



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

CDTA

Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou

Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques

Département des Sciences Agronomiques

Mémoire de fin de cycle

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Spécialité : Eau et Environnement

Thème

**Etude, conception et validation d'une plateforme
d'un biocapteur électrochimique pour la détection
d'*Escherichia Coli* dans les eaux de surface**

Réalisé par :

M^{me} Ihaddadene Fetta Ep Yessad.

M^{elle} Mebarki Thiziri.

Devant le jury :

M ^r Metahri M.S.	MCA	UMMTO	Promoteur
M ^{me} Berrouane N.	Doctorante	UMMTO	Co-promotrice interne
M ^{me} Kahlouche K.	Maitre de recherche	CDTA	Co-promotrice externe
M ^{me} Amirat Y.	MAA	UMMTO	Présidente
M ^r Moualek I.	MCB	UMMTO	Examineur

Promotion: 2020/2021

Remerciements

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre Promoteur Dr Metahri Med Saïd, et Co- promotrice Mme BERROUANE N de nous avoir fait l'honneur d'assurer l'encadrement de notre travail, pour leurs aides, leurs critiques et leurs suggestions, qui ont été pour nous d'un grand apport. Nous leurs sommes très reconnaissants.

Notre respect a Messieurs et dames les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en consacrant du temps à la lecture de ce manuscrit, et d'avoir accepté de juger et d'évaluer ce travail et l'enrichir par leurs propositions.

Nos remerciements s'adressent aussi à Mme Kahlouche K et tout le personnel du CDTA ayant aidé à la réalisation de notre modeste travail

On tient également à remercier Melle Belmihoub et Mme Aissaoui pour le soutiens, aide et encouragement qu'elles nous ont toujours procuré

Dédicaces

Je dédie mon travail à :

*La mémoire de mon «**beau-père**» victime de la pandémie Dieu tout puissant*

l'accueille dans son vaste paradis

*A mes deux trésors **Yani** et **Yales** Dieu les bénisse*

*A mon cher **mari** ainsi que sa famille*

*A mes chers **parents** Dieu puisse leurs accorder santé, baraka et longue vie*

A mes sœurs et frères

A mes collègues et amis

A toute la promotion « Eau et environnement 2020-2021 » en particulier

Arhab Thiziri

Lynda

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A ma mère Les mots me manquent pour vous qualifier, tout ce que j'aurais à dire ne saurait, exprimer à fond tout le sacrifice et l'endurance que vous avez dû subir pour nous élever. Je ne saurais jamais vous remercier assez. Seul Dieu peut vous gratifier de tout ce que vous avez fait pour nous. Que Dieu le tout puissant vous accorde longue vie, bonne santé et bonheur à nos côtés.

A mon père vous avez fait d'énormes sacrifices pour vos enfants et vous n'avez jamais cessé de nous prodiguer des conseils pour le droit chemin. Que votre simplicité, votre disponibilité, et votre respect pour les autres me servent d'exemples.

A mes adorables sœurs LILA, DYHIA, et MERIEM, et mon cher frère ABDE RAHIM, qui m'ont permis de dépasser les obstacles de la vie et m'ont encouragé à toujours aller de l'avant.

A mon fiancé AGHILES ; l'homme de ma vie a qui je dois ma réussite.

A ma très chère et adorable belle-mère qui n'a jamais cessé de me soutenir et de m'encourager, et toute ma belle-famille.

A ma grande famille paternelle.

A la mémoire de mon grand-père OMAR que dieu l'accueille dans son vaste paradis, et toute ma grande famille maternelle.

A mon binôme IHADDADENEFETTA.

A tous ceux qui me sont chers et qui m'ont soutenue.

Taiziri

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Chapitre 1 : Généralités sur l'eau de surface

1. Eaux de surface 4

2. Pollution de l'eau 4

2.1. Types de polluants 4

2.1.1. Polluants physiques 4

2.1.2. Polluants chimiques 5

2.1.3. Polluants organiques 5

2.1.4. Polluants biologiques 5

3. Paramètres de qualité 5

3.1. Paramètres organoleptiques 5

3.1.1. Couleur 5

3.1.2. Odeur et goût 6

3.1.3. Turbidité 6

3.2. Paramètres physico-chimiques 6

3.2.1. Température (T°) 6

3.2.2. Potentiel Hydrogène (pH) 6

3.2.3. Conductivité électrique (CE) 7

3.2.4. Matières En Suspension (MES) 7

3.2.5. Dureté totale (DT) 7

3.2.6. Alcalinité 7

3.2.7. Equilibre calco-carbonique 8

3.2.8.	Chlorures	8
3.2.9.	Sodium	8
3.2.10.	Potassium	8
3.2.11.	Sulfates	8
3.3.	Paramètres indésirables	9
3.4.	Paramètres de toxicité.....	9
3.5.	Paramètre organiques.....	10
3.5.1.	Demande biochimique en oxygènes (DBO ₅)	10
	Tableau 03:Qualité de l'eau en fonction de la DBO ₅ (Rodier, 2009).....	10
3.5.2.	Demande chimique en oxygène (DCO)	10
3.5.3.	Phosphate	11
3.5.4.	Azote ammoniacal.....	11
3.5.5.	Nitrates	11
3.5.6.	Nitrites.....	12
3.6.	Microbiologie de l'eau.....	12
3.6.1.	Bactéries de l'eau	12
3.6.2.	Parasites de l'eau.....	16
3.6.3.	Virus de l'eau	16
4.	Epidémies d'origine hydrique.....	16

Chapitre 2 : Détection des bactéries et biocapteurs

1.	Méthodes conventionnelles classiques de détection des bactéries.....	17
1.1.	Méthodes par culture	17
1.1.1.	Nombre le plus probable NPP (milieu liquide).....	17
1.1.2.	Filtration sur membrane (milieu solide).....	17
1.2.	Méthode Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA)	17
1.3.	Méthode de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR).....	18
2.	Biocapteurs	19

2.1. Historique	19
2.2. Définition et principe de fonctionnement	19
2.3. Domaines d'applications	20
2.4. Composants d'un biocapteur	21
2.4.1. Biorécepteur	21
2.4.2. Transducteurs	23
2.5. Transduction d'intérêt (électrochimique)	24
2.6. Biocapteurs d'intérêt (immunologiques)	25
2.7. Méthodes d'immobilisation des biorécepteurs	26
3. Bactéries pathogènes et biodétection	26
4. Bactérie d'intérêt (<i>Escherichia Coli</i>)	27
4.1. Description biologique et origine de la bactérie	27
4.2. Problèmes sanitaires liée à la bactérie	28
4.3. Cycle de vie de la bactérie	29
4.4. Facteurs influençant la survie d' <i>E. Coli</i> dans l'environnement.....	30

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

1. Objectif de l'étude.....	31
2. Zone d'étude	31
3. Lieu et durée de l'étude.....	31
4. Prélèvement et échantillonnage de l'eau.....	32
5. Matériels et produits utilisés	33
6. Analyses bactériologiques par la méthode classique	33
6.1. Recherche et dénombrement de la flore aérobie mésophile totale	35
6.2. Dénombrement des coliformes totaux et Coliformes fécaux	36
6.2.1. Méthode du milieu liquide	36
6.2.2. Méthode du milieu solide.....	38
6.3. Recherche des entérocoques intestinaux (par filtration sur membrane).....	39

6.4.	Recherche des Clostridium sulfito-réducteurs.....	40
6.5.	Recherche des salmonelles	41
	La recherche des salmonelles comprend deux phases, à savoir :	41
6.6.	Isolement du vibron cholérique	43
8.	Biodétection d'Escherichia Coli.....	47
8.1.	Matériels et produits utilisés.....	47
8.2.	Activations de l'électrode d'or	49
8.3.	Caractérisation des électrodes.....	51
8.3.1.	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	51
8.3.2.	Spectrophotométrie Raman.....	52
8.3.3.	Voltammétrie cyclique (CV).....	53
8.4.	Greffage de l'anticorps et Pyrene-PEG	54
8.5.	Biodétection d'E. Coli sur interface modifiée PEG/rGO/PEI	55

Chapitre 4 : Résultats et discussions

1.	Résultats des analyses bactériologiques par la méthode classique	56
2.	Résultats de l'identification et isolement d'E. Coli.....	58
2.1.	Par méthode classique sur Chromagar	58
2.2.	Par galerie biochimique API 10.....	58
3.	Résultats de la caractérisation des électrodes.....	59
3.1.	Par microscopie électronique à balayage (MEB).....	59
3.2.	Par spectrophotométrie RAMAN.....	60
3.3.	Par voltammétrie cyclique (CV).....	61
3.4.	Par Voltammétrie Différentielle Pulsée DPV.....	62
4.	Résultats de la Biodétection	64
	Conclusion.....	67

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
AFM : Microscopie à Force Atomique
ARN : Acide Ribonucléique
BCPL : Bouillon Lactosé au Bromocrésol Pourpre
BGN : Bacilles Gram Négatifs
CDTA : Centre de Développement des Technologies Avancées
CF : Coliformes Fécaux
CT : Coliformes Totaux
CV : Voltampérométrie Cyclique
DBO : Demande Biochimique en Oxygène
DCO : Demande Chimique en Oxygène
DO : Densité Optique
DPV : Voltampérogramme d'Impulsion Différentielle
E. Coli : *Escherichia Coli*
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
EPA : Eau Peptone Alcaline
EPD : Dépôt Electro Phorétique
G : Graphème
GN : Gélose Nutritive
GNAB : Gélose Nutritive Alcaline Biliée
GO : Oxyde de Graphène
HPA : Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques
IFA : L'Immuno Fluorescence
IUPAC : Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée
LPS : Lipo Poly Saccharides
MEB : Microscope Électronique à Balayage
MES : Matière En Suspension
MTH : Maladie à Transmission Hydrique
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCA : Plate Counting Agar

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PEG : Poly Ethylène Glycol

PEI : poly EthylèneImine

pH : potentiel Hydrogène

PPM : Partie Par Million

rGO :Oxyde de GraphèneRéduit

SB :Slanetz Barthley

TEA:Tri Ethyl Amine

TSI : Triple Suger Iron.

