



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

CDTA

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET SCIENCES
ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES

Mémoire de fin de cycle

En vue de l'obtention du diplôme de Master
en Science biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème

**Analyse bactériologique des eaux usées et identification
d'*ESCHERICHIA Coli* par la méthode traditionnelle
et par biocapteur électrochimique.**

Présenté par :

- M^{elle} OULD BENHAMMOU Lynda.
- M^{elle} OULTACHE Dahbia

Sous la direction de :

- M^r METAHRI.S (Encadreur interne).
- M^{me} BERROUANE.N (Encadreur interne).
- M^{me} KAHLOUCHE. K (Encadreur externe).

Présenté devant le jury :

- M^r MOUALEK, Président de jury Maitre de conférence, Classe (A), UMMTO.
- M^r BERRADJ, Examineur , Maitre de conférences, Classe (A), UMMTO.

Promotion : 2020 - 2021



Remerciement

Avant tout, nous remercions Dieu de nous avoir donné la force et la foi afin de réaliser ce Travail. Nous tenons à remercier Monsieur METAHRI Mohammed Saïd, notre promoteur, qui a accepté de nous encadrer.


Nous exprimons nos respectueux remerciements à Madame Berrouane Nawal notre Co-promotrice. Son avis et ses remarques, ses critiques et ses qualités humaines apportées tout au long de ce travail nous ont été précieuses.

Nous adressons nos remerciements à Madame Kahlouche Karima qui nous a proposé ce travail et qui nous a encadrée au niveau de centre de développement des technologies avancées (CDTA) à Alger

Nous adressons notre profonde reconnaissance à Monsieur Moualek Idir pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury

Nous exprimons aussi nos reconnaissances à Monsieur Barradj pour l'honneur qu'il nous a fait de juger ce mémoire

Nos remerciements vont à Monsieur Ouelhadj Akli , à Monsieur Titouche Yacine, à Monsieur Bariz Karim pour leurs aide, Monsieur Loucif Siad Mohamed et Monsieur Nait Bouda Amine.





Dédicaces

C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que nous dédions ce travail de fin de cycle à nos chers parents qui ont sacrifiés leurs vies pour notre réussite et nous ont éclairés le chemin par leurs conseils judicieux. Nous espérons qu'un jour nous pourrions leurs rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour nous, que Dieu leurs prête bonheur et longue vie.

Nous dédions aussi ce travail à nos frères qui nous ont toujours soutenu, nos familles, nos ami(es), tous nos professeurs qui nous ont enseignés et à tous ceux qui nous sont chers.

Lynda

Et

Dahbia



Liste des abréviations

Liste des abréviations

AAF : Aérobic-Anaérobic Facultatif

Ac : Anticorps

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADCC : Cytotoxicité Cellulaire Dépendante de l'AC

Ag : Antigène

APTES : 3-Amino Propyl-Tri Ethoxy Silane

ARS : Anaérobies Sulfite-Réductrices

AU : Electrode d'Or Nu

AU-rGO/PEI : Electrode d'Or Modifiée avec Oxyde de Graphène Réduit / Poly Ethylène Imine

Bfp : Bundle Forming Pilus

BSA : Albumine de Sérum Bovin

CDTA : Centre de Développement des Technologies Avancées

CDR : Régions Déterminant la Complémentarité

CNR : Centre National de Référence

CL : Région Constante de l'anticorps

CV : Voltamétrie Cyclique

DAEC : E. coli à Adhérence Diffuse

D.O : Densité Optique

DPV : Voltammétrie Différentielle à Impulsions

EAggEC : E. coli Entéroaggrégatifs

E.coli : *Escherichia Coli*

EHEC : E. coli Entéro Hémorragiques

EIEC : E. coli Entéro Invasifs

EIS : Electrochemical Impedance Spectroscopy (Spectroscopie d'Impédance Electrochimique)

ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorban Assay (Technique d'Immunoabsorption Par Enzyme Liée)

EPST : Etablissement Public à Caractère Scientifique et Technologique

EPD : Dépôt Electrophorétique

EPEC : E. coli Entéro Pathogènes

ETEC : E. coli Entero Toxinogènes

ExPEC : E. coli à l'Origine de Pathologies Extra Intestinales

Fab : Fragment de Liaison à l'Antigène

Fc : Fragment Constant

GO : Oxyde de Graphène

GO /PEI : Oxyde de Graphène/ Poly Ethylène Imine

GPTMS : 3-Glycidoxy Propyl /Tri Methoxy Silane

IND : Indénombrable

ITO : Oxyde d'Indium-Etain

IUPAC : Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée

LDC : Lysine Décarboxylase

MAb : Anticorps Monoclonal

MEB : Microscope Electronique à Balayage

MTH : Maladie Transmissible Hydrique

N : Nombre d'Unité Formant Colonies (de la flore mésophile) par Millilitre de Produits Initiale

ODC : Ornithine Décarboxylase

ONA : Office National de l'Assainissement

PBS : Tampon Phosphate Salin

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PEI : Polyéthylènimine

Pyrène-PEG : Pyrène-Poly Ethylène Glycol

qPCR : PCR Quantitative

rGO/PEI : Oxyde de Graphène Réduit / Poly Ethylène Imine

STEP : Station d'Épuration des eaux usées

SWV (Square Wave Voltammetry) : Voltamétrie à Onde Carrée Electrochimique

TELISA : Thermometric Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Technique d'Immunoabsorption Par Enzyme Liée Thermométrique)

TSA : Trypto Caséine Soja

UFC : Unité Formant Colonies

VL : Région Variable ou Lumière Variable

Liste des figures

<i>Figure</i>	<i>Titre</i>	<i>N° de page</i>
01	Les eaux usées dans un cycle d'eau	04
02	Les étapes d'épuration	08
03	Schéma d'un prétraitement d'une station d'épuration	08
04	<i>Escherichia Coli</i> sous microscope électronique à G x 100	15
05	Illustration des différents types d'ELISA	19
06	Représentation des étapes d'une PCR	20
07	Schéma général d'un biocapteur démontrant des exemples et la constitution de chaque partie	22
08	Domaines d'applications des biocapteurs	23
09	Différents types de biorécepteurs	24
10	Structure d'un anti-corps	26
11	Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique	27
12	Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur	30
13	Step EST de TIZI OUZOU	33
14	Centre de développement des technologies avancées	35
15	Recherche de flore mésophile totale à 22 et à 37°C sur milieu TGEA	39
16	Méthode pour la recherche des coliformes par filtration sur membrane	41
17	Méthode pour la recherche des entérocoques par filtration sur membrane	42
18	Recherche des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices par filtration sur membrane	43
19	Recherche des salmonella	44
20	Recherche des staphylocoques par méthode de filtration sur membrane	45

21	Recherche des Vibrio par méthode de filtration sur membrane	46
22	Schéma correspondant à la recherche d'E.Coli sur milieu Chromagar	46
23	Mélange GO /PEI	48
24	Dépôt du graphène oxyde par électrophorèse par un générateur	49
25	Différentes étapes utilisées pour la construction de l'immunocapteur pour la détection électrochimique sélective d'E. Coli UTI89	49
26	Microscope électronique à balayage	50
27	Spectromètre de micro- Raman	51
28	Analyse de l'électrode d'Or par spectromètre.	51
38	Boite de pétrie correspondant à la recherche de E. Coli sur milieu Chromagar.	58
39	Test de la catalase sur la bactérie <i>Escherichia Coli</i>	59
40	Test de l'indole sur la bactérie <i>Escherichia Coli</i>	59
41	Réalisation du test de l'oxydase sur la bactérie <i>Escherichia Coli</i> .	60
42	Réalisation du test de mannitol mobilité sur la bactérie <i>Escherichia Coli</i> .	60
43	Voltamétrie cyclique (CV) de l'électrode d'or (AU) avant et après fonctionnalisation avec GO/PEI, avec vitesse de scan 20mVs-1	61
44	Imaged' une électrode d'or après revêtement électrophorétique avec rGO/PEI vu sous MEB	62
45	Spectres des électrodes d'or fonctionnalisés	63
46	voltampérogrammes d'impulsions différentielles de l'électrode d'or	64
47	Voltampérogrammes d'impulsions différentielles (DPV)	65

Liste des tableaux

<i>N° tableau</i>	<i>Titre</i>	<i>N° page</i>
01	Composants majeurs typique d'eau usée domestique	06
02	Maladies hydriques et leurs symptômes	13
03	Pathovars d'E. Coli responsables de diarrhées chez l'homme	17
04	Résultats du dénombrement des colonies de la flore mésophile a différentes dilutions.	53
05	Résultat du dénombrement des coliformes fécaux et totaux.	54
06	Résultat du dénombrement des entérocoques.	55
07	Résultat du dénombrement des clostridium.	55
08	Résultat du dénombrement des salmonelles.	56
09	Résultat du dénombrement des staphylocoques	57
10	Résultat du dénombrement des vibrions.	58

Table des matières

Table de matière

Liste des abréviations

Listes des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction	1
Chapitre I : Eaux usées et qualité microbiologique	3
I.1.Eaux usées	3
I.2. Eaux usées dans le cycle de l'eau	3
I.3. Origines des eaux usées.....	4
I.3.1. Eaux usées domestiques	4
I.3.2. Eaux pluviales	5
I.3.3. Eaux usées industrielles.....	5
I.4. Composition des eaux usées.....	5
I.5. Assainissement des eaux usées.....	6
I.6. Epuration des eaux usées.....	7
I.6.1. Prétraitements	8
I.6.2. Traitements primaires (physico-chimiques	9
I.6.3. Traitements secondaires (biologiques)	10
I.6.4. Traitement tertiaire	10
I.7. Microorganismes constituant l'eau usée	11
I.7.1. Bactéries	11
I.7.2. Parasites.....	11

Table de matière

I.7.3. Virus	12
I.8. Maladies hydriques provoquées par les bactéries contaminants l'eau	12
I.9. Bactéries indicatrices de contamination fécale.....	13
I.9.1. Coliformes	13
I.9.2. Streptocoques	14
I.9.3. Clostridium sulfo-réducteurs	14
I.10. Bactérie d'intérêt <i>ESCHERICHIA coli</i> commensal et pathogène	15
I.10.1. Taxonomie des <i>Escherichia coli</i>	16
I.10.2. Souches de E. coli pathogènes.....	16
Chapitre II : Biocapteurs et détection des micro-organismes.....	18
II. Biocapteurs et détection des micro-organismes.....	18
II.1. Détection des micro-organismes	18
II.1.1. Détection par culture des micro-organismes.....	18
II.1.2. Détection par la méthode ELISA (Enzyme Linked Immuno sorbant Assay) ..	19
II.1.3. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	20
II.1.4. Détection par biocapteur	21
II.2. Biocapteur	22
II.2.1. Définition et principe de fonctionnement d'un biocapteur	22
II.3. Classification des biocapteurs	23
II.3.1. La reconnaissance moléculaire utilisée (biorécepteur)	23
II.3.1.1. Acide désoxyribonucléique (ADN)	24
II.3.1.2. Anticorps	25
II.3.1.3. Enzymes	26

Table de matière

II.3.1.4. Micro-organismes, tissus biologiques.....	27
II.3.2. Transducteur associé.....	27
II.3.2.1. Biocapteurs optiques.....	27
II.3.2.2. Biocapteurs mécaniques.....	28
II.3.2.3. Biocapteurs thermiques ou calorimétriques.....	28
II.3.2.4. Biocapteurs électrochimiques.....	28
II.4. Techniques d'Immobilisation du biorécepteur sur le transducteur.....	30
Chapitre III : Matériel et méthodes.....	33
III. Matériels et méthodes.....	33
III.1. Objectif du travail.....	33
III.2. Présentation de la zone d'étude.....	33
III.3. Durée de l'étude.....	33
III.4. Prélèvement et échantillonnage de l'eau.....	34
III.5. Protocole et lieux d'analyse.....	34
III.5.1. Analyse bactériologique par la méthode traditionnelle (milieux de culture)...	35
III.5.1.1. Principe de la méthode par filtration.....	37
III.5.1.2. Dénombrement de flore mésophile totale.....	37
III.5.1.3. Coliformes totaux et Féciaux.....	39
III.5.1.4. Recherche des entérocoques intestinaux.....	41
III.5.1.5. Isolement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices.....	42
III.5.1.6. Recherche des Salmonelles.....	43
III.5.1.7. Isolement des staphylocoques à coagulase positive.....	43
III.5.1.8. Isolement du vibron cholérique.....	45

Table de matière

III.5.2. Identification et isolements d' <i>Escherichia coli</i>	46
III.5.3. Bio détection électrochimique d' <i>Escherichia Coli</i>	47
Chapitre IV : Résultats et discussion.....	53
IV. 1. Résultats des analyses bactériologiques par la méthode classique	53
IV.1.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale	53
IV. 1.2. Coliformes totaux et fécaux.....	55
IV. 1.3. Entérocoques	55
IV. 1.4. Clostridium	55
IV. 1.5. Salmonelles.....	56
IV. 1.6. Staphylocoques	57
IV. 1.7. Vibrions	57
1.8. Identification et isolement de la bactérie d'intérêt (<i>Escherichia coli</i>).....	58
IV. 2. Résultats et discussion de l'analyse par biocapteur.....	60
IV. 2.1. Activation de l'électrode	60
IV. 2.2. Caractérisation de l'électrode	62
IV. 2.3. Résultat de la voltampérogrammes d'impulsions différentielles	64
Conclusion	68
Référence bibliographique	
Annexes	
Résumé	

Introduction

Introduction

Nombreuses maladies qui affectent la population de la planète sont liées en partie à l'insuffisance de l'évacuation des eaux usées domestiques et industrielles. Ces dernières sont devenues de plus en plus énormes devant le développement industriel, l'essor économique, l'expansion démographique et la grande densité des zones urbaines. Ces eaux usées constituent en absence d'un traitement un danger croissant pour la santé humaine et le milieu naturel à cause de leurs charges en matières chimiques toxiques et de micro-organismes pathogènes (bactéries, virus, parasites...). Elles constituent donc des menaces permanentes pour la santé humaine. Selon l'OMS, 80% des maladies qui affectent la population de la planète sont liées à la pollution des eaux. En effet, la plupart des microorganismes qui sont à l'origine des grandes épidémies historiques d'origine hydrique, ont pour habitat normal les intestins de l'homme et certains animaux à sang chaud. C'est pourquoi, le contrôle et la surveillance de la qualité de l'eau notamment les eaux usées seraient de plus en plus indispensable (El ouali,2014).

Les techniques de détection de bactéries déjà disponibles sont longues et compliquées à mettre en œuvre. Par conséquent, il subsiste un besoin capital de développer de nouvelles méthodes de détection qui soient rapides, simples d'utilisation et qui puissent mesurer de très faibles concentrations de bactéries. Ces méthodes pourraient alors compléter, voir remplacer les techniques classiques existantes. Le développement d'applications dans le domaine des biocapteurs est un travail pluridisciplinaire qui fait appel à l'électrochimie, la biologie et les microtechnologies. Les travaux publiés dans ce domaine sont nombreux. Malgré tout, il est possible d'apporter des améliorations sur leur miniaturisation, les matériaux de transduction, les limites de détection tout en réduisant les étapes de réalisation et de fonctionnalisation et donc les coûts de fabrication (Kahlouche, 2018).

Le coût et les délais de la méthode traditionnelle nous poussent vers la mise au point de nouvelles méthodes de détection de la présence d'*Escherichia Coli* dans les eaux usées. Ces méthodes doivent être rapides, sensibles, automatisées et à faibles coûts. Dans cet ordre d'idées, les biocapteurs sont une avenue intéressante due à leur grande versatilité. Il existe plusieurs types de biocapteurs et il est possible d'obtenir plusieurs renseignements différents selon le type de biocapteur utilisé et la cible recherchée (Mehrotra, 2016). Par exemple, le biocapteur le plus connu est le glucomètre, qui permet de connaître le taux de glycémie d'un individu. Le test effectué avec le glucomètre est rapide et est effectué directement sur les lieux où se trouve le patient. Le biocapteur permet ainsi d'effectuer les tests sur place et en temps réel, alors que les méthodes de détection traditionnelles sont effectuées au laboratoire. Ainsi,

Introduction

il est possible d'effectuer de la surveillance en continu avec les biocapteurs grâce à leur automatisation (Rajendran.2014).

L'objectif de notre étude est l'analyse des eaux usées traitées de la STEP Est de Tizi Ouzou avec la technique conventionnelle au laboratoire, et par biocapteur électrochimique à base d'une électrode d'or et de graphène afin de faire la comparaison des deux techniques au niveau du temps mais aussi de la fiabilité des résultats.

Le biocapteur utilisé dans notre expérience est un biocapteur électrochimique où la présence des agents pathogènes se manifeste par un changement de signal électrochimique.

On s'est concentré sur la recherche de la bactérie *Escherichia Coli* qui se trouve habituellement dans les eaux usées afin de tester la fiabilité et la spécificité de notre biocapteur et montré ses avantages par rapport à la méthode traditionnelle. Par la suite, on peut appliquer cette technique sur n'importe quel autre échantillon (sérum, urine, sang ... etc).

Chapitre I

Eaux usées et qualité microbiologique

1. Eaux usées

Les eaux usées sont toutes les eaux récoltées après des activités domestiques, agricoles et industrielles chargées en substances toxiques et organiques qui parviennent dans les canalisations d'assainissement. Les eaux usées englobent également les eaux de pluies et leurs charges polluantes, elles engendrent au milieu récepteur toutes sortes de pollution et de nuisance (Metahri, 2012).

Les eaux usées rejetées contiennent des polluants, notamment organiques. Elles doivent donc être collectées et traitées avant d'être rejetées dans la nature (Kendouci et al, 2013), car si elles étaient rejetées dans le milieu sans traitement, elles pollueraient gravement l'environnement et la ressource en eau (Adjahouinou et al, 2014). En effet, certaines eaux usées contiennent une charge polluante importante (Allalgua et al, 2014). C'est pourquoi la réglementation impose des normes de rejet, dans les eaux superficielles comme dans le sol et le sous-sol suivant différents types de dispositifs d'épuration et de rejets (Amiri et al, 2016).

2. Eaux usées dans le cycle de l'eau

L'eau, qu'elle soit à l'état de vapeur dans l'atmosphère ou à l'état liquide dans les rivières, les courants, les lacs, les mers et les océans ou à l'état d'eau souterraine dans les couches géologiques, se trouve, la plupart du temps, dans un mouvement de recyclage continu et non dans un état statique. On appelle cela un cycle hydrologique (Benneni et Bouarissa, 2020).

Les eaux usées sont très souvent considérées plus comme une nuisance à éliminer plutôt qu'une ressource. Pourtant, elles constituent une source non négligeable de substances valorisables : eau, énergie, nutriments, matières organiques et autres sous-produits. Elles représentent une composante importante du cycle de l'eau (voir figure 1) et doivent être gérées dans l'ensemble du cycle de gestion de l'eau : à partir du prélèvement, du traitement, de la distribution, de la collecte et du traitement après utilisation de l'eau douce, jusqu'à sa réutilisation et son retour ultérieur à l'environnement où elles réapprovisionnent la source pour des prélèvements d'eau ultérieurs (Boukary, 2018).

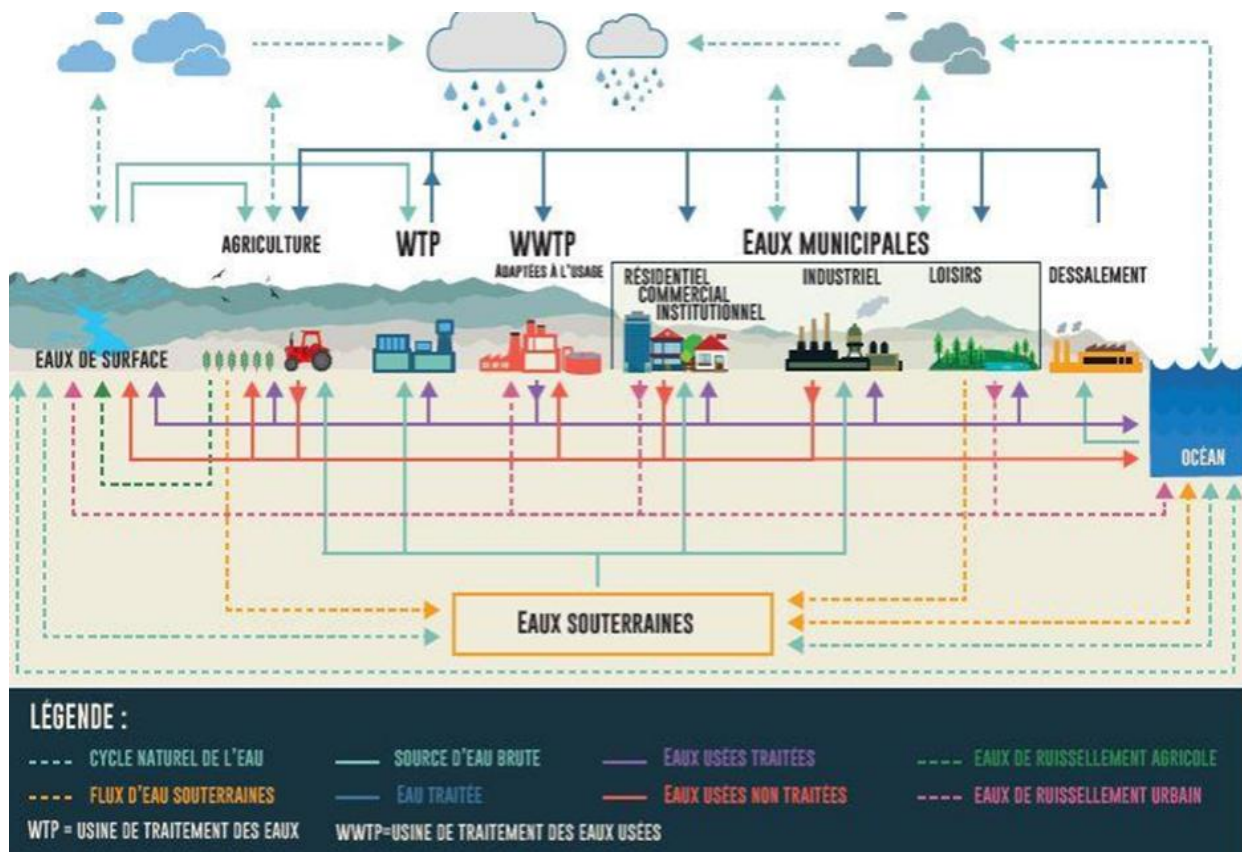


Figure 1 : Eaux usées dans un cycle d'eau (UN WATER, 2017).

3. Origines des eaux usées

Eaux usées c'est les eaux ayant été utilisé pour des usage domestique et industriel et même agricole constituant donc un effluent polluer et qui sont rejeté dans le milieu naturel et dans un émissaire d'égout (Ramade, 2000). Les Eaux usées regroupent les eaux usées domestiques, les eaux de ruissellement, les eaux industrielles (Baumonts et al, 2004).

3.1. Eaux usées domestiques

Les eaux usées d'origine domestique sont issues de l'utilisation de l'eau (potable dans la majorité des cas) par les particuliers pour satisfaire tous les usages ménagers. Lorsque les habitations sont en zone d'assainissement collectif, les eaux domestiques se retrouvent dans les égouts. On distingue généralement deux « types » d'eaux usées domestiques qui arrivent toutes les deux dans le réseau d'assainissement (Aissaoui et Tlidjane, 2020):

- Les eaux vannes, qui correspondent aux eaux de toilettes ;
- Les eaux grises qui correspondent à tous les autres usages : lave-linge, lave-vaisselle, douche/bain, etc.

La composition originelle de l'eau potable, qui elle-même dépend de la composition de l'eau utilisée pour produire l'eau potable, de la qualité du traitement de cette eau, des normes sanitaires du pays concerné, de la nature des canalisations, etc. Les diverses utilisations par les particuliers qui peuvent apporter un nombre quasi- infini de polluants : tous les produits d'entretien, lessives mais aussi, solvants, peintures, mercure de thermomètre, colle, etc. Les utilisateurs eux-mêmes qui vont rejeter de la matière organique dans les égouts (urines et fèces) ; la matière organique est le polluant majoritaire des eaux domestiques. Ce type de rejets apporte également des micro-organismes et des contaminants divers (Aissaoui et Tlidjane, 2020).

3.2. Eaux pluviales

C'est des eaux de ruissellement issues des pluies, d'arrosage des voies publiques, de lavage des caniveaux, des marchés et des cours. Les eaux pluviales sont de même nature que les eaux domestiques et peuvent contenir en plus, des métaux lourds et des composés toxiques (Habi et Haddad, 2019).

3.3. Eaux usées industrielles

Elles ont une composition très différente de celle des eaux usées domestiques. Leurs caractéristiques varient d'une industrie à l'autre. En plus de matières organiques, azotées ou phosphorées, elles peuvent également contenir des produits toxiques, des solvants, des métaux lourds, des micropolluants organiques, des hydrocarbures. Certaines d'entre elles nécessitent un prétraitement de la part des industries avant d'être rejetées dans les réseaux de collecte. Elles ne sont mêlées aux eaux domestiques que si elles ne présentent plus de danger pour les réseaux de collecte et ne perturbent pas le fonctionnement des usines de dépollution. Les eaux usées, contiennent, en plus de toutes ces matières, toutes sortes de microorganismes : champignons, protozoaires, bactéries, virus (Sbai et Amira, 2015).

4. Composition des eaux usées

Eaux usées c'est les eaux ayant été utilisé pour usage domestique, industrielle ou même agricole constituant donc un effluent pollué et qui sont rejeté dans le milieu naturel et dans un émissaire d'égout (Ramande, 2000). Les eaux usées regroupent les eaux usées domestiques, les eaux de vanne et les eaux ménagères, les eaux de ruissellement, les eaux industrielles et les eaux usées d'usines (Baumonts et al, 2004). Les conséquences du rejet des eaux usées non ou mal traitées peuvent être classées en trois catégories (Boukary, 2018) :

- Effets nocifs pour la santé humaine,
- Impacts négatifs sur l'environnement,
- Répercussions néfastes sur les activités économiques

La composition des eaux usées est extrêmement variable et dépend de leur origine (industrielle, domestique, etc.). Le Tableau 1 résume les principaux composants d'une eau usée domestique.

Tableau 1 : Composants majeurs typique d'une eau usée domestique (Metcalf et Eddy, 1991).

