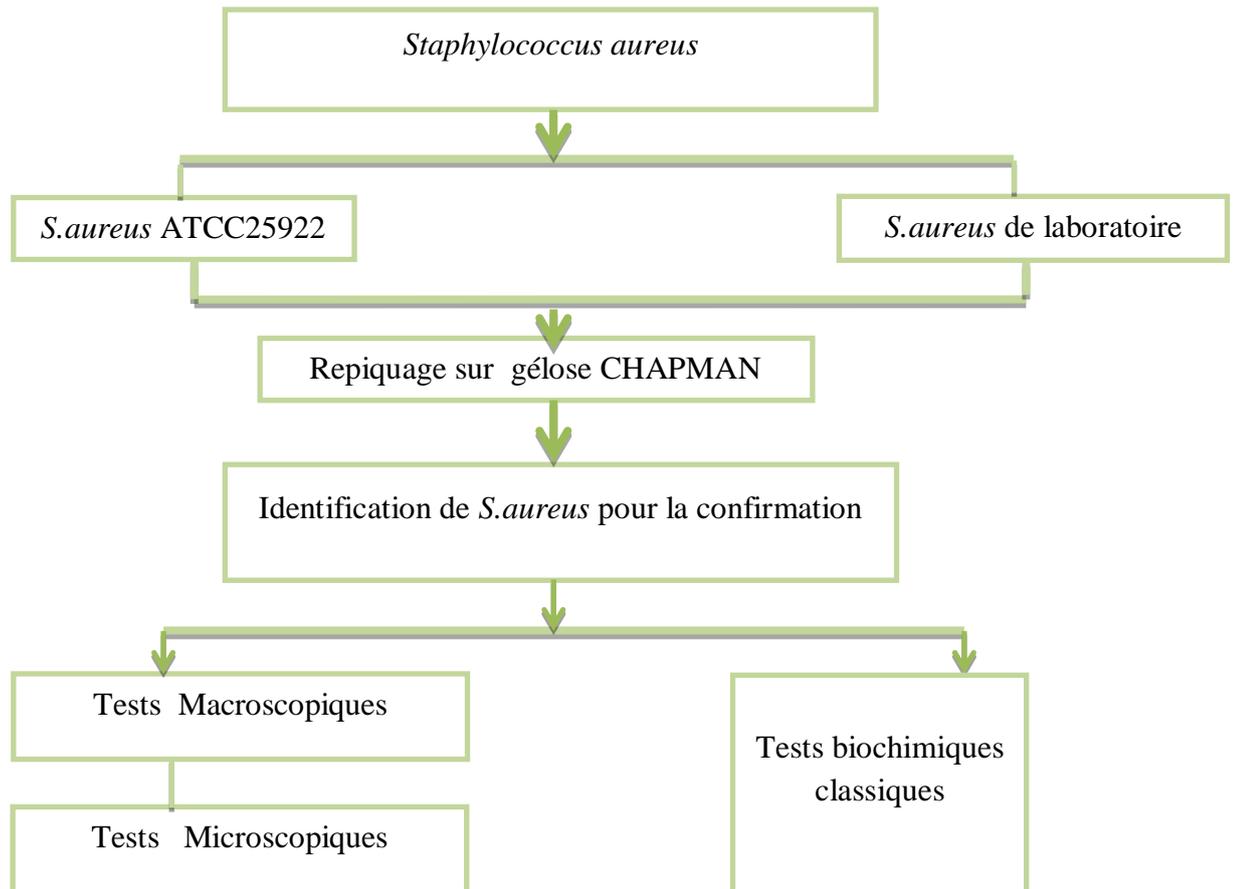


Figure 01 : Organigramme récapitulatif du protocole expérimental

A cause de la pandémie du COVID- 19 qui a touché le monde entier, quelques étapes seulement ont été réalisées (**figure 02**), par contre la plupart ont été traitées et discutées dans ce document sur la base des recherches déjà effectuées.

### 1.3.2.2/ Protocole réalisé



**Figure 02:** Organigramme récapitulatif du protocole réalisé

### 1.4/ Repiquage de la bactérie sur le milieu Chapman :

#### ✓ Technique

- A l'aide d'une anse de platine stérile, prélever une colonie caractéristique et l'ensemencer dans une boîte de pétri
- Incuber à 37 C° durant 24 heures.

## 1.4.1/ Observation microscopique

### 1.4.1.1/ Coloration de Gram

#### ✓ Principe

La méthode de coloration de gram permet de différencier les bactéries à Gram positive, de Gram négative, Ceci étant dû à une différence de composition de la paroi. En se basant sur la différence de la perméabilité de la bactérie, une solution alcoolique va fragiliser et perméabiliser les membranes contenant le plus de lipide permettant l'élimination du complexe crystal violet-iodine des cellules des bactéries a Gram négative, c'est l'étape de décoloration ; les bactéries a Gram positive vont rester colorées en violet tandis que celles a Gram négative vont prendre la teinte de la contre-coloration qui sera appliquée dans un dernier temps. Elle permet aussi de mettre en évidence les caractères morphologiques (forme, taille) des bactéries ainsi que leurs arrangement cellulaires (**BIOLTROP, 2012**).

#### ✓ Technique

- A l'aide d'une anse de platine stérile, on prélève une à deux colonies à partir d'une culture jeune de 48 heures.
- Réaliser un frottis bactérien fin et uniforme en étalant l'échantillon sur une lame en verre stérile contenant quelques gouttes d'eau distillée.
- Fixer la préparation au bec bunsen.
- Inonder la lame de violet de gentiane et laisser agir pendant une minute.
- Eliminer l'excès du colorant par un rinçage a l'eau courante.
- Recouvrir le frottis avec le Lugole et laisser agir pendant une minute.
- Rincer a l'eau courante.
- Décolorer a l'alcool pendant environ 10 secondes, puis rincer a l'eau.
- Recouvrir le frottis au contre-colorant (Fuchsine) et laisser reposer pendant 30 à 60 secondes.
- Bien rincer a l'eau et buvarder délicatement.
- Observer au microscope optique à l'objectif ( $\times 100$ ) après avoir déposé une goutte d'huile d'immersion.

## 1.5/ Recherche des Staphylocoques à catalase positive :

### 1.5.1/ Repiquage de Staphylocoque sur le milieu Baird Parker

La gélose de Baird-Parker au jaune d'œuf au tellurite de potassium est le milieu sélectif le plus utilisé pour la recherche et le dénombrement *des Staphylocoques* à coagulase positive en microbiologie alimentaire.