UFC : Unité Formant Colonie

VBNC : Viable Bacteria Non Culturable

VF : Viande Foie

Liste des tableaux

Tableau	Titre du tableau	Page
01	Normes de l'OMS pour les paramètres indésirables	06
02	Normes de l'OMS pour les paramètres toxiques	07
03	Qualité de l'eau en fonction de la DBO5	08
04	Variables influençant la survie de <i>E. coli</i> dans l'environnement	29
05	Coloration de Gram	42
06	Récapitulatif des résultats d'analyses bactériologiques de l'eau du barrage	49

Liste des figures

Figure	Titre de la figure	Page
01	Escherichia-coli sous microscope électronique à G X 1000	13
02	Aspect en microscope optique (×1000) des entérocoques	14
03	Photographie de Clostridium perfringens observée au microscope optique G×1000	14
04	Images des Salmonelles sous microscope à un Grossissement X 12 000	15
05	Vibrions cholériques observé en microscope Électronique à balayage	15
06	Schéma d'un biocapteur	19
07	Famille des biorécepteurs et transducteurs	21
08	Représentation schématique de quelques biorécepteurs	21
09	Structure schématisée d'un anticorps	22
10	Composants généraux d'un biocapteur électrochimique	25
11	Schéma d'un biocapteur bactérien	25
12	Architecture bactérienne et cibles pour la biodétection. Les deux types de bactéries peuvent avoir des flagelles. Les cibles intracellulaires pour la biodétection comprennent les protéines, l'ADN et l'ARN	27
13	Illustration d'une colonie d' <i>Escherichia coli</i>	28
14	Image réelle d'une souche E Coli pathogène indiquant l'organelle responsable de la pathogénicité	29
15	Cycle de la bactérie <i>Escherichia coli</i>	30
16	Localisation du barrage de Taksebt	31
17	Photo de l'entrée du CDTA	32
18	Principe des dilutions	34
19	Dénombrement de la flore mésophile totale	36
20	Dénombrement des coliformes totaux et fécaux (Test présomptif)	37
21	Dénombrement des coliformes totaux et fécaux (test de confirmation)	38
22	Recherche des coliformes par la méthode de filtration sur membrane	39
23	Recherche des entérocoques par la méthode de filtration sur membrane	40
24	Dénombrement des Clostridium sulfito-réducteurs	41
25	Recherche des salmonelles (enrichissement)	42
26	Recherche des salmonelles (isolement)	43
27	Recherche du vibron cholérique	44
28	Galerie biochimique API 10 S	47
29	Microscope électronique à balayage (JOEL)	48
30	Spectromètre Raman (HoribaJobin-Yvon)	48
31	Spectrophotomètre UV9200 (BIOTECH ENGINEERING)	48
32	Potentiostat (AUTOLAB)	48
33	Electrodes d'or utilisées	48
34	photos de dépôt du couple GO/PEI	49
35	Différentes étapes utilisées pour la construction de	

Liste des figures

	l'immunocapteur pour la détection électrochimique sélective d' <i>E. Coli</i> UTI89	49
36	Morphologie d'une électrode d'or avant et après revêtement électrophorétique avec rGO/PEI. Lors de l'application de +15 VDC pendant 4 min.	50
37	Voltammogramme d'impulsions différentielles d'or (noir) et d'or recouvertes de rGO/PEI (bleu) enregistrées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M).	51
38	Schéma du principe de fonctionnement du MEB	52
39	Schéma illustrant le principe de la Spectrophotométrie Raman	53
40	Représentation d'un voltammogramme cyclique	54
41	Immobilisation covalente d'anticorps anti-fimbriae d' <i>E. Coli</i> sur l'Électrode PEG / rGO / PEI (PEG/rGO/PEI-anti-fimbrial)	54
42	Colonies d' <i>E. Coli</i> sur boîte de pétri du milieu Chromagar	58
43	Galerie biochimique API 10 d'identification d' <i>E. Coli</i>	58
44	Micrographies des électrodes d'or par microscope électronique à balayage avant et après le revêtement avec le graphène	59
45	Revêtement avec rGO/PEI de l'électrode d'or sous MEB	60
46	Spectroscopie Raman	61
47	Voltammétrie cyclique (CV) de l'électrodes d'or (Au) dans $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (10 mM) / KCl (0.1 M); vitesse de scan 20mVs^{-1}	62
48	Voltammogramme d'impulsions différentielles d'or (noir) et d'or recouvertes de rGO/PEI (bleu) enregistrées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M)	63
49	Voltampérogrammes d'impulsions différentielles (DPV) mesurées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 Mm) / PBS (0.1M) après <i>E. Coli</i> incubation pendant 30 min avec Anticorps AC- <i>E. Coli</i> ($200\mu\text{g} / \text{ml}$) [AC] = $200\mu\text{g}/\text{ml}$, [BAC] = $10^2\text{CFU}/\text{ml}$, [BSA], vitesse de balayage 100 mv/s	64
50	Voltampérogrammes d'imputions différentielles (DPV) mesurées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$ (5mM)/PBS(0,1M) après <i>E. coli</i> . Incubation pendant 30 min avec AC- <i>E. Coli</i> ($200\mu\text{g} / \text{mL}$) pour différentes concentrations : 0 UFC ml^{-1} (vert), 10^4 UFC ml^{-1} (bleu), 10^7 UFC ml^{-1} (rouge), 10^9 UFC ml^{-1} (noir) Vitesse de balayage $100\text{mV} / \text{s}$	65
51	Diagramme de la variation du pic du courant en fonction de la concentration bactérienne	65

Introduction

L'eau est le moteur de la vie et l'un des principaux vecteurs de propagation de nombreuses maladies qui sont à l'origine d'épidémies majeures chez l'homme ou l'animal car elle constitue le foyer de nombreux microorganismes pathogènes, spécialement les bactéries qui incluent des espèces du genre *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Escherichia* et d'autres comme les *Legionella*, ainsi que certaines espèces du genre *Vibrio* qui ne sont pas des bactéries d'origine entériques, mais des pathogènes dont l'habitat naturel est l'environnement et plus particulièrement les systèmes aquatiques (Pierre *et al.*, 2009).

Les eaux de surface peuvent être contaminées par des matières fécales de l'homme et de l'animal et contenir une grande variété de microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme. La recherche systématique de tous les germes entéro-pathogènes n'étant pas réalisable en pratique, le dénombrement de « bactéries indicatrices » est classiquement utilisé pour évaluer cette contamination fécale et les risques sanitaires qui y sont associés. Pendant de nombreuses années, les coliformes totaux et fécaux ont été largement utilisés comme indicateurs de contamination fécale. Plus récemment, les bactéries appartenant à l'espèce *Escherichia Coli* (*E. Coli*) ont été plus spécifiquement dénombrées car elles sont très abondantes dans la flore intestinale humaine et animale, et c'est aussi la seule espèce qui soit strictement d'origine fécale. Sa présence dans l'eau signifie que cette dernière est contaminée par une pollution d'origine fécale et qu'elle peut donc contenir une pathogénicité (Leduc et Vaurette, 2016 ; Tarbague, 2011).

Les techniques d'analyses bactériologiques conventionnelles sont souvent coûteuses, complexes et applicables seulement au laboratoire et avec une durée d'analyse longue. Les méthodes classiques pour dénombrer les bactéries *E. coli* sont basées sur la culture en milieu liquide (NPP, nombre le plus probable) ou en milieu solide (comptage du nombre de colonies ou UFC, unité formant colonie). Cependant, ces résultats ne sont obtenus qu'après un minimum de 18 à 24 heures d'incubation. Par ailleurs, il a été démontré que les bactéries d'origine fécale, quand elles sont rejetées dans l'environnement, peuvent perdre leur capacité à croître sur des milieux de culture, bien que leur viabilité soit préservée. Le dénombrement de ces bactéries viables non cultivables (ou VBNC : Viable Bacteria Non Culturable) est cependant important à comptabiliser d'un point de vue sanitaire selon certains auteurs. Il serait donc souhaitable de disposer de méthodes plus rapides et plus simples telles que la biodétection (Tarbague, 2011 ; Bensana, 2020).