Constituants	Unité	Concentration Fort	Concentration Moyen	Concentration Faible
Solides totaux (TS)	mg/l	1200	720	350
Solides dissouts(TDS)	mg/l	850	500	250
Solides suspendus	mg/l	350	220	100
DBO	mg/l	400	220	110
Azote (N)	mg/l	85	40	20
Nitrite et Nitrate	mg/l	0	0	0
Phosphore (P)	mg/l	15	8	4
Alcalinité (CaCO3)	mg/l	200	100	50
Coliformes totaux	UFC/100ml	10 ⁷ à 10 ⁹	10 ⁷ à 10 ⁸	10 ⁶ à 10 ⁷
Les composés organiques volatiles	µg/l	> 400	100 à 400	<100

5. Assainissement des eaux usées

Dans la plupart des pays et en particulier dans les milieux urbanisés, les eaux usées sont collectées et acheminées par un réseau d'égout (ou réseau d'assainissement), les collecteurs permettent l'acheminement des eaux depuis les immeubles producteurs d'eaux usées (habitations, industries, écoles, hôpitaux...) d'une ou de plusieurs entités (ville, village...) soit jusqu'à une station de traitement collective, soit jusqu'à un site autonome de traitement (Rejsek, 2002). L'assainissement est donc l'ensemble des techniques de collecte,

de transport et de traitement des eaux usées avant leurs rejets dans le milieu naturel. Il existe deux types de réseaux d'assainissements (Habi et Haddad, 2019) :

- ✓ **Réseaux unitaires** : Dans le système unitaire, les eaux pluviales et les eaux usées urbaines sont évacuées vers la STEP par une canalisation commune. L'avantage de ce système est le coût plus faible que le séparatif pour la gestion des canalisations vers la STEP. L'inconvénient est que le dimensionnement des canalisations doit être suffisamment important pour éviter les inondations et permettre d'évacuer un débit pluvial important au moins jusqu'au bassin d'orage.
- ✓ **Réseaux séparatifs** : Dans le système séparatif, l'évacuation des eaux usées urbaines (ménages, artisanats et industries) se fait dans une canalisation distincte de celle des eaux pluviales. Ces dernières sont rejetées directement dans le récepteur aquatique sans passer par la station d'épuration. Le système séparatif permet de pallier les problèmes de surcharge de la STEP lors d'évènements pluvieux.

6. Epuration des eaux usées

Par un système de canalisation, les effluents sont drainés jusqu'à la station d'épuration. Ils sont soumis à un prétraitement (dégrillage, tamisage, dessablage, dégraissage-déshuilage, bassin tampon) illustré dans la figure 2 dont le but est de retirer mécaniquement les éléments solides et les graisses favorisant ainsi la protection des ouvrages en aval (canalisations, pompes, bassins). Le traitement proprement dit fait appel à des procédés physico-chimiques et biologiques (Diallo, 2013).

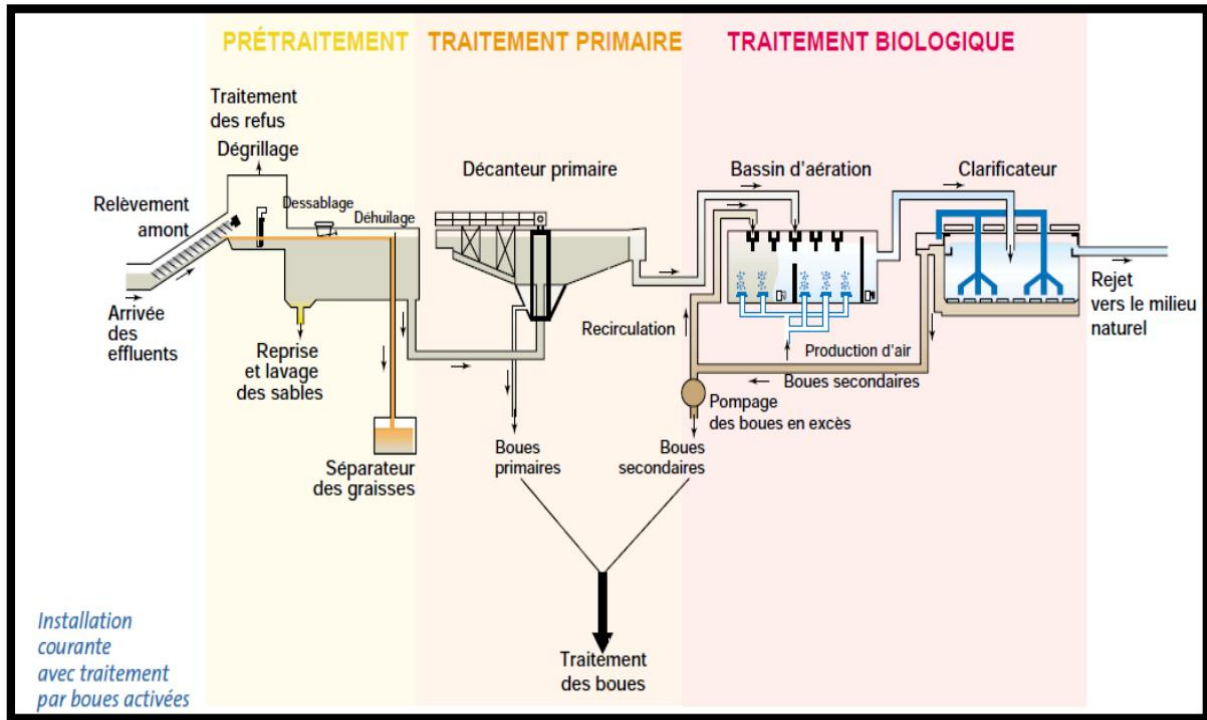


Figure 2 : Etapes d'épuration (Bouanane et Boulhart, 2020).

6.1. Prétraitements

Le prétraitement a pour objectif de séparer les matières grossières et les éléments susceptibles de gêner les étapes ultérieures du traitement. Il comprend quatre principaux modes de traitement des eaux usées (voir figure 3) : le dégrillage pour retenir les déchets volumineux, le dessablage pour obtenir une meilleure décantation et éviter l'abrasion des équipements, le dégraissage et le déshuilage pour éviter l'encrassement de la station par des corps gras (Bouanane et Boulhart, 2020).

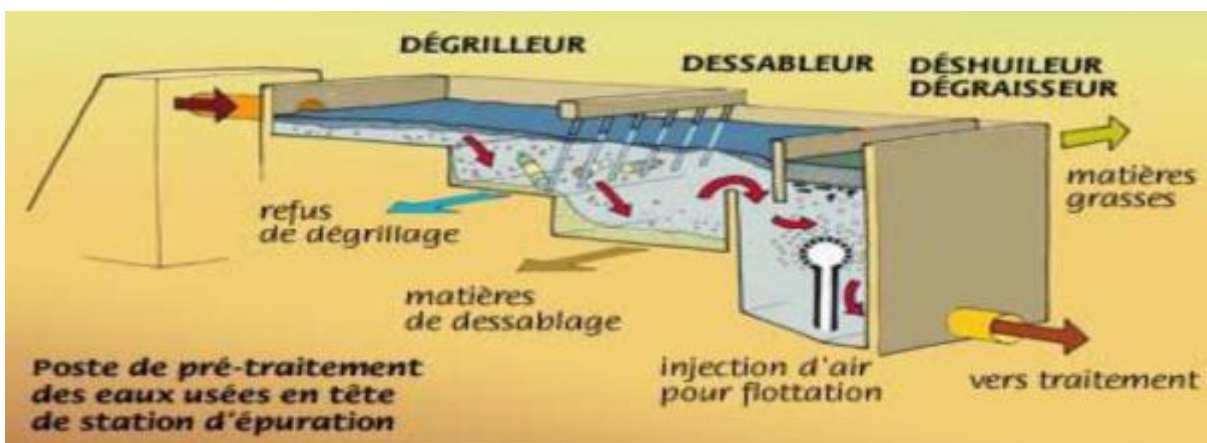


Figure 3 : Schéma d'un prétraitement d'une station d'épuration (Banouh et Djenane, 2017)

6.1.1. Relevage

Cette étape est nécessaire avant tout prétraitement pour assurer un passage gravitaire de l'eau dans les différents ouvrages de traitement, le niveau d'entrée des eaux à épurer étant en général plus bas que le niveau de sortie du clarificateur des eaux épurées avant leurs rejets dans le milieu naturel. En utilisant un système de relevage assuré par des pompes ou par vis d'Archimède (Diallo, 2013).

6.1.2. Dégrillage

Il consiste à faire passer les eaux usées au travers d'une grille ou une série de grilles composées de barreaux placés verticalement ou inclinés de 60 à 80° sur l'horizontale. L'espacement des barreaux varie de 6 à 100 mm, cela permet de retenir les éléments les plus grossiers. La vitesse moyenne de passage entre les barreaux est comprise entre 0,6 et 1 m/s, juste ce qu'il faut pour provoquer l'application des matières sur la grille, sans pour autant provoquer une perte de charge trop importante ou faire passer des matières avec le flux d'eau (Boumansour et Smahi, 2020).

6.1.3. Dessablage

Il s'effectue sur des particules de dimensions supérieures à 200 μm . La vitesse de sédimentation se calcule par la loi de Stokes (chute libre). On calcule la section du dessableur de manière que la vitesse de l'eau ne descende pas au-dessous de 0,30 à 0,20 m/s ; on évite ainsi que les matières organiques se déposent en même temps que les sables. Les ouvrages à prévoir pour obtenir une vitesse d'écoulement de 0,30 m/s sont, par ordre d'importance (Boumansour et Smahi, 2020).

6.2 Traitements primaires (physico-chimiques)

Le traitement primaire est destiné à l'élimination des matières en suspension facilement décantables. Le traitement des eaux est seulement physique ou éventuellement physico-chimique à travers un décanteur primaire. Les eaux usées sont acheminées vers une cuve de sédimentation dans lequel elles subissent une décantation primaire, à fin d'éliminer les matières volumineuses en suspension (décantation physique). Par contre le traitement physico-chimique a pour but d'accélérer l'effet gravitationnel des particules encore en suspension dans les eaux usées grâce à l'action de réactifs chimiques ajoutés artificiellement (coagulants ou flocculent) (Derbane et Aider, 2020).

6.3. Traitements secondaires (biologiques)

Les technologies d'épuration faisant appel aux microorganismes pour la dégradation de la matière organique contenue dans les effluents issus des unités industrielles produisant des boissons gazeuses et alcoolisées semblent plus efficaces que les méthodes physicochimiques. Ces microorganismes éliminent la pollution organique carbonée biodégradable et la pollution inorganique pour assurer leur multiplication et leur développement. Pour ce faire, ils secrètent dans le milieu des enzymes qui serviront de catalyseurs aux réactions chimiques et biochimiques. Ainsi, le carbone, l'azote, le soufre, le fer et d'autres ions contenus dans la matière, sont utilisés dans un processus mettant en œuvre une dégradation biologique ou physico-chimique à travers des processus d'hydrolyse, de volatilisation et de solubilisation. Au cours de ces réactions, des enzymes intracellulaires interviennent pour l'assimilation des métabolites et des enzymes extracellulaires pour la destruction des structures moléculaires complexes pour les rendre assimilables par les bactéries. Les performances des processus biologiques utilisés dans le traitement des eaux usées dépendent de la dynamique d'utilisation du substrat et de la croissance microbienne. Ainsi, la compréhension des réactions biologiques et des principes de base qui gouvernent la croissance des microorganismes, permet une exploitation efficace du procédé (Boukary, 2018).

6.4. Traitement tertiaire

Les STEP utilisent rarement les traitements tertiaires, c'est pourquoi il reste encore dans l'eau rejetée (eaux de surfaces) quelques substances dangereuses mal éliminées, et qui nécessite un contrôle et des mesures dans le but de connaître les qualités du cours d'eau. Le traitement tertiaire peut être à la fois biologique et physico-chimique. En effet, ce traitement est réalisé après le traitement primaire et secondaire et regroupe un ensemble de techniques destinées à réduire la concentration des éléments nutritifs résiduels (comme le phosphore et l'azote), polluants organiques résistants et des éléments traces métalliques. C'est pour cela que les traitements tertiaires sont classés comme des traitements complémentaires qui deviennent nécessaires, pour assurer une meilleure réduction de ces substances dans les milieux naturels (Khaoulani, 2015).

7. Microorganismes constituant l'eau usée

Les eaux usées contiennent tous les microorganismes excrétés avec les matières fécales. Cette flore entérique normale est accompagnée d'organismes pathogènes. L'ensemble de ces organismes peut être classé en quatre grands groupes : les bactéries, les virus les parasites (protozoaires, helminthes), les moisissures. (Belahmadi, 2011).

7.1. Bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus communément rencontrés dans les eaux usées. Les eaux usées urbaines contiennent environ 10^6 à 10^7 bactéries/100 ml dont la plupart sont des Proteus et des entérobactéries, 10^3 à 10^4 des Streptocoques et de 10^2 à 10^3 des Clostridium. La concentration en bactéries pathogènes est très variable et peut atteindre 10^4 germes par litre. Parmi les bactéries pathogènes les plus détectées, les Salmonelles, dont celles responsables de la typhoïde, des paratyphoïdes et des troubles intestinaux. Les coliformes thermotolérants sont des germes témoins de contamination fécale communément utilisés pour contrôler la qualité relative d'une eau. En plus de ces germes les eaux usées d'une station d'épuration contiennent des espèces autochtones considérées comme acteurs majeurs des biodégradations telles que : Pseudomonas, Alcaligenes, Micrococcus, Flavobacterium et d'autres (Belahmadi, 2011).

7.2. Parasites

Les parasites présents dans les eaux usées sont généralement des protozoaires et des helminthes. Les protozoaires sont des organismes unicellulaires munis d'un noyau, plus complexes et plus gros que les bactéries. La plupart des protozoaires pathogènes sont des organismes parasites, c'est-à-dire qu'ils se développent aux dépens de leur hôte. Certains protozoaires adoptent au cours de leur cycle de vie une forme de résistance, appelée kyste. Cette forme peut résister généralement aux procédés de traitements des eaux usées (Bounoua et al, 2017).

Les helminthes par contre sont des vers multicellulaires, tout comme les protozoaires, ce sont majoritairement des organismes parasites. Les œufs d'helminthes sont très résistants et peuvent notamment survivre plusieurs semaines, voire plusieurs mois sur les sols ou les plantes cultivées. La concentration en œufs d'helminthes dans les eaux usées est de l'ordre de 10^1 à 10^3 œufs/l (Banouh et Djenane, 2017).

7.3. Virus

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires qui ne peuvent se multiplier que dans leur cellule hôte. Leur concentration estimée dans les eaux usées urbaines est comprise entre 10^3 et 10^4 particules par litre. Leur isolement et leur dénombrement dans les eaux usées restent difficiles, ce qui conduit vraisemblablement à une sous-estimation de leur nombre réel. Les virus entériques sont ceux qui se multiplient dans le trajet intestinal. Parmi les virus entériques humains les plus nombreux il faut citer les entérovirus, les rotavirus, les rétrovirus, les adénovirus et le virus de l'Hépatite A. Il semble que les virus soient plus résistants dans l'environnement que les bactéries, du fait qu'au cours de processus de traitement des eaux usées les virus sont plus difficiles à éliminer que les bactéries classiques couramment utilisées comme indicateurs de la qualité bactériologique des eaux (Belahmadi, 2011).

8. Maladies hydriques provoquées par les bactéries contaminants l'eau

L'eau joue un rôle important pour la vie, la santé, l'accès à l'hygiène et au confort. Mais elle peut véhiculer en particulier de nombreux micro-organismes, bactéries, virus et protistes de tout genre, qui y vivent et s'y développent. Aujourd'hui, dans les pays industrialisés où l'hygiène individuelle et collective est de mieux en mieux respectée, on n'observe plus d'épidémies inquiétantes des maladies infectieuses liées à l'eau de consommation humaine. Par contre le pire est à venir dans les pays du Tiers-monde en pleine expansion démographique (Merah, 2019). On y trouve deux groupes de pathologies d'origine hydrique, à ne pas confondre en raison des différentes mesures thérapeutiques et préventives qui s'y attachent :

- ✓ Maladies acquises au contact de l'eau polluée ou transmises par des vecteurs.
- ✓ Maladies liées à la consommation d'une eau contaminée par des germes pathogènes.

Leur signe d'appel est toujours la diarrhée (Merah, 2019). On appelle maladies hydriques ou MTH (maladie transmissible hydrique) toutes maladies causées par la consommation d'eau contaminée par des selles animales ou humaines, qui contiennent des microorganismes pathogènes (Tourab, 2013).

Parmi ces maladies : La brucellose, la tuberculose, la fièvre typhoïde, le choléra et les diarrhées (voir tableau 2), pour ne citer que ces quelques maladies qui tuent des milliers de personnes chaque année à travers le monde. Selon l'OMS chaque jour, 6000 personnes

meurent dans le monde à cause de maladies diarrhéiques. En 2001, on a ainsi dénombré près de 2 millions de morts, dont plus de la moitié sont des enfants (Merah, 2019).

Tableau 2 : Maladies hydriques et leurs symptômes (Rey, 2018 ; Merah, 2019 ; Essayagh et al, 2020 ; Nicolas et al, 2007 ; Tuon et al, 2017 ; Holzapfel, 2018).

Maladies	Bactéries responsables	Symptômes
Choléra	Vibrio cholerae	Diarrhées fréquentes, vomissement incontrôlables, déshydratation rapide ...
Fièvre typhoïde et paratyphoïde	Salmonella typhi et paratyphi	Fièvre prolongée, hépatomégalie, splénomégalie, anorexie, céphalée ...
Dysenterie	Shigella	Fièvre, dysenterie, selles mucoïdes, crampes abdominales ...
Brucellose	Brucella	Fièvre, sueurs, frissons, fatigue, endocardite ...
Tuberculose	Mycobacterium tuberculosis	Fièvre, faiblesse générale, malaise, anorexie, sudation nocturne avec odeur caractéristique ...

9. Bactéries indicatrices de contamination fécale

Ce sont les indicateurs microbiens de pollution fécale appelés aussi germes test ou germes témoins de contamination fécale. Il s'agit des organismes présents en grand nombre dans les matières fécales humaines ou animales. En général, les indicateurs microbiens ne sont pas eux-mêmes pathogènes chez l'humain. Ce sont des genres et espèces de bactéries dont la présence dans les eaux ne constitue pas en elle-même un risque sur la santé des populations, mais indique l'importance de la pollution biologique des eaux. Leur détection signale un risque de contamination fécale (humaine ou animale) de la masse d'eau ou du réseau de distribution faisant l'objet du contrôle et, par conséquent, la présence possible d'agents entéropathogènes. On y distingue les coliformes, les streptocoques et les clostridium sulfo-réducteurs (Goita, 2014).

9.1. Coliformes

Ils sont définis comme l'ensemble des bactéries aérobies et anaérobies facultatives Gram négatif, non sporulantes, en forme de bâtonnet, qui sont capables de se multiplier en présence de sels biliaires ou d'autres agents de surface ayant des propriétés équivalentes et de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 heures à 35-37°C. Les principaux

genres inclus dans le groupe sont : Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella et Serratia. La presque totalité des espèces est non pathogène et ne représente pas de risque direct pour la santé, à l'exception de certaines souches d'*Escherichia coli* (E. coli) ainsi que de rares bactéries pathogènes opportunistes. Les coliformes fécaux, ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5° C. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est l'*Escherichia coli* (E. coli) et, dans une moindre mesure, certaines espèces des genres Citrobacter, Enterobacter et Klebsiella. La bactérie E. coli représente toutefois 80 à 90 % des coliformes thermotolérants détectés (El Attiffi El Ouadrassi, 2011).

9.2. Streptocoques

Les streptocoques appartiennent à la famille des streptococcaceae. Ce sont des cocci à Gram positif arrondis ou ovoïdes ou rarement allongées en bâtonnets. Les streptocoques nécessitent pour leur multiplication de nombreux facteurs de croissance qui sont présents dans la gélose au sang frais (Babou et M'zyene, 2018).

Les streptocoques fécaux sont un sous-groupe des streptocoques, en grande partie d'origine humaine. Cependant, certaines bactéries classées dans ce groupe peuvent être trouvées également dans les fèces animales, ou se rencontrent sur les végétaux. Ils sont néanmoins considérés comme indicateurs d'une pollution fécale et leur principal intérêt réside dans le fait qu'ils sont résistants à la dessiccation. Ils apportent donc une information supplémentaire sur une pollution. L'identification de streptocoques fécaux donnera une confirmation importante du caractère fécal de pollution (OMS, 2004).

9.3. Clostridium sulfo-réducteurs

Ce sont des bacilles à gram positif, anaérobies stricts, mobiles par ciliature péritriche, mais parfois immobiles et capsulés. Ils font partie de la flore intestinale de l'homme et des animaux. Ils sont thermorésistants, donc ils sont capables de survivre dans l'environnement et de contaminer n'importe quel type d'aliment ou matériel si les conditions d'hygiène et de stérilisation ne sont pas respectées. Les espèces pathogènes du genre Clostridium sont impliquées dans plusieurs affections parmi elles clostridium perfringens qui est un germe ubiquiste et qui est l'espèce la plus spécifique parmi les Clostridium sulfito-réducteurs. Elle peut être isolée dans des eaux superficielles, des vases, des boues, elle est pathogène pour l'homme et les animaux. Elle est responsable de toxi-infections alimentaires collective (TIAC) apparaissant 6 à 12 heures après l'ingestion d'aliments contaminés. Elle contamine

fréquemment certains aliments (viande, lait, fruits, légumes). Sa présence dans l'eau est signe d'une contamination fécale (Mezerdi, 2019).

10. Bactérie d'intérêt *ESCHERICHIA coli* commensal et pathogène

En 1885, l'allemand Theodor Escherich décrit pour la première fois la bactérie *Escherichia coli*, bactérie isolée à partir des selles de nourrissons, qu'il nomma tout d'abord *Bacterium coli* commune. Ce n'est que 70 ans plus tard que le nom d'*Escherichia coli* (*E. coli*) est réellement retenu en hommage aux travaux de T. Escherich. Le genre *Escherichia* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* (voir annexe 1), appartenant à la classe des gamma-protéobactéries. En plus de l'espèce *E. coli*, il existe au sein du genre *Escherichia* cinq autres espèces : *E. albertii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* et *E. vulneris*. Chaque espèce présente des caractéristiques biochimiques spécifiques qui permettent de les différencier. Une bactérie du genre *Escherichia* est un bacille (voir figure 4) à coloration de Gram négative, aérobie-anaérobie facultatif (AAF), possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvue d'oxydase et non halophile. *E. coli* est une bactérie immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C (Balière, 2017).

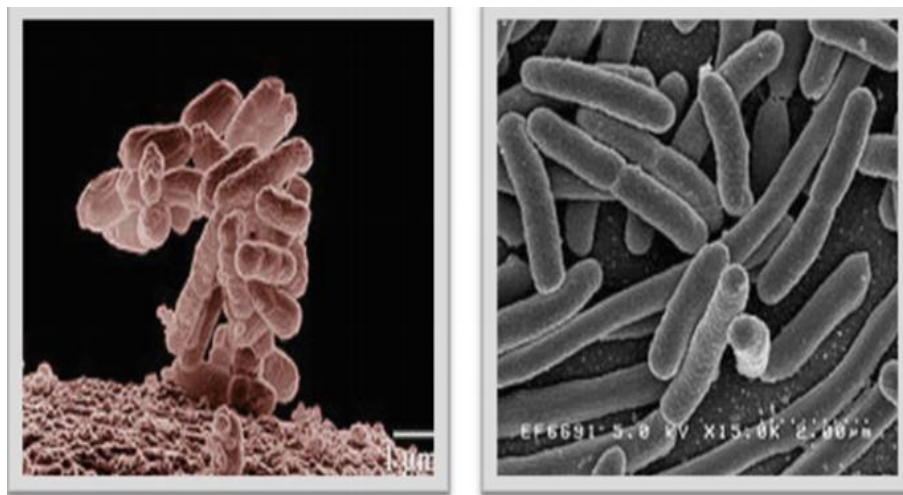


Figure 4 : *Escherichia Coli* sous microscope électronique à G x 100 (Avril et al, 2000).

C'est une bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA (trypticase-caséine-soja). *E. coli* est capable de fermenter le lactose et de produire de l'indole et possède différentes enzymes telles que la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et la bêta-glucuronidase. La majorité des souches

fermente le sorbitol. La plupart des caractéristiques biochimiques sont partagées par l'ensemble des *E. coli* en dehors du sérotype O157:H7 qui ne fermente pas le sorbitol, à l'exception de certains mutants qui ont la capacité de fermenter ce sucre (King et al., 2014) et qui sont dépourvus de l'activité bêta-Glu. Ces caractéristiques particulières sont utilisées pour sa recherche et son isolement dans l'environnement et l'alimentation (ISO 16654, 2001). *E. coli* constitue une espèce bactérienne sous-dominante du microbiote aérobie-anaérobie facultatif intestinale de l'Homme et des animaux. Cette bactérie représente 80 à 90 % des coliformes thermotolérants ou coliformes fécaux (capables de fermenter le lactose à 44.5°C) qui constituent un sous-groupe des coliformes totaux. Enfin, l'espèce *E. coli* est une bactérie versatile qui comprend, à la fois, des bactéries commensales du tube digestif, des bactéries pathogènes et des bactéries adaptées à l'environnement (Balière, 2017).

10.1. Taxonomie des *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille Gram négatif le plus souvent mobile appartenant à la famille des Entérobactéries. Il fermente le lactose, l'indole et le glucose avec production de gaz. Il possède un génome à ADN double brin circulaire de 4,6 millions de paires de bases, qui est entièrement séquencé. La plupart des souches d'*Escherichia coli* ne sont pas pathogènes. Leur pathogénicité est due à leurs antigènes de surface (Goita, 2014).

10.2. Souches d'*E. coli* pathogènes

10.2.1. Commensalité et pathogénicité

Le centre national de référence (CNR) des *E. coli* et des *Shigella* définit deux catégories de pathovars pour *E. coli*, en se basant sur leur pathogénicité (KERN-BENAIBOUT, 2006) :

- Les *E. coli* à l'origine de pathologies intestinales : les *E. coli* enterotoxinogènes ETEC, les *E. coli* entéro-pathogènes EPEC, les *E. coli* entérohémorragiques EHEC, les *E. coli* entéroinvasifs EIEC, les *E. coli* entéroaggrégatifs, EAaggEC et les *E. coli* à adhérence diffuse DAEC
- Les *E. coli* à l'origine de pathologies extra intestinales : les *E. coli* à l'origine de pathologies Extra Intestinales (ExPEC).

10.2. Pathogènes intestinaux

Les pathogènes intestinaux de *E. coli* appartiennent pour la plupart aux groupes phylogénétiques A/B1/E et sont reconnus comme des agents responsables de syndrome

diarrhéique d'origine alimentaire ou hydrique. Six principaux pathovars (tableau 3) classifiés en fonction des signes cliniques et des facteurs de pathogénicité exprimés sont inclus dans ce groupe (Diallo, 2013).

Tableau 3 : Pathovars d'E. Coli responsables de diarrhées chez l'homme (Diallo, 2013).