### ✓ Technique

- A l'aide d'une anse de platine stérile, prélever une colonie caractéristique et l'ensemencer dans une boîte de pétri
- Incuber à 37 C° durant 24 heures.



**Figure 03:** Repiquage de *Staphylococcus aureus* sur le milieu BP

### 1.5.2/ Ré-identification des souches

#### A. Test de la catalase

##### ✓ Principe

Pendant la respiration aérobie, certaines bactéries produisant du Peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est très toxique et certaines bactéries sont capables de le dégrader grâce à des enzymes qu'elles synthétisent et notamment la catalase (BOUDOUDA, 2015).

La catalase a la propriété de décomposer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sous forme gazeuse selon la réaction suivante:



##### ✓ Technique

- Sur une lame propre et sèche, déposer une goutte d'eau oxygénée.
- A l'aide d'une anse de platine stérile, ajouter une quantité suffisante de culture bactérienne.
- Observation immédiatement.



**Figure 04** : Test de la catalase

✓ **Lecture**

Les bulles correspondent au dégagement de gaz de dioxygène O<sub>2</sub>

-Apparition de bulles → Catalase positive.

-Absence de bulles → Catalase négative.

**1.6/ Etude des caractères biochimiques :**

Les différents tests pratiqués sont détaillées dans le tableau 02 (DEBBI et SAADI, 2019).

Tableau 02 : les tests biochimiques chez les *S.aureus*

Milieu / principe	Aspect de milieu avant l'ensemencement	Mode d'ensemencement	Caractère recherché	Lecture
<p><b>Mannitol Mobilité</b></p> <p><u>Principe</u> : ce milieu permet l'étude de la fermentation du mannitol, il permet aussi la mise en évidence de la mobilité bactérienne.</p>		<p>Le milieu mannitol est ensemencé par piqure centrale à l'aide d'une pipette pasteur chargée de la culture bactérienne en milieu semi-solide incubé à 37 °C pendant 24h.</p>	<p>Fermentation de mannitol -La mobilité</p>	<p>-<u>Mannitol (+)</u> Apparition d'une coloration jaune -<u>Mannitol (-)</u> Milieu reste rouge. -<u>Mobilité (+)</u> Diffusion de la culture à partir de la ligne d'ensemencement en créant une trouble du milieu. -<u>mobilité (-)</u> Pas de diffusion.</p>
<p><b>TSI</b></p> <p>-<u>Principe</u> : Ce milieu permet d'étudier la fermentation de trois sucres (saccharose, lactose, glucose) d'apprécier la production ou non de l'H<sub>2</sub>S et de noter la production ou non de gaz à partir du glucose.</p>		<p>-Ensemencement de la pente de la gélose par des stries serrées, puis le culot par piqure centrale et l'incubation est réalisée à 37°C pendant 24h. -Le bouchon de milieu ne doit pas être trop vissé.</p>	<p>-Lactose -Glucose -Saccharose -Gaz -Production d'H<sub>2</sub>S</p>	<p>-<u>Lactose (+)</u> : Virage de la pente au jaune (la pente du milieu). -<u>Saccharose (+)</u> : virage au jaune de milieu de tube (la pente de milieu). -<u>Glucose (+)</u> : virage de culot au jaune et bactérie aéro-anaérobie. -<u>Gaz (+)</u> : apparition des bulles ou des poches gazeuse qui décalent la gélose de fond de tube. -<u>Production d'H<sub>2</sub>S</u> : Noircissement du milieu.</p>

<p><b>Citrate de Simmons</b></p>		<p>Ce milieu peut être utilisé aussi bien en tube gélose incliné qu'en boîte de pétri. Dans les deux cas ensemercer légèrement la surface du milieu par stries et pour les tubes en pente jusque dans le culot, puis incubation</p>	<p>-utilisation de citrate</p>	<p>- <u>Citrate (+)</u> : Virage de milieu au bleu et une culture de colonie sur la pente.</p>
----------------------------------	---	---	--------------------------------	--

A cause de la pandémie du COVID-19 on n'a pas pu de terminer notre travail au sein de laboratoire donc on va utiliser d'autres thématiques proche à la nôtre.

## 1.7/ Standardisation de Mc Farland:

- Préparer l'étalon 0,5 Mc Farland en versant 0,5 ml d'une solution de BaCl<sub>2</sub>dihydraté à 1% (10g/l), dans une éprouvette de 100ml. Compléter à 100ml avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1% (10 ml/l). Ainsi préparé, il doit avoir une D.O de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm.
  - Aliquoter la solution en volumes de 10 ml, dans des tubes identiques à ceux qui serviront à la préparation des inoculum (le nombre d'aliquotes sera fonction du nombre de manipulateurs).
  - Sceller ces tubes de façon à éviter toute évaporation (parafilm, ruban adhésif, ...).
  - Repérer le niveau du liquide à l'aide d'un marqueur, et le contrôler régulièrement en prenant la densité optique.
  - Conserver les tubes à température ambiante, et à l'abri de la lumière (papier aluminium).
  - Homogénéiser le tube étalon avant de le comparer à l'inoculum préparé :
- Inoculum et étalon doivent avoir la même turbidité lorsqu'ils sont examinés sur un fond rayé.
- Privilégier l'utilisation des densitomètres.

## 1.8/ Antibiogramme :

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

Le principe consiste à placer la culture de bactéries en présence des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci.

Le milieu utilisé est le MH coulé dans une boîte de pétri de façon uniforme et jusqu'à une épaisseur de 4 mm.

La méthode est la diffusion sur gélose

### ✓ Technique

- A proximité du bec Bunsen et à l'aide d'une anse de platine stérilisée au préalable prélever une ou deux colonies isolées sur milieu de culture.
- Les déposer dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique, bien mélanger la préparation.
- Inonder la boîte contenant milieu de Mueller-Hinton par la préparation.
- Ré aspirer soigneusement à la pipette Pasteur l'excès de suspension ou rejeter dans un bicher de l'eau de javel.
- Sécher le milieu ensemencé pendant 15 minutes à 37C°.
- Appliquer des disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince flambée ou distributeur.
- Incuber les boîtes dans l'étuve à 37C° pendant 18 heures.

La lecture doit se faire dans les délais recommandés:18 à 24 heures. La zone d'inhibition circulaire est mesurée par le diamètre en millimètres à l'aide d'une règle. Il existe trois types d'interprétation selon le diamètre du cercle qui entoure le disque d'antibiotique : souche ou bactérie sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par (EUCAST ,2016).