Pour combiner les avantages des tests biologiques avec la spécificité et la sensibilité des analyses physico-chimiques et microbiologiques, les efforts de la recherche en biotechnologies ont ciblé le développement de biocapteurs. Il s'agit d'organismes vivants modifiés génétiquement couplés à un système de transduction de signal permettant la détection de quantités bio disponibles d'un polluant spécifique. Les biocapteurs sont construits de sorte que l'organisme puisse capter un stress environnemental et le traduire en un signal facilement mesurable. Leur intérêt principal est qu'ils permettent d'évaluer la biodisponibilité du polluant, avec une grande spécificité donnée essentielles pour une analyse environnementale et pour la mise en place de techniques de bio-redressement (Riether, 2001)

L'objectif de notre étude est en premier lieu, la caractérisation bactériologique d'un échantillon d'eau de surface (eau du barrage de Taksebt), en se basant sur les méthodes d'analyses conventionnelles classiques au laboratoire, et ce par une mise en culture sur milieux solides et liquides spécifiques à chaque groupe bactérien. En second lieu, nous avons abordé une nouvelle approche, qui vise le développement d'une méthode alternative de détection de bactéries, par l'élaboration d'un biocapteur immunologique (biorécepteur de type anticorps), qui aura pour cible l'identification de la bactérie *Escherichia coli* qui est un indicateur de contamination fécale par excellence des milieux aqueux. Le fonctionnement typique d'un tel immunocapteur est la présence d'une espèce antigénique cible, immobilisée spécifiquement par le biorécepteur, la propagation du courant électrique est modifiée, ce qui se traduit par une perturbation mesurable d'un signal électrique. L'enjeu de cette approche est la capacité à détecter des concentrations de bactéries en dessous du seuil imposé par la législation et ceci en un laps de temps court (une à trois heures), afin de déclencher une alerte précoce. Un tel système, évitant des étapes de manipulation, et notamment de culture cellulaire préalable, autoriserait une détection directe in situ, et un suivi quasi temps réel de la qualité des eaux en générale (Tarbague, 2011).

Afin de réaliser ces objectifs, nous avons procédé premièrement à l'identification et à l'isolement de la bactérie *E. coli*, puis la préparation d'échantillons portant différentes dilutions. Ensuite nous sommes passés à l'étape de fonctionnalisation des électrodes d'or par l'ajout d'oxyde de graphène (greffage d'un biorécepteur), ensuite nous avons mis au point une modification chimique de surface assurant le rôle d'agent de liaison adapté d'une part avec la plateforme de transduction et d'autre part avec les espèces biologiques cibles et de plus

favorisant les interactions aux interfaces (ajout de l'anticorps spécifique a *E. coli*). Et enfin nous sommes passés au protocole de biodétection de nos échantillons de différentes concentrations étant confirmé par des mesures potentiométriques.

Nous avons entamé notre recherche dans le premier chapitre par des généralités sur les eaux de surfaces, et les différentes composantes physiques, chimiques ou microbiologique qui révèlent la qualité de ces eaux .Dans le second chapitre, nous avons fait une récolte de données bibliographiques sur les méthodes d'analyses conventionnelles classiques, et la biodétection dont le principe et les composantes d'un biocapteur ainsi que les différents types existants. Pour le troisième chapitre nous nous sommes étalés sur tous les protocoles expérimentaux qui nous ont servi de guide pour la pratique de nos analyses bactériologiques au laboratoire, ainsi que pour l'élaboration de notre biocapteur .En dernier lieu, nous avons présenté les résultats de nos deux parties expérimentales que nous avons éclairé par une longue discussions en se basant sur le témoignages de différents auteurs ayant prouvé de large expériences dans le domaines de la surveillance de la qualité l'eau en particulier et l'environnement en général .

Chapitre 01

Généralité sur l'eau de surface

1. Eaux de surface

Elles sont constituées par toutes les eaux circulantes ou stockées à la surface de la terre. Elles ont pour origine soit les eaux de ruissellement, soit les nappes profondes dont l'émergence constitue une source de ruisseaux puis de rivière. Ces eaux se rassemblent en cours d'eau, caractérisés par une surface de contact eau-atmosphère toujours en mouvement et une vitesse de circulation appréciable. Elles peuvent se trouver stockées en réserves naturelles (étangs et lacs) ou artificielles (retenues, barrages). La composition chimique des eaux de surface dépend de la nature des terrains traversés par l'eau durant son parcours dans l'ensemble des bassins versants. Au cours de son cheminement, l'eau dissout les différents éléments constitutifs des terrains (Sari, 2014).

Les eaux de surface sont contaminées plus ou moins par des bactéries (dont certaines pathogènes) et des virus. D'une manière générale, on doit considérer que les eaux de surface sont très rarement utilisables pour les besoins industriels et, a fortiori, pour la production d'eau potable à l'état brut, elles doivent être soumises à des traitements de purification qui dans certains cas peuvent être particulièrement sophistiqués (Berne et Jean, 1991).

2. Pollution de l'eau

La pollution de l'eau est définie comme étant toute modification physique ou chimique de la qualité des eaux, qui a une influence négative sur les organismes vivants et qui rend l'eau inadéquate aux usages souhaités. Une eau est dite polluée, lorsque sa composition ou son état est directement ou indirectement modifié par l'action de l'homme (Ramade, 2000).

2.1. Types de polluants

Tout facteur susceptible de provoquer un déséquilibre dans l'eau et qui altère sa qualité est appelé polluant. Les principaux polluants de l'eau sont :

2.1.1. Polluants physiques

L'élévation de la température de l'eau de surface diminue la solubilité des gaz dans l'eau, en particulier l'oxygène. Les particules en suspension de nature organique ou minérale sont introduites dans l'eau de surface par les eaux de ruissellement d'effluent industriel et urbain. La radioactivité est potentiellement la plus dangereuse des polluants physiques (Amrani, 2017).

2.1.2. Polluants chimiques

Les polluants chimiques sont des sels minéraux dissous tel que des chlorures, des sulfates et des micropolluants tels que les métaux lourds (plomb, chrome) et les pesticides tels que les herbicides, insecticides, fongicides, .etc. Les détergents sont des tensioactifs utilisés en pratique pour le dégraissage, nettoyage, et autres. De même que les hydrocarbures qui sont déversés par les stations de service et les huiles industrielles (Rolland, 2003).

2.1.3. Polluants organiques

L'eau se charge en matières biodégradables ou non, et constitue un milieu nutritif favorable au développement des microorganismes notamment les pathogènes (Rolland, 2003).

2.1.4. Polluants biologiques

La pollution biologique peut être de nature virale, parasitaire ou bactérienne. Ces microorganismes sont nuisibles pour la santé de l'Homme. Les polluants biologiques entraînent un déficit en oxygène dissous et un dégagement des odeurs désagréables. Les polluants bactériologiques et viraux sont les plus dangereux, ils provoquent des maladies mortelles comme la typhoïde et le choléra (Rolland, 2003).

3. Paramètres de qualité

L'appréciation de la qualité des eaux de surface se base sur la mesure de paramètres organoleptiques, physico-chimiques, mais surtout sur la présence ou l'absence de microorganismes indicateurs d'une plus ou moins bonne qualité de l'eau. L'approvisionnement en eau doit être vérifié régulièrement pour garantir le maintien d'une qualité satisfaisante de l'eau.

3.1. Paramètres organoleptiques

Il s'agit de la saveur, de la couleur, de l'odeur et de la transparence de l'eau. Ils n'ont pas de signification sanitaire mais, par leur dégradation, peuvent constituer des facteurs d'alerte pour une pollution ou un mauvais fonctionnement des installations de traitement ou de distribution (Lounnas, 2009).

3.1.1. Couleur

Les eaux naturelles sont toujours plus ou moins colorées. Leur couleur varie du jaune pâle à peine perceptible au brun rougeâtre, selon la nature et la concentration des matières colorantes qui sont souvent d'origine naturelle et proviennent de la dégradation de matières végétales. La couleur d'une eau dépend aussi du pH et de la turbidité (Behloul, 2009).

3.1.2. Odeur et goût

Toute odeur est un signe de pollution ou de présence de matières organiques en décomposition. L'odeur est détectée par les organes olfactifs. D'autre part le goût peut être défini comme l'ensemble des sensations gustatives, olfactives et de sensibilité chimique commune perçue lorsque la boisson est dans la bouche. Dans le cas d'une eau potable, l'apparition ou le changement de goût et d'odeur peuvent être signe d'activité microbienne et de lacune dans le traitement ou de contamination dans le réseau de distribution. Par ailleurs, une eau traitée peut avoir un goût plus prononcé qu'une eau non potable du fait du chlore résiduel (Lounnas, 2009).

3.1.3. Turbidité

La norme ISO 7027 (AFNOR, 1999) définit la turbidité comme étant la « réduction de transparence d'un liquide due à la présence de substances non dissoutes ».

La turbidité d'une eau est une mesure globale qui prend en compte toutes les matières, soit colloïdales, soit insolubles, d'origine minérale ou organique. Des particules en suspension existent naturellement dans l'eau, comme le limon, l'argile, les matières organiques et inorganiques en particules fines, le plancton et d'autres microorganismes (Ben Thayer *et al.* 2007).