	Pathovars	Manifestations cliniques	Principaux facteurs de virulences
EPEC	E.coli entéropathogènes	Diarrhée infantile (enfants de moins de 2ans essentiellement dans les PVD)	- Adhésines dont le Bfp (bundle formingpilus) -Facteur attachement-effacement
EHEC	E.coli entérohémorragiques	Colite hémorragique. Syndrome hémolytique et urémiques.	-Shiga-like toxine anciennement nommée verotoxine
EIEC	E.coli entéroinvasifs	Diarrhées dysentériques .	-Pouvoir invasif (plasmide pINV)
ETEC	E.coli entérototoxinogènes	Syndrome cholériforme. Diarrhées des voyageurs (turista).	- Adhésines (CFA) - Entérotoxines LT et SP
EAgEC	E.coli entéroagrégatifs	Diarrhées persistantes.	-Entérotoxine EAST-1 - Facteur d'adhésion AAF/1
DAEC	E.coli à adhérence diffuse	Diarrhées (enfants entre 2 à 6ans).	- Adhésines

Chapitre II

Biocapteurs et détection des micro-organismes

1. Détection des micro-organismes

Les micro-organismes sont omniprésents et se retrouvent partout dans notre environnement, plusieurs techniques ont été mises en place afin de les détecter. Les méthodes de détection se perfectionnent avec le temps en affinant la spécificité et la sélectivité en un temps record. En passant par les méthodes traditionnelles comme la culture des micro-organismes, la PCR ou encore l'ELISA et plus récemment les biocapteurs. La détection traditionnelle au laboratoire des micro-organismes pathogènes se fait surtout par quelques méthodes : la culture des micro-organismes, la méthode immuno-enzymatique « Enzyme linked immunosorbent assay » (ELISA) et la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cependant, ces techniques nécessitent une expertise spécialisée afin d'exécuter les méthodes, mais aussi afin d'analyser les résultats. Même si la méthode de référence (par culture) est utilisée depuis le 19e siècle, elle démontre encore une sensibilité et une spécificité élevée. Cependant, les biocapteurs représentent une méthode alternative émergente intéressante pour leur faible coût de production et d'utilisation, ainsi que leur rapidité d'exécution, ce qui réduit considérablement le temps d'attente entre la collecte de l'échantillon et l'obtention des résultats, faiblesse notoire de la culture. Les biocapteurs devront cependant démontrer leur spécificité et sélectivité vis-à-vis des méthodes conventionnelles déjà bien établies (Choinière, 2017).

1.1. Détection par culture des micro-organismes

La culture des micro-organismes est la première méthode de détection la plus utilisée. Cette méthode est très spécifique dû à l'utilisation de différents milieux de culture qui peuvent permettre la croissance de seulement une espèce ou un type ou genre microbien suivi par la caractérisation phénotypique. Par exemple, le milieu de culture MacConkey est sélectif et différentiel, car il contient du violet de cristal et des sels biliaries qui inhibent la croissance des bactéries Gram positives et des bactéries en forme de sphère, appelées coques. De plus, elle contient du lactose et un indicateur de pH pour distinguer les bactéries qui peuvent fermenter le lactose des autres bactéries. Cependant, la culture des micro-organismes est basée sur la croissance de ces dernières, ce qui demande du temps. Selon le micro-organisme recherché, la croissance peut prendre de 16 h à 10 jours, comme *L. pneumophila* (Sikora et al., 2015), et demande plusieurs tests d'identification phénotypique dans des milieux différents afin d'identifier les produits métaboliques de la bactérie. C'est pourquoi d'autres tests sont effectués en parallèle afin d'aider l'identification. De plus, cette méthode demande

d'être exécutée par un technicien spécialisé et formé à cet effet. Elle est aussi la technique généralement la moins coûteuse pour la détection des micro-organismes (Fedio et al. 2011).

1.2. Détection par la méthode ELISA (linked immunosorbent assay)

L'ELISA est une technique principalement utilisée pour détecter des molécules associées aux micro-organismes pathogènes. C'est une technique bien implantée due à sa sensibilité et sa sélectivité accrue. Le principe repose sur l'immobilisation d'une cible sur une surface. Cette cible peut être un Ag (pour capturer un anticorps (Ac) spécifique) ou un Ac (pour capturer un Ag spécifique). Le sérum d'un patient peut être ajouté si l'on recherche des Ac particuliers. Une suspension peut être ajoutée si l'on cherche un Ag. À l'aide d'un Ac ou un Ag couplé à une enzyme, une réaction ELISA peut être mise en évidence à l'aide d'une réaction enzymatique. Il existe 4 types différents d'ELISA : direct, indirect, sandwich et ELISA par compétition (voir figure5) (Choinière, 2017).

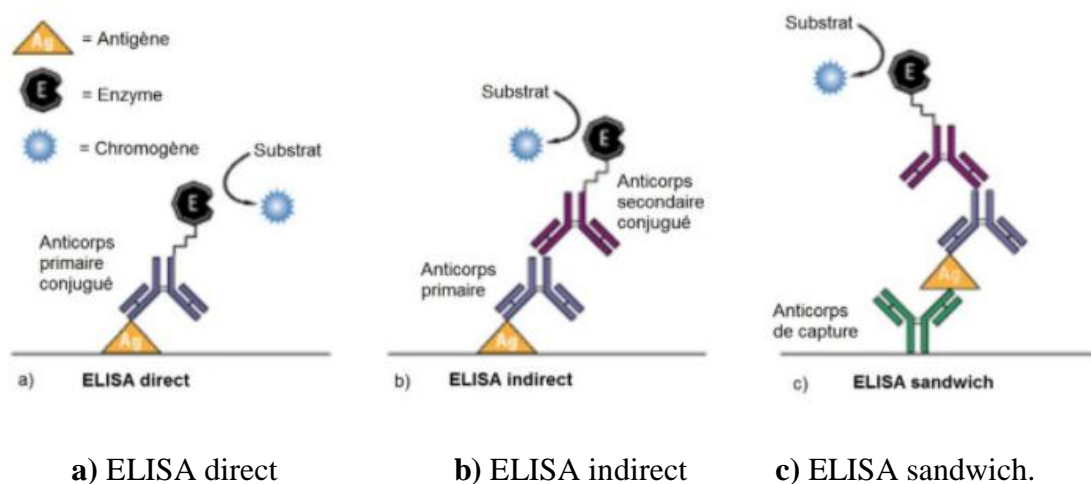


Figure 5 : Illustration des différents types d'ELISA (Thermo Fisher Scientific n.d.-a, 2017).

Il existe plusieurs trousse d'ELISA utilisées en laboratoire afin de détecter la présence de micro-organismes. L'ELISA est la plus souvent utilisée afin de détecter des Ag ou des Ac et non pas des bactéries entières. Il y a quelques articles qui se servent d'une variation d'ELISA basée sur le papier plutôt que sur les plaques à 96 puits afin de détecter les bactéries et notamment E. coli (Shih et al, 2015).

En ciblant le micro-organisme en entier, il est possible de le détecter rapidement, directement dans le milieu, par exemple, dans une tour de refroidissement, sans avoir à cultiver l'organisme ou à extraire l'ADN et effectuer une PCR des échantillons d'eau. Comme

les biocapteurs, les méthodes ELISA nécessitent la capture des antigènes ou Ac sur une surface. Le plus souvent, un antigène ou un Ac est fixé passivement sur la surface plastique d'une microplaque à 96 puits après incubation pendant 16 h dans un tampon alcalin ou neutre, mais des liens covalents peuvent aussi être employés (Butler, 2000).

1.3. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

La technique moléculaire la plus employée pour la détection des micro-organismes est la PCR, une technique très spécifique et sensible. Le principe repose sur la duplication in vitro d'une partie du génome du micro-organisme. La méthode consiste à répéter 3 phases de 20 à 40 fois environ, soit la dénaturation, l'appariement et l'élongation (voir figure 6). Cette méthode est employée principalement lorsque le temps de croissance du micro-organisme suspecté est plutôt long, car la PCR est une méthode très rapide (Choinière, 2017).

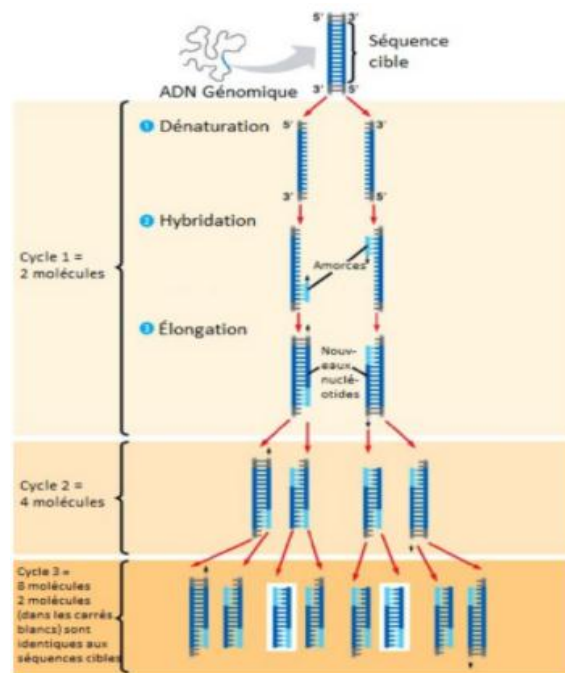


Figure 6 : Représentation des étapes d'une PCR (Kavya , 2015).

Avant la première dénaturation, il y a une étape d'initialisation qui permet d'activer la polymérase. Ensuite, la dénaturation permet aux doubles brins d'ADN de se séparer et l'appariement est l'étape où les amorces, petits brins d'ADN fabriqués, se lient à des endroits spécifiques sur les brins simples du génome dénaturé. Finalement, la phase d'élongation permet à la polymérase de répliquer les brins d'ADN (Kavya, 2015 ; Mullis et al, 1986).

Après une étape d'enrichissement du micro-organisme de 16 h, au besoin, il y a l'extraction d'ADN, qui est ensuite analysé par PCR avec les bons réactifs, ce qui demande

environ 3 h afin d'obtenir les résultats. Cependant, la technique est plus coûteuse dû aux réactifs utilisés et est aussi très sensible aux conditions expérimentales et aux inhibiteurs. La technique demande entre autres d'utiliser les bonnes amorces pour les bons gènes et d'avoir une méthode d'extraction d'ADN adaptée à l'échantillon à partir duquel on veut effectuer le test. Plusieurs tests ont été effectués afin d'améliorer l'étape d'extraction d'ADN selon les 27 échantillons à tester (Vingataramin et Frost, 2015).

De plus, il existe différents types de PCR, soit la PCR traditionnelle, la PCR quantitative (qPCR) et récemment, la PCR digitale. Principalement, la PCR traditionnelle nécessite l'électrophorèse en gel à la suite de l'amplification afin de détecter s'il y a eu amplification d'un produit, alors que le qPCR permet de suivre l'amplification en temps réel à l'aide d'un agent intercalant, comme le SYBR Green, ou d'une sonde fluorescente avec la méthode TaqMan. Finalement, la PCR digitale qui utilise le même principe que le qPCR, mais divise l'échantillon en partition afin d'obtenir, de façon optimale, une copie d'ADN par partition afin de pouvoir quantifier directement, sans avoir recours à des valeurs standards de comparaison (Thermo Fischer Scientific, 2005).

1.4. Détection par biocapteur

Une révolution récente des méthodes de détection de certaines biomolécules dans les aliments, dans l'environnement ou dans des liquides biologiques (sang, urine...etc.) a été perçue comme réponse à des demandes accrues. Ces méthodes visaient à élaborer des techniques fiables plus rapides et plus simples, capables de détecter des analytes en une seule analyse loin des méthodes d'extraction lentes, coûteuses et nécessitant des agents d'extraction nocifs. Face à cette problématique, un intérêt grandissant a été porté durant ces dernières années aux nouveaux dispositifs révolutionnaires à la taille et au prix réduit dits biocapteurs autorisant l'exploration in situ d'un grand nombre d'échantillons et l'identification ou le dosage en parallèle d'une large gamme de substances cibles (El Alami El Hassani, 2019).

Le premier biocapteur développé a été l'œuvre de Leland Clark en 1956 dans le but de déterminer la concentration en oxygène dissous dans le sang. Leland Clark a été connu comme le « père des biocapteurs » et son invention de l'électrode à oxygène porte son nom : Clark électrode. En 1962, ce biocapteur a été amélioré par le même auteur afin de mesurer le taux de glucose dans le sang, suivi par la découverte du premier biocapteur potentiométrique permettant de détecter l'urée par Guilbault et Montalvo en 1969. L'année 1975, a connu la découverte du premier immunocapteur dédié au dosage de l'éthanol et l'acide lactique par

Suzuki et al. Au cours des dernières décennies, le domaine des biocapteurs a connu une ampleur remarquable sous la pression de leurs divers domaines d'applications. Leur caractère compact et portatif ainsi que leur grande spécificité et sensibilité font d'eux une des meilleures alternatives aux techniques analytiques existantes (El Alami El Hassani, 2019).

2. Biocapteur

D'après l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), un biocapteur est un dispositif intégré fournissant des informations spécifiques quantitatives ou semi-quantitatives par le biais d'un élément de reconnaissance d'origine biologique en contact direct avec un élément de transduction.

2.1. Principe de fonctionnement d'un biocapteur

Le concept biocapteur regroupe tout dispositif de mesure défini par un couple de ligands biologiques sélectifs liés à un transducteur qui transforme un phénomène biochimique en un signal mesurable (voir figure 7) (Thévenot et al, 2001).

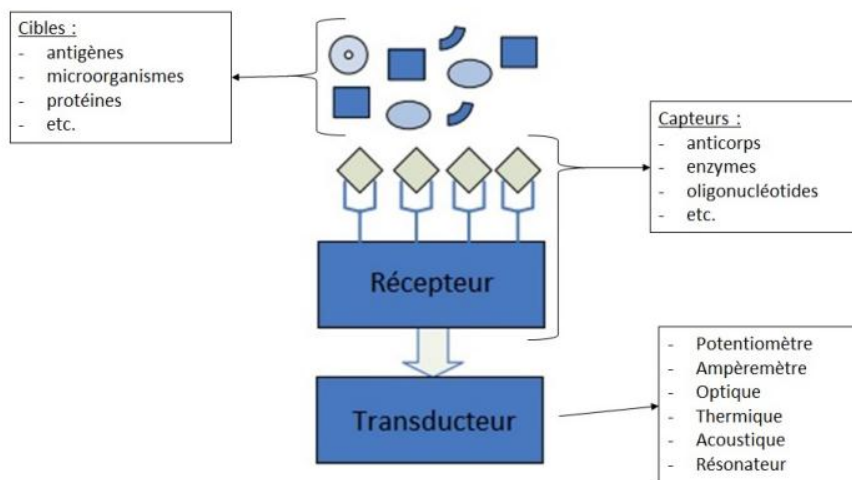


Figure 7 : Schéma général d'un biocapteur démontrant des exemples et la constitution de chaque partie (Choinière, 2017).

Leur caractère compact, leur grande spécificité, leur sensibilité et leur portabilité sont autant de raisons permettant de penser qu'ils pourraient, à long terme, supplanter les techniques analytiques existantes. Le biorécepteur qui est un élément biologique sélectif (anticorps, enzymes, cellules, ADN, organites cellulaires, tissus...) catalyse des réactions biochimiques ou interfère avec des structures complémentaires permettant d'avoir des

changements de propriétés physiques ou chimiques transformés en signaux électriques mesurables par le transducteur, ces signaux seront ensuite amplifiés et traités (Dupont, 2005).

Les biocapteurs constituent une nouvelle classe de dispositifs analytiques plus spécifiques que les méthodes traditionnelles dans de nombreux domaines d'applications dans les principaux sont représentées dans la figure 8 (Montrose, 2013).

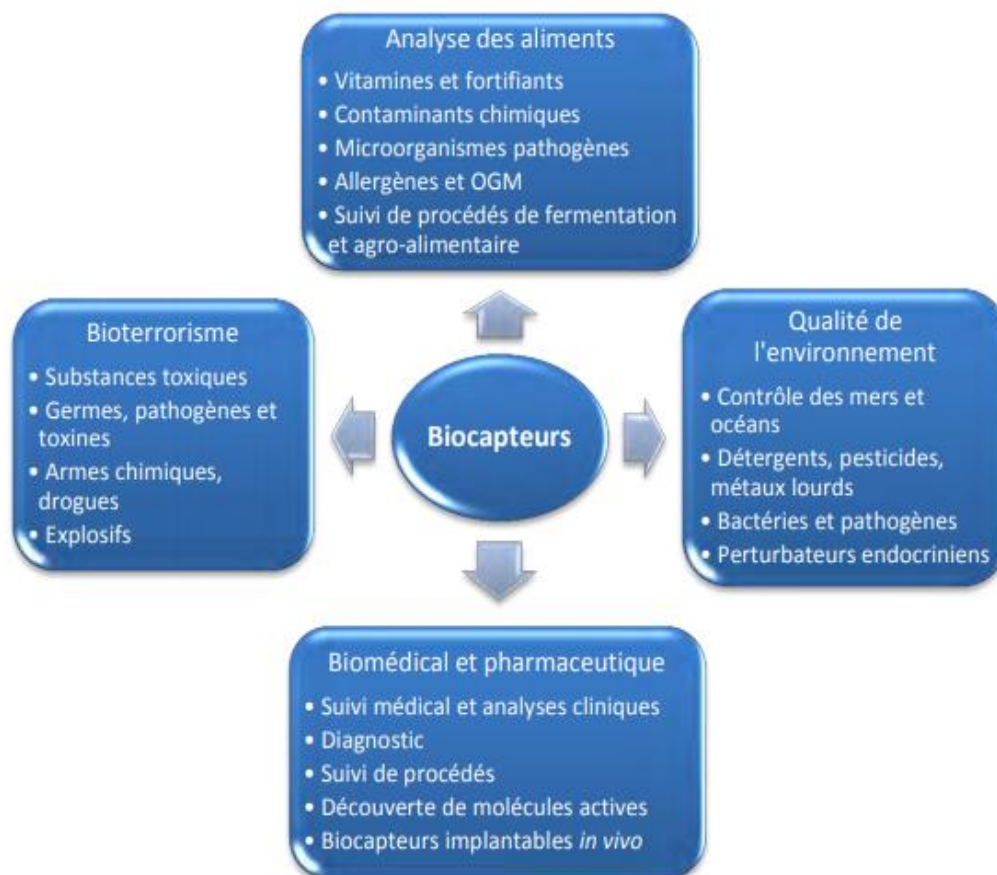


Figure 8 : Domaines d'applications des biocapteurs (Montrose, 2013).

3. Classification des biocapteurs

Les biocapteurs peuvent être classés selon : la reconnaissance moléculaire utilisée (biorécepteurs) et selon le transducteur associé.

3.1. Reconnaissance moléculaire utilisée (biorécepteur) :

Le biorécepteur est un élément très important des plateformes de détection, il assure l'interface entre analyte et transducteur. La fonctionnalisation physique ou chimique du biorécepteur, est double : son affinité avec les espèces à détecter va d'une part, déterminer la

sélectivité du capteur et d'autre part, jouer un rôle d'amplification participant à la sensibilité globale de la plateforme. On peut classer aussi les biorécepteurs en trois types ; les biorécepteurs d'affinité, les biorécepteurs métaboliques et les récepteurs biomimétiques (figure 9) (Tarbague, 2011).

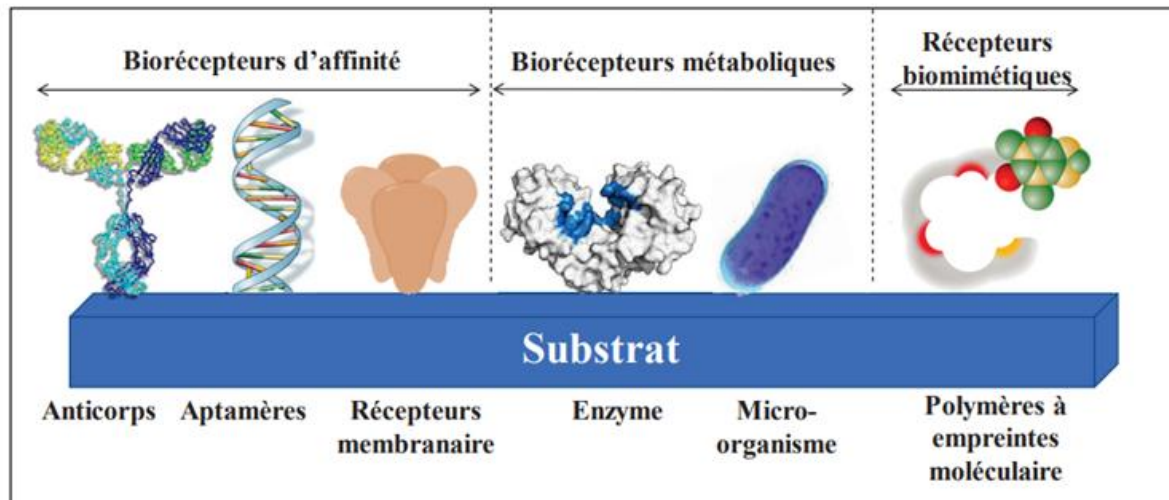


Figure 9 : Différents types de biorécepteurs (El Alami El Hassani, 2019).

3.1.1. Acide désoxyribonucléique (ADN)

Les acides nucléiques sont des macromolécules biologiques agencées sous forme de chaînes polymériques constituant le matériel génétique cellulaire. Ils peuvent être immobilisés en tant que tels (double brin) sur un transducteur physique ou sous forme d'une seule chaîne d'acides nucléiques (un seul brin) dans le but de détecter des processus d'hybridation. La détection d'un fragment d'ADN spécifique par hybridation avec une chaîne d'ADN complémentaire a gagné un intérêt considérable ces dernières années en raison de son importance pour le diagnostic précoce des maladies, tels que le cancer, "l'hypercholestérolémie". Le décodage du génome humain a sensiblement favorisé ce développement. Le principe de transduction le plus utilisé avec ce type de biorécepteur est la détection optique des oligonucléotides marqués à l'aide de fluorochromes. L'analyse parallèle d'un grand nombre de fragments d'ADN peut être aussi réalisée à l'aide de la technique des biopuces à ADN. L'utilisation de l'ADN double brin immobilisé sur un transducteur optique ou électrochimique a aussi connu des développements considérables pour le screening rapide de toxines ou de substances organiques carcinogènes mais aussi pour l'identification de nouveaux principes actifs anti-tumoraux (Marrakchi, 2006).

3.1.2. Anticorps

Un anticorps est une protéine, utilisée par le système immunitaire pour la détection et la neutralisation d'antigènes spécifiques de certains virus et bactéries. Les anticorps sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines et sont constitués de plusieurs chaînes moléculaires. Ils sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes type B, les plasmocytes, et sont largement utilisés comme agent de capture en biologie, en particulier dans les tests ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Notamment, leur structure générique leur confère des avantages certains en tant que biorécepteur. En effet de nombreuses espèces cibles pourront être adressées, en conservant le même protocole d'immobilisation de l'anticorps récepteur sur le transducteur. Cette détection, fondée sur une réaction immunologique hautement spécifique ne nécessitera pas de préparation lourde de l'échantillon. Le principal inconvénient de ce type de biorécepteur réside sans doute dans la difficulté d'obtention d'un anticorps adapté pour une cible identifiée, induisant un coût élevé. Des études récentes impliquant les aptamères, oligomères parfois appelés « anticorps chimiques », du fait de leur caractère hautement fin et sélectif, visent à contourner ce problème d'approvisionnement dans certains cas (Tarbague, 2011).

➤ Structure d'un anticorps

Les ACs ou Igs sont des glycoprotéines sériques hautement solubles impliquées dans les mécanismes de défense du système immunitaire. Ils peuvent être divisés en cinq classes en fonction de leurs séquences de chaînes constantes de chaînes lourdes, à savoir IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. La structure de base d'un AC est décrite dans la figure 10 et peut être subdivisée en deux blocs de construction distincts : le fragment de liaison à l'antigène (Fab) et le fragment constant (Fc). La chaîne légère a une région variable (lumière variable ou VL) et une région constante (CL). Le composant Fab de l'AC contient la région variable du fragment Fv, où les régions déterminant la complémentarité (CDR) peuvent être localisées. Les CDR forment les sites de liaison à l'antigène de l'AC et confèrent une spécificité à l'antigène. La région Fc est essentielle pour la médiation des fonctions effectrices. La région Fc est essentielle pour la médiation des fonctions effectrices telles que la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'AC (ADCC), la phagocytose cellulaire dépendante de l'AC, la présentation de l'antigène au système immunitaire, la dégranulation, la lyse médiée par le complément et la régulation de l'activation et de la prolifération cellulaire (Kahlouche, 2018).

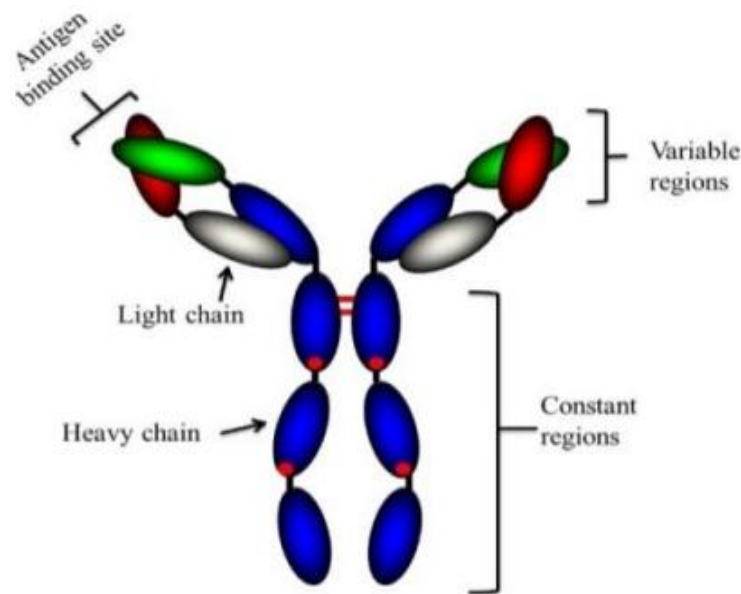


Figure 10 : Structure d'un anti-corps (Khalouche, 2018).

3.1.3. Enzymes

Les enzymes sont des protéines globulaires qui jouent le rôle de catalyseurs biologiques, c'est-à-dire qu'elles règlent et accélèrent la vitesse des réactions biochimiques sans toutefois être modifiées ou détruites au cours de ces réactions. Les enzymes accélèrent 10^3 à 10^6 fois la réaction correspondante qui se déroulerait sans catalyseur. En abaissant l'énergie d'activation de la réaction qu'elle catalyse, une enzyme abaisse le niveau énergétique de l'état de transition et accélère ainsi la réaction. Les enzymes ont une stéréospécificité tellement forte qu'elles effectuent des réactions leur permettant de choisir parmi différents énantiomères ou de discriminer d'autres groupes pratiquement identiques entre eux (voir figure 11). Certaines enzymes sont de nature purement protéique. D'autres sont formées de deux parties : une protéine et un cofacteur. Le cofacteur peut être l'ion d'un métal, notamment du cuivre ou du fer, ou une molécule organique nécessaire à la réaction. La plupart des cofacteurs organiques sont des dérivés des vitamines (surtout des vitamines du complexe). Etant donné qu'ils travaillent en synergie avec les enzymes, ces cofacteurs sont appelés coenzymes (Marrakchi, 2006).