Dans ces deux méthodes utilisées on ensemence la *S.aureus* sur la surface de la gélose MH puis on ajoute les disques argileux et deux témoins (les disques d'ATB et ni ATB ni argile).

### 1.8.1/ Méthodes des disques d'antibiotiques (Méthode indirect)

#### ✓ Principe général

Pour réaliser la méthode de disque, la culture bactérienne est effectuée à la surface d'une gélose de MH. Des disques pré imprégnés d'une dose connue d'antibiotique sont déposés à la surface de la gélose. L'antibiotique (Ampicilline) diffuse à partir du disque en créant un gradient de concentration. La détermination du diamètre de la zone d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice. Les caractères de sensibilité ou de résistance de la souche bactérienne en seront déduits (MEGHNI et LAZGEUGE, 2018).

#### 1.8.1.1/ Application des disques

- Les disques seront confectionnés à partir de papier (Wattman n° 5), à raison de 6mm de diamètre. Pour éviter tous risques de contamination aux germes exogènes au cours de l'expérimentation les disques ont été stérilisés à 120°C pendant 15 minutes .
- Trois disques imbibés pendant 5 minutes dans chaque concentration d'extrait obtenu selon le solvant utilisé.
- Déposer à la surface des boîtes les disques imbibés et les disques d'antibiotique choisis (Gentamycine) en appuyant légèrement à l'aide de la

pince stérilisée ; on doit veiller à ne pas chauffer les disques par la pince flambée.

- Un disque appliqué ne peut être déplacée, les différents disques doivent être distants d'environ 30 mm, la boîte peut et doit être retournée sans problème. Tous les essais sont effectués à trois reprises.

### 1.8.2/ Méthode des puits de diffusion

Il s'agit d'un test simple de criblage et de sensibilité, en utilisant une méthode dite de diffusion avec des puits creusés dans le milieu Mueller Hinton [(PEREZ *et al*, 1990).

Cette méthode de puits a été modifiée dans le laboratoire où on a utilisé les pipettes pasteur flambées et refroidies pour creuser des puits de 0,8mm de diamètre comportant environ 100 µl d'échantillon d'argile.

Cette technique est répertoriée et décrite dans différentes publications. [(OSHO *et BELLO*, 2002), (ASSEGID *et al*, 2004)].

#### 1.8.2.1/ Le mode opératoire

On dépose 0,1 ml de chaque souche puis on étale en surface du milieu MH par écouvillonnage. Nos échantillons de l'argile ont été versés avec une micropipette dans les puits creusés à raison de cinq puits par boîte. L'incubation se fait à  $37^{\circ}\pm 2C$  pendant 24h à 48h. Et Nos expériences sont réalisées en triple.

#### 1.8.2.2/ Expression des résultats

Les zones d'inhibition ont été mesurées deux fois par puits à des angles perpendiculaires (JASON *et al*, 2004).

Ont déterminé les intervalles suivant : <5mm inactive, 5,5-9 mm activité très basse, 12-15 mm activité moyenne et >15 mm activité élevée.

**NB :** les zones d'inhibition on obtient :

- Soit une zone translucide transparente avec absence totale de croissance.
- Soit une zone où il y'a une décroissance par rapport au tapis bactérienne Pour confirmer l'effet : si elle est bactéricide ou bactériostatique.

On utilise une boîte de Pétri contient le milieu de culture neuf et on va repiquer l'intérieur de la zone d'inhibition et on voit s'il y'a présence ou absence de croissance microbienne. Si le résultat est positif c'est-à-dire il y'a une croissance on le considère comme un effet bactériostatique, si non s'il y'a absence de croissance c'est un effet bactéricide (MURAT *et al*, 2007).

### 1.9/ Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

La CMI est définie comme étant la croissance la plus faible d'un agent antimicrobien qui inhibe la croissance visible d'un micro-organisme après l'incubation, et la CMB comme la plus faible concentration d'un agent antimicrobien qui tue 99.9% des micro-organismes après

sous-culture sur le milieu la CMI<sub>0</sub>, CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>100</sub> [(COSENTINO et al, 1999).(BELLERBECK, 2000).(ANDREWS, 2001)].

La méthode par dilution a pour but d'évaluer des CMI. Celle-ci consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme.

### 1.9.1/ Préparation des dilutions

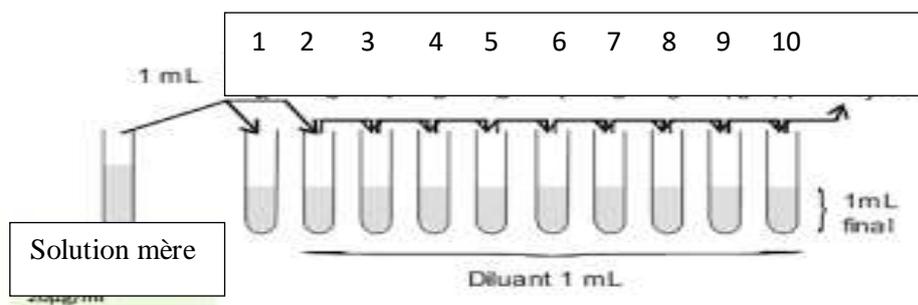


Figure 05: préparation des dilutions

### 1.9.2/ Méthode des spots

#### ✓ Principe de la méthode

Ce test a pour objectif d'estimer la concentration minimale inhibitrice des souches testées au contact de différentes concentrations des agents antimicrobiens étudiés.

Cette technique est réalisée en trois étapes :

- Dans des boîtes de Pétri stériles, couler 15 ml du milieu MH qui va servir d'apport en nutriments pour les souches bactériennes.
- Réaliser une dilution volume à volume : dans 3 ml du milieu de culture, mélanger des volumes variables de l'agent antimicrobien à tester. Puis, la dilution obtenue est versée et étalée d'une façon homogène dans les boîtes de Pétri préalablement coulées.
- Après solidification, déposer 3 spots de 5µl de la suspension bactérienne à  $10^6$  UFC/ml en forme de triangle.

Nous avons aussi réalisé un témoin positif contenant uniquement la suspension microbienne, et un témoin négatif ne contenant uniquement l'agent antimicrobien.

Les boîtes sont ensuite, incubées à 37°C pendant 24h.

La plus petite concentration pour laquelle il n'y'a aucun développement visible de la souche est considérée comme étant la CMI.