3.2. Paramètres physico-chimiques

3.2.1. Température (T°)

La température est un paramètre physique clé, dans le sens qu'elle agit de manière déterminante sur les processus chimiques et biologiques au sein des cours d'eau. Il est important de connaître la température de l'eau avec une bonne précision. En effet celle-ci joue un rôle dans la solubilité des gaz, dans la dissociation des sels dissous et dans la détermination du pH, pour la connaissance de l'origine de l'eau et les mélanges éventuels, etc. En outre, cette mesure est très utile pour les études limnologiques. D'une façon générale, la valeur de ce paramètre est influencée par la température ambiante mais également par d'éventuels rejets d'eaux résiduaires chaudes (Ghazali *et al.* 2013).

3.2.2. Potentiel Hydrogène (pH)

Le potentiel Hydrogène est une mesure de l'acidité de l'eau c'est-à-dire la concentration en ions d'hydrogène (H^+). Le pH d'une eau naturelle peut varier de 4 à 10 en fonction de la nature acide ou basique des terrains traversés. Des pH faibles (eaux acides) augmentent notamment le risque de présence de métaux sous une forme ionique plus toxique.

Des pH élevés augmentent les concentrations d'ammoniac, toxique pour les poissons. On admet généralement qu'un pH naturel situé entre 6.5 et 8.5 caractérise des eaux où la vie se développe de manière optimale (Savary, 2010).

3.2.3. Conductivité électrique (CE)

Désigne la capacité de l'eau à conduire un courant électrique, elle est déterminée par la teneur en substances dissoutes, la charge ionique, la capacité d'ionisation, la mobilité et la température de l'eau. Par conséquent, elle renseigne sur le degré de minéralisation d'une eau. La conductivité électrique standard s'exprime généralement en milli-siemens par mètre ($\mu\text{S}/\text{m}$) à 20 °C. La conductivité d'une eau naturelle est comprise entre 50 et 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Haddad *et al.* 2014).

3.2.4. Matières En Suspension (MES)

Sont constituées de toutes particules organiques ou minérales véhiculées par les eaux. Elles peuvent être composées de particules de sable, de terre et de sédiment arrachés par l'érosion, de divers débris apportés par les eaux usées ou les eaux pluviales très riche en MES, d'êtres vivants planctoniques notamment les algues. (Girgenti, 2011).

3.2.5. Dureté totale (DT)

Produite par les sels de calcium et de magnésium contenus dans l'eau. On distingue deux types de dureté : la dureté carbonatée qui correspond à la teneur en carbonates et bicarbonates de Ca et Mg et la dureté non carbonatée produite par les autres sels. La dureté est mesurée par le titre hydrotimétrique exprimé en degré français (°F); 1°F correspond à 10 mg de carbonate de calcium dans 1 litre d'eau. La dureté d'une eau naturelle dépend de la structure géologique des sols traversés (Belghiti *et al.*, 2013).

3.2.6. Alcalinité

Correspond à la capacité d'une eau à réagir avec les ions hydrogène (H^+) qui est due à la présence des ions hydrogénocarbonate (HCO_3^-), carbonate (CO_3^{2-}) et hydroxyde (OH^-). On distingue (Lounnas, 2009):

- Le titre alcalimétrique complet TAC :

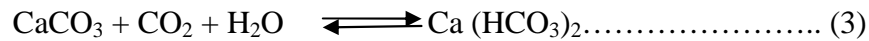
$$(\text{TAC}) = [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] + [\text{OH}^-] \dots \dots \dots (1)$$

- Le titre alcalimétrique TA :

$$(\text{TA}) = [\text{OH}^-] + 1/2[\text{CO}_3^{2-}] \dots \dots \dots (2)$$

3.2.7. Equilibre calco-carbonique

L'équilibre entre le carbonate de calcium et le bicarbonate de calcium est fonction de la teneur en CO₂ dans l'eau définie comme concentration en CO₂ équilibrant. La réaction chimique prépondérante est (Degremont, 2005) :



Deux cas peuvent se présenter :

- Si le [CO₂] libre > [CO₂] équilibrant, le sens (1) est prédominant le CO₂ excédentaire attaque la couche calcaire présente dans les canalisations. L'eau est donc agressive.
- Si [CO₂] libre < [CO₂] équilibrant, le sens (2) domine. Une partie de Ca(HCO₃)₂ se dépose en calcaire et augmente la teneur en CO₂ libre. L'eau est dite entartrante ou incrustante.

3.2.8. Chlorures

Les teneurs en chlorures des eaux sont extrêmement variées et liées principalement à la nature des terrains traversés ; les normes fixent sa concentration maximale à 250 mg/l. Les eaux courantes exemptes de pollution ont une teneur < 25 mg/l de chlorures, tandis qu'elle peut atteindre 1000 mg/l pour les eaux ayant traversé des marnes salifères (Beer, 2010).

3.2.9. Sodium

Le sodium est un métal alcalin que l'on trouve dans des sels sous forme d'ion Na⁺. Il est très soluble dans l'eau et se trouve à concentrations plutôt faibles dans les eaux brutes. Il affecte les qualités organoleptiques de l'eau lorsque sa concentration dépasse 200 mg/l. L'Union Européenne fixe son taux maximal à 200 mg/l dans l'eau potable (Beer, 2010).

3.2.10. Potassium

Se trouve sous forme de cation monovalent (K⁺) en milieu naturel. Il s'agit d'un métal essentiel pour l'organisme, On le trouve dans les eaux brutes non polluées à des concentrations généralement faibles. Il y parvient principalement via des infiltrations de mica et de feldspath potassique ou de sels potassiques. Une part anthropogène peut provenir de l'utilisation d'engrais et de jus de décharge (Beer, 2010).

3.2.11. Sulfates

Les origines naturelles des sulfates sont l'eau de pluie et la mise en solution de roches sédimentaires évaporitiques, notamment le gypse (CaSO₄) et la pyrite (FeS) est plus rarement de roches magmatiques (galène, blende) (Ghazali, 2013). Leur présence dans l'eau peut provenir des effluents industriels et de dépôts d'origine atmosphérique, mais les

concentrations les plus élevées se rencontrent généralement dans les eaux souterraines et sont d'origine naturelle. L'ion sulfate est l'un des anions les moins toxiques, à des concentrations élevées il peut avoir un effet purgatif ou entraîner une déshydratation et une irritation gastro-intestinale, il peut aussi communiquer un goût perceptible et contribuer à la corrosion du réseau de distribution. Les seuils de détection gustative sont de 200-250 mg/l pour Na_2SO_4 , 250-900mg/l pour CaSO_4 , 400-600 mg/l pour MgSO_4 (Maiga, 2005).

3.3. Paramètres indésirables

Leur présence dans les eaux naturelles peut provenir de la dégradation de la matière organique et dépend de la nature des terrains traversés, il est préférable de les trouver à des petites quantités dans l'eau de boisson, les normes de l'OMS recommandent les valeurs portées sur le tableau 01 (OMS, 2000).

Tableau01 : Normes de l'OMS pour les paramètres indésirables (OMS, 2000).

Paramètres indésirables	Normes OMS
Fer	0.3 mg/l
Aluminium	0.2 mg/l
Manganèse	0.05mg/l
Phosphates	0.5 mg/l
Fluor	1.5 mg /l

3.4. Paramètres de toxicité

En raison de leur effet néfaste sur la santé humaine, même en petites traces, il est donc souhaitable de ne pas les trouver dans l'eau potable, pour ces raisons les normes sont strictes vis-à-vis de ces paramètres, l'OMS recommande les valeurs portées sur le tableau 02 (OMS, 2000).

Tableau02 : Normes de l'OMS pour les paramètres toxiques (OMS, 2000).

Paramètre toxiques	Norme OMS
Arsenic	0.05 mg/l
Argent	0.05 mg/l
Baryum	1.00 mg/l

Cadmium	0.01 mg/l
Cyanure	0.05 mg/l
Chrome	0.05 mg/l
Cuivre	1.50 mg/l
Mercure	0.001 mg/l
Plomb	0.05 mg/l
Hydrogènesulfuré	0.02 mg/l
Sélénium	0.01 mg/l
Zinc	5.00 mg/l
H.P.A	0.20 mg/l

3.5. Paramètres organiques

3.5.1. Demande biochimique en oxygène (DBO₅)

On appelle DBO₅ d'une eau la quantité d'oxygène exprimée en mg/l, consommée pendant 5 jours à une température de 20°C, nécessaire pour décomposer par oxydation biologique des matières organiques présentes dans l'effluent. La valeur obtenue représente environ 80% de la pollution biodégradable totale (Rodier, 2009). Le tableau 03 présente la qualité de l'eau en fonction de la DBO₅.

Tableau 03: Qualité de l'eau en fonction de la DBO₅ (Rodier, 2009).

Valeur de la DBO ₅ (mg/l)	Qualité des eaux
DBO ₅ < 3	Très bonne
3 < DBO ₅ < 5	Bonne
5 < DBO ₅ < 8	Moyenne
DBO ₅ > 8	Mauvaise

3.5.2. Demande chimique en oxygène (DCO)

C'est la quantité d'oxygène nécessaire pour obtenir une oxydation complète des matières organiques et minérales présentes dans l'eau. Certaines matières contenues dans l'eau sont oxydées par un excès de dichromate de potassium, en milieu acide en présence de

sulfate d'argent et de sulfate de mercure. L'excès de dichromate de potassium est dosé par le sulfate de fer et d'ammonium. La DCO est exprimée en mg/l d'O₂ consommé par les matières oxydables dans un litre d'eau (Melghit, 2013).