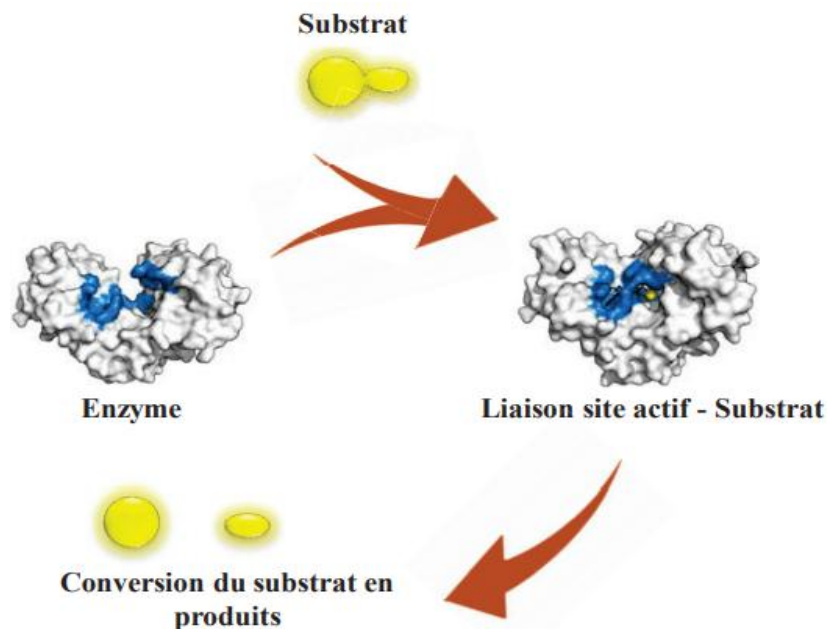


Figure 11 : Mécanisme réactionnel d'une réaction enzymatique (El Alami El Hassani, 2019).

3.1.4. Micro-organismes, tissus biologiques

Les biorécepteurs à base de micro-organismes, de cellules uniques ou de tissus organiques (pulpe de fruits, membranes cellulaires, bactéries, champignons, microalgues...), exploitent dans la majorité des cas des interactions enzymatiques plus stables (enzymes dans leur milieu naturel) avec les analytes. Ces biorécepteurs à cellules entières font l'objet d'un intérêt certain aujourd'hui, du fait de leur spécificité comme en témoignent des travaux récents pour la détection d'E.Coli, de virus (Tarbague, 2011).

3.2. Transducteur associé :

3.2.1. Biocapteurs optiques

Les capteurs optiques à enzymes, appelés parfois 'optodes' ou 'optrodes' par analogie avec les électrodes, sont en général des capteurs optochimiques qui exploitent la variation des propriétés optiques du milieu ou d'un récepteur immobilisé, en présence d'une grandeur chimique ou physico-chimique à mesurer. De nombreuses techniques optiques ont été adaptées afin d'être utilisées pour l'élaboration de biocapteurs. Les principales méthodes sont : la mesure de l'absorbance, de la chimiluminescence, de la fluorescence, de la résonance psalmodique de surface ou encore de l'onde évanescente (Kermad, 2014).

3.2.2. Biocapteurs mécaniques

Les méthodes de transduction mécanique sont principalement basées sur la génération et la détection d'ondes mécaniques ou acoustiques. Comme une onde acoustique se propage au travers ou à la surface d'un matériau, un changement au niveau de la zone de passage de l'onde propagée affectera sa vitesse et/ou son amplitude. Les variations de la vitesse de l'onde, induites par une augmentation ou une diminution de masse typiquement, peuvent être suivies par la mesure de spectres en fréquence et corrélées à l'information correspondant à la reconnaissance biologique recherchée (Ayela, 2007).

3.2.3. Biocapteurs thermiques ou calorimétriques

Ces biocapteurs, développés dans les années 1970, permettent de transformer un signal biochimique en un signal thermique. Un microcalorimètre ou une résistance thermique, raccordé au composé biologique, permet de mesurer les modifications d'enthalpie ou de température dues à une réaction entre le biorécepteur et l'espèce à détecter. Lorsque ces biocapteurs thermiques sont immunochimiques, on les appelle « TELISA » (Thermometric enzyme linked immunosorbent assay). Ces biocapteurs ont été utilisés notamment dans la détection d'insuline. Les principaux avantages de ce genre de biocapteurs sont leur rapidité de réponse, leur reproductivité, l'absence d'interférence des produits dérivés et d'interférence électrochimique ou optique et la stabilité des colonnes d'enzymes. Cependant, leur coût est relativement élevé du fait de la lourde instrumentation nécessaire à leur mise en œuvre, l'obligation d'un prétraitement pour des échantillons spécifiques et l'avalissement (encrassement) pour une utilisation prolongée (Kermad, 2014).

3.2.4. Biocapteurs électrochimiques

Un biocapteur électrochimique (Ampérométrique, potentiométrique, conductométrique et impédimétrique) est un appareil dans lequel le récepteur est intégré ou intimement associé à une électrode. C'est la raison pour laquelle ils se prêtent particulièrement bien à la miniaturisation et donc à la conception d'appareils destinés à un usage sur site. Deux techniques sont fréquemment utilisées (RECORD, 2018) :

- Le voltamètre à onde carrée (SWV pour Square Wave Voltammetry)
- La spectroscopie d'impédance électrochimique (EIS pour Electrochemical impedance spectroscopy).

La sensibilité, la spécificité et la stabilité du biocapteur est fonction de la méthode d'immobilisation du biorécepteur à la surface du transducteur, en particulier du type de liaisons mises en œuvre : adsorption, encapsulation, liaison covalente, liaison ionique, polaire, hydrogène ou interaction hydrophobe (constitution d'une ou 2 couches auto-assemblées de lipides). Autant d'éléments qui introduisent une grande diversité (RECORD, 2018).

A. Transducteurs potentiométriques

Ils sont basés sur la mesure du potentiel d'une électrode de travail par rapport à une électrode de référence. Le composé biologique fixé est le plus souvent une enzyme mais peut également être une cellule entière. La détermination des potentiels des électrodes permet de mesurer directement la concentration de l'analyte à doser. Les biocapteurs potentiométriques ont l'avantage de disposer de temps de réponse très courts (entre 5 à 10 minutes). Leur fabrication est largement industrialisée et par conséquent est moins coûteuse (Kengne, 2011).

B. Transducteurs ampérométriques

Les biocapteurs ampérométriques consistent généralement en une électrode dont la surface est recouverte d'un biofilm dans lequel sont immobilisées des biomolécules. Dans ce système, l'électrode est maintenue à un potentiel constant permettant d'obtenir l'électro-oxydation (ou la réduction) de l'un des produits de la réaction enzymatique à la surface de cette dernière générant ainsi un courant électrique dont l'intensité, dans certaines conditions, est proportionnel à la concentration en solution de l'espèce à doser. L'ampérométrie est parmi les modes de transduction les plus utilisés pour la mise en œuvre de biocapteurs. La plupart des travaux publiés sur les biocapteurs ampérométriques à base d'enzymes concernent le dosage du glucose dans le sang (Marrekchi, 2006).

C. Transducteurs conductimétriques

Les méthodes de transduction par conductimétrie sont attractives grâce à leur simplicité de fabrication et leur facilité d'utilisation. Les transducteurs conductimétriques mesurent les changements d'impédance électrique entre deux électrodes, où les variations peuvent provenir à une interface ou dans la région comprise entre les électrodes. Contrairement aux transducteurs ampérométriques et potentiométriques, la simplicité de fabrication provient de l'absence d'électrode de référence. La mesure de deux types d'impédance peut être un avantage ou un inconvénient, selon la composition du milieu principalement. Par exemple, si les changements doivent être mesurés à l'interface des

électrodes, la composition du milieu dans la région entre les électrodes (la force ionique entre autre) peut perturber les mesures. C'est pourquoi, malgré la simplicité du principe de détection, des optimisations sont nécessaires afin d'améliorer la sélectivité de la détection (Ayela, 2007).

D. Transducteurs impédimétriques

Le principe de ce type de transducteur repose sur la technique de la spectroscopie d'impédance basée sur l'application d'une contrainte sous forme d'une variation sinusoïdale en tension de quelques millivolts d'amplitude, entre l'électrode de référence et l'électrode de travail et la mesure du courant généré entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire en fonction de la fréquence (El Alami El Hassani, 2019).

4. Techniques d'Immobilisation du biorécepteur sur le transducteur

Pour qu'un biocapteur soit opérationnel, l'élément permettant la reconnaissance moléculaire doit être immobilisé sur une surface adaptée à la fois au greffage et à la transduction. L'immobilisation du biorécepteur est l'une des étapes les plus délicates dans la conception d'un biocapteur. Il existe plusieurs techniques générales d'assemblage des biorécepteurs aux matériaux des transducteurs allant de la simple adsorption à l'élaboration de structures complexes (voir figure 12).

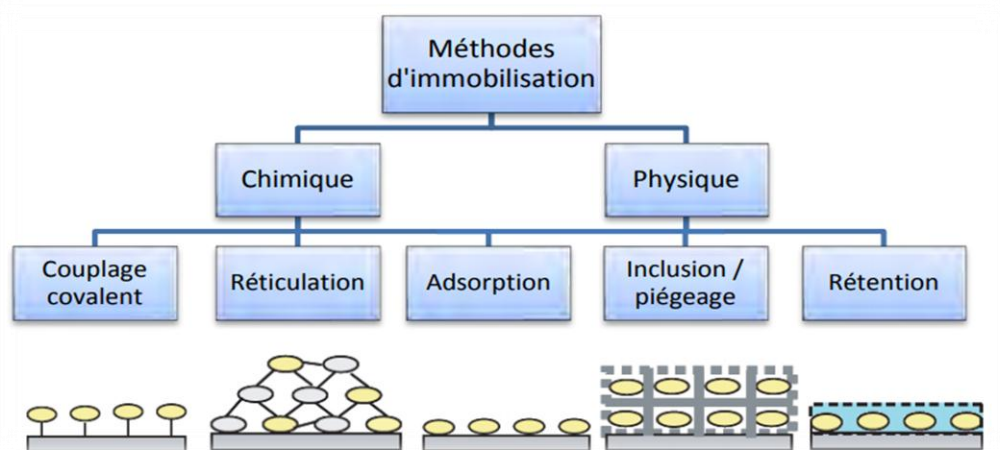


Figure 12 : Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur (Montrose, 2013).

Le choix du procédé d'immobilisation dépend du biorécepteur. Il doit être non dénaturant et doit permettre la conservation de sa spécificité et de sa sensibilité. De plus, le biorécepteur ne doit pas se décrocher pendant l'activité de reconnaissance et doit résister aux

changements de milieu (pH, température, etc...). Enfin, la couche d'immobilisation doit être reproductible et garantir la stabilité au cours du temps du biocapteur (Montrose, 2013).

4.1. Liaison covalente

L'immobilisation par liaison covalente est l'une des techniques les plus répandues. Elle permet la formation d'une liaison de forte énergie entre le biorécepteur et le transducteur sans perte de l'activité de biorecognition. Cette liaison est résistante aux changements de pH ou de force ionique et permet le contrôle de l'uniformité et de la distribution du biorécepteur sur la surface. Cet accrochage reproductible peut être direct ou indirect. Le couplage direct est la technique de référence pour la fixation des biomolécules de petite taille sur des surfaces d'or ou de silice via une monocouche auto-assemblée ou un film polymère conducteur. Les biomolécules immobilisées sont stables mais leur réactivité diminue généralement à cause de l'inaccessibilité ou de la dénaturation des centres actifs. De plus, des étapes supplémentaires d'activation des groupements fonctionnels sont préconisées pour améliorer le rendement et la sensibilité ce qui allonge le temps de fabrication des bioélectrodes. Lorsque le couplage direct est peu convenable ou impossible, les biomolécules sont immobilisées sur la surface du transducteur en formant des interactions d'affinité à l'aide d'un intermédiaire chimique ou biologique, comme la biotine ou la streptavidine. Cette stratégie permet d'avoir un biocapteur stable et surtout régénérable. Le greffage chimique par couplage covalent se prête aux biorécepteurs protéiques tels que les enzymes, les anticorps et les acides nucléiques qui possèdent des groupes fonctionnels, généralement amines ou carboxyles mais aussi thiols, utilisables pour leur immobilisation et n'interférant pas avec les parties nécessaires à la reconnaissance (Montrose, 2013).

4.2. Réticulation

La réticulation se fait par utilisation d'agents réticulant, tel que le glutaraldéhyde ou le bisacrylamide. L'intérêt de ce type de composés est la présence de multiples fonctions chimiques en leur sein, leur permettant de ponter deux protéines entre elles par réaction avec les fonctions NH_2 présentes à la surface des biomolécules. Il est ainsi possible de lier entre elles différentes protéines par formation d'un réseau de chaînes de polymères. On obtient alors une structure tridimensionnelle, de masse moléculaire plus élevée et présentant des propriétés physico-chimiques différentes de celles des composés pris à part, par exemple l'insolubilité dans les solvants. Deux méthodes de réticulation peuvent être utilisées. La première est la méthode classique, utilisant simplement un agent réticulant et la protéine a

immobilisé. La seconde est appelée co-réticulation et fait intervenir une seconde protéine, ne présentant pas d'activité catalytique, permettant de stabiliser la structure tridimensionnelle. La réticulation est avantageuse de par sa simplicité de mise en œuvre. Malgré tout, elle présente différents inconvénients. La création du réseau tridimensionnel entraîne notamment une modification des propriétés physiques des molécules et peut ainsi diminuer les propriétés mécaniques de la structure. De plus, la modification de la structure de la protéine engendre généralement une diminution de l'activité catalytique due à la modification du site actif de l'enzyme (Palomar, 2017).

4.3. Adsorption

C'est l'une des techniques les plus simples à mettre en œuvre et ne nécessite généralement pas l'utilisation de réactifs. L'adsorption des biomolécules en solution se fait sur une surface solide et résulte d'interactions physiques ou chimiques. Les liaisons physiques sont de faible énergie : liaison ionique, interaction hydrophobe ou liaison de Van Der Waals. Les liaisons chimiques impliquent le partage ou le transfert d'électrons, ce qui les rend plus sélectives et plus fortes. Du fait de la faible énergie mise en jeu, les molécules peuvent se désorber lors de la modification physico-chimique du milieu. Cependant, du fait de sa simplicité et de son faible coût, l'adsorption directe des protéines et autres biomolécules demeure la technique de référence pour les tests ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) et les biocapteurs qui en découlent (Guedri, 2010).

4.4. Emprisonnement physique

La méthode d'inclusion et de rétention consiste à incorporer la biomolécule dans un gélifiant tel que la gélatine, le polyacrylamide ou l'agarose. Le biorécepteur est mélangé à la matrice et déposé dans des conditions contrôlées sur la surface afin de le piéger mécaniquement dans les mailles de la matrice. Le polymère permet la diffusion des analytes et des réactifs nécessaires à la biorecognition. Cette méthode d'immobilisation, souvent appliquée à des cellules entières, permet une bonne conservation du biorécepteur du fait qu'il ne soit pas réellement fixé. Cependant son utilisation est limitée par la taille des pores de la matrice qui peut relarguer les biomolécules. De plus, la présence du film génère une barrière diffusionnelle supplémentaire ce qui entraîne une augmentation du temps de réponse et une diminution de la sensibilité. Après avoir défini les biocapteurs et ses différentes composantes, nous allons aborder la manière dont ces dispositifs sont intégrés pour des applications biomédicales et plus précisément pour le diagnostic médical (Montrose, 2013).

Chapitre III

Matériel et méthodes

1. Objectif du travail

L'objectif de notre travail est d'analyser l'eau usée de la STEP de Tizi Ouzou afin d'identifier sa composition bactériologique, et dans le but principal est d'isoler et d'identifier la bactérie E. Coli qui va nous servir dans la deuxième partie expérimentale utilisant un biocapteur à base d'anticorps où nous allons comparer la méthode de détection des micro-organismes (E. Coli) : méthode traditionnelle sur milieu de cultures et la méthode par biocapteur afin d'étudier son efficacité et sa limite de détection.

2. Présentation de la zone d'étude

La station d'épuration Est de la ville de Tizi-Ouzou (Figure 13) a été conçue au début des années 90 et a été mise en service en août 2001 et transférée à l'ONA en juillet 2003. Elle a pour but l'épuration des effluents du côté Est de la ville de Tizi Ouzou, pour lequel la pollution va être réduite à un degré qui garantit les objectifs de qualité des milieux récepteurs, selon le procédé (boue activée à culture libre) pour un volume journalier théorique de 1 800 m³ /jour, et une capacité de 120 000 habitants.



Figure 13 : STEP Est de Tizi Ouzou (Google earth, 2021)

3. Durée de l'étude

Notre étude s'est déroulée sur une période allant du 20 mai au 05 juin 2021, plusieurs prélèvements ponctuels, ont été effectués au niveau de la STEP de Tizi-Ouzou ; au même moment de la journée, entre 9 h et 11 h du matin.

4. Prélèvement et échantillonnage de l'eau

Le prélèvement d'un échantillon d'eau est une opération délicate à laquelle le plus grand soin doit être apporté. Les conditions essentielles à respecter pour le prélèvement sont d'abord le respect des règles d'asepsie, et la non modification de la flore au cours du prélèvement et du transport des échantillons. Les manipulations effectuées au cours du prélèvement ne doivent en aucun cas être à l'origine d'une contamination. Les prélèvements se font dans des flacons propres, secs, étanches, à col large stérilisés par autoclavage à 120 °C pendant 30 min.

Le transport des échantillons d'eau (Norme NF T 90-420 de février 1987) doit se faire à une température maintenue entre 1 et 4° C grâce à des emballages isothermes (glacières) pour empêcher la prolifération des germes. Tous les flacons portent une étiquette où sont mentionnées les indications suivantes :

- Nature de l'eau
- Lieu de prélèvement
- Date de prélèvement

5. Protocole et lieux d'analyse

Dans notre étude les prélèvements de l'eau usée traitée ont été réalisés à la sortie de la station d'épuration Est de la ville de Tizi Ouzou. Les analyses microbiologiques ont été effectuées au sein du laboratoire de traitement des eaux (G03) de la faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques de l'université de Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. L'activation des électrodes et l'analyse par biocapteur ont été faites au sein du Centre de développement des technologies avancées (CDTA).

Le Centre de Développement des Technologies Avancées (CDTA) (Figure 14) est un établissement public à caractère scientifique et technologique (EPST). Il a pour mission de mener des actions de recherche scientifique, d'innovation technologique, de valorisation et de formation dans les domaines des sciences et des technologies de l'information, des technologies industrielles et de la robotique, des dépôts et des traitements des matériaux, des applications et des technologies des lasers.



Figure 14 : Centre de développement des technologies avancées

5.1. Analyse bactériologique par la méthode traditionnelle (milieux de culture)

L'analyse bactériologique a pour but la recherche et dénombrement des germes existant dans l'effluent secondaire à savoir :

- La flore mésophile totale ;
- Les coliformes totaux ;
- Les coliformes fécaux et *Escherichia Coli* spécialement ;
- Entérocoques intestinaux ;
- Clostridium sulfito-réducteur ;
- Salmonelles
- Staphylocoque
- Vibrio cholérique

➤ Matériels utilisés

- | | |
|--|--------------------------------|
| ✓ Flacons stériles | ✓ Bain marie de marque Memmert |
| ✓ Rampe de filtration | ✓ Eprouvettes |
| ✓ Etuves réglées à 22, 37 et 44°C de marque Nuve | ✓ Entonnoirs |

- ✓ Portoirs
- ✓ Etiquettes
- ✓ Conteur de colonies
- ✓ Filtres de 0.45 μ m
- ✓ Tubes à essais stériles
- ✓ Bec-bunsen
- ✓ Pipettes pasteur
- ✓ Boites de pétries
- ✓ Plaque chauffante
- ✓ Potentiostat de marque Harrison 6515A DC Power Supply
- ✓ Spectromètre RAMAN de marque Horiba
- ✓ Electrodes en or
- ✓ Four pasteur de marque Wisd
- ✓ Générateur de marque MS major science Mini-300
- ✓ Pince stérile

➤ Produits utilisés

- ✓ Gélose PCA ;
- ✓ Gélose viande de foie (VF) ;
- ✓ Milieu tergitol préparé ;
- ✓ Gélose Slanetz et Bartley ;
- ✓ Milieu BEA ;
- ✓ Gélose TTC ;
- ✓ Gélose Trypto Caseine Soja ;
- ✓ Gélose Hektoen ;
- ✓ Gélose Chromagar ;
- ✓ Gélose Chapman ;
- ✓ Gélose GNAB ;
- ✓ Eau peptonnée ;
- ✓ Eau peptonnée alcaline ;
- ✓ Eau physiologique ;
- ✓ Réactif : kovacs, alun de fer, sulfite de sodium et l'huile de vaseline ;
- ✓ Anti corps anti fambriac du lapin
- ✓ Polyéthylènimine branchée (PEI, Mw~25,000),
- ✓ Carbodiimide hydrosoluble monohydrochloride 1-ethyl-3[3-

- | | |
|--|--|
| dimethylaminopropyl
(EDC.HCl), | ✓ Dichlorométhane
(CH ₂ Cl ₂), la triéthylamine
(≥99.5%, TEA), |
| ✓ N-hydroxysuccinimide
(NHS), | ✓ Oxyde d'éthylène O-(2-
aminoéthyl)-O'-(2-
méthyléthyl) |
| ✓ le tampon phosphate salin
(PBS, 10 mM, pH 7.4), | heptaéthylène glycol
(≥90%, NH ₂ -PEG ₈ -N ₃)
est obtenus chez Sigma-
Aldrich (France). |
| ✓ Potassium ([K ₄ Fe(CN) ₆]), | ✓ Oxyde de graphène (GO)
en poudre provient de
Graphènea, Espagne. |
| ✓ Chlorure
d'hexaammineruthenium(
III) ([Ru(NH ₃) ₆]Cl ₃), | |
| ✓ Acide 1-
pyrenecarboxylique (97%,
Pyr-COOH), | |
| ✓ Carbonate de N,N'-
disuccinimidyle (≥95.0%,
DSC), | |

5.1.1 Principe de la méthode par filtration

L'échantillon d'eau à analyser est filtré à travers une membrane qui retient les microorganismes recherchés. La membrane est ensuite placée sur un milieu gélosé ou sur un tampon absorbant imprégné de bouillon de culture. Durant l'incubation, des colonies se forment à la surface de la membrane. Cette technique permet de travailler sur des volumes importants d'échantillon et donc de concentrer les bactéries présentes en petit nombre sur un support de petite surface (filtre membrane 0.45µm).

5.1.2. Dénombrement de flore mésophile totale

Il s'agit d'une technique de numération de manière non spécifique du plus grand nombre de microorganismes après incorporation de volumes d'échantillon ou de ses dilutions dans un milieu gélosé (**Norme NF EN ISO 6622 juillet 1999**). Pour le dénombrement de la flore mésophile totale nous avons suivi les étapes citées si après (figure 15) :

- Agiter soigneusement et de façon prolongée le flacon d'échantillon, de manière à remettre les microorganismes en suspension homogène.

- Prélever ensuite 1ml de l'échantillon et procéder aux dilutions adaptées à celui-ci.
- Placer un volume de prise d'essai de 1 ml de ses dilutions, de manière stérile, dans le fond d'une boîte de pétri.
- Utiliser une pipette stérile de 1 ml, en débutant par la dilution la plus forte jusqu'à la plus faible.
- Ajouter 15 à 20 ml de gélose fondue de PCA (maintenue en surfusion à 45° C) et mélanger avec précaution par rotation de la boîte de pétri, sans faire de bulles et sans mouiller les bords extérieurs, afin de répartir les bactéries de manière homogène sur la surface de la boîte. Le temps entre l'addition de la prise d'essai (ou dilution) et l'addition du milieu fondu ne doit pas dépasser 15 minutes.
- Laisser le milieu solidifier sur une surface plane, horizontale et fraîche.
- Retourner les boîtes et incuber une série à 37° C et l'autre série à 22° C pendant 24 h.
- Après incubation dénombrer les colonies apparentes à l'aide du compteur de colonies.
- Puis calculer le nombre d'unités formant colonies (UFC) par millilitre d'échantillon à partir du nombre de colonies apparues sur le milieu de culture et en respectant le mode de calcul donné par la norme, selon la formule suivante :

$$N = \frac{\Sigma \text{ des colonies}}{VX(n_1 + 0.1n_2)d_2}$$

- N : Nombre d'UFC par ml de produit initial ;
- Σ des colonies: Sommes des colonies des boîtes interprétables ;
- V : Volume d'inoculum déposé par boîte en ml (v = 1 ml) ;
- n 1 : Nombre de boîtes considéré à la première dilution retenue ;
- n 2 : Nombre de boîtes considéré à la seconde dilution retenue ;
- d 2 : Facteur de la première dilution retenue

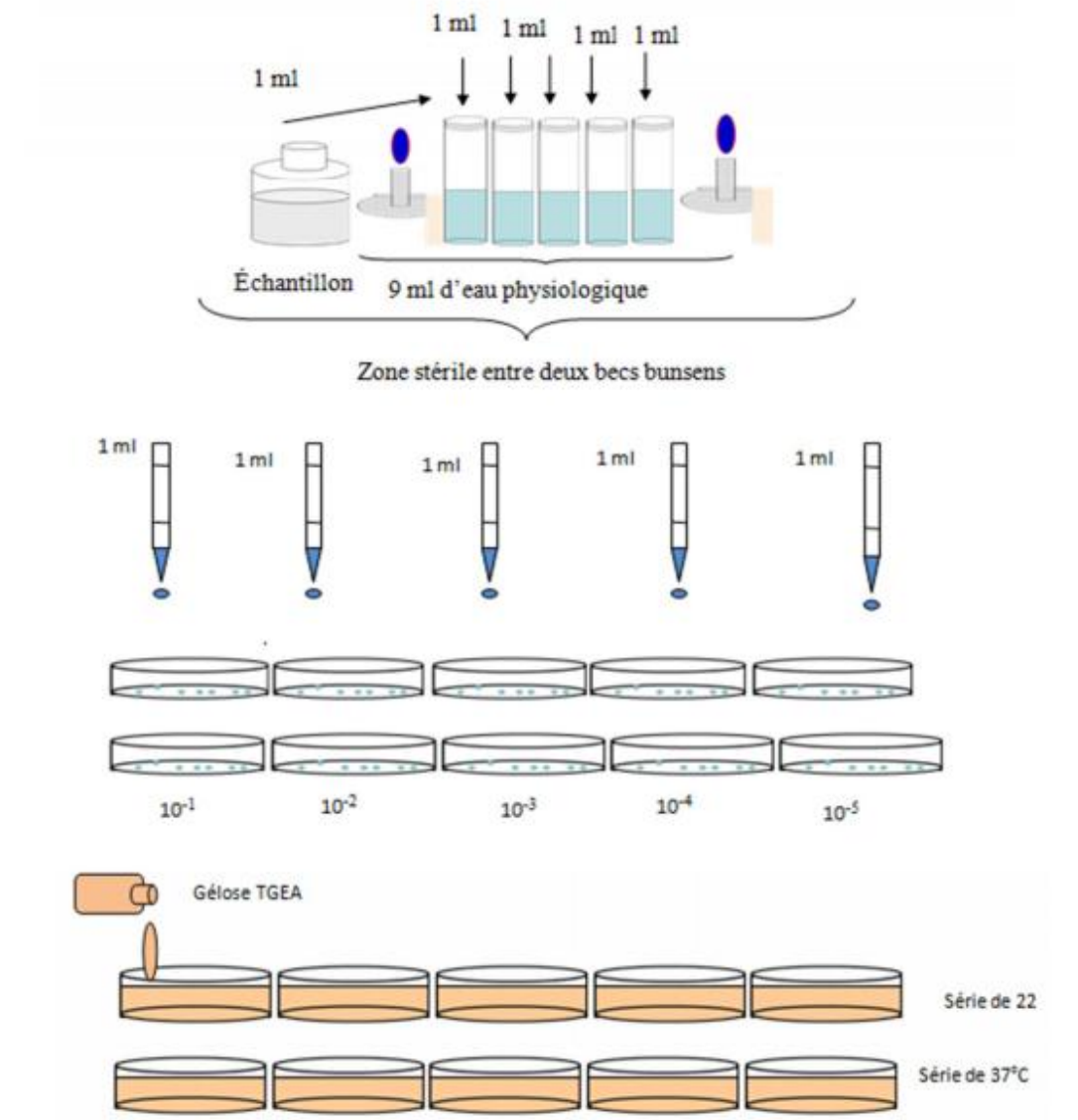


Figure 15 : Recherche de flore mésophile totale à 22 ° C et à 37° C sur milieu TGEA (NF EN ISO 6622 juillet 1999)

5.1.3. Coliformes totaux et Fécaux

Cette méthode consiste à rechercher et dénombrer des *Escherichia coli* et des coliformes (**Norme ISO9308-1**) qui sont présentes dans tous type d'eau par le suivie de ces étapes (figure 16) :

- Stériliser l'entonnoir gradué en verre ainsi que le filtre poreux en les faisant passer à travers la flamme du bec bunsen ;
- Refroidir avec de l'eau à analyser ou avec de l'eau distillée ;

- Flamber la pince et transférer dans des conditions d'asepsie la membrane poreuse de 0.45 μm et la mettre entre l'entonnoir et le filtre poreux ;
- Fixer ce dispositif avec la pince correspondante ;
- Verser ensuite aseptiquement entre deux becs bunsens l'échantillon à analyser (eau épurée) ;
- Actionner la pompe à vide pour absorber l'eau à travers la membrane ;
- Après avoir filtré toute la quantité d'eau (100 ml), arrêter la pompe et retirer l'entonnoir en verre ;
- Retirer la membrane à l'aide d'une pince stérile, et la transférer immédiatement sur la surface d'une plaque de gélose TTC préalablement préparée. Incuber les boîtes de pétries couvercle en bas à 37° C pendant 24h (jusqu'à 48 h) pour les coliformes totaux, et incuber à 44° C pendant 24 heures afin d'avoir les coliformes fécaux.
- Après incubation, considérer les colonies lactose positif (c'est à dire milieu présente une coloration jaune sous la membrane) comme caractéristiques des coliformes, quelle que soit leur taille.
- Repiquer de préférence, toutes les colonies caractéristiques, ou un nombre représentatif (au moins dix), sur une gélose non sélective comme la gélose Tryptocaseïne Soja ; incuber à 37° C pendant 24 h ; et un bouillon au tryptophane, incubé à 44° C pendant 24 h.