Les CMI sont calculées en pourcentage (%) du volume de l'agent antimicrobien incorporé par rapport au volume de la couche superficielle du milieu de culture (ABDI et al, 2016)



## *Résultats et Discussion*



## 1/ Identification des souches :

### 1.1/ Etude Macroscopique

- Aspect des colonies

Sur le milieu Chapman, les colonies des *Staphylocoques* apparaissent crémeuses, entourées et pigmentées d'une auréole jaune. Le changement des couleurs du milieu de rouge au jaune se traduit par la fermentation de mannitol avec libération de produits acides donc la bactérie est de mannitol positive (**figure 06**).



**Figure 06:** Aspect macroscopique des colonies caractéristiques de *Staphylocoque* sur milieu chapman.

Sur le milieu Bp, les colonies des *Staphylocoques* apparaissent noires due à la réduction de tellurite, convexes, brillantes, de diamètre compris entre 0,5 et 2 mm entourées d'une halo clair correspond à une protéolyse des lipoprotéines du jaune d'œuf par des lipoprotéinases. A l'intérieur du halo transparent, une zone opaque due à l'action de lécithinase (hydrolyse de la lécithine) (**DELARRAS, 2007**) (**figure 07**).

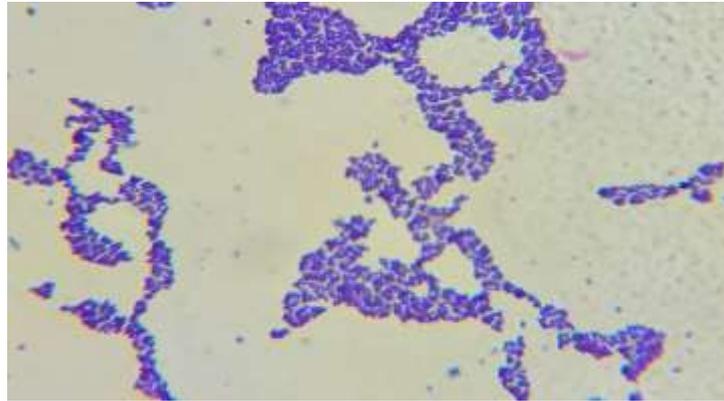


**Figure 07:** aspect macroscopique des colonies caractéristiques des *S.aureus* sur milieu BP

## 1.2/ Etude microscopique

- **Coloration de Gram**

Les résultats de la coloration de Gram des isolats ont révélés à Gram positif ,associées en diplocoques et en grappes de raisin (**figure 08**) .



**Figure 08:** Aspect microscopique des staphylocoques  
(Coloration de gram objectif \*100).

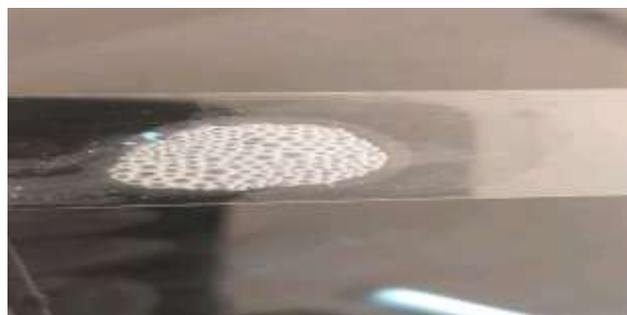
## 2/ Ré-identification des souches :

Les tests d'identification ont permis de confirmer l'appartenance des souches isolées à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

- ✓ **Test de catalase**

La présence d'une catalase est un caractère quasi-constant chez *les Staphylocoques* et sa mise en évidence permet de distinguer parmi les cocci à gram positif *les Staphylocoques* des *Streptocoques*.

L'isolat au genre *Staphylococcus*, est décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage ce qui se traduit par le dégagement des bulles de gaz (**Figure 09**).



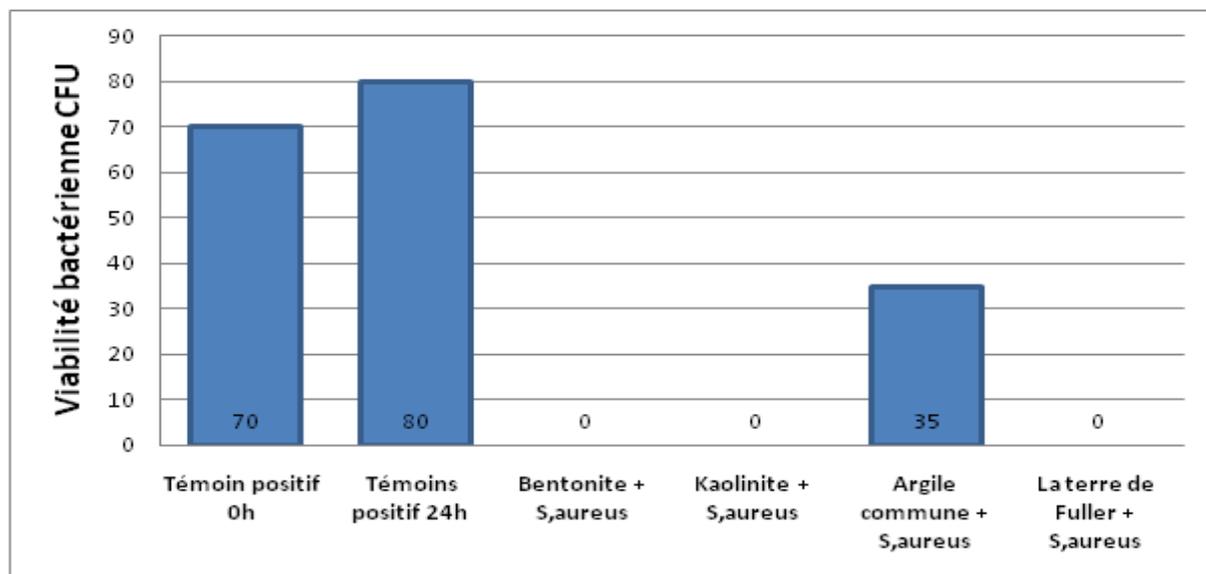
**Figure 09 :** Mise en évidence de la catalase chez les *Staphylocoques aureus*.

Compte tenu de la situation actuelle à laquelle le monde est confronté en raison de l'épidémie de Corona, nous n'avons pas eu l'occasion d'achever notre travail; C'est pourquoi nous nous comptons sur les résultats et discussions obtenus dans les articles précédents.

### 3/ L'activité antibactérienne de l'argile bentonite sur les *Staphylococcus aureus* :

#### 3.1/ Le premier article : Effet antibactérien de certaines argiles minérales in vitro :

Cet article (SHEHAB et al, 2011) vise à évaluer l'effet antibactérien de quatre types d'argiles minérales (Bentonite, Kaolinite, la terre de Fuller, et argile commune ) sur la souche bactérienne *S- aureus* qui a été isolée d'un patient (homme adulte) atteint d'une infection cutanée (furonculose).