3.5.3. Phosphate

Les phosphates font partie des anions assimilables par le corps de l'être humain. Quelle que soit leur origine (domestique, industrielle ou agricole), leur présence dans les eaux à fortes concentration (teneurs supérieures à 0.2 mg/l) favorise le développement massif d'algues, lesquelles conduisent à l'eutrophisation des lacs et des cours d'eau. La directive des communautés européennes (CEE) indique comme teneur du phosphore dans l'eau destinée à la consommation humaine un niveau guide de 0.4 mg/l et une concentration maximale admissible de 5 mg/l, aucune valeur indicative n'est recommandée par l'OMS (Guergaziet Achour, 2005).

3.5.4. Azote ammoniacal

Constitue un des maillons du cycle complexe de l'azote dans son état primitif. C'est un gaz soluble dans l'eau. Il existe en faible proportion, inférieure à 0.1mg/l d'azote ammoniacal dans les eaux naturelles. Il constitue un bon indicateur de la pollution des cours d'eau par les effluents urbains. Dans les eaux superficielles, il provient de la matière organique azotée et des échanges gazeux entre l'eau et l'atmosphère (Makhouk*etal.*, 2011). L'ammonium en lui-même n'est pas nuisible. Mais lorsque le pH augmente, il se transforme en ammoniac, un gaz soluble dans l'eau et toxique pour la vie aquatique. Des problèmes apparaissent à partir d'une concentration de 0.1 mg NH₃/l (Merabet, 2010).

3.5.5. Nitrates

Constituent la forme azotée la plus dominante dans les cours d'eau et dans les nappes d'eau souterraine. Ils proviennent généralement de la décomposition de la matière organique par oxydation bactérienne des nitrites et constituent ainsi l'ultime produit de la nitrification. En milieu naturel, sa concentration dépasse rarement 0.45 mg/l. Des valeurs supérieures indiquent des rejets d'eaux usées dans les milieux aquatiques superficielles et souterraines, et surtout une utilisation excessive de fertilisants utilisés en agriculture (Derwich*etal.*, 2010). A cet effet, l'Organisation mondiale de la Santé OMS a fixé à 50 mg/l la valeur guide à ne pas dépasser pour la consommation d'eau de boisson. Cette teneur maximale a été reprise par la Communauté européenne dans sa directive 98/83/CE du 3 novembre 1998 (Alouane, 2011).

3.5.6. Nitrites

Les nitrates (NO_3^-) proviennent de l'oxydation complète des composés de l'azote. Les principales sources de rejet des nitrates sont les aérosols d'acide nitrique ou de nitrates d'ammonium provenant d'usines d'acide nitrique ou de fertilisants et les effluents de certaines industries alimentaires (salaison, etc.). Les nitrates sont aussi largement utilisés comme agent oxydant dans l'industrie chimique. La présence de nitrites dans les effluents industriels est surtout liée à leur utilisation comme inhibiteur de corrosion. Les nitrites sont considérés comme étant des ions intermédiaires entre les nitrates et l'azote ammoniacal, ce qui explique les faibles quantités rencontrées en milieu aquatique (Abboudiet *al.*, 2014). La norme de l'OMS (2002) pour les nitrites est de (0.1 mg/l).

3.6. Microbiologie de l'eau

Les microorganismes sont constitués de bactéries, de champignons microscopiques comme les levures, de parasites, d'algues microscopiques, d'archaebactéries et de virus. La contamination des eaux de surface par des microorganismes d'origine fécale existe depuis longtemps, dès que l'eau a été utilisée comme vecteur d'élimination des déchets. Avec le développement de l'urbanisation, les problèmes d'hygiène et de santé publique liés à la contamination bactérienne de l'eau sont devenus de plus en plus critiques. Des contrôles stricts des eaux de surface et des eaux destinées à la consommation humaine ont permis l'éradication presque complète dans le monde occidental des plus graves de ces maladies, qui restent cependant un fléau dans de nombreux pays en voie de développement (Tortora *etal.*, 2016).

3.6.1. Bactéries de l'eau

Les bactéries sont des micro-organismes procaryotes unicellulaires, c'est-à-dire que leurs cellules n'ont pas de noyau et que chaque cellule est une entité à part entière qui peut vivre et se reproduire par elle-même. Elles ont une taille moyenne de 1 à 5 micromètres et n'ont pas d'organites cellulaires, soit ni de chloroplaste ni de mitochondrie. Même si ce sont des organismes unicellulaires, les bactéries se regroupent souvent pour former des communautés multicellulaires appelées biofilms (Chevalier, 2003).

3.6.1.1. Coliformes totaux

Sont utilisés depuis très longtemps comme indicateurs de la qualité microbienne de l'eau parce qu'ils peuvent être indirectement associés à une pollution d'origine fécale. Les coliformes totaux sont définis comme étant des bactéries en forme de bâtonnet, aérobies ou

anaérobies facultatives. La presque totalité des espèces sont non pathogènes et ne représentent 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 (Chevalier, 2003).

3.6.1.2. Coliformes fécaux

Ou coliformes thermo-tolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est l'*Escherichia coli* (*E. coli*). Bien que la présence de coliformes fécaux témoigne habituellement d'une contamination d'origine fécale, plusieurs coliformes fécaux ne sont pas d'origine fécale, provenant plutôt d'eaux enrichies en matière organique, tels les effluents industriels du secteur des pâtes et papiers ou de la transformation alimentaire. L'intérêt de la détection de ces coliformes, à titre d'organismes indicateurs, réside dans le fait que leur survie dans l'environnement est généralement équivalente à celle des bactéries pathogènes et que leur densité est généralement proportionnelle au degré de pollution produite par les matières fécales. Par ailleurs, puisque les coliformes fécaux ne prolifèrent habituellement pas dans un réseau de distribution, ils sont utiles pour vérifier son étanchéité, permettant de détecter une contamination fécale découlant par exemple d'infiltrations d'eau polluée dans les canalisations. Ils sont aussi de bons indicateurs de l'efficacité du traitement de l'eau, mais comme leur nombre est moins élevé que celui des coliformes totaux, ces derniers leur sont préférables pour cette fonction (Painchaud, 1997).

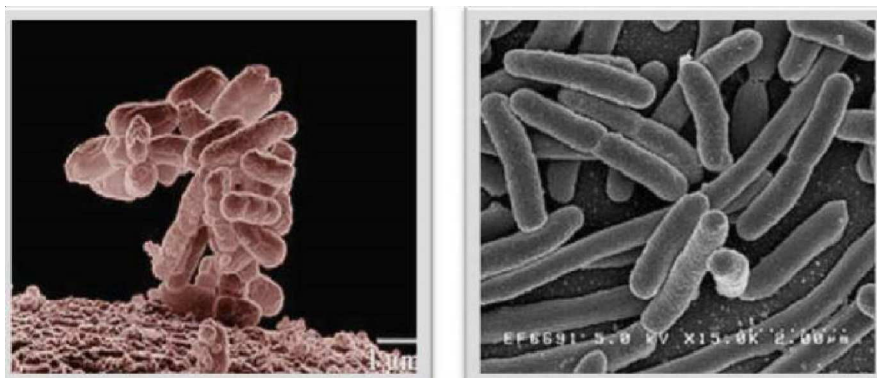


Figure 01 : *Escherichia coli* sous microscope électronique à G X 1000 (Avril *et al.*, 2000)

3.6.1.3. Streptocoques fécaux

Sous cette dénomination générale, il faut entendre l'ensemble des streptocoques possédant la substance (acide teichoïque), antigénique caractéristique du groupe D de Lancefield. Ces streptocoques sont généralement pris globalement en compte comme des témoins de pollution fécale, car tous ont un habitat fécal. Ils sont présents dans le tube digestif et constituent une population importante. Contrairement aux coliformes ils n'ont pas le pouvoir

se multiplier dans l'eau. Connus aussi par l'appellation entérocoques intestinaux, leurs dénombrements sont rarement effectués indépendamment des dénombrements des coliformes et coliformes thermo tolérants. Toutefois, d'une façon générale, les concentrations en streptocoques fécaux sont, dans les milieux naturels autres que ceux spécifiquement pollués par le bétail, inférieurs à celles des coliformes fécaux (Rodier, 2009). La norme exige leur absence dans 100 ml d'eau (Gadin-Goyon, 2002).

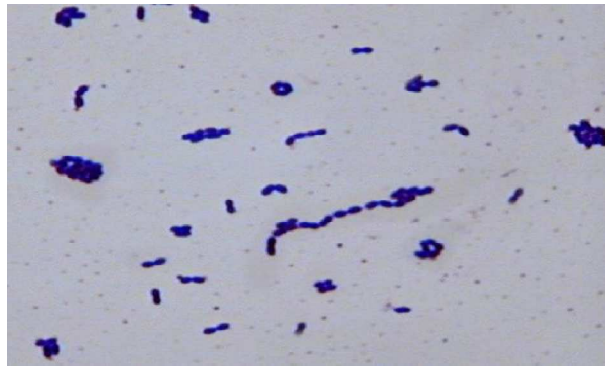


Figure 02: Aspect en microscope optique GX 1000 des entérocoques (Arhab et Chebli, 2021).