Après incubation, réaliser le test oxydase sur les colonies isolées sur la gélose et rechercher de la production d'indole sur le bouillon. Les colonies ayant une réaction négative à l'oxydase sont considérées comme coliforme. Les colonies ayant une réaction négative à l'oxydase mais positive à l'indole sont considérées comme E. coli.

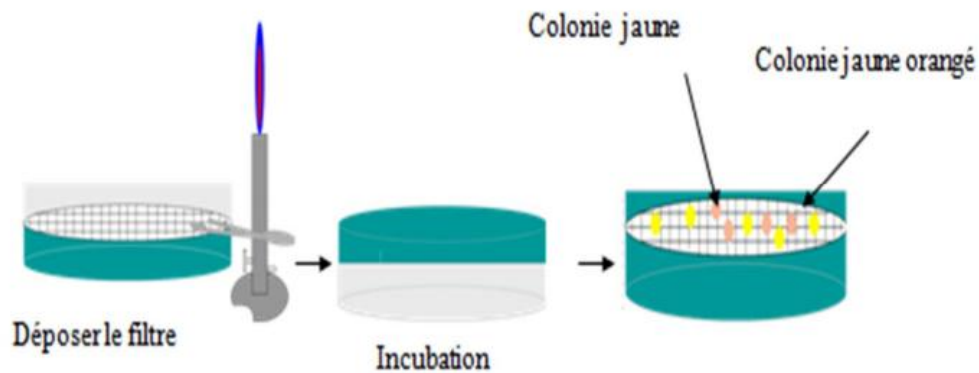


Figure 16 : Méthode pour la recherche des coliformes par filtration sur membrane (Norme ISO9308-1)

5.1.4. Recherche des entérocoques intestinaux

Les entérocoques intestinaux sont des bactéries à Gram positive présente sous forme de cocci sphérique formant des chainettes, ne possédant pas de catalase, capable de se développer sur milieu sélectif à l'azoture de sodium en donnant des colonies caractéristiques qui réduit le TTC ainsi qu'elles hydrolysent l'esculine en 2 h à 44° C après avoir été repiqué sur la gélose biliée à l'esculine et à l'azoture (BEA) (Norme ISO 7899-2 NA 766).

La recherche des entérocoques ou streptocoques du groupe « D » se déroule selon le même procédé utilisé pour la recherche des coliformes par la méthode de filtration sauf qu'ici la membrane est déposée sur le milieu Slanetz et Bartley (figure 17).

Après incubation durant 24 h à 37° C, on procède au dénombrement des colonies qui présentent une coloration rouge, marron ou rose, pouvant être limitée à leur centre ou à leur périphérie, et provenant de la réduction par les entérocoques du TTC.

La confirmation du genre *Enterococcus* se fera par transfert de la membrane à l'aide d'une pince stérile sur un milieu à l'esculine préalablement chauffé à 44° C et incubation de ce milieu à 44° C pendant 2 heures. Les colonies présentant une coloration foncée à noire sur cette gélose seront dénombrées comme des entérocoques.

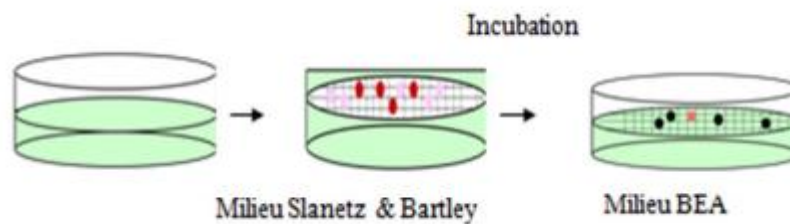


Figure 17 : Méthode pour la recherche des entérocoques par filtration sur membrane
(Norme ISO 7899-2 NA 766)

5.1.5. Isolement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices

On entend par bactéries anaérobies sulfito-réductrices (ARS) des bactéries qui se présentent sous forme de bacille à Gram positif et qui en se développant à température de 37° C en 24 à 48 heures en gélose profonde de type gélose viande foie, donnant des colonies caractéristiques qui sont de couleur blanche entourées d'une auréole noire. Cette dernière est le témoin de la réduction du sulfite de sodium (Na_2SO_3) qui se trouve dans le milieu ; en sulfure qui en présence de Fe^{2+} donne Fe S (sulfure de fer) de couleur noir (**Norme ISO 6461/2- 1986**).

La présence de spores de bactéries ARS dans les eaux, constitue généralement un véritable indice de contamination fécale ancienne. Leur recherche se fait par (figure 18) :

- Sélection de la spore en détruisant toutes formes végétatives par chauffage de l'eau à analyser au bain marie à 75° C, pendant 15 minutes à partir du moment où cette température a été atteinte. Ensuite on réalise un choc thermique sous l'eau du robinet.
- Filtration de 100 ml de cette eau sur une membrane dont les pores sont suffisamment petits pour retenir les spores (0,45 μm).
- Après la filtration, placer la membrane, face supérieure tournée vers le bas, dans le fond d'une boîte de pétri de 90mm de diamètre, stérile et vide, en s'assurant qu'il ne reste pas de bulles d'air emprisonnées sous le filtre.
- Verser ensuite soigneusement 18 ml de milieu de culture liquéfié (gélose viande foie), préalablement refroidi à environ 45° C, sur la membrane en l'immobilisant avec des pinces stériles.

- Après solidification de la gélose, incuber en atmosphère anaérobie dans une jarre à anaérobiose à 37° C pendant 24 heures et 48 h.
- Compter toutes les colonies noires après incubation et donner le résultat en nombre de spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices en fonction du volume filtré.

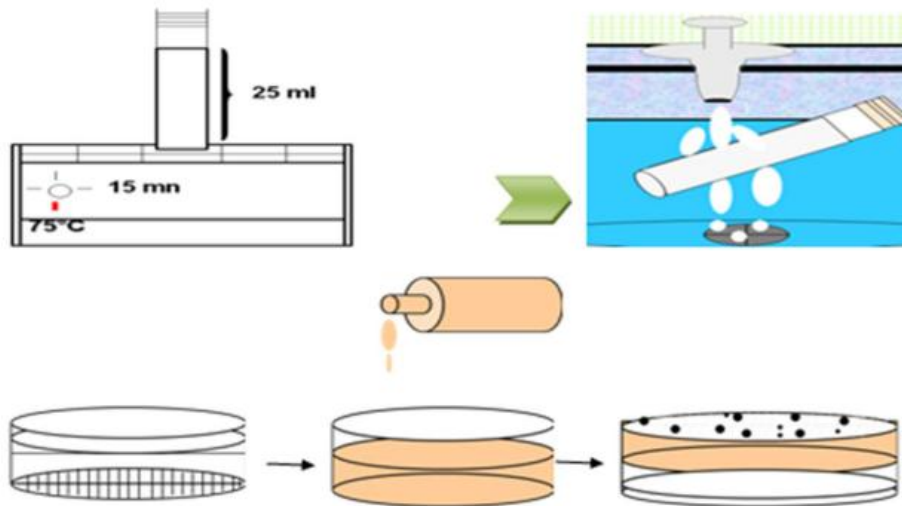


Figure 18 : Recherche des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices par filtration sur membrane (Norme ISO 6461/2- 1986)

5.1.6. Recherche des Salmonelles

Les Salmonella sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatives, asporulés et oxydase négative, ces dernières sont en forme de bâtonnet, qui forme des petites colonies lisses à contours réguliers, pigmentées en vert ou en bleu vert à centre noir sur milieu Hektoen à une température d'incubation de (36° C ± 2) pendant 24 à 48 heures (**Norme ISO 6340**).

La recherche et l'identification des salmonelles se fait comme suit (figure 19) :

- Filtration de 250ml d'eau sur une membrane de 0,45µm.
- Placer le filtre dans 50 ml de l'eau peptonée tamponnée afin d'effectuer le pré enrichissement et incuber à 37° C pendant 24 heures.

- Après incubation, transférer 1 ml du bouillon d'enrichissement dans 10 ml du milieu Rappaport Vassiliadis préalablement chauffé à 42° C, et incuber à 37° C pendant 18 à 24 h.
- Repiquer les colonies à l'aide d'une anse sur le milieu Hektoen afin d'effectuer un isolement et incuber à 37° C pendant 24 h.

Pour confirmer La présence de colonies de salmonelles (contour régulier avec ou sans centre noir) sur les milieux gélosés sélectifs (Hektoen) il faut effectuer une galerie biochimiques basée essentiellement sur : ONPG, UREE, TSI, indole, LDC.

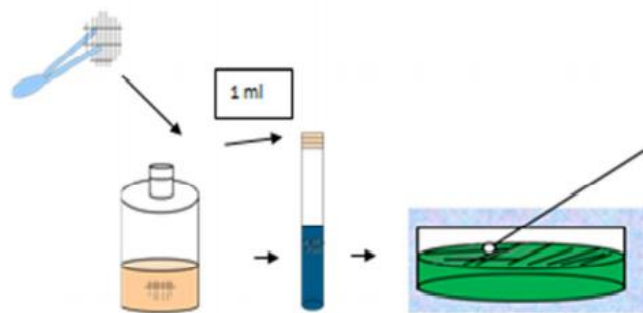


Figure 19 : Recherche des salmonella (Norme ISO 6340).

5.1.7. Isolement des staphylocoques à coagulase positive

Les Staphylocoques à coagulase positive sont des bactéries qui se présentent sous forme de cocci à Gram positif ; sphériques, isolées ou regroupées formant ainsi des grappes de raisin, possédant l'enzyme catalase et la coagulase. Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à 37° C sur un milieu sélectif Chapman au mannitol ou Bird Parker (**Norme NF ISO 7218**). L'espèce type du genre est *Staphylococcus aureus*, elle est pathogène et fortement redoutée.

La recherche de ces germes se déroule grâce à une filtration décrite précédemment toute, en transférant la membrane aseptiquement, à l'aide d'une pince stérile, sur la surface d'une plaque de gélose Chapman au mannitol préalablement préparée. Cette dernière est incubée couvercle en bas à 37° C pendant 48 heures.

Après l'incubation, les colonies spécifiques de staphylocoques sont représentées sous forme de petites colonies lisses légèrement bombées à contours réguliers, pigmentées soit en jaune (Fermente le mannitol) ou blanc (ne fermente pas le mannitol).

Pour l'identification de ses bactéries on doit prendre quelques colonies et établir deux tests complémentaires (figure 20) :

- Le test de la catalase qui consiste à mettre en contact la colonie avec de l'eau oxygénée si elle est dotée de cette enzyme il y aura apparition des bulles d'air

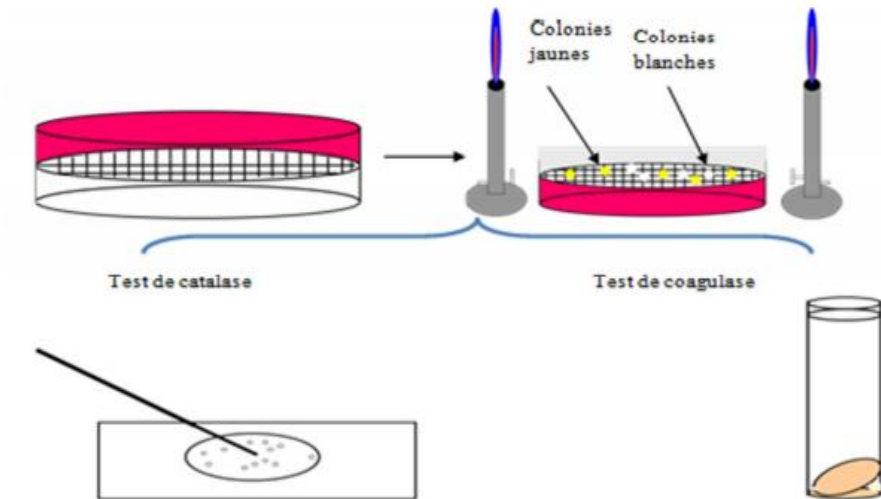


Figure 20 : Recherche des staphylocoques par méthode de filtration sur membrane
(Norme NF ISO 7218)

5.1.8. Isolement du vibriion cholérique

On entend par *Vibrio cholera*, une bactérie qui est présente sous forme de bacille incurvé à Gram négatif (Norme ISO / TS 21872-1). La technique de recherche et d'identification de *Vibrio cholera* dans des eaux usées par filtration sur membrane consiste à suivre mode opératoire ci-dessous (Figure 21) :

- Verser 450ml de l'échantillon d'eau usée traitée dans un flacon d'eau peptonée alcaline dans le but d'effectuer le premier enrichissement puis incubé à 24h à 37 °C.
- Après incubation, effectuer le deuxième enrichissement qui consiste à transférer 1 ml du bouillon du premier enrichissement dans 10 ml d'eau peptonée alcaline
- Après incubation, on ensemence la gélose GNAB à partir du bouillon du deuxième enrichissement, incubé à 37°C pendant 24 h.

Pour confirmer la présence de colonies typique de *Vibrio* (colonies plates et transparentes) sur les milieux gélosés sélectifs il faut effectuer une mini galerie biochimique (test d'oxydase, LDC, ODC et ADH) et il faut établir l'identification morphologique (état

frais, coloration de Gram). La confirmation de la présence de se germe nécessite aussi l'établissement d'un test d'agglutination avec de l'eau physiologique et le sérum polyvalent.

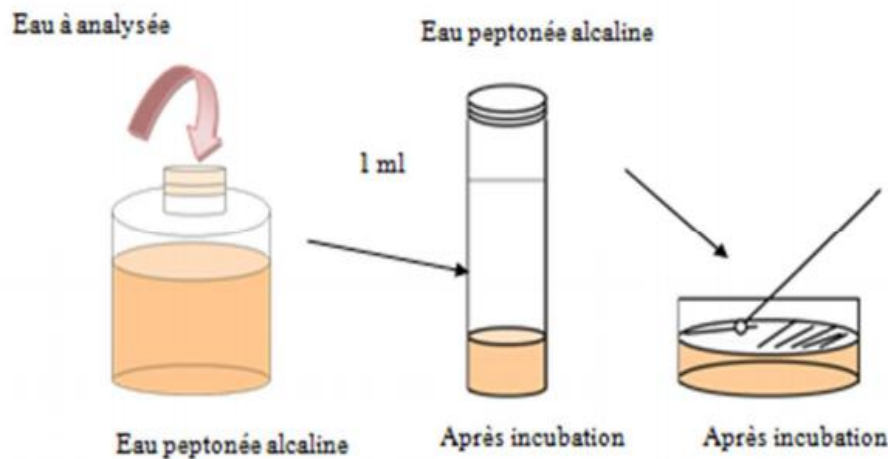


Figure 21 : Recherche des Vibrio par méthode de filtration sur membrane

(Norme ISO / TS 21872-1)

5.2. Identification et isolements d'*Escherichia coli*

En plus de la galerie biochimique effectuée pour identifier *E.coli* nous avons utilisé le milieu CHROMagar pour son isolement. Dans notre expérience nous avons isolés *E. coli* à partir des coliformes du milieu TTC en la cultivant sur le milieu CHROMagar et en effectuant plusieurs tests biochimiques pour confirmer son identification. La figure 22 représente la bactérie *E. Coli* de couleur bleu sur milieu CHROMagar.

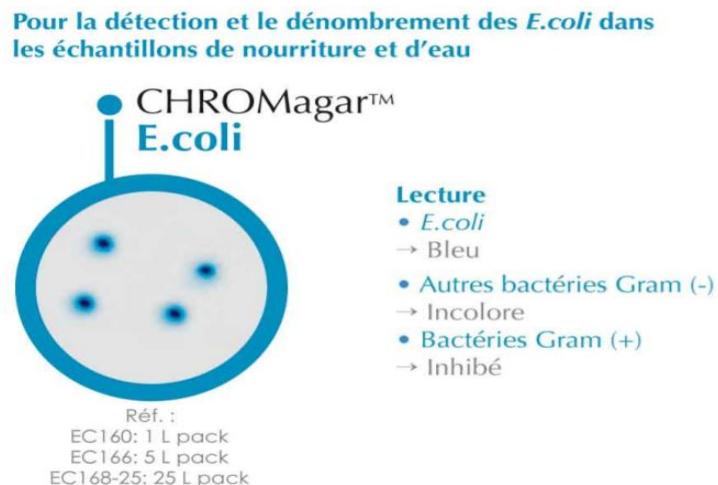


Figure 22 : Schéma correspondant à la recherche d'*E.Coli* sur milieu Chromagar

5.3. Bio détection électrochimique d'*Escherichia Coli*

La détection rapide, fiable et sélective des micro-organismes est très importante dans l'analyse clinique ainsi que dans la surveillance de la qualité des aliments et de l'eau. Dans cette étude, nous abordons la stratégie de la construction d'un immunocapteur pour des applications électrochimiques sensibles et sélectives pour la détection des bactéries uropathogènes *Escherichia Coli* (E. Coli) UTI89 dans des échantillons de l'eau. Nous avons exploité le procédé du dépôt électrophorétique (EPD) pour préparer, dans une manière simple, contrôlable et rentable, des électrodes d'or modifiées avec des couches minces active d'oxyde de graphène réduit / polyéthylèneimine (rGO/PEI). Comme le rGO présente une grande surface et des propriétés électrochimiques favorables, la présence des groupes de NH₂ dans le PEI offre une multitude de possibilités pour la fonctionnalisation de la surface du capteur. Pour atteindre la sélectivité de détection, la surface de l'électrode était modifiée de manière covalente par des anticorps anti-fimbriae d'E. Coli via la formation d'une liaison amide. Pour minimiser l'adsorption non spécifique, l'immunocapteur a été modifié avec des fractions pyrène-polyéthylène glycol (pyrène-PEG) avant l'immobilisation de l'anticorps.

La détection d'E. Coli reposait sur la restriction du transfert d'électrons du milieu redox, dans notre cas le ferrocyanure de potassium, vers le transducteur électrique modifié par rGO/PEI en raison de la formation d'un complexe immunitaire.

Dans un travail récent, une étude a révélé que E. Coli UTI89 est une bactérie uropathogène qui interagit fortement avec la surface modifiée de graphène / polyéthylèneimine (PEI) par des interactions électrostatiques.

Étant donné que ces interactions ne sont pas spécifiques, dans cette étude nous proposons une nouvelle stratégie pour la détection rapide et spécifique de E. Coli uropathogène UTI89 en solution aqueuse et sérique par une lecture électrochimique. La détection sensible et sélective de E. Coli UTI89 est obtenue par fonctionnalisation chimique des groupes -NH₂ du PEI des électrodes d'oxyde de graphène réduit (rGO). Ce dernier est modifié avec des anticorps anti-fimbrial E. Coli avec des unités de pyrène modifiées par le polyéthylène glycol (PEG) afin d'inhiber l'adsorption non-spécifique des bactéries E. Coli sur la surface du capteur. Le changement du pic du courant du couple redox de ferrocyanure de potassium en utilisant la voltammétrie différentielle à impulsions (DPV) a été utilisé pour l'analyse quantitative des solutions contaminées par E. Coli UTI89. Cela dépend du fait que la formation d'un immunocomplexe entre d'anticorps E. Coli anti-fimbrial et E. Coli UTI89

induit une restriction du transfert d'électrons du potassium ferrocyanure au transducteur électrique, qui évolue linéairement avec la concentration de l'E. Coli UTI89. L'immunocapteur conçu peut détecter spécifiquement E. Coli UTI89 à 10 ufc mL^{-1} d'une manière très spécifique même dans l'échantillon de sang et d'urine.

5.3.1. Activation de l'électrode d'Or

Une solution aqueuse GO / PEI a été obtenue en mélangeant GO ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) et PEI ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) dans un rapport volumique de 1/1 tout en agitant pendant 48 h à température ambiante (Figure 23).



Figure 23 : Mélange GO /PEI

Le dépôt électrophorétique (EPD) sur des substrats en verre revêtus d'or préparés par évaporation thermique de 5 nm de titane (couche d'accroche) et de 50 nm d'or sur des lames de verre nettoyées ($76 \times 26 \times 1 \text{ mm}^3$). L'EPD a été réalisée dans une cellule à deux électrodes où les deux électrodes sont placées parallèlement l'une à l'autre et sont séparées d'une distance de 1 cm. Une feuille de platine ($1 \times 2 \text{ cm}^2$) agit comme l'anode et le substrat verre / Ti / Au comme cathode. Le dépôt électrophorétique (EPD) de rGO / PEI (1 mg / ml) se fait en appliquant une tension continue (15 V) pendant 2 min (Figure24).

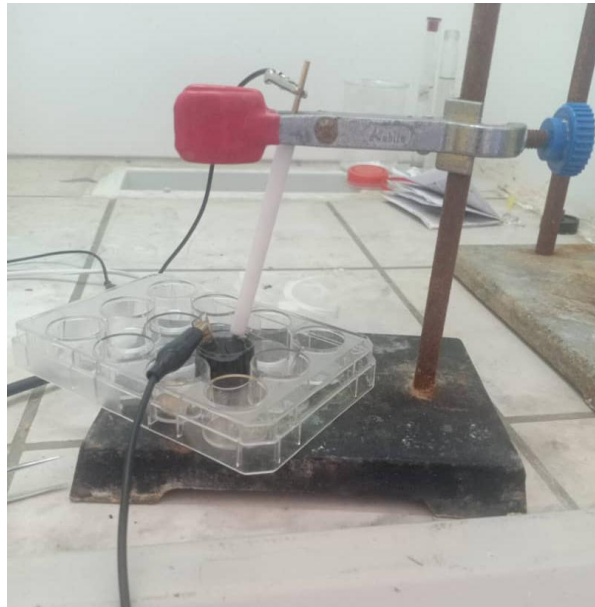


Figure 24 : Dépôt du graphène oxyde par électrophorèse par un générateur

Après dépôt, l'interface est rincée avec de l'eau Milli-Q et séchée à l'air. Nous avons utilisé un générateur pour fonctionnaliser l'électrode de travail (Au) par électrophorèse avec une solution d'oxyde de graphène (GO) qui sera réduit à la surface de l'électrode / rGO.

La Figure 25 présente la stratégie utilisée pour la préparation des électrodes destinées à la détection spécifique d'E. Coli UTI89 par des moyens électrochimiques. La stratégie se base sur la fonctionnalisation d'une électrode en or (Au) par dépôt électrophorétique de rGO / PEI, suivi d'une modification non covalente avec le pyrène-PEG. Par la suite procédé au greffage d'anticorps anti-fimbriae E. Coli UTI89 aux groupes amine de PEI par une liaison covalente.

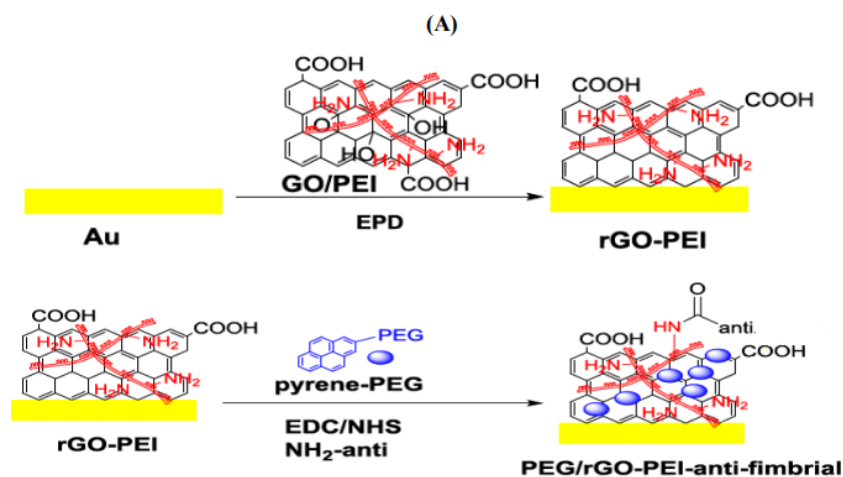


Figure 25 : Différentes étapes utilisées pour la construction de l'immunocapteur pour la détection électrochimique sélective d'E. Coli UTI89

Nous avons opté pour le concept de dépôt électrophorétique (EPD), comme EPD anodique de rGO en utilisant GO comme matière de départ. En outre, EPD est bien adapté pour la fonctionnalisation de différentes surfaces d'électrode pour concevoir des plates-formes de détection. Les solutions aqueuses GO présentent un potentiel zêta négatif ($\zeta = -41,3 \pm 0,8$ mV), ce qui engendre la migration des feuillets d'oxyde de graphène (GO) vers l'anode par l'application d'une tension continue (DC). Pour une réduction plus complète de GO à rGO, un dépôt cathodique EPD et une matrice avec un potentiel zêta positif est nécessaire. Cela peut être obtenu en chargeant GO avec un polymère cationique avec des groupes aminés répétés tels que polyéthylèneimine (PEI). Un mélange 1/1 de GO et de PEI donne des nanofeuillets GO/PEI avec $\zeta = +36,4 \pm 1,3$ mV, étant bien adapté à l'EPD cathodique.