**Figure 10** : Effet antibactérien des argiles minérales utilisées contre l'isolat *S- aureus*.

Les résultats obtenus montrent que la bentonite ; kaolinite et la terre de Fuller ont un effet bactéricide car ils ont conduit à une destruction complète de *Staphylococcus aureus*. En revanche, l'argile minérale commune a un effet bactériostatique car elle a ralenti la croissance de cet isolat bactérien.

En raison de la qualité particulière de l'argile minérale spécifique utilisée pour incorporer divers ions, selon les charges et les solutés disponibles, la surface peut être hydrophile ou hydrophobe. La surface hydrophobe est de nature organique et peut contenir des substances organiques mortelles pour les bactéries. Les particules d'argile ont une charge négative, tandis que les toxines dans le corps ont une charge positive. En utilisant de l'argile, les ions chargés positivement de diverses toxines sont attirés vers la surface chargée négativement des particules d'argile, et l'échange d'ions se produit. Dans ce processus, les toxines sont liées et retenues jusqu'à ce qu'elles puissent être éliminées (détoxification) (SHEHAB et al, 2011).

3.2/ Le deuxième article ; Argiles utilisées dans la curation de diverses affections en côte d’ivoire « étude de l’effet antibactérien » :

Cet article (KOUAKOU et al, 2014) vise à évaluer l’activité antibactérienne de trois argiles référencées (UK1 ; UB1 ; UB2) de compositions différentes sur la souche bactérienne *S.aureus* ATCC 25923, rencontrée aussi bien dans les infections gastro-intestinales que dans les infections de la peau.

Tableau 03: Composition minéralogique (%) des matériaux argileux.

Ech	Ka	Qz	Verm	Illite	Mont	Cal	Feld	Total
UK1	22.6	4.1	0	18.1	6.5	0	0	88.3
UB1	0	30	11	31.5	0	18	0	90.5
UB2	0	5.5	0	5.6	20.5	0	49	80.6

Mont=montmorillonite, Ka=kaolinite, Qz =quartz, Cal=calcite, Feld=feldspath, Verm=vermiculite.

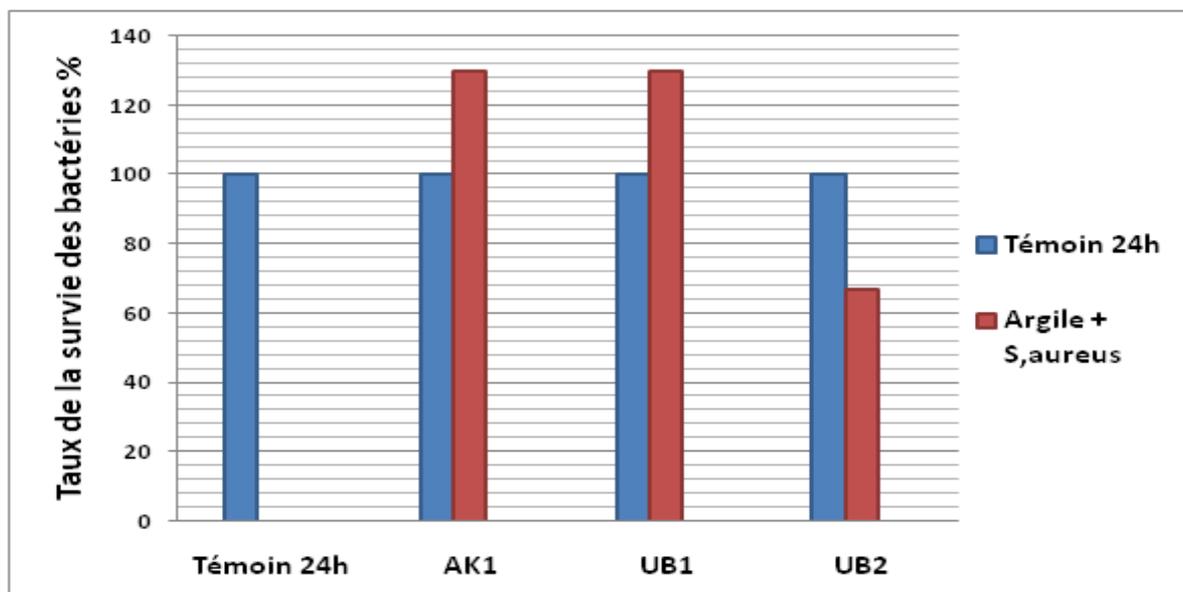


Figure 11: Effet des argiles sur la croissance de *Staphylococcus aureus* après 24h d’incubation

Les résultats obtenus montrent que UB2 inhibe faiblement la croissance de la bactérie avec un taux de survie de 67% en revanche AK1 et UB1 promeuvent leur croissance avec un taux de survie au-de la 100%.

La promotion de la croissance de la bactérie constatée en présence d’AK1 et UB1 serait due à la présence de la kaolinite, de la montmorillonite et de l’illite dans ces argiles. En effet, ces minéraux dans certaines conditions pourraient favoriser l’assimilation d’acétate dont l’énergie de dégradation favorise la croissance bactérienne.

UB2 contient pourcentage élevé de montmorillonite (20,5%). en effet la montmorillonite par son pouvoir absorbant élevé séquestrerait des nutriments tels que le  $Ca^{2+}$  et le  $K^+$  essentiels à la croissance de la bactérie .et par son caractère hydrophile pourrait induire une diminution de la quantité en eau du milieu qui est défavorable au développement des bactéries. Cependant, UB2 a un faible effet inhibiteur (destruction incomplète) sur la croissance bactérienne parce que cette bactérie est à gram positif. En effet, la paroi des bactéries à gram positif est plus épaisse que celle des bactéries à gram négatif, ce qui complique le mécanisme d'action de cette argile.