3.6.1.4. Clostridies sulfito-réductrices

Ne sont pas seulement d'origine fécale, mais sont des germes ubiquistes, dont la présence dans l'eau est souvent révélatrice d'infiltration telluriques, ou de matières organiques en putréfaction, bien que *C. perfringens* soit un indicateur assez spécifique de la pollution liée aux déjections animales. La présence de ces spores permet donc de détecter une contamination ancienne ou intermittente. Leur absence indique une bonne protection des nappes. La norme tolère la présence d'une spore dans 20 ml d'eau (Gadin-Goyon, 2002).



Figure 03: Photographie de *Clostridium perfringens* observée au microscope optique GX1000 (Pourcher, 2007).

3.6.1.5. Salmonelles

Ce sont des coccobacilles appartenant à la famille des entérobactéries, généralement considérés comme pathogènes bien que leur virulence et leur pathogénie varient énormément : fièvre typhoïde, gastroentérite (Dellarras, 2003). Humains et animaux peuvent éliminer dans les selles des salmonelles, non seulement en cas de maladie mais aussi tant que porteur asymptomatique. Les salmonelles peuvent être présentes dans les eaux usées d'origine agricole et domestique, les eaux douces y compris les eaux potables et les nappes phréatiques ainsi que l'eau de mer (Rodier *et al.*, 2009).



Figure04: Images des Salmonelles sous microscope à un GX 12 000(Chebli et Arhab, 2021).

3.6.1.6. Vibrion cholérique

Le vibrion cholérique appartient à la famille des *vibrionaceae*. Ce sont des germes d'habitat fécal, on distingue deux variétés responsables de choléra, il s'agit du *vibrion cholerae* et *vibrion cholerae el Tor*(Rodier, 2005).

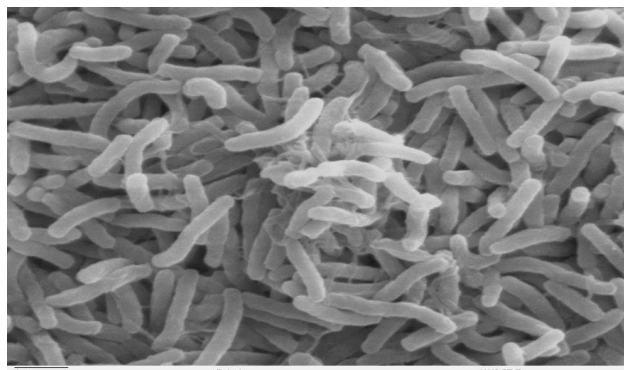


Figure 05: Vibrions cholériques observé en microscope Électronique à balayage (Arhab et Chebli, 2020).

3.6.2. Parasites de l'eau

La recherche des agents infectieux dans l'eau ne se limitent plus à la recherche des bactéries, en effet, suite à des épidémies parfois importantes, les parasites ont été identifiés et peuvent donc maintenant être recherchés dans les eaux. L'OMS a classé les parasites, en 2003 parmi les agents pathogènes émergents. Ce classement fait suite à l'observation d'une augmentation significative de cas d'épidémies d'origine hydrique liées aux parasites à travers le monde (Babou et M'zyene, 2018).

3.6.3. Virus de l'eau

Les virus transmis par voie oro-fécale provoquent de grandes épidémies, l'eau joue un rôle majeur dans leur transmission. Parmi les virus présents dans l'eau, on compte le virus de l'hépatite A ; le virus de l'hépatite E plutôt confiné dans les milieux tropicaux, le virus commun des gastroentérites, les adénovirus, les Reovirus, le plus souvent les virus sont adsorbés aux matières en suspension et décantent avec elles, aussi bien la désinfection au rayonnement UV est efficace pour les détruire (Benkaddour, 2016).

4. Epidémies d'origine hydrique

Une épidémie (du grec *epi*= sur et *démos* = peuple) est définie comme étant l'augmentation et la propagation inhabituellement rapides, dans une collectivité ou un territoire donné et pendant une période de temps limitée, du nombre de cas d'une maladie transmissible. Il est maintenant évident que l'eau constitue un important vecteur de transmission des microorganismes pathogènes responsables d'épidémies, les pathogènes se transmettant par l'eau peuvent être des virus, des bactéries et des parasites. Divers événements d'éclousions microbiennes ont marqué l'histoire de la santé publique et de la microbiologie de l'eau, en particulier, celles de deux bactéries, *Vibrio cholerae* et *Salmonella enterica serovar Typhi* (Bernier, 2007). Les tableaux en annexe 01 et 02 nous montrent les différentes maladies transmissibles par l'eau d'après (Bernier, 2007 ; Pierre *et al.*, 2009).

Chapitre 02

Détection des bactéries et biocapteurs

Au cours des dernières décennies, les évolutions considérables des méthodes analytiques mises en jeu dans les domaines de la médecine, de l'agro-alimentaire ou le contrôle de l'environnement, ont nécessité le développement des techniques de détection d'agents contaminants (bactéries pathogènes en particulier) de plus en plus rapides et sélectives. Dans ce contexte, l'utilisation de capteurs représente une solution potentiellement économique pour réaliser des mesures de contamination in situ (Sbouï, 2016).

1. Méthodes conventionnelles classiques de détection des bactéries

Il existe plusieurs méthodes classiques de détection des bactéries, parmi elle on cite :

1.1.Méthodes par culture

Elles sont basées sur la révélation visuelle de réactions métaboliques simples. Ces tests incluent les techniques de fermentation en tubes multiples/nombre le plus probable et la filtration sur membrane(Bernier, 2007).

1.1.1. Nombre le plus probable NPP (milieu liquide)

Le NPP est une évaluation statistique du nombre de bactéries et non le décompte réel de bactéries présentes. Ce besoin d'interprétation découle du fait que les entités qui donnent lieu à des colonies ou à de la croissance en milieu liquide, ne sont pas des bactéries libres mais probablement des agglomérats de bactéries nommés unités formatrices de colonies (UFC). L'unité de la table de NPP est donc l'UFC/100 ml (Bernier, 2007).

1.1.2. Filtration sur membrane (milieu solide)

Cette technique de détection consiste à filtrer un échantillon d'eau (100 ml) pour récupérer les bactéries sur une membrane de faible porosité (0.45 μm), grâce à l'aspiration exercée par une pompe à vide. La membrane est ensuite incubée sur un milieu gélose à des températures déterminées et pendant un intervalle de temps qui dépend de la méthode utilisée. Des techniques de filtration sur membrane (FM) sont disponibles pour la détection des indicateurs de contamination fécale et tout autre pathogène bactérien pour lequel il existe une méthode de culture (Bernier, 2007).

1.2.Méthode Enzyme-LinkedImmunsorbantAssay(ELISA)

Le test ELISA a été, à l'origine développé pour détecter les anticorps circulants. Il s'agit d'un procédé (immuno absorption enzymatique) qui permet de doser les antigènes (corps considéré comme étranger par l'organisme) et les anticorps grâce à l'utilisation d'un marqueur

(molécule dont la détection permet d'identifier ces éléments). Dans la méthode ELISA, ces marqueurs sont des enzymes.

Les tests ELISA sont réalisés sur des plaques de microtitration, en polystyrène ou en polychlorure de vinyle. Ces plaques sont translucides et comportent de nombreuses micros cavités dans lesquelles sont déposés les échantillons. En premier lieu, les antigènes sont déposés dans les cavités qui sont ensuite rincées pour éliminer les Ag en excès, une fraction de ces Ag est restée fixée aux parois des cupules par liaisons hydrophobes.

Successivement l'opération est répétée avec un anticorps primaire puis secondaire, qui lui est liés de façon covalent à la peroxydase oxyde différentes molécules qui, en fonction de leur degré d'oxydation vont présenter des couleurs différentes. Il existe plusieurs types d'Elisa (Pierron, 2005) :

- ✓ Elisa directe
- ✓ Elisa indirecte
- ✓ Elisa compétitive
- ✓ Elisa sandwich.

1.3. Méthode de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Ces méthodes sont fondées sur l'utilisation d'une enzyme ADN polymérase qui permet de recopier à partir d'une amorce (amorce d'ADN) une séquence cible (ADN cible) connue. La PCR fournit une méthode ingénieuse afin d'amplifier spécifiquement une séquence d'ADN de façon exponentielle *in vitro*. Cette méthode publiée par Mullis *et al.* en 1987, repose sur la succession de cycles d'amplification. Elle est constituée d'une trentaine de cycles, chacun d'eux comportant trois étapes essentielles :

- ✓ La dénaturation thermique des ADN double brin en ADN simple brin ;
- ✓ L'hybridation de deux oligonucléotides (couples d'amorces) de part et d'autre de la séquence à amplifier (sur les brins cibles dénaturés) ;
- ✓ L'extension ou élongation enzymatique des amorces par une ADN polymérase thermorésistante. Cette dernière phase permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire par une ADN polymérase ADN dépendante thermostable (la *Taq* polymérase étant la plus utilisée). Elle reste fonctionnelle tout au long de la PCR (Payet, 2018).

2. Biocapteurs

2.1. Historique

En 1950, Leland Clark a développé le premier capteur pour mesurer la concentration d'oxygène dissout dans le sang. Sa collaboration avec Lyons en 1962, a permis l'évolution de ce biocapteur en l'associant à une membrane enzymatique contenant la glucose-oxydase, et une électrode à oxygène dans le but d'évaluer la concentration en glucose dans le sang.