5.3.2. Caractérisation des électrodes fonctionnalisées

Nous avons caractérisé notre électrode fonctionnalisée avec le microscope électronique à balayage et avec de la microscopie Raman.

➤ Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images MEB ont été obtenues à l'aide d'un microscope électronique équipé d'un émetteur d'émission de champ thermique et de trois détecteurs différents.

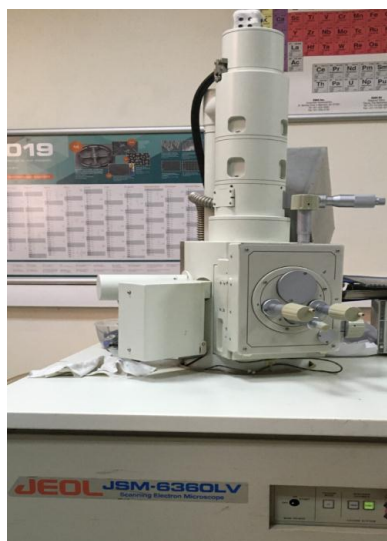


Figure 26 : Microscope Electronique à Balayage (MEB).

• Spectroscopie Raman

Les mesures de spectroscopie micro-Raman ont été effectuées sur Système LAbRam HR Micro-Raman (Horiba Jobin) combiné avec une diode laser de 473 nm comme source

d'excitation. La lumière visible était concentrée par un objectif de 100×. La lumière diffusée a été recueillie par le même objectif en configuration de rétrodiffusion, dispersé par un Monochromateur de longueur focale de 1800 mm et détecté par un CCD (voir figure 27 et 28).

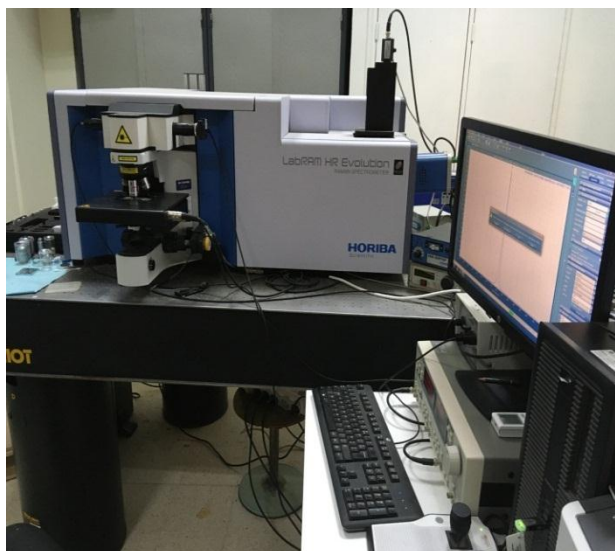


Figure 27 : Spectromètre de micro - Raman



Figure 28 : Analyse de l'électrode d'Or par spectromètre. (RAMAN)

5.3.3. Greffage de l'anticorps et Pyrene-PEG

La liaison covalente d'anticorps anti-fimbriae du lapin sur rGO/PEI fonctionnalisé avec pyrène-PEG a été obtenue par couplage chimique des groupes-NH₂ de PEI avec les fonctions-COOH des anticorps anti-fimbriae E. Coli en utilisant EDC/NHS comme agents de réticulation. Selon une recherche récente, les anticorps anti-fimbriae d'E. Coli uropathogène (O157:H7) ont été obtenus en immunisant des rats avec des fimbriae purifiées. Ces anticorps ont été par la suite délipidés (débarassés des lipides) et purifiés sur une colonne de chromatographie d'affinité HiFliQ Protéine A (CliniSciences) et dilués à 1 mg/ml de concentration dans du tampon citrate de sodium à pH 5,6, puis évalué par la technique ELISA.

Brièvement, l'interface de l'or recouvert de PEG / rGO / PEI a été incubée dans une solution aqueuse de solution d'anticorps anti-fimbriae E. Coli (10 ng ml⁻¹), EDC·HCl (25 mM) et NHS (25 mM) à 4°C pendant 2 h sous agitation. La surface obtenue est lavée soigneusement avec du PBS pour éliminer les anticorps en excès et les réactifs n'ayant pas réagi. La surface fonctionnalisée a ensuite été stockée dans du tampon PBS à 4°C avant utilisation.

5.3.4. Culture bactérienne

Afin de tester la fiabilité et la limite de détection de notre biocapteur nous avons effectuée des dilutions à partir de la bactérie d'intérêt *Escherichia coli* isolé des eaux usées de la STEP de Tizi ouzou. Dans l'avenir nous pouvons utilise directement notre échantillon d'eau usée sans passer par les dilutions. Les dilutions nous on permit de tester la fiabilité et surtout la limite de détection de notre biocapteur.

Nous possédons des colonies d'E.Coli sur un milieu solide (milieu chromagar) à partir de celles-ci on prélève une colonie qu'on ensemence dans un milieu liquide (LB) ce milieu est conçu pour permettre la croissance d'E. Coli. Après on mesure la densité optique qui doit être comprise entre 0,08 et 0,1. La croissance se traduit par l'apparition d'un trouble du milieu.

Chapitre IV

Résultats et Discussion

1. Résultats des analyses bactériologiques

Il faut savoir que la survie des microorganismes est très variable suivant les conditions du milieu récepteur, retenons simplement que la présence des particules en suspension favorise la survie des bactéries et des virus, ainsi que la présence des matières organiques comme source de nutriments.

1.1. Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale

Les résultats obtenus du dénombrement de la flore aérobie mésophile à 22° C et de la flore mésophile à 37° C sur gélose PCA sont illustrés dans le tableau 4 et la figure 29 (voir annexe 2).

Tableau 4 : Résultats du dénombrement des colonies de la flore mésophile a différentes dilutions.

Dilutions / Flores(UFC)	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	N (UFC/ml)
Flore mésophile à 22 ° C (première dilution)	IND	66	14	9	4	5,13.10 ³
Flore mésophile à 37° C (première dilution)	132	52	35	23	14	2,0 .10 ⁴
Flore mésophile à 22 ° C (deuxième dilution)	IND	87	25	13	8	2,2x10 ⁵
Flore mésophile à 37° C (deuxième dilution)	111	49	28	19	11	8,77x10 ²

IND : Indénombrable

N : Nombre d'unité formant colonies (de la flore mésophile) par millilitre de produits initiale

Les résultats enregistrés concernant la flore mésophile à 22° C de la STEP Est de Tizi-Ouzou pour la première dilution et la deuxième dilution sont respectivement de 5,13. 10³ UFC/ml, et de 2,2. 10⁵ UFC/ml.

Les résultats enregistrés concernant la flore mésophile à 37° C de la première dilution et la deuxième dilution sont respectivement de 2,0 .10⁴ UFC/ml et de 8,77x10² UFC/ml.

Nos résultats sont différents de ceux de Hamek et Mokrane (2018), qui ont travaillé sur les eaux de la même station d'épuration et qui ont trouvé que la flore mésophile à 22° C

était indénombrable et la flore mésophile à 37° C était de $2,8 \cdot 10^5$ UFC/ml. Nos résultats se différencient aussi des résultats trouvés par Babou et M'zyene (2018) qui ont travaillé sur les eaux usées extraites dans la même région où elles ont trouvé $3,98 \cdot 10^7$ UFC/ml pour la flore mésophile à 22° C et $4,11 \cdot 10^7$ UFC /ml pour la flore mésophile à 37° C. Cette différence est peut-être due aux facteurs externes liés aux caractéristiques des eaux usées comme le manque flagrant d'eau cette année donc la dotation minimale.

1.2. Coliformes totaux et fécaux

Les résultats obtenus du dénombrement des coliformes fécaux et totaux sur milieu gélosé lactosé au TTC et au tergitol 7 sont illustrés dans le tableau 5 et dans la figure 30 et 31 (Voir annexe 2)

Tableau 5 : Résultat du dénombrement des coliformes fécaux et totaux.

Bactérie	Nombre d'UFC/100ml
Coliformes fécaux	IND
Coliformes totaux	IND

Nous remarquons à partir des résultats de l'analyse bactériologique que les eaux usées sont très chargées en coliformes totaux et fécaux et que leur nombre est non quantifiable. Ces résultats montrent que l'eau qui arrive à la STEP renferme des taux élevés de coliformes fécaux et totaux, ses eaux d'origine domestique riche en matière fécale et en matière organique doivent faire l'objet d'une surveillance sévère surtout dans le cas d'une réutilisation agricole ou autre.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par Oukouni et Achour (2014) qui ont travaillé sur l'évaluation de la qualité physicochimique et bactériologique des eaux usées brutes et épurées de la ville de Ouargla, et qui ont trouvés 150 UFC/100 ml pour les coliformes totaux et 11 UFC/100 ml pour les coliformes fécaux, on remarque que les eaux usées de la STEP de Tizi Ouzou sont trop chargées en coliformes par rapport à la STEP de Ouargla.

En 2019, Khichane et Khouas ont travaillé sur l'évaluation de l'impact bactériologique des rejets de la STEP Est Tizi-Ouzou sur l'ensemble hydraulique récepteur où ils ont trouvés 36 UFC/100 ml pour les coliformes totaux et 32 UFC/100 ml pour les coliformes fécaux. Ces résultats sont différents des nôtres et cette différence peut s'expliquer d'une part par le fait

que le traitement biologique utilisé par la STEP favorise la croissance bactérienne pour dégrader la pollution carbonée ou azotée et d'autre part par l'absence d'un traitement de désinfection qui sert à la destruction de ces germes.

1.3. Entérocoques

Les résultats obtenus du dénombrement des entérocoques sur milieu Slanetz et Bartley sont illustrés dans le tableau 6 et la figure 32 (voir annexe 2).

Tableau 6 : Résultat du dénombrement des entérocoques.

Bactérie	Nombre d'UFC/100ml
Entérocoques	0

Les résultats concernant la recherche des entérocoques dans les eaux usées ont révélé leur absence. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Kaddouri et Mebarki (2020) qui ont travaillé sur l'épuration des eaux usées par filtration sur sable et qui ont mentionné l'absence des entérocoques dans les eaux usées traités par filtration sur sable des bains maures de la ville d'Adrar. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Khichane et Khouas (2019) où ils ont mentionné l'absence totale des entérocoques dans les eaux usées de la STEP de Tizi Ouzou.

Nos résultats différents des résultats obtenus par Eddarba (2011) et qui ont travaillé sur l'évaluation de la contamination bactériologique des eaux usées des stations d'épuration du grand Agadir et qui a trouvé $1,9.10^5$ UFC/100 ml. Cette différence pourrait être imputée au fait que ces stations sont alimentées par des réseaux d'assainissement différents des nôtres et qu'il existe une variabilité temporelle qui est liée aux apports pluviaux et suggèrent que la stratégie d'échantillonnage est cruciale en temps de pluie.

1.4. Clostridium

Les résultats obtenus du dénombrement des clostridiiums sont illustrés dans le tableau 7 et dans la figure 33 (voir annexe 2).

Tableau 7 : Résultat du dénombrement des clostridiiums.

Bactérie	Nombre d'UFC/100ml
Clostridium	5

A partir de nos résultats d'analyse bactériologique nous constatons la présence de 05 colonies de la bactérie Clostridium. Les spores de Clostridium survivent dans l'eau pendant des mois, par conséquent leur présence peut indiquer une pollution fécale éloignée ou intermittente.

En comparant nos résultats avec ceux obtenus par Tfyche (2014) qui a travaillé sur le suivi de la qualité bactériologique et physicochimique des eaux usées de la STEP de Ouargla où il a trouvé dans la première analyse que les spores des clostridiens sulfite- réducteurs sont indénombrables et dans la deuxième analyse, 53 colonies ont été dénombrées. Alors que dans l'étude faite par Babou et M'zyene (2018) elles ont trouvé dans leurs trois analyses que la bactérie Clostridium est indénombrable.

Nos résultats sont inférieurs aux études citées plus haut, notamment Babou et M'zyene (2018) qui ont effectué leur étude dans la même STEP que nous, ainsi nous constatons que le nombre de clostridiens a nettement diminué, en rappelons que les spores de Clostridium servent d'indice de contamination fécale ; mais aussi d'indicateurs d'efficacité de traitement de par leur résistance plus élevée dans l'eau.

1.5. Salmonelles

Les résultats obtenus du dénombrement des salmonelles sur milieu Hektoen sont illustrés dans le tableau 8 et dans la figure 34 (voir annexe 2).

Tableau 8 : Résultat du dénombrement des salmonelles.

Bactérie	Nombre d'UFC/1ml
Salmonelles	99

L'eau est un vecteur reconnu de contamination à la Salmonelle. Les Salmonelles sont présentes dans les eaux usées agricoles et domestiques, les eaux douces, les eaux souterraines, et même dans les eaux de mer. A partir de nos résultats d'analyse bactériologique nous constatons la présence de 99 UFC/ml de Salmonelle dans les eaux usées.

Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Khichane et Khouas (2019) où ils ont mentionné la présence des Salmonelles dans la même STEP (Tizi Ouzou).

Est différent des résultats obtenus par Charabi (2016) qui a travaillé sur les possibilités de réutilisation des eaux épurées et valorisation des boues de la station d'épuration de Boumerdes, où il signale l'absence totale des salmonelles.

Cette différence de résultats peut s'expliquer par :

- Les changements des conditions climatiques qui pourraient augmenter la survie des germes,
- La variation du niveau des eaux entraînant une moindre dilution des eaux usées,
- La répartition des cas cliniques de Salmonelloses surtout dues à des voyageurs revenant de vacances de l'étranger par exemple.

1.6. Staphylocoques

Les résultats obtenus du dénombrement des Staphylocoques sur milieu Chapman sont illustrés dans le tableau 9 et la figure 35 (voir annexe 2).

Tableau 9 : Résultat du dénombrement des staphylocoques

Bactérie	Nombre d'UFC/100 ml
Staphylocoques	35

Les Staphylocoques sont assez répandus dans l'environnement, cependant c'est sur la peau et les muqueuses des animaux qu'on les rencontre le plus souvent, tout comme chez l'homme puisqu'elles font partie de la microflore normale de la peau humaine et se trouve en permanence dans le nasopharynx de 20 à 30 % des adultes.

Les staphylocoques peuvent également être détectés dans les eaux usées, dans les eaux des piscines et des spas et même dans certains approvisionnements en eau de boisson.

Nous avons trouvé 35 UFC/100 ml de *Staphylococcus* dans notre effluent secondaire, nos résultats sont très faibles par rapport aux résultats trouvés par Bekouche (2016) qui a trouvé 10^4 UFC/100 ml de Staphylocoque, dans les eaux usées traitées de la STEP de la ville d'Adrar. Tandis que dans l'étude faite par Bouchelegem et Bouregaa (2015) sur l'évaluation de la qualité des eaux usées après traitement par les différents procédés où elles ont signalé l'absence totale des Staphylocoques dans leur prélèvement fait le 30/03/2015 dans l'eau usée traitée de la ville de Guelma.

1.7. Vibrions

Les résultats obtenus du dénombrement des vibrions sur milieu GNAB sont illustrés dans le tableau 10 et la figure 37 (annexe 2).

Tableau 10 : Résultat du dénombrement des vibrions.

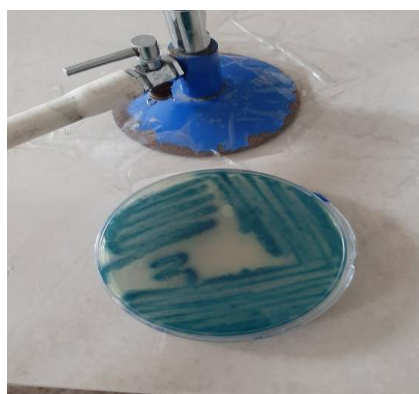
Bactérie	Nombre d'UFC/1ml
Vibrio	IND

Les résultats concernant la recherche des vibrions dans les eaux usées ont révélé la présence de celle-ci et que leurs nombres est non quantifiable. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par El Ouali Lalami et al (2014) dont lesquelles ils ont mentionnés l'absence de ce germe dans la station collectrice des eaux usées (Ben tatou) au Maroc. Il faut noter que les facteurs environnementaux peuvent influencer la survie des vibrions. Les principaux facteurs de stress étudié sont : la lumière solaire, la salinité, la teneur en éléments nutritifs, la température, le pH.

D'après les résultats d'analyses bactériologiques des eaux usées brutes, il apparait également que le traitement biologique utilisé dans la STEP EST de la ville Tizi Ouzou n'est pas efficace pour l'abattement des germes pathogènes. Les résultats obtenus peuvent s'expliquer d'une part par le fait que le traitement biologique utilisé dans la STEP, favorise la croissance bactérienne pour dégrader la pollution carbonée ou azotée, et d'autre part par l'absence d'un traitement de désinfection qui sert à la destruction des germes pathogènes. De plus, l'eau usée est considérée comme un milieu optimal pour la prolifération microbienne (Ounoki & Achour,2014).

1.8. Identification et isolement de la bactérie d'intérêt (*Escherichia coli*)

Après incubation de *E. Coli* sur milieu chromagar à 37° C pendant 24h nous observons des colonies bleues rondes de taille moyenne à grande avec contour régulier (Figure 38), la présence de ce type de colonies nous confirme l'identification d'*E. coli*.

**Figure 38** : Boîte de pétrie correspondant à la recherche de *E. Coli* sur milieu Chromagar.

Afin de confirmer l'identification de notre souche (E. Coli), nous avons réalisé plusieurs tests biochimiques :

- ❖ Pour le test de la catalase nous observons la formation de bulles d'air preuve que la souche est catalase positif (+) comme nous le montre la figure 39.



Figure 39 : Test de la catalase sur la bactérie Escherichia Coli

- ❖ Pour le test d'indole (figure 40), nous observons la formation d'un anneau rouge à la surface du tube signe de la production d'indole.



Figure 40 : Test de l'indole sur la bactérie Escherichia Coli

- ❖ Pour le test d'oxydase (figure 41), le résultat est négatif.

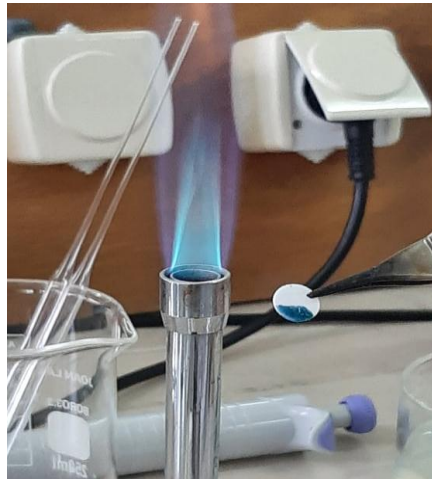


Figure 41 : Réalisation du test de l'oxydase sur la bactérie Escherichia Coli.

- ❖ Pour le test de mannitol mobilité (figure 42), le milieu a viré au jaune (Fermentation du mannitol), donc nous constatons que la souche est mannitol positif, nous remarquons aussi que la bactérie est mobile car elle diffuse à partir de la ligne d'inoculation créant un trouble du milieu.



Figure 42 : Réalisation du test de mannitol mobilité sur la bactérie Escherichia Coli.

2. Résultat et discussions de l'analyse par biocapteur

2.1. Activation de l'électrode

La Figure 43 représente la voltamétrie cyclique de l'électrode d'or avant et après fonctionnalisation avec du G0 /PEI dans $KFe(CN)_6$ (10 mM)/KCL(0.1M), où on remarque l'effet de la fonctionnalisation de l'or par l'oxyde de graphène sur l'amplification du signal et par conséquent le transfert des électrons.

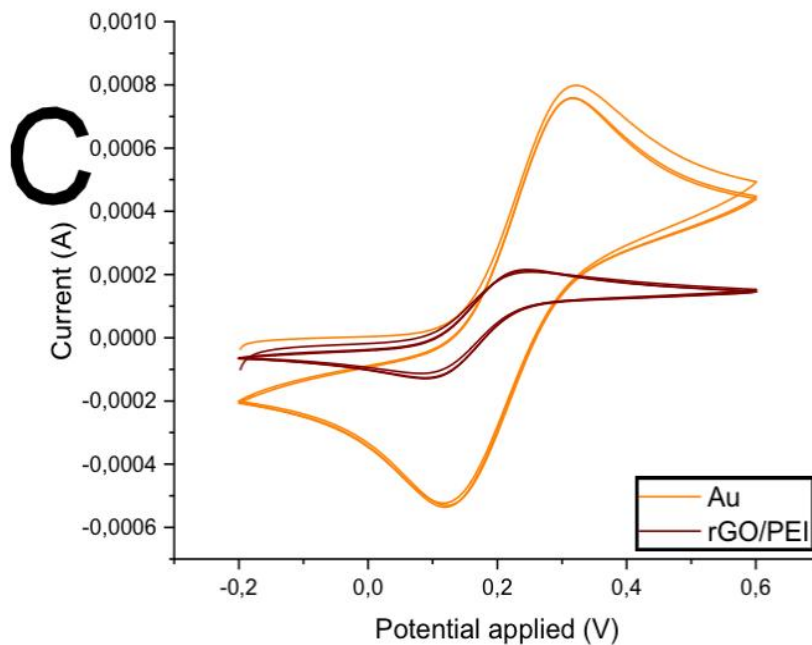


Figure 43 : Voltamétrie cyclique (CV) de l'électrode d'or (AU) avant et après fonctionnalisation avec GO/PEI, avec vitesse de scan 20mVs^{-1}

En orange c'est comant de l'électrode d'or avant la fonctionnalisation qui est de $0,0008(\text{A})$; en rouge la voltamétrie cyclique de l'électrode d'or après fonctionnalisation avec du GO/PEI qui est de $0.0002 (\text{A})$. En comparant les voltammogrammes obtenus pour les différentes étapes de modification de surface, on note des diminutions significatives des pics de courant allant de l'AU (électrode d'or nu), puis vers l'AU-rGO/PEI. Ces résultats suggèrent que les nano feuilles d'oxyde de graphène agissent comme des barrières pour le transfert d'électrons entre la surface de l'électrode et les espèces redox dans la solution. Cette diminution du courant nous confirme que la fonctionnalisation a été bien effectuée.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Sboui, (2016) qui a travaillé sur le développement et l'évaluation des micros-biocapteurs électrochimiques pour l'immuno-détection en temps réel de *Legionella pneumophila* dans les échantillons environnementaux où les voltammogrammes obtenus pour les différentes étapes de modification de surface où il observe aussi des diminutions significatives du courant de l'ITO nu vers l'ITO-GPTMS.

2.2. Caractérisation de l'électrode

2.2.1. Par microscope électronique à balayage (MEB)

La Figure 44 montre la morphologie d'une électrode d'or après revêtement électrophorétique avec rGO/PEI. Lors de l'application de +15 VDC pendant 4 min, l'électrode en or est revêtue d'un film homogène de nanofeuillets rGO/PEI. A partir de cette image nous observons le dépôt électrophorétique qui est constitué de deux produits l'oxyde de graphène réduit (en gris foncé) et le PEI (en gris clair).

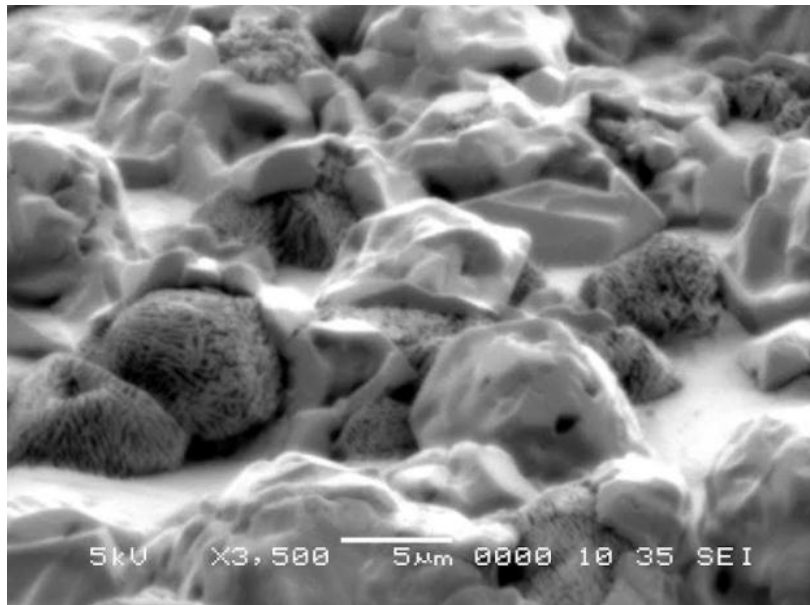


Figure 44 : Imaged'une électrode d'or après revêtement électrophorétique avec rGO/PEI vu sous MEB

2.2.2. Par le Raman

A partir des spectres Raman enregistrés pour les différentes électrodes d'or fonctionnalisées avec GO/PEI (figure 45), nous avons essayé d'attribuer à chaque pic, la vibration nucléaire correspondante, qui nous permettra de prédire la structure des molécules. L'identification se fait à partir de la bibliothèque existante du Raman, mentionnant les bandes vibrationnelles d'absorption entre 400 - 4000 cm^{-1} des principaux groupes fonctionnels.