---

## *Conclusion*



## Conclusion

---

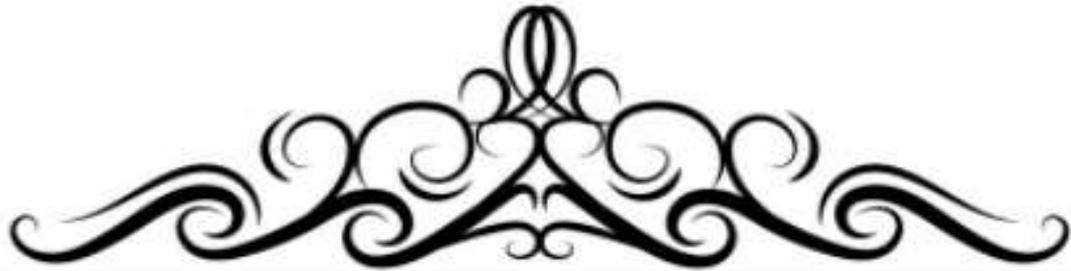
L'augmentation de l'incidence des infections liées à la résistance aux antibiotiques indique un besoin pour identifier et analyser de nouveaux agents antibactériens. Les résultats obtenus dans cette étude, seront essentielles pour soutenir et valider l'utilisation des minéraux de l'argile comme produit peu coûteux à effet antibactérien grâce à leurs propriétés physico-chimiques .

Ces résultats ont indiqué que l'argile pourrait fournir un traitement alternatif contre de nombreuses infections bactériennes humaines.

Les argiles testées possèdent une activité antibactérienne. Mais, cette activité dépend du type d'argile et du type de bactérie rendant ainsi que ça peut être complexe le mécanisme d'action de ces argiles.

L'argile pourrait être un véritable substitut d'antibiotiques qui n'entraînerait pas de résistance comme les antibiotiques.

La valeur médicinale de l'argile comme antibiotique naturel est de plus en plus démontrée scientifiquement, ce qui constitue l'importance de son utilisation en médecine moderne et dans le secteur de l'industrie pharmaceutique et cosmétique. Et il est également utile et nécessaire de tenir plus de travaux de recherche sur l'argile bentonite et ses impacts sur la fonction corporelle.



## *Références Bibliographiques*



## Références bibliographique

### A

- **Andrews, J. M. (2001).** «Determination of minimum inhibitory concentrations». *J Antimicrob Chemother*, vol.48, n° 1.Pp 5-16.
- **Assegid, G. Erik, S. Lapre, I. (2004).** «Microcalometric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona* spp and comparison of some parameters with those obtained with standard methods». *Thermochimica Acta*, vol. 415, n°1-2.Pp. 99-106.
- **Abdi F ,akram R (2016)** Évaluation de l'activité antibactérienne de d'origine végétale, microbienne individuellement et en combinaison.memoire de master université de tizi ouzou .université mouloud maamri tizi ouzou .Pp 33.

### B

- **Bellerbeck, V.G. (2000).** «Activité antifongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon Nardus*(L) W. WATSON sur *Aspergillus niger*. Evaluation d'un bioréacteur pour l'étude del'effet inhibiteur de substances volatiles en phase vapeur». Laboratoire de bactériologie-virologie et microbiologie industrielle et UPRES-EA3030, Pharmacophore-Redox. Faculté de pharmacie de Toulouse. France
- **BENALI. R ; BRAHMI. S ; MEKNI. M ; RADDAOUL. A ; OUNIS. A ; DZIRI.Ch ; El MAY. M ; (2017).** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'argile verte Tunisienne et son effet sur la flore intestinale chez le rat Wistar ; Tunisie F.S.B XV .Pp160-166.
- **BOUALEM S, BOUGHELAMALLAH Ch, CHERATI S(2019),**recherche et dénombrement des *Staphylocoques* à coagulase positive dans les aliments prêts à manger,mémoire de master ,université ibn khaldoun,tiaret. Pp 48.
- **Boudouda R. (2015).** Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse de *pseudomonas aeruginosa*. Université des frères mentouri constantine. Pp 47.

### C

- **Claire L. (2012).** Arn régulateurs de *Staphylococcus aureus* : rôle de rsaa dans la formation du biofilm de la capsule, niveau d'expression des arn dans les prelevements cliniques. These de doctorat. Université claud bernard. Lyon 1.Pp 214.
- **Cosentino, S. Tuberoso, C.I. Pisano, B. Satta, M. Mascia, V. Arzedi, E. Palmas, F. (1999).** «In vitro antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian Thymus* essential oils». *Lett Appl Microbiol*, vol. 29, n°2.Pp 130-5.

## Références bibliographique

### D

- **DEBBI S, SAADI M(2019)**, Isolement, identification et étude de la résistance des souches d'*Escherichia coli* isolées dans différents service de l'hôpital de lakhdaria, mémoire de master, université akli mohand oulhadj – bouira .Pp 37.
- **Delarras. (2007)**, microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire.
- **Drugeon .H.-B ; Rouveix. B; Michaud-Nerard. A ; (2012)**. Activité antibactérienne du triclocarban sur les *Staphylocoques*, *Entérocoques* et *Streptocoques* résistant ; Paris ; Médecine et maladies infectieuses ; Vol.42. Pp 276-279.

### E

- **EUCAST. (2016)**. European Commite on Antimicrobial Susceptibility Testing.

### G

- **GUENOUN N, GADA S (2017)**, activation de la bentonite de maghnia pour usage pharmaceutique, memoire de master, université mouloud mammeri de tizi-ouzou .Pp 32.

### J

- **Jason, H. D. Esther. R. ANGERT. (2004)**. «Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica». *Apidologie*, vol. 35.Pp 411–417.

### K

- **Katherine M. Cafilisch, Suzannah M. Schmidt-Malan, Jayawant N. Mandrekar, Melissa J. Karau, Jonathan P. Nicklas, Lynda B. Williams, Robin Patel ; (2018)**. Antibacterial activity of reduced iron clay against pathogenic bacteria associated with wound infections .USA ; International journal of antimicrobial agents, vol.52 .Pp 692-696.
- **KHATEM .R ; (2017)**. Etude des propriétés absorbantes des argiles modifiées vis à vis de polluants organiques. Cas des pesticides et des produits pharmaceutiques. Thèse de doctorat. Université ABDEL HAMID IBN BADIS Mostaganem: Faculté des sciences de la nature et de la vie. Pp 175.

## Références bibliographique

- **KOUAKOU. L ; ANDJI-YAPI. Y ; COULIBALY-KALPY. J et COULIBALY.K ; (2014).** Argiles utilisée dans la curation de diverses affections en Côte d'Ivoire: Etude de l'effet antibactérien ; Côte d'Ivoire ; Ivoir. Sci. Technol.,24 Pp 84-92.