Cinq années plus tard, Updike et Hicks ont élaboré une électrode enzymatique permettant le dosage du glucose dans des solutions biologiques. A la fin des années 70 (1969), Georges Guilbault a élaboré un dispositif pour le dosage de l'urée dans le sang et l'urine (Sbouï, 2016).

2.2. Définition et principe de fonctionnement

Un biocapteur est généralement défini comme étant un outil analytique qui convertit une réponse biologique en un signal physique mesurable. Il associe une membrane, appelée biorécepteur, qui comprend une espèce biologique permettant la reconnaissance sélective de la molécule recherchée, et un transducteur permettant de détecter et/ou de quantifier les biomolécules dans les aliments, l'environnement ou dans les liquides biologiques (Guinlet, 2017). la figure suivante nous montre le schéma d'un biocapteur

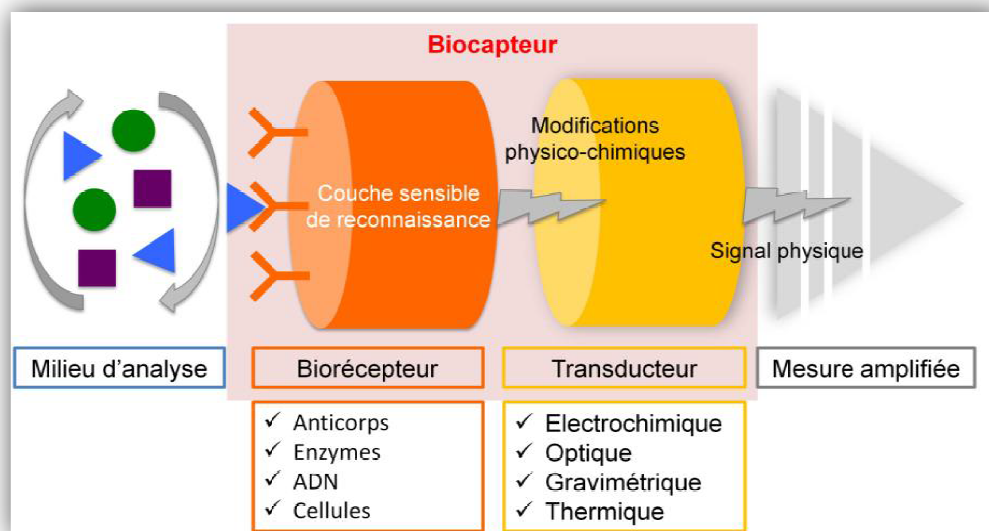


Figure 06 : Schéma d'un biocapteur (Guinlet, 2017).

Selon l'Union internationale de la Chimie Pure et Appliquée (IUPAC), un biocapteur doit être petit et compact, avoir un signal réversible, donner des déterminations précises et établir une connexion réelle entre le matériel biologique et le transducteur. Le choix du

biorecepteur dépend de l'analyte recherché. Au fil des années, différents biorecepteurs ont été utilisés. Il est possible d'utiliser toute molécule biologique permettant l'analyse spécifique de l'analyte cible. Les plus communs sont les enzymes, les acides nucléiques, les récepteurs de molécules biologiquement actives (hormones, toxines, facteurs de croissance, neurotransmetteurs), les cellules entières, les organites cellulaires et les anticorps (Guinlet, 2017).

Chaque événement ayant lieu au niveau du biorecepteur peut produire un changement qui est transformé en un signal électrique quantifiable par le transducteur. Le type de transducteur est choisi en fonction des modifications biochimiques se produisant au niveau du biorecepteur. Le transducteur convertit ces changements en signaux électriques mesurables qui sont amplifiés et traités par des circuits électroniques. Les plus utilisés reposent sur l'optique, la calorimétrie, la piézoélectricité et l'électrochimie. Les performances des biocapteurs sont caractérisées par différents paramètres (Montrose, 2013) :

- ✓ **La sélectivité** : l'aptitude à détecter l'espèce cible à l'exclusion de toute autre. Ce paramètre dépend principalement du biorecepteur, bien que le choix du transducteur puisse contribuer à une bonne sélectivité.
- ✓ **La sensibilité** : le rapport entre la réponse du capteur et la variation correspondante de la grandeur à mesurer.
- ✓ **La reproductibilité** : la capacité du biocapteur à donner des réponses très voisines pour des mesures répétées de la même quantité d'analyte à mesurer.
- ✓ **La limite de détection** : la plus petite valeur de la grandeur à mesurer pouvant être détectée de façon significative.
- ✓ **L'exactitude** : c'est l'accord entre le résultat de la mesure et la valeur vraie de la grandeur mesurée ; l'écart est appelé erreur absolue.
- ✓ **La durée de vie** : période pendant laquelle les caractéristiques du capteur permettent son utilisation avec un degré de précision suffisant.
- ✓ **La dérive** : l'évolution de la ligne de base du capteur en l'absence de l'espèce cible.

2.3. Domaines d'applications

Les domaines d'application des biocapteurs sont nombreux, les tableaux en annexes 05/A et 05/B recensent quelques domaines et leurs usages (Kengne-Momo, 2011).

2.4. Composants d'un biocapteur

Les principaux composants d'un biocapteur sont : le biorécepteur et le transducteur, la figure 07 résume la famille des biorécepteurs et transducteurs existants (Kengne, 2011).

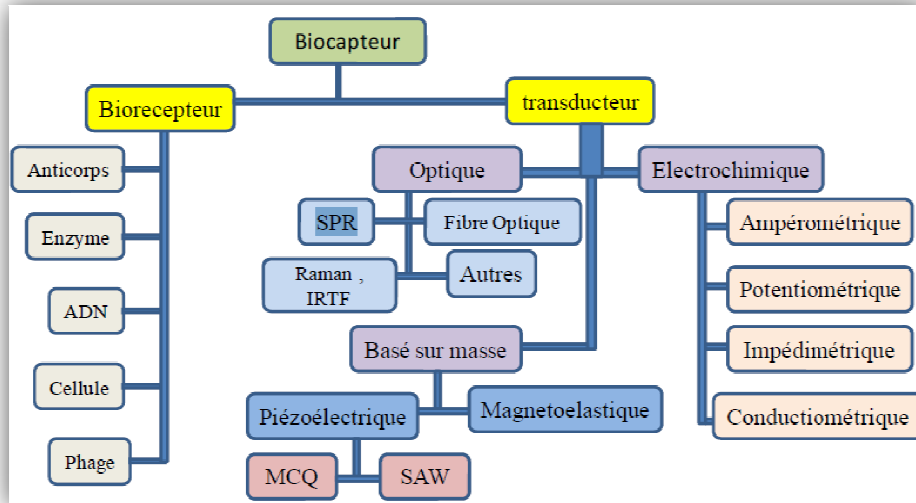


Figure 07 : Famille des biorécepteurs et transducteurs (Kengne, 2011).

2.4.1. Biorécepteur

Le biorécepteur constitue la surface utilisée pour capter la cible à l'aide de capteur. Le capteur peut différer selon l'intérêt du biocapteur, il est possible d'utiliser soit des anticorps, des enzymes, des oligonucléotides, des ligands, etc. Le capteur utilisé dépend beaucoup de la cible, qui peut être une protéine, une cellule, un gène, un Antigène, etc. La surface utilisée va dépendre du type de biocapteur souhaité. Ces biorécepteurs sont majoritairement classés en deux catégories : les biorécepteurs catalytiques et ceux d'affinité (Choinière, 2018).

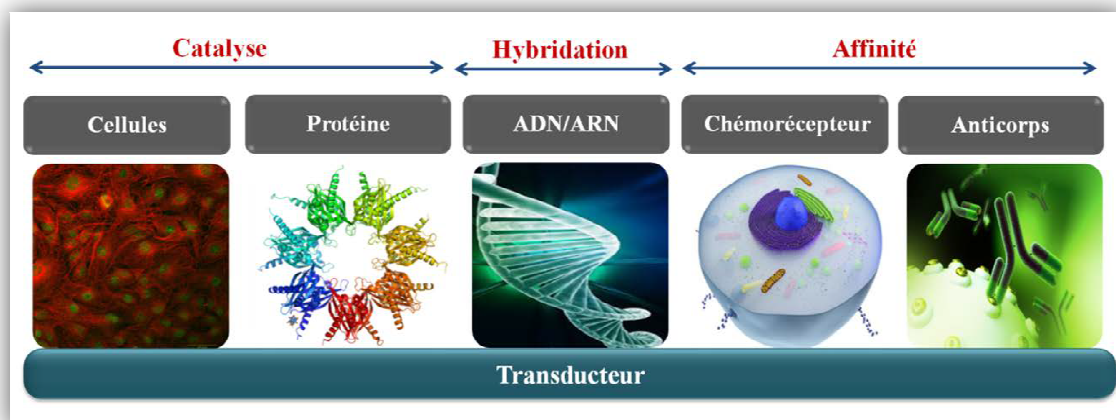


Figure 08 : Représentation schématique de quelques biorécepteurs(Sbouï, 2016).