Analytical Report

Analyst	RAMAN-CDTA
Date	12/07/2023
Report#	Kahlioucha-rGo-PEI(1/1)
Notebook#	naibouda

Pic	Intensité
1335.35	100.00
1594.98	82.74

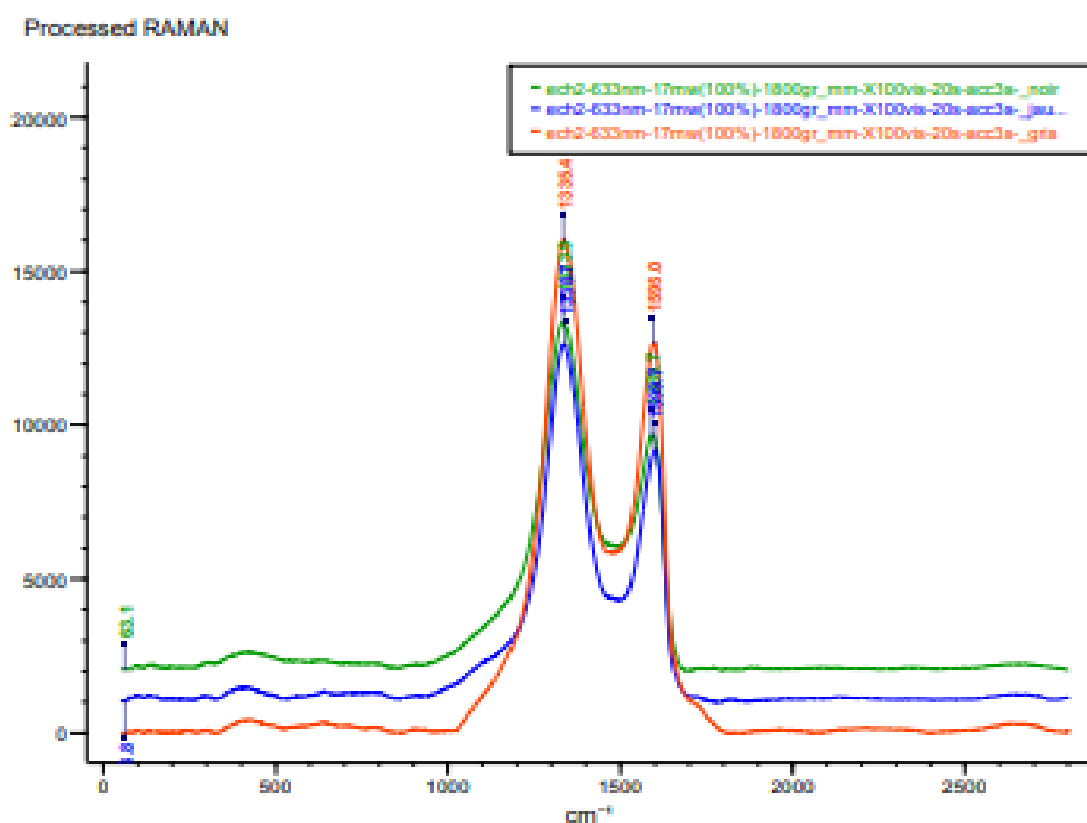


Figure 45 : Spectres des électrodes d'or fonctionnalisés

Nous observons clairement l'existence de deux pics sur l'ensemble des échantillons caractérisant l'électrode d'or aux alentours de 1300 et 1600 cm^{-1} , qui représentent deux formes de carbone : le carbone et le noir d'ivoire, ils sont les principaux précurseurs qui existent dans nos échantillons. En effet les deux pics observés sont enregistrés exactement aux mêmes longueurs d'onde : le premier à 1335,35 cm^{-1} qui correspond à la liaison d'élongation C-NO₂ et le deuxième est situé à 1594,98 cm^{-1} est attribué à la liaison d'élongation C=C du carbone.

2.3. Résultat de la voltampérogramme d'impulsion différentielle

La figure 46 représente les voltampérogrammes d'impulsions différentielles (DPV) de l'électrode d'or avec rGO-PEI puis avec du BSA puis associée avec l'anticorps puis avec une concentration bactérienne mesurées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (5mM)/ PBS (0,1M).

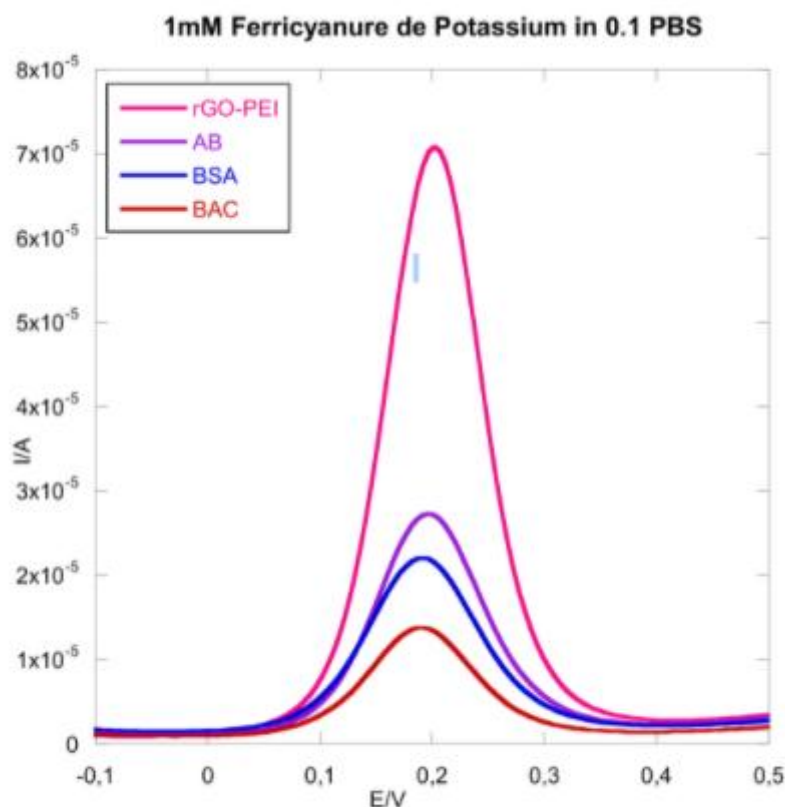


Figure 46 : voltampérogrammes d'impulsions différentielles de l'électrode d'or

Comme présenté dans le voltammogramme (figure 46), le pic du courant était de 7×10^{-5} A pour l'électrode d'or revêtue avec du rGO/PEI et diminue jusqu'à $2,7 \times 10^{-5}$ A avec l'addition de l'anticorps. En revanche, après la fixation des anticorps sur la surface de l'électrode avec du rGO-PEI, le voltammogramme montre une diminution du pic du courant. Cette réduction peut être attribuée à la formation d'une couche d'anticorps, à la surface de l'électrode, qui a légèrement bloqué le transfert d'électrons entre l'électrode et le couple redox et encore avec l'ajout du BSA le courant est de $2,3 \times 10^{-5}$ A, avec la présence de bactéries le courant a atteint $1,3 \times 10^{-5}$ A.

Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par Sboui, 2016 où il note des diminutions significatives des pics de courant allant de l'électrode nue vers l'ITO-GPTMS, puis vers l'ITO-GPTMS-MAb.

La figure 47 (A) représente les voltampérogrammes d'impulsions différentielles (DPV) mesurées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (5mM) / PBS (0,1M) après l'incubation d'E. Coli pendant 30min avec AC-E. Coli (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pour différentes concentrations : 0 ufc/ml (vert), 10^4 ufc/ml (bleu), 10^7 ufc/ml (rouge), 10^9 ufc/ml (gris)

Pour l'échantillon témoin (eau physiologique exempte de bactéries), la valeur du courant était de 1,15 A (I_0), une fois les bactéries UTI89 (10^4 ufc/ml) ajoutées, la réponse électrochimique du système a diminué jusqu'à atteindre 1,120 A (I_c) en raison de la restriction de transfert d'électrons de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ à l'interface électrique. Avec une concentration de 10^7 (ufc/ml) le signal du courant a diminué jusqu'à atteindre 1,09 A, et avec une concentration de 10^9 (ufc/ml) le courant a atteint 0,57A.

La Figure 47 (B) représente sous la forme d'un diagramme à barres le courant oxydatif enregistré après l'incubation d'E. coli pendant 30 min avec AC-E. coli pour différentes concentrations 10^9 (ufc/ml) ; 10^7 (ufc/ml) ; 10^4 (ufc/ml).

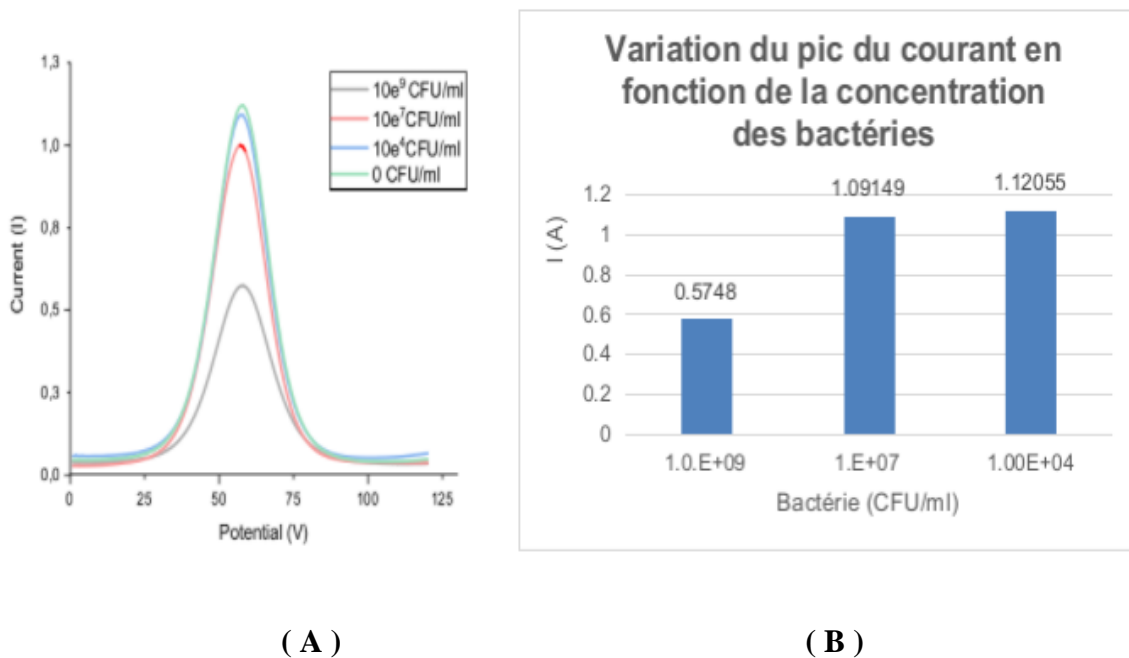


Figure 47 : Voltampérogrammes d'impulsions différentielles (DPV)

Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Kahlouche (2018) où le signal électrochimique observait une diminution du courant avec l'augmentation de la concentration de la bactérie. Le signal électrique de la concentration (10^1 ufc/ml) était de 130 μA et il a diminué jusqu'à 80 μA avec une concentration de (10^2 ufc/ml). D'après ces résultats nous

constatons que le signal électrochimique diminue avec l'augmentation de la concentration des bactéries.

Tandis que dans les travaux fait par Sboui, (2016) où il a exposé les électrodes modifiées par l'anticorps à des concentrations croissantes de bactérie et où il a représenté le diagramme de Nyquist des spectres d'impédance électrochimique après l'immobilisation des anticorps (ITO-APTES-MAb) et après l'ajout de concentrations différentes de *Légionella* (10^1 UFC/ml, 10^2 UFC/ml, 10^3 UFC/ml, 10^4 UFC/ml et 10^5 UFC/ml) où on observe une diminution du spectre d'impédance électrochimique avec l'augmentation de la concentration bactérienne. Le diamètre de diagramme de Nyquist montre la résistance de transfert de charge de la sonde redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, augmente progressivement avec l'augmentation des concentrations de *L. pneumophila* dans les échantillons. Ces résultats permettent de suggérer la création d'une couche des bactéries qui se fixent sur leur anticorps monoclonal spécifique. Cette couche inhibe l'accès à la surface conductrice aux espèces de la sonde redox. Ainsi la résistance de transfert de charge entre la sonde en solution et l'électrode augmente.

Dans le travail de Ben Aissi, 2020 sur l'élaboration de plateformes nanométriques pour la détection dans le domaine agroalimentaire et environnemental d'aflatoxine à différentes concentrations, allant de 10 fM à 500 fM, elle a trouvé que la bio détection de la cible a fait diminuer progressivement les signaux Nyquist de capacitance électrochimique redox, la formation du complexe aptamère-AFM1235 a induit ainsi à une perturbation électronique au sein du film de bio-reconnaissance, ce qui provoque une altération de la densité des charges.

Duplon (2011) a travaillé sur la conception d'un biocapteur basé sur la photoluminescence de microorganismes et a étudié une nouvelle méthode de détection d'*E. Coli* en utilisant l'émission de la photoluminescence de microstructures. La charge électrique négative des bactéries immobilisées à la surface de microstructures fonctionnalisées par anticorps contribué à l'augmentation des émissions de la photoluminescence. Les échantillons sont exposés à différentes concentrations de bactéries ont permis de suivre la dynamique de l'immobilisation des bactéries observée sur une période de plusieurs heures. Les résultats indiquent que la méthode étudiée permet la détection d'*E. Coli* à 10^4 UFC/ml en moins de 120 min le signal de la photoluminescence augmente avec le temps ; compatible avec l'augmentation attendue de la concentration de charge électrique négative délivrée par les bactéries immobilisées.

Conclusion

Conclusion

L'eau usée est chargée de différents polluants (chimique, biologique et organique) qui constituent un impact non négligeable sur l'environnement dans son ensemble et les ressources en eau douce superficielle et souterraine, l'objectif de ce travail est de faire une analyse microbiologique au laboratoire, et ensuite tester le biocapteur afin de pouvoir envisager son usage dans différents échantillons, pour détecter différentes bactéries ou même des produits chimiques et toxiques.

Dans notre étude nous avons comparé la méthode traditionnelle d'analyse sur milieux de cultures et le biocapteur afin de détecter la présence de la bactérie *Escherichia Coli* dans les eaux usées, et surtout tester la fiabilité et la limite de détection du biocapteur.

Dans un premier temps nous avons réalisé une analyse bactériologique des eaux usées de la STEP de Tizi ouzou qui consiste à la recherche des germes revivifiables, des coliformes, des entérocoques, des staphylocoques, des clostridium, des salmonelles et des vibrions et principalement l'isolement de la bactérie *Escherichia coli*. Pour l'analyse bactériologique des eaux usées de la STEP de Tizi-Ouzou nous avons trouvé les résultats suivants :

- Pour la flore mésophile à 22° : $5,13 \cdot 10^3$ ufc/ml
- Pour la flore mésophile à 37° : $2,0 \cdot 10^4$ ufc/ml
- Pour les entérocoques : 0 ufc/100ml
- Pour les salmonelles : 99 ufc/ml
- Pour les staphylocoques : 35 ufc/100 ml,
- Pour les clostridium : 5 ufc/ml
- Et pour les coliformes et vibrions nous avons trouvé un résultat indénombrable.

Nous avons ensuite identifié, isolé et effectué des dilutions décimales de la bactérie *Escherichia coli* afin de les utiliser pour tester la fiabilité et la limite de détection du biocapteur.

L'objectif de la méthode d'analyse par biocapteur est l'immuno-détection électrochimique d'*Escherichia coli* dans différentes dilutions, notre biocapteur est constitué d'électrodes d'or qu'on a d'abord modifiées avec du GO/PEI, nous avons exploité le procédé du dépôt électrophorétique (EPD) pour préparer dans une manière simple, contrôlable et rentable, des électrodes d'or modifiées. Comme le rGO présente une grande surface et des propriétés électrochimiques favorables, la présence des groupes de NH_2 dans le PEI offre une multitude

Conclusion

de possibilités pour la fonctionnalisation de la surface du capteur. Ensuite on a procédé à la caractérisation des électrodes modifiées par la spectroscopie raman et avec la microscopie électronique à balayage.

L'étape suivante était consacrée à l'immobilisation des molécules d'anticorps polyclonal d'E. Coli. Nos résultats sont exprimés par un signal électrochimique où la diminution de ce dernier signifie une augmentation de la concentration de bactéries. Pour l'échantillon témoin (eau physiologique exempte de bactéries), la valeur du courant était de 1,15A (I₀), une fois les bactéries UTI89 (10⁴ ufc/ml) ajoutées, la réponse électrochimique du système a diminué jusqu'à 1,120 A(I_c) en raison de la restriction de transfert d'électrons de [Fe(CN)₆]⁴⁻ à l'interface électrique. Avec une concentration de 10⁷ (ufc/ml) le signal du courant a diminué jusqu'à 1,09 A et encore avec une concentration de 10⁹ (ufc/ml) le courant a atteint 0,57A.

L'isolement de *Escherichia coli* au laboratoire avec la méthode traditionnelle des milieux de culture, nous a pris plus de 48 h et cela avec plusieurs contraintes de manipulations de savoir-faire et surtout une certaine rigueur afin de ne pas contaminer nos échantillons et à chaque fois faut s'assurer de l'identification de la bactérie avec plusieurs tests. Avec la méthode du biocapteur, en 30 min on a pu avoir nos résultats en utilisant une électrode modifiée pour la détection spécifique de la bactérie E. Coli par un anticorps polyclonal AC-E. Coli.

Le biocapteur nous a permis d'avoir un gain de temps non négligeable, et une spécificité qui permet d'éviter toute les étapes faites au laboratoire dans des conditions strictes.

Notre étude ouvre l'intérêt à poursuivre d'autres tests avec différents paramètres afin de déterminer une stratégie efficace et optimale pour les biocapteurs à savoir :

- Détecter différentes bactéries en utilisant d'autres anticorps spécifiques.
- Utiliser d'autres échantillons comme les boissons, les urines, le sang, et tout liquide biologique.
- Détecter des produits chimiques toxiques, des métaux lourds, ... etc.
- Utiliser d'autres électrodes : de platine, d'argents.
- Utiliser d'autres produits d'activation des électrodes.

Référence bibliographique

Référence bibliographique

Adjahouinou D., Yehouenou B., Liady M., Didier F., 2014. Caractérisation bactériologique des eaux résiduaires brutes de la ville de Cotonou (Bénin), *Journal of Applied Biosciences* 78:6705 – 6713

Aissaoui M., Tlidjane E., 2020. Quelle culture choisir et pour quel système d’irrigation doit on opter s’il s’agit des eaux usées épurées ? Mémoire de fin d’étude Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

Allalgua A., Ayari A., Boutmedjet S., Znati N., Kaouachi N., Boualleg C., 2014. Caractérisation physico-chimique et bactériologiques des eaux brutes et potables du Barrage Ain Dalia (Souk- Ahras). 1er Séminaire National sur la Santé et Bio-Surveillance des Ecosystèmes Aquatiques, Souk Ahras, Algeria

Amiri K., Bekkari N., Débbakh A., Benmalek A., Bouchahm N., 2016. Caractérisation des eaux usées des rejets domestiques de la ville de Touggourt (Algérie). Centre de recherche scientifique et technique sur les régions arides (CRSTRA), Algérie. *Journal Algérien des Régions Arides (JARA)*

Avril J., Denis F., Dabernat H., Monteil H., 2000. *Bactériologie clinique*. 2^{ème} édition Marketing, paris. Pages 148-280.

Ayela C., 2007. Micromembranes résonantes à actionnement et détection piézoélectriques intégrés pour la détection de molécules biologiques en temps réel. Thèse de doctorat. Université Toulouse III – PAUL SABATIER

Babou L., M’zyene N., 2018. Suivi des paramètres physico-chimiques et biologiques des eaux brutes et traitées de la STEP Est de Tizi-Ouzou ; MEMOIRE Présenté en vue d’obtention d’un diplôme de Master, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Balière C., 2017. *Les Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l’environnement littoral : cas des STEC et des EPEC THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Banouh M., Djenane S., 2017. Caractérisation des sous-produits de l’épuration pour une éventuelle valorisation. Mémoire de Master en génie hydraulique. Option génie hydrotechniques, Université de Bouira

Baumont S Camard J Lefranc A Franconi A., 2004. Réutilisation des eaux usées : risques sanitaires et faisabilité en ile de France. Rapport ORS, 220p

Référence bibliographique

Bekouche H., Belnasra O., Boulahya K., 2016.Traitement microbiologique des eaux usées de la ville d'Adrar par les grains de Moringa Oléifèra. MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN CHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT A L'UNIVERSITE D'ADRAR.

Belahmadi M., 2011. Etude de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote des effluents d'entrée et de sortie de la station d'épuration des eaux usées d'ibn ziad, MEMOIRE DE FIN DE CYCLE UNIVERSITE DE MENTOURI CONSTANTINE

Ben Aissa S., 2020.Élaboration de plateformes nanométriques pour la détection dans le domaine agroalimentaire et environnemental. Thèse de doctorat en cotutelle pour obtenir le grade de DOCTEUR.UNIVERSITE DE TUNIS EL MANAR & UNIVERSITE DE PERPIGNAN VIA DOMITIA.

Benneni H., Bouarissa B., 2020. Epuration des eaux usées, analyse et synthèse des données scientifiques. Cas de la station d'épuration des eaux de la wilaya de Bordj Bou Arreridj : Prospection, évaluation du rendement épuratif. Mémoire de Master, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

Bouanane Y., Boulhart N., 2020. Etude de l'efficacité du traitement des eaux usées de la station d'épuration de Sidi Merouane (Mila). Projet de Fin d'Etude préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master Spécialité : Hydraulique Urbaine. Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf –Mila.

Boucheleghem A., Bouregaa M., 2015.Evaluation de la qualité des eaux usées (Wilaya de Guelma) après traitement par les différents procédés (Station d'épuration, Nanoparticules et les lentilles d'eaux). Mémoire de Master, université de Guelma.

Boukary S., 2018.Traitement des eaux usées industrielles par des procédés membranaires sous climat sahélien : cas des eaux usées de brasserie au Burkina Faso. THÈSE EN COTUTELLE Pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'INSTITUT INTERNATIONAL D'INGENIERIE DE L'EAU ET DE L'ENVIRONNEMENT.

Boumansour N., Smahi D., 2020. Étude des performances épuratoires de la station d'épuration des eaux uséesMEMOIRE DE FIN DE CYCLE Université A. MIRA – BEJAIA

Bounoua C., Meziti K., Sahli R., 2017. Analyses physico-chimiques des eaux usées au niveau de la station d'épuration de la wilaya de Bordj Bou Arreridj (Comparaison avec les

Référence bibliographique

normes algériennes et l'OMS) Mémoire de fin d'étude Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.

Butler J., 2000. Solid Supports in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Other Solid-Phase Immunoassays. *Methods*, 22(1), 4–23. <http://doi.org/10.1006/meth.2000.1031>

Charabi M., 2016. Possibilités de réutilisation des eaux épurées et valorisation des boues de la station d'épuration de BOUMERDES W.BOUMERDES. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme de Master en Hydraulique. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Choinière S., 2017. Comparaison de différentes stratégies de capture d'*Escherichia coli* sur des surfaces afin d'être appliquées aux biocapteurs, Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en Microbiologie.

Derbane R., Aider C., 2020. Suivi parasitologique des eaux usées traitées de la STEP Est de Tizi_Ouzou. Mémoire de fin d'étude Université Mouloud Mammeri

Diallo A., 2013, *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans les effluents d'origine humaine et animale : Prévalence et caractérisation avant et après traitement épuratoire THESE En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE.

Duplan L., 2011. Conception d'un biocapteur basé sur la photoluminescence du GAAS(001) pour la détection de micro organismes .Mémoire de maîtrise en nanobiotechnologies. Université de Sherbrooke.

Dupont., 2005. Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire, Tech. Ing. Agroaliment.

Eddarba R., 2011. Evaluation de la contamination bactériologique des eaux usées des stations d'épuration du grand Agadir : isolement, caractérisation moléculaire et antibiorésistance des espèces du genre *Vibrio*. Thèse en cotutelle pour obtention du grade de docteur. UNIVERSITE IBN ZOHR FACULTE DES SCIENCES D'AGADIR ET UNIVERSITE DE STRASBOURG.

El Alami El Hassani N., 2019. Conception et Réalisation de Capteurs et de Biocapteurs Electrochimiques à Base de Nanomatériaux pour le Contrôle de la Qualité en Agroalimentaire

Référence bibliographique

et pour l'Analyse Biomédicale, THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON opérée au sein de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

El Attiffi El Ouadrassi A., 2011. La qualité microbiologique des eaux de baignade. Thèse de doctorat. Université Mohammed V Faculté de médecine et de pharmacie -RABAT

El Ouali Lalami A., Zanibou A., Bekhti K., Zerrouq F., Merzouki M., 2014. Contrôle de la qualité microbiologique des eaux usées domestiques et industrielles de la ville de Fès au Maroc (Microbiological Control wastewater domestic and industrial city of Fes Morocco). J. Mater. Environ. Sci. 5 (S1) (2014) 2325-2332.

Essayagh M., et al., 2020. Profil épidémiologique de la fièvre typhoïde, Meknés, 2013–2016. Rev Epidemiol Sante Publique.

Fedio W., Jinneman K., Yoshitomi K., Zapata R., Wendakoon C., Browning P., & Weagant S., 2011. Detection of E. coli O157:H7 in raw ground beef by 133 Pathatrix??? immunomagnetic-separation, real-time PCR and cultural methods. International Journal of Food Microbiology, 148(2), 87–92.

Goita A., 2014. Les bactéries pathogènes d'origine hydrique de l'épidémiologie à la prévention, Thèse de doctorat ; UNIVERSITE MOHAMED V –SOUISSI FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE-RABAT

Guedri H., 2010. Mise au point de biocapteurs basés sur la mesure d'activités enzymatiques de cellules algales pour la surveillance des milieux aquatiques. Thèse de doctorat. L'institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

Habbi T., Hadda T., 2019. Normalisation du rejet urbain brut de la STEP Ouest de la ville de Tizi-Ouzou. MEMOIRE DE FIN DE CYCLE UNIVERSITE DE MOULOD MAMMERI TIZI OUZOU

Hamek R., Mokrane F., 2018. Evaluation de la qualité des eaux usées brutes et épurées de la ville de Tizi-Ouzou : Analyse Physicochimique, Bactériologique, Parasitaire et Antibiorésistance. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master en science de la nature et de la vie. Université de Mouloud Mammeri Tizi-ouzou.

HOLZAPFEL M., 2018. De l'épidémiologie moléculaire aux analyses fonctionnelles de Brucella chez les ruminants, une approche intégrée pour l'identification et l'étude de la

Référence bibliographique

diversité phénotypique d'un genre génétiquement homogène 2018 Thèse de doctorat
UNIVERSITÉ PARIS-EST

ISO 16654., 2001. Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour la recherche des *Escherichia coli* O157.

Kaddouri I., Mebarki F., 2020. Epuration des eaux usées par filtration sur sable (cas des bains maures à Adrar ville).MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN CHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT.UNIVERSITE AHMED DRAIA ADRAR

Kahlouche K., 2018. Microsystème pour la nanomédecine : application aux maladies nosocomiales et à la détection des agents pathogènes. Thèse de doctorat. Ecole doctorale science pour l'ingénieur et microtechniques. Université Bourgogne Franche-Comté (UFBC)

Kavya S., 2015. PCR Technique with its Application. Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology, 4(1), 1–12. Retrieved from <https://www.rroj.com/open-access/pcr-technique-with-itsapplication.php?aid=54526>

Kendouci M., Kharroubi B., Maazouzi A., Bendida A., 2013. Study of physic-chemical quality of wastewater discharged into the natural environment the case of Bechar River Algeria, Energy Procedia.

KENGNE - MOMO Rosine Pélagie., 2011.Mise en œuvre des surfaces spécifiques en vue de la détection de bactéries pathogènes par diffusion Raman. Thèse Pour obtenir les grades de Docteur /PhD en Chimie Organique de l'Université de Yaoundé I et Docteur en Physique de Université du Maine. COTUTELLE INTERNATIONALE UNIVERSITE DE YAOUNDE I - UNIVERSITE DU MAINE.

Kermad A., 2014.Étude et réalisation d'un biocapteur à base de silicium structuré (Électro) chimiquement. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat En Physique Energétique et Matériaux. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

KERN-BENAIBOUT E., 2006. *Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour l'Homme : Synthèse bibliographique sur le portage par les animaux domestiques et la transmission à l'Homme par la contamination de l'environnement. THESE pour obtenir le grade de DOCTEUR VETERINAIRE DIPLOME D'ETAT. L'Université Paul-Sabatier de Toulouse.