### M

- **MEGHNI L, LAZREUGE FZ(2018),** Effet antimicrobienne des extraits de *Thymus vulgaris* chez *Staphylococcus aureus* responsable des infections uro-génitale chez la femme, mémoire de master,université abdel hamid ibn badis, Pp 56.
- **MERAH M., BENSACI BACHAGHA M. et BOUDERHEM A ; (2010).** Etude de l'effet antimicrobien de trois échantillons du miel naturel récoltes du territoire algérie ; Annales des Sciences et Technologie ; vol.2, N° 2.Pp 115-125.
- **MOOSAVI. M ; (2017).** Bentonite clay as a natural remedy. Iran j public health, vol. 46, n°9 .Pp 1176-1183.

### N

- **Natapol P., Suphang K., Sirijan S., Witawat T., Thida T., Woranich H and Nitaya I. (2017).** Screening method for *Staphylococcus aureus* identification in subclinical bovine mastitis from dairy farms. Veterinary world, Eissn 2231-0916. Vol 10. Pp 722.

### O

- **Osho, A. Bello, O.O. (2002).** «Antimicrobial effect of honey produced by *Apis mellifera* on some common human pathogens». *Asian journal.EXP.BIOL.SCI*, vol.1, n°4. Pp.875-880.

### P

- **Perez, C. Paul, M. Bazerque, P. (1990).** «An Antibiotic assay by the agar well diffusion method». *Acta. Bio. Med. Exp.vol*, 15. Pp113-115.

### R

- **ROBERT.D ; (2013).***Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) : généralités, antibiotiques actifs, résistances acquises, et implication en pathologie communautaire illustrée par l'exemple des infections acquises au cours de la pratique

## Références bibliographique

---

sportive .Thèse de doctoract. Université Angers : Faculté UFR sciences pharmaceutiques et ingénierie de la santé. Pp 126.

### S

- **Shehab A. Lafi et Mohamed R.AL-Dulaimy ; (2011).** Antibacterial effect of some mineral clays in vitro. Egypt. Acad. J. biolog. Sci., 3(1).Pp75-81.
- **Srikanth. G, Y.V. Madhavia, Sidharth. Ch, Srinivas. N ; (2019).** Promising antibacterial agents against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. India ; Bioorganic chemistry ; Vol. 92 ; Pp23.



# *Annexes*



### Annexe 01 : Composition des milieux de culture

#### ❖ Gélose de Baird Parker

##### Solution de tellurite de potassium

- Tellurite de potassium .....1 g
- Eau .....100 ml

##### Emulsion de jaune d'œuf

- Nettoyer les œufs avec une brosse à l'aide d'un détergent liquide.
- Les rincer à l'eau courante puis désinfecter les coquilles, en les pulvérisant d'alcool suivi de flambage.
- En opérant de façon aseptique, casser chaque œuf et séparer le jaune du blanc.
- Placer les jaunes dans un flacon stérile et ajouter quatre fois leur volume d'eau stérile.
- Mélanger vigoureusement.
- Chauffer le mélange dans le bain d'eau (4,4) réglé à 47° C pendant 2h.
- Entreposer le mélange à  $+3^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$  pendant 24 h pour laisser se former un précipité .
- Recueillir aseptiquement le liquide surnageant dans un flacon stérilisé pour l'utilisation.

##### Milieu complet

- Milieu de BP .....180 ml
- Solution de tellurite de potassium .....5 ml
- Emulsion de jaune d'œuf .....10 ml

##### Préparation du milieu déshydraté

- Mettre en suspension 63 g de milieu de base déshydraté dans 1000 ml d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacons, à raison de 180 ml par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121° C pendant 15 minutes.  
Ph de milieu prêt à l'emploi à 25 °C :  $7,2 \pm 0,2$ .

## Annexes

---

### ❖ Gélose de Chapman

#### Préparation de milieu déshydraté

- Mettre en suspension 111,0 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.  
Ph du milieu prêt à l'emploi à 25 °C :  $7,4 \pm 0,2$ .

### ❖ Mannitol mobilité

#### Préparation de milieu déshydraté

- Mettre en suspension 33,0 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

### ❖ Citrate de simmon

#### Préparation de milieu déshydraté

- Mettre en suspension 29,28 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

### ❖ TSI

#### Préparation de milieu déshydraté

- Mettre en suspension 68.6 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.

## Annexes

---

- Répartir en flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

### ❖ ADN ase

#### Préparation de milieu déshydraté

- Mettre en suspension 42,0 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

### ❖ L'eau physiologie

#### Composition

- Chlorure de sodium (NaCl) .....9 g
- Eau distillée .....1000 ml

#### Préparation de milieu déshydraté

- Dissoudre 9 g de poudre dans un litre d'eau distillée.
- Bien mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.
- Répartir à raison de 9 ml par tube.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

### Annexe 02 : Composition des réactifs

#### 1. Réactifs de la coloration de Gram

##### - Violet de gentiane

- Phénol..... 2.0 g
- Violet de gentiane..... 1.0 g
- Éthanol à 90° ..... 10 ml
- Eau distillée..... 100 ml

##### -Lugol

- Iodure de potassium .....2.0 g
- Iode métalloïde .....1.0 g
- Eau distillée .....300 ml

##### - Alcool absolu

##### - Fuchsine

- Fuchsine basique .....1.0 g
- Phénol .....5.0 g
- Ethanol à 90° .....10 ml
- Eau distillée .....100 ml

#### 2. Réactif de catalase

- Eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....3 %

### Annexe 03 : Ré-identification des souches (les tests qui ne sont pas terminés)

#### 1. Matériels méthodes

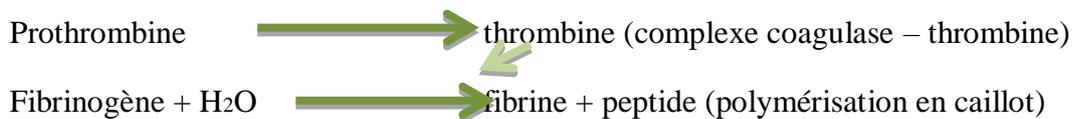
##### ❖ Ré-identification des souches

##### Test de coagulase

##### ✓ Principe

La coagulase libre est une enzyme extracellulaire, capable de coaguler le plasma humain ou de lapin. Elle réagit avec une coaguline plasmatique proche de la prothrombine dans le plasma, et former un complexe nommé staphylothrombine qui convertit le fibrinogène en fibrine (CLAIRE, 2012).

La coagulase a la propriété de provoquer la coagulation du plasma selon la réaction suivante :



##### ✓ Technique

- A l'aide d'une anse de platine stérile, prélever une colonie caractéristique et l'ensemencer dans un tube de bouillon BHIB.
- Incuber à 37°C durant 24 heures.
- Mettre dans un tube à hémolyse 0.5 ml de culture et 0.5 ml de plasma de lapin.
- Placer le tube dans l'étuve à 37 °C durant 2 à 24 heures.



**Figure 12 : Test de la coagulase (BOUALEM et al, 2019).**

### ✓ Lecture

La réaction est considérée comme positive (coagulase positive) lorsque le coagulum occupe les  $\frac{3}{4}$  du volume initialement mis en jeu. En principe, la coagulation se manifeste en moins de 3 heures et le plus souvent le caillot adhère aux parois du tube. Parfois la coagulation se produit plus lentement; dans ce cas la réaction doit être considérée comme positive, si un caillot apparaît en moins de 24 heures.

## Test d'ADNase

### ✓ Principe

Certaines bactéries sont capables d'hydrolyser l'acide désoxyribonucléique grâce à une enzyme : désoxyribonucléase (ADNase) (NATAPOL et al, 2017).



### ✓ Technique

- A partir d'une culture pure et fraîche, prélever les colonies suspectes et les ensemercer à la surface de la gélose à ADN en strie unique.
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.
- Après l'incubation, inonder la surface du milieu avec l'HCl.
- Laisser agir une minute et ré-aspirer l'excès.

## Annexes

---



**Figure 13 :** Test d'ADN ase.

### ✓ Lecture

Lorsque l'ADN est hydrolysé, un halo clair est visible autour de la strie et le reste de la boîte reste opaque.

## 3. Résultats et discussion

### ✓ Test de coagulase

La formation du coagulum nécessite la présence d'une globuline de la prothrombine, il apparaît après 3 à 6 heures et parfois se traduit plus lentement (24 heures), se qu'indique un résultat positive.

Dans le cas négatif, le milieu reste liquide (**figure 14**).



**Figure 14:** Mise en évidence de la coagulase chez les *Staphylocoques* (BOUALEM et al, 2019).

## Annexes

---

### ✓ Test d'ADNase

La zone d'hydrolyse est mise en évidence par l'addition d'acide chlorhydrique à la surface du milieu, ce qui provoque la précipitation de l'ADN (**Figure 15**).

Il y a présence d'un halo clair autour de la culture si l'ADN a été hydrolysé.



**Figure 15** : Mise en évidence de l'ADNase chez *les Staphylocoques* (BOUALEM et al, 2019).

## Résumé

L'objectif de ce travail était d'évaluer le pouvoir l'activité antibactérienne d'argile et son effet sur les *staphylococcus aureus*, à partir de deux souches ; la première était référencée et la 2ème non référencée ; ce travail était faites au niveau du laboratoire de la microbiologie de l'université SNV Tiaret.

À cause de la pandémie du COVID- 19 qui a touché le monde entier, ont été réalisé seulement l'identification de la souche référencée était basée sur les caractéristiques morphologiques (étude macro et microscopiques) et sur les différents tests biochimiques disponibles au niveau du laboratoire.

La concentration de la suspension d'argile a été testée après le tamisage à 40 µm et la stérilisation. sur la base de résultats préliminaires

L'antibiogramme était fait à partir de la préparation des disques de papiers wattmans imbibés dans les différentes dilutions remplaçant les disques d'antibiotiques de l'antibiogramme pour le but d'observation les conséquences sur le développement et la survie de la bactérie, et déterminer leur CMI

De plus, les minéraux présents dans les différentes argiles pourraient expliquer l'inhibition ou La promotion de la croissance bactérienne observée qui rend complexe le mécanisme d'action de ces argiles. Il ressort de ces essais que toutes les argiles possèdent une activité inhibitrice qui dépend du type d'argile et du type de bactéries.

**Mots clés :** Activité antibactérienne, Argile, Résistante à l'ATB, CMI.

## **Abstrat**

The objective of this work was to evaluate the potency of clay antibacterial activity and its effect on *Staphylococcus aureus*, from two strains; the first was referenced and the second not referenced; this work was done in the microbiology laboratory of SNV Tiaret University.

Due to the COVID-19 pandemic which affected the whole world, only the identification of the referenced strain was carried out was based on the morphological characteristics (macro and microscopic studies) and on the various biochemical tests available at the laboratory level. The concentration of the clay suspension was tested after sieving at 40  $\mu\text{m}$  and sterilization. based on preliminary results

The antibiogram was made from the preparation of wattman paper discs soaked in different dilutions replacing the antibiotic discs in the antibiogram for the purpose of observing the consequences on the development and survival of the bacteria, and determine their MIC .

In addition, the minerals present in the different clays could explain the inhibition or promotion of the bacterial growth observed which complicates the mechanism of action of these clays. It emerges from these tests that all clays have an inhibitory activity which depends on the type of clay and on the type of bacteria.

**Key words :** Antibacterial activity, Clay, ATB resistant, MIC.

## الملخص :

كان الهدف من هذا العمل هو تقييم فعالية النشاط المضاد للبكتيريا في الطين وتأثيره على المكورات العنقودية الذهبية من سلالتين ؛ تمت الإشارة إلى الأول ولم تتم الإشارة إلى الثاني ؛ تم هذا العمل في مختبر الأحياء الدقيقة بجامعة علوم الطبيعة و الحياة تيارت .

نظرًا لوباء الكورونا الذي أثر على العالم بأسره ، تم تحديد السلالة المشار إليها فقط بناءً على الخصائص المورفولوجية (الدراسة الكلية والميكروسكوبية) وعلى الاختبارات البيوكيميائية المختلفة المتاحة على مستوى المختبر. .

تم اختبار تركيز معلق الطين بعد الغريلة عند 40 ميكرومتر والتعقيم. بناءً على النتائج الأولية

تم عمل المضاد الحيوي من تحضير أقراص ورقية واتمان منقوعة في تخفيفات مختلفة لتحل محل أقراص المضادات الحيوية من المضاد الحيوي لغرض مراقبة العواقب على تطور البكتيريا وبقائها ، وتحديد الحد الأدنى للتركيز الخاصة بهم

بالإضافة إلى ذلك ، يمكن أن تفسر المعادن الموجودة في الطين المختلفة تثبيط أو تعزيز النمو البكتيري الملحوظ - مما يعقد آلية عمل هذه الطين. يتضح من هذه الاختبارات أن جميع أنواع الطين لها نشاط مثبت يعتمد على نوع الطين ونوع البكتيريا.

**الكلمات المفتاحية :** نشاط مضاد للبكتيريا ، طين ، مقاومة المضادات الحيوية ، الحد الأدنى للتركيز