Référence bibliographique

Khaoulani S., 2015. Traitement d'eaux usées par adsorption sur des polymères de cyclodextrine et développement de capteurs chimiques à base de membranes de verres de chalcogénures destinées à la détection des ions Hg^{2+} . THESE DE DOCTORAT Présentée à l'Université du Littoral Côte d'Opale.

Khichane S., Khouas D., 2019. Evaluation de l'impact bactériologique des rejets de la STEP Est Tizi-Ouzou sur l'ensemble hydraulique récepteur (Oued, Nappe, Forage et réseaux de distribution). Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master en science biologiques. Université de Mouloud Mammeri Tizi-ouzou.

King L., Loukiadis E., Mariani-Kurkdjian P., Haeghebaert S., Weill F., Baliere C., Ganet S., Gouali M., Vaillant V., Pihier N., Callon H., Novo R., Gaillot O., Thevenot-Sergentet D., Bingen E., Chaud F., and Valk h., 2014. Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. *Clinical Microbiology and Infection*. 20 (12):O1136-1144

Koffi A., 2015. Evaluation de la sécurité sanitaire à salmonella dans la filière avicole et de l'implication de souches aviaires dans les diarrhées humaines à ABIDJAN, COTE D'IVOIRE. Thèse de doctorat UNIVERSITE NANGUI ABROGOUA

Marrakchi M., 2006. Développement et optimisation de biocapteurs à base de biomolécules et de micro-organismes sur microélectrodes interdigitées. Thèse de doctorat. Ecole Centrale de Lyon, école Doctorale Chimie, procédés, Environnement.

Mehrotra P., 2016. Biosensors and their applications - A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(2), 153–159. <http://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.002>

Merah A., 2019. Etude de la qualité physico-chimique et microbiologique de l'eau des puits de la région EL HASSIANE. MEMOIRE DE FIN D'ETUDE UNIVERSITE DE MOSTAGANEM

Metahri M., 2012. Elimination simultanée de la pollution azoté et phosphaté des eaux usées traités, par des procédés mixtes cas de la STEP est de la ville de Tizi-Ouzou. THESE DE DOCTORAT UNIVERSITE MOULOU MAMMARI TIZI OUZOU

Metcalf E., Eddy H., 1991. Wastewater engineering treatment disposal re-use. New York: Metcalf and Eddy; Wastewater Engineering, 3rd Edition.

Référence bibliographique

Mezerdi D., 2019. Analyses Physicochimique des ressources en eau de surface Réception d'effluents d'eaux usées courants à BISKRA Etude comparative entre oued Biskra et Zemor. MÉMOIRE DE MASTER. Université Mohamed Khider de Biskra

Montrose A., 2013.Développement d'un immunocapteur impédimétrique pour la détection et la quantification d'une sous- population cellulaire : Application au diagnostic précoce des infections. Thèse de doctorat Université Toulouse III

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., & Erlich H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51 Pt 1, 263–273.

Nicolas X., Granier H., et Le Guen P., 2007. Shigellose ou dysenterie bacillaire. La Presse Médicale, 36(11), 1606–1618. doi:10.1016/j.lpm.2007.03.001

OMS., 2004. Directive de qualité pour l'eau de boisson : Vol2 : critères d'hygiène et documentation à l'appui. Genève, p : 1050.

Ounoki S., Achour S., 2014. Evaluation de la qualité physicochimique et bactériologique des eaux usées brutes et épurées de la ville d'Ouargla. Possibilité de leur valorisation en irrigation Larhyss Journal, ISSN 1112-3680, n°20, Décembre 2014 .Laboratoire de Recherche en Hydraulique Souterraine et de Surface, université de Biskra. Département de génie civil et d'hydraulique, faculté des sciences appliquées, Université Kasdi Merbeh Ouargla.

Palomar Q., 2017. Intégration de matériaux nanostructurés dans la conception et la réalisation de biocapteurs sans marquage pour la détection de cibles d'intérêt. Thèse de doctorat. Université de Grenoble Alpes.

Rajendran R., & Rayman G., 2014. Point-of-care blood glucose testing for diabetes care in hospitalized patients: an evidence-based review. Journal of Diabetes Science and Technology, 8(6), 1081–90. <http://doi.org/10.1177/1932296814538940>

Ramade F., 2000.Dictionnaire encyclopédique des pollutions. Ediscience international, Paris, p 689.

RECORD., 2018. Les biocapteurs analytiques destinés à un usage environnemental : définition, place au sein des autres méthodes analytiques et perspectives d'usages, 115 p, n°16-0152/1A

Référence bibliographique

Rejsek F., 2002. Analyse de l'eau, aspect réglementaire et technique, Edition CRDP, Aquitaine, d'aménagement et d'urbanisme de la région Ile-de-France.

Rey J., 2018. Maladies bactériennes et virales d'origine hydrique THESE DE DORCTORAT UNIVERSITE DE GRENOBLE ALPES

Sbai A., Amira A., 2015. Caractérisation des eaux usées industrielles de la raffinerie de SBAA ADRAR (Doctoral dissertation, Université Ahmed Draïa-Adrar).

Sboui D., 2016.Développement et évaluation d'un micro-biocapteur électrochimique pour l'immuno-détection en temps réel de Legionella pneumophila dans les échantillons environnementaux.THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE ENTRE L'UNIVERSITE DE LYON & L'UNIVERSITE DE MONASTIR

Shih C., Chang C., Hsu M., Lin J., Kuan C., Wang H., ... Cheng C., (2015). Paper-based ELISA to rapidly detect Escherichia coli. Talanta, 145, 2–5.
<http://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.051>

Sikora A., Wójtowicz-Bobin M., Koziol-Montewka M., Magryś A., et I Gładysz., 2015. Prevalence of Legionella pneumophila in water distribution systems in hospitals and public buildings of the Lublin region of eastern Poland, Ann. Agric. Environ. Med. 22, 195–201,
<https://doi.org/10.5604/12321966.1152064>.

Tarbague K., 2011. Étude et mise au point d'une plateforme de biodéttection de micro-organismes couplant immunocapteur à ondes de love et dispositifs PDMS microfluides, THÈSE Présentée à L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1 ÉCOLE DOCTORALE DE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR.

Tfyeche L., 2014. Suivi de la qualité physico-chimique et bactériologique des eaux usées de Ouargla au cours de leur traitement. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master en hydraulique.UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA.

Thermo Fisher Scientific (n.d.-a), 2017. Overview of ELISA. Retrieved October 2, 2017, from <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/protein-biology/proteinbiology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-proteinmethods/overview-elisa.html#2>

Thermo Fisher Scientific (n.d.-b), 2005. Biosystems, Essentials of real time PCR about sequence detection chemistries TaqMan Chemistry, (ReVision 1–8,2005.
<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/nucleic-acid->

Référence bibliographique

[amplification-expression-profiling/pdfs.par.65119.file.dat/essentials%20of%20real%20time%20pcr.pdf](#)

Thévenot D., Toth K., Durst R., Wilson G., 2001, Electrochemical biosensors:recommended definitions and classification, *Biosens. Bioelectron* 16 (2001) 121–131.

Tourab H., 2013. Mémoire de fin Contribution à l'étude de la qualité physicochimique et bactériologique des eaux souterraines dans la plaine du Haouz, Université des Sciences et Techniques Cadi Ayyad, FST Marrakech (Maroc).

Tuon F., Gondolfo R., Cerchiari N., 2017. Transmission interhumaine de Brucella - une revue systématique. *Médecine tropicale et santé internationale*, 22 (5), 539-546. doi: 10.1111/tmi.12856

UN WATER., 2017. Rapport mondial des Nations Unies sur la mise en valeur des ressources en eau 2017. Place de Fontenoy, 75352 Paris 07-SP.

Vingataramin L., Frost E., 2015. A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. *BioTechniques*, 58, 120–125. <http://doi.org/10.2144/000114263>

Annexes

Annexe 01 :



FICHE TECHNIQUE BACTERIOLOGIE

Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique
Association déclarée à la Préfecture de la Haute-Garonne le 30 Octobre 1973
et enregistrée sous le n° W313002633
CTCB - 33 route de Bayonne - 31300 TOULOUSE
☎ : 05 34 51 49 80 – Fax : 01 57 67 25 90
Email : secretariat@ctcb.com – site Internet : www.ctcb.com
Siret : 428 789 853 000 28 – APE : 8559A

FICHE TECHNIQUE : *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae.

E. coli est l'espèce type du genre *Escherichia*.

HABITAT

E. coli fait partie de la flore digestive de l'homme et des animaux. C'est l'espèce prédominante de la flore fécale humaine aéro-anaérobie.

Sa présence dans l'eau est un indice de contamination fécale.

POUVOIR PATHOGENE CHEZ L'HOMME

Bactérie ayant de nombreux facteurs de pathogénicité.

- Infection intestinale :
 - EPEC = autrefois
 - ETEC = entérotoxique, turista
 - EIEC = entéro-invasif, identique à Shigellose
 - EHEC = entérohémorragique, diarrhées sanglantes, anémie hémolytique, thrombocytopenie et insuffisance rénale : SHU (O157 H7)
 - EAggEC = entéro-agrégatif
 - DAEC = *E. coli* à adhésion diffuse.
- Infection urinaire : 80 % des infections urinaires primitives.
- Suppuration à point de départ intestinal : pus appendicite, péritonite, cholécystite.....
- Septicémie :
 1. après une infection urinaire ou digestive
 2. après « translocation intestinale » chez le sujet neutropénique.
- Méningite néo-natale : *E. coli* K1
- Autres infections : pulmonaire, ostéo-articulaire

ECHANTILLONS

Les urines, les selles, le sang, les pus sont les prélèvements principaux où *E.coli* peut être retrouvé.

CARACTERES BACTERIOLOGIQUES

- **Caractères morphologiques** : Bacilles mobiles le plus souvent, à Gram -.

- **Caractères culturels** :

Aéro-anaérobies facultatifs

Culture facile sur milieux ordinaires, lactosés.

Sur milieux solides après 18-24h les colonies sont arrondies, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre.

Pousse sur milieux sélectifs pour entérobactéries type Mac Conkey, Drigalski.

Annexes

- Caractères enzymatiques et biochimiques :

Oxydase -, catalase +.

Caractères d'une Entérobactérie

Glucose +, nitratase +

Caractères de *E. coli*

Gaz en glucose, lactose +, ONPG +, H₂S -, mannitol +, sorbitol + (le plus souvent sauf souches de ECEH, mais pas toutes), indole +, citrate -, VP -, urée -, TDA ou APP -, gélatine -, malonate -, inositol -, adonitol -. LDC variable (90% +), ODC variable, ADH -.

DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

* avec autres espèces du genre *Escherichia*.

* avec les *Shigella* : sont toujours LDC – et acétate -. Il existe des sérums agglutinants.

SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

E. coli sont naturellement sensibles aux antibiotiques actifs sur les bacilles à Gram -.

1- β -lactamines :

E. coli est classé dans le groupe 1. La résistance acquise résulte de l'évolution vers l'acquisition de pénicillinases, de céphalosporinases.

Acquisition d'une carbapénémase : exceptionnellement des souches d'*E. coli* peuvent acquérir une carbapénémase.

Les nouvelles recommandations dans les infections urinaires simples montrent l'intérêt du pivmécillinam par la réévaluation du taux de sensibilité de *E. coli* (<20%)

2- Aminosides :

E. coli est naturellement sensible aux aminosides.

Les variants à petites colonies sont souvent résistants aux aminosides.

3- Fluoroquinolones :

Les quinolones sont actives sur *E. coli*.

Le mécanisme de résistance acquise résulte le plus fréquemment d'une modification de cible.

Repérer si la souche a un profil sauvage ou de résistance acquise : les entérobactéries de profil sauvage sont S à l'acide nalidixique.

4-autres :

Taux de sensibilité fort et stable pour fosfomycine-trométanol et nitrofurantoïne.

Dr. Danielle CLAVE
Expert biologiste -Bactériologie
CHU TOULOUSE

Annexe 02

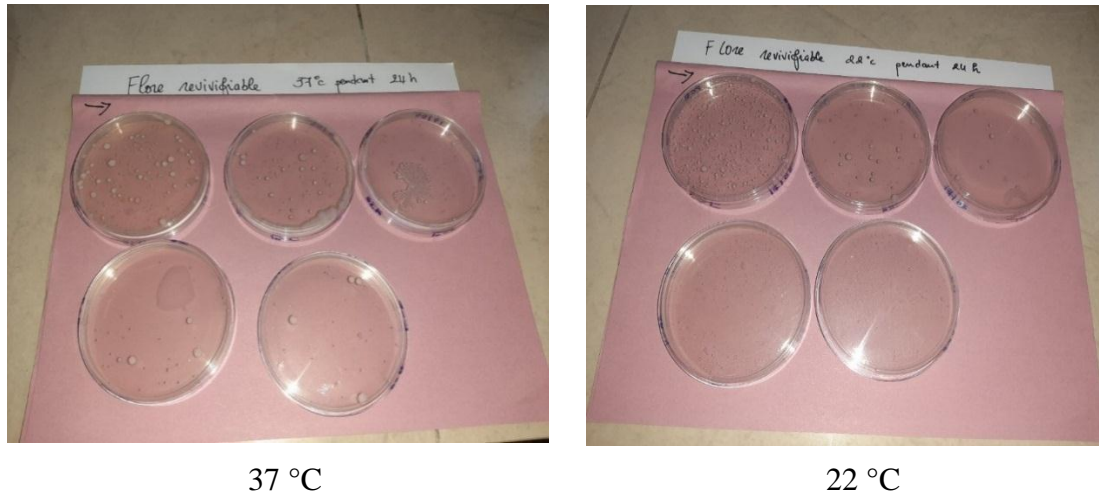


Figure 29 : Boites de pétri correspondant au dénombrement de la flore revivifiables des différentes dilutions

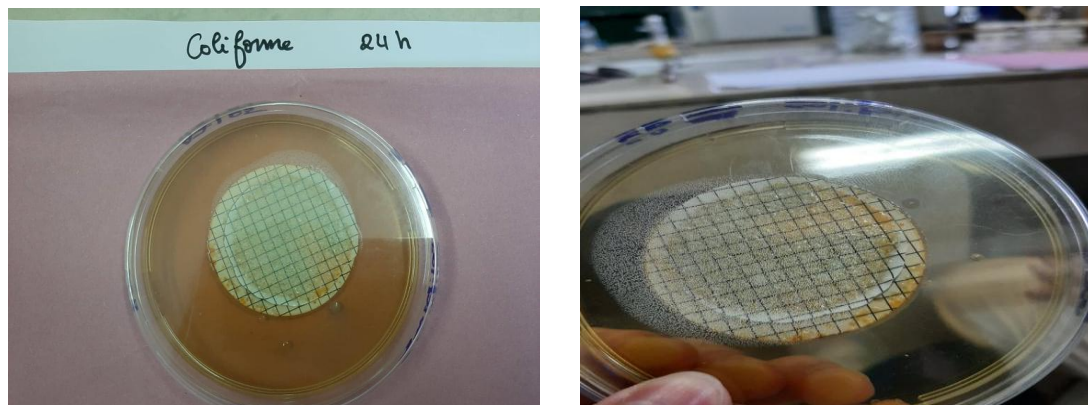


Figure 30 : Représentation des boites de pétries correspondant à la recherche des coliformes fécaux 37°C dans l'effluent secondaire

Annexes

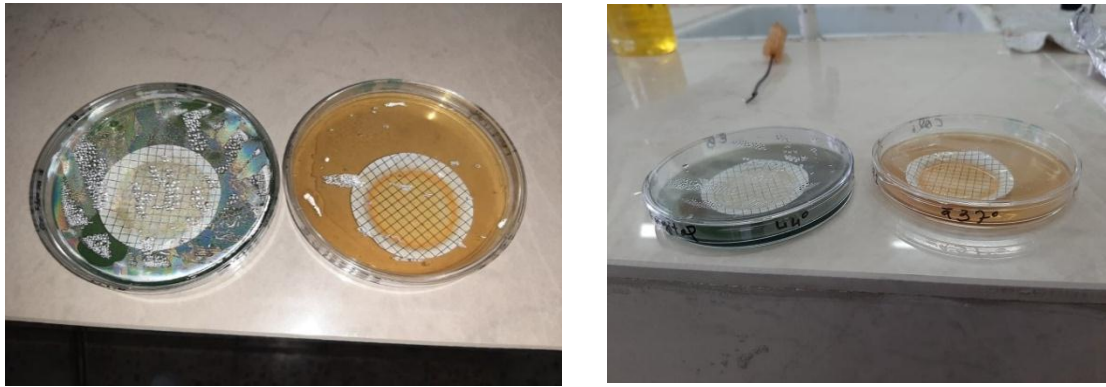


Figure 31 : Représentation des boîtes de pétries correspondant à la recherche des coliformes fécaux à 37°C (à droite) et 44°C (à gauche) dans l'eau usée



Figure 32: Boîtes de pétrie correspondant à la recherche des entérocoques 37°C pour l'eau usée sur le milieu Slanetz et Bartley.

Annexes

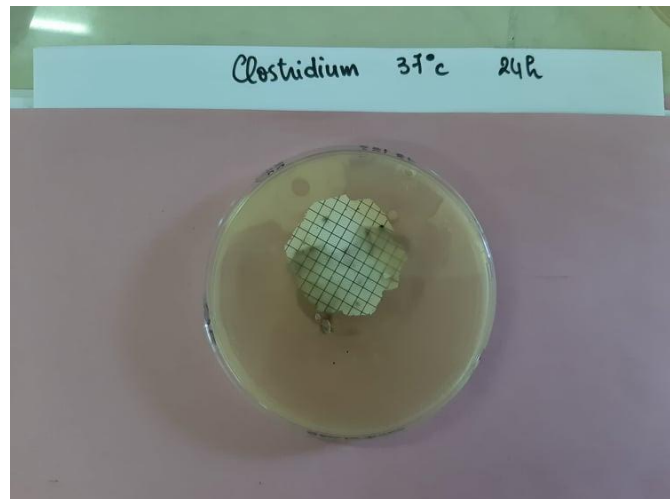


Figure 33 : Boite de pétrie correspondant à la recherche des Clostridium à 37°C en anaérobiose pour l'eau usée sur milieu VF.



Figure 34 : Boites de pétries correspondant à la recherche des Salmonelles à 37°C pour l'eau brute sur milieu Hektoen.

Annexes

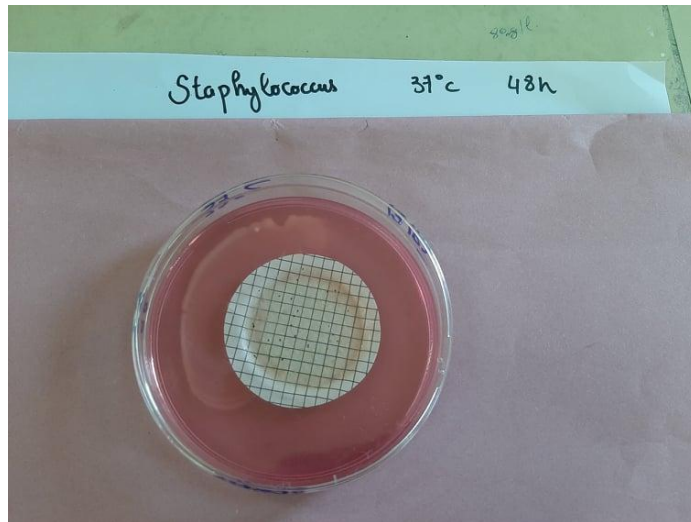


Figure 35 : Boîte de pétrie correspondant à la recherche des *Staphylococcus* à 37°C pour l'eau usée sur milieu Chapman



Figure 36 : Deuxième enrichissement dans l'eau peptonée alcaline correspondant à la recherche des *Vibrio* à 37°C dans l'eau usée

Annexes

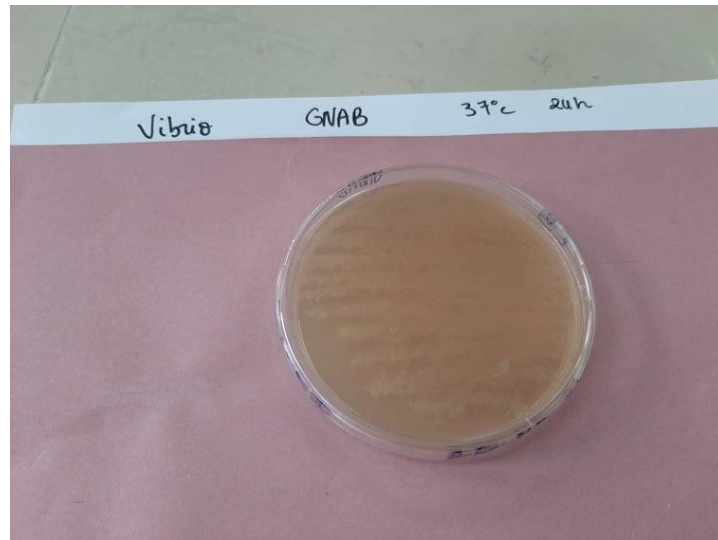


Figure 37 : Boite de pétrie correspondant à la recherche de *Vibrio* à 37°C pour l'eau usée sur GNAB.

Résumé

Le protocole standard de la détection des bactéries dans le domaine médical, agro-alimentaire et environnementale reste la méthode de culture microbienne. Cette dernière nécessite plusieurs jours pour identifier l'agent pathogène. Or, ces temps de latence ne sont pas forcément compatibles avec l'urgence. C'est la cause du besoin croissant de développer de nouvelles méthodes et des outils capable de rivaliser ces méthodes traditionnelles en termes de rapidité et de spécificité. C'est dans ce cadre que s'inscrit l'objectif de notre travail. Dans la première étape de ce travail, nous avons procédé à une analyse microbiologique traditionnelle sur milieu de culture bactérien, pour détecter et dénombrer les différentes bactéries constituant les eaux usées traitées de la STEP Est de la ville de Tizi-Ouzou. Les résultats obtenus étaient de $5.13 \cdot 10^3$ ufc/ml pour la flore mésophile à 22 °C ; $2 \cdot 10^4$ ufc/ml pour la flore mésophile à 37 °C ; 0 ufc/100ml pour les entérocoques, 99 ufc/ml pour les salmonelles, 35 ufc/100 ml pour les staphylocoques, 5 ufc/ml pour les clostridiiums et un résultat indénombrable pour les coliformes et les vibrions. Dans la deuxième étape et en collaboration avec le CDTA, nous avons procédé au développement d'un immunocapteur sur une structure basée sur une électrode en or et spécifique à la détection de la bactérie *Escherichia coli* avec des anticorps correspondants. Les performances de ce biocapteur ont ensuite été évaluées d'après les réponses des méthodes analytiques utilisées (potentiométrie). Les résultats obtenus montrent que le signal électrochimique diminue avec l'augmentation de la concentration en bactéries, ou pour une concentration de 10^4 ufc/ml la valeur du courant était de 1,120 A, avec une concentration de 10^7 ufc/ml le signal du courant a diminué jusqu'à 1,09 A et il diminue encore jusqu'à 0,57A pour une concentration de 10^9 ufc/ml.

Abstract

The standard protocol for the detection of bacteria in the medical, agro-food and environmental fields remains the method of microbial culture. The latter will take several days to identify the pathogen. Or, these latency times are not necessarily compatible with the urgency. This is the cause of the need to develop new methods and tools capable of competing with these traditional methods in terms of speed and specificity. It is within this framework that the objective of our work falls. In the first step of this work, we carried out a traditional microbiological analysis on the bacterial culture medium, to detect and enumerate the different bacteria constituting the water used in the water treatment plant of the wilaya of Tizi-Ouzou. The results obtained were $5.13 \cdot 10^3$ cfu / ml for the mesophilic flora at 22 °C ; $2 \cdot 10^4$ ufc / ml for the mesophilic flora at 37 °C ; 0 cfu / 100ml for enterococci, 99 cfu / ml for salmonella, 35 cfu / 100ml for staphylococci, 5 cfu / ml for clostridia and an uncountable result for coliforms and vibrios. In the second step and in collaboration with the CDTA, we proceeded to the development of an immunosensor on a structure based on an electrode in and specific to the detection of the bacterium *Escherichia coli* with corresponding antibodies. The biosensor performances were then evaluated according to the responses of the analyzes used (potentiometry). The results obtained decrease as the signal electrochemically increases in the concentration of bacteria, or for a concentration of 10^4 cfu / ml the value of the current was 1.120 A, with a concentration of 10^7 ufc / ml the signal of the current decreased until at 1.09 A and it decreases further down to 0.57 A for a concentration of 10^9 cfu / ml.

الملخص

إن طرق الكشف عن البكتيريا في المجال الطبي والصناعة الغذائية تعتمد على طرق تقليدية تتمثل في استعمال أوساط مغذية لزراعتها وهي طرق تستغرق وقتا للحصول على النتائج مما لا يتوافق مع الحالات الاستعجالية، لذا فمن الضروري البحث عن طرق وأدوات قادرة على منافسة هذه الطرق التقليدية في المختبر من حيث السرعة والثبات وذلك لإيجاد نظام فعال للكشف المبكر وهذا هو الهدف من هذا العمل. في الخطوة الأولى من هذا العمل، انتقلنا إلى التحليل الميكروبيولوجي التقليدي على وسط المزرعة البكتيرية، لاكتشاف وإحصاء البكتيريا المختلفة التي تشكل مياه الصرف الصحي المعالجة لمحطة معالجة مياه الصرف الصحي الشرقية في مدينة تيزي وزو. وفق الطريقة التقليدية على وسط الاستزراع للكشف عن البكتيريا المتواجدة فيها و كانت النتائج المحصل عليها كالتالي : ($5,13.10^3$ ufc/ml) لبكتيريا flore mésophile في درجة حرارة 22°C و ($2,0.10^4$ ufc/ml) في درجة حرارة 37°C ، 0 (ufc/100ml) للمكورات المعوية entérocoques ، (99 ufc/ml) للسالمونيللا salmonelles ، (35 ufc/100 ml) للمكورات العنقودية staphylocoques ، (5 ufc/ml) لبكتيريا الكلوستريديوم clostridium و نتيجة لا تعد بالنسبة لبكتيريا القولونية les coliformes و vibrio و في المرحلة الثانية و بالتعاون مع مركز تطوير التكنولوجيا المتقدمة CDTA ، شرعنا في تطوير جهاز استشعار مناعي على هيكل يعتمد على قطب كهربائي ذهبي ومخصص للكشف عن بكتيريا Escherichia coli مع الأجسام المضادة المقابلة. تم بعد ذلك تقييم أداء هذا المستشعر الحيوي بناءً على استجابات الطرق التحليلية المستخدمة (قياس الجهد) ، تم تمثيل النتائج على شكل تخطيط حيث لوحظ أن الإشارة الكهروكيميائية تتناقص مع زيادة تركيز البكتيريا فعند بلوغ البكتيريا تركيز (10^4 ufc/ml) تكون قيمة التيار 1,120 A و عند تركيز (10^7 ufc/ml) تنخفض قيمته الى 1,09 A حتى 0,57A. كنتيجة سمحت لنا هذه الدراسة من مقارنة الطريقة التقليدية للتحليل البكتريولوجي باستعمال أوساط الزرع و تقنية اللاقط الحيوي التي أبدت زيادة سرعة وكفاءة وخصوصية الكشف عن البكتيريا.