2.4.1.1 Biorécepteur d'affinité

Ils permettent une reconnaissance hautement spécifique d'une molécule biologique ciblée, deux biorécepteurs d'affinité sont majoritairement exploités dans le monde des biocapteurs (Mathélié-Guinlet, 2017).

A. Anticorps : il s'agit de protéines reconnaissant spécifiquement un antigène donné au sein d'un système biologique. Il s'ensuit une réaction immunitaire spécifique. Les anticorps possèdent un fragment cristallisable, commun aux anticorps d'une même espèce et un site d'accroche spécifique à un antigène donné, la fixation entre les deux systèmes est assurée par des sites de reconnaissance spécifique, appelés paratopes et épitopes respectivement pour l'anticorps et l'antigène (figure 09).

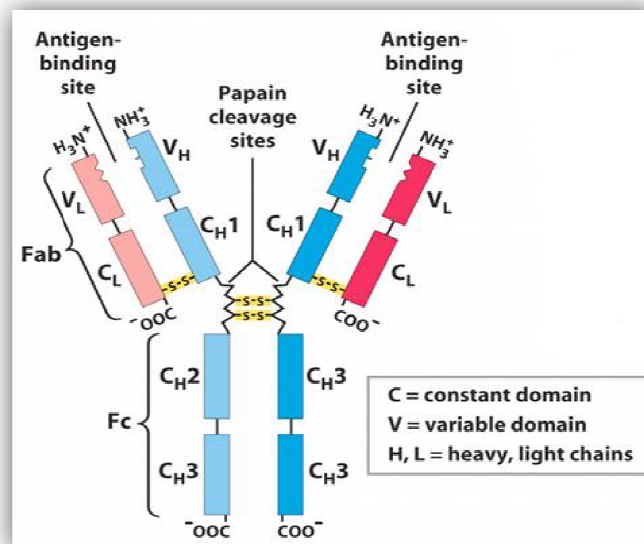


Figure 09 : Structure schématisée d'un anticorps (Mathélié-Guinlet, 2017).

Dès lors que l'immobilisation des anticorps à la surface du transducteur est optimale, dès lors que les sites récepteurs sont orientés uniformément et correctement, la reconnaissance garantit donc une détection robuste, sensible et rapide des analytes. Toutefois, cela nécessite que l'antigène complémentaire ne soit pas dénaturé et que les conditions de couplage soient favorisées. Cette technique est donc conditionnée par les caractéristiques de l'environnement analytique (pH, force ionique, température...). Bien qu'il existe de nombreuses protéines dans la nature qui permettent des liaisons d'affinité spécifiques (les récepteurs membranaires par exemple), les propriétés spéciales des anticorps en font le choix le plus populaire pour les essais de liaison aux protéines. Les avantages des anticorps sont nombreux. Ils sont stables,

solubles, sélectifs. Leur préparation et leur immobilisation sont bien décrites. Ils sont disponibles sous forme de mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes d'un même antigène, dénommés anticorps polyclonaux, ou pour reconnaissant un seul épitope (anticorps monoclonaux) (Hassani, 2018). Notre étude fera appel au Biorécepteur anticorps (**anticorps de la bactérie *Escherichia coli***).

B. ADN : bien que moins répandues, les bio-puces à ADN ont suscité un intérêt considérable ces dernières années dans le diagnostic précoce de maladies, notamment les cancers. Elles reposent sur l'hybridation de brins d'ADN, immobilisés à la surface du transducteur (optique ou électrochimique) avec ceux, complémentaires, présents au sein du milieu analysé. Les enchainements nucléotidiques complémentaires étant uniques, ces biorécepteurs garantissent l'ultra-spécificité et l'infailibilité du biocapteur qui les accueille.

2.4.1.2 Biorécepteurs catalytiques

Les enzymes sont des protéines possédant la capacité de catalyser une réaction de transformation chimique d'un substrat donne. Elles peuvent sans être détruites, générer une très grande quantité de produits de réaction ciblée en un temps très court (seconde), quantité qui sera aisément détectée par le transducteur. Cette activité confère aux biocapteurs des temps de réponse court et des possibilités de miniaturisation élevées. Toutefois, la dénaturation des enzymes, suite à des variations de température ou pH, inhibant alors leur capacité catalytique rend leur utilisation de moins en moins fréquente (Mathélié-Guinlet, 2017).

2.4.2 Transducteurs

Le transducteur constitue un dispositif qui permet de mettre en évidence la réaction entre le récepteur et la cible. Il peut se composer d'un procédé utilisant l'acoustique ou l'optique afin d'analyser la réaction. Il peut aussi consister en un potentiomètre, un ampèremètre, un résonateur, etc. (Choinière, 2018). Le choix du transducteur dépend de (Sbouï, 2016):

- Type de réaction et de substances consommées ou libérées : modification de charge, de pH, variation de la fluorescence...
- Utilisation du biocapteur : un biocapteur pour les analyses biomédicales doit être à usage unique alors qu'un biocapteur pour les analyses environnementales doit être robuste...

- Possibilités interférences : dans les milieux troubles une détection optique n'est pas recommandée.

Généralement il existe quatre types de transducteurs (Montrose, 2013):

- **Transducteur optique**, mesurant des changements tels que l'absorption optique, la fluorescence ou l'indice de réfraction,
- **Transducteur piézoélectrique**, mesurant un changement de masse,
- **Transducteur thermique**, mesurant le changement de température accompagnant une réaction,
- **Transducteur électrochimique**, basé sur le changement des propriétés électriques ou la production d'espèces redox.

2.5. Transduction d'intérêt (électrochimique)

Les méthodes de transduction électrochimique sont très populaires dans le domaine des biocapteurs, non seulement pour des raisons historiques, le premier biocapteur mis au point en 1962 est électrochimique, mais aussi pour leur simplicité. Le principe des biocapteurs électrochimiques repose sur une réaction d'oxydoréduction ou une modification de conductivité électrique au niveau de l'interface, qui modifie un signal électrique suite à la fixation de l'élément à analyser. La détection électrochimique est fiable avec une limite de détection basse et un coût de revient très faible. De plus, ces transducteurs sont facilement miniaturisables. En revanche, ils peuvent manquer de sélectivité, la figure 10 montre les différentes composantes (Montrose, 2013).

Un capteur électrochimique est généralement un système composé de deux ou trois électrodes, une de travail, une de référence et une auxiliaire. Il existe différents types de biocapteurs électrochimiques qui sont classés selon leur mode de transduction (Montrose, 2013 ;Kahlouche, 2018):

- ✓ Ampérométrie, mesurant un changement de courant à un potentiel donné,
- ✓ Conductimétrie, mesurant un changement de conductivité ou de transport de charges,
- ✓ Impédancemétrie, mesurant un changement d'impédance.
- ✓ Potentiométrie, basée sur la mesure de la différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence .La détermination des potentiels d'électrode permet de connaître directement la concentration du corps à doser : le signal obtenu est proportionnel au logarithme de la concentration (loi de Nernst).

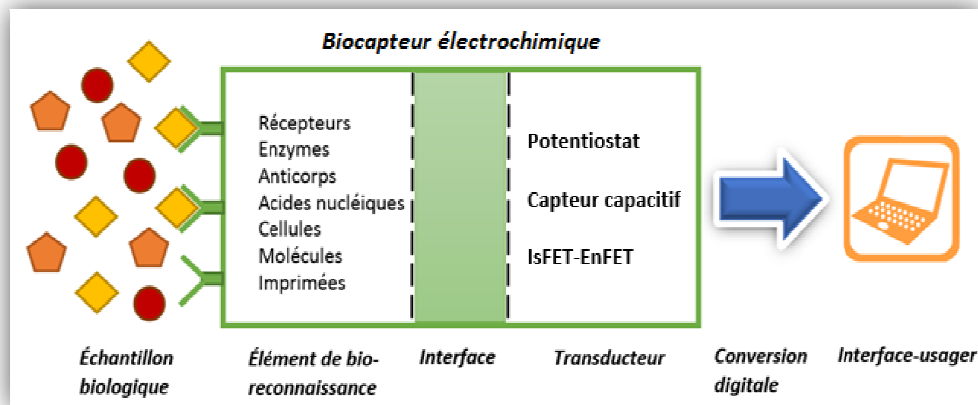


Figure 10: Composants généraux d'un biocapteur électrochimique (Massicotte, 2013).

2.6. Biocapteurs d'intérêt (immunologiques)

Le réactif biologique est constitué des anticorps spécifiques dirigés contre le polluant recherché. Ces anticorps sont préparés par procédés biotechnologiques ; leur degré de spécificité vérifié préalablement conditionnera les performances du capteur. La présence du polluant dans le milieu analysé traduite par sa fixation sur l'anticorps pourra être suiviedirectement si les anticorps sont fixés sur une membrane piézoélectrique. A côté des détecteurs piézoélectriques il existe des transducteurs optiques et ampérométriques. La liaison à l'anticorps est mesurée indirectement à l'aide d'un traceur facile à analyser quantitativement. L'analyse en système compétitif nécessite deux réactifs : l'anticorps spécifique et la substance antigénique analogue au polluant recherché mais marquée par le traceur ; la substance marquée entrera en compétition avec le polluant pour les sites de liaison à l'anticorps. La quantité de traceur fixée aux anticorps sera inversement proportionnelle à la concentration du polluant dans le milieu(Osbildetal.2015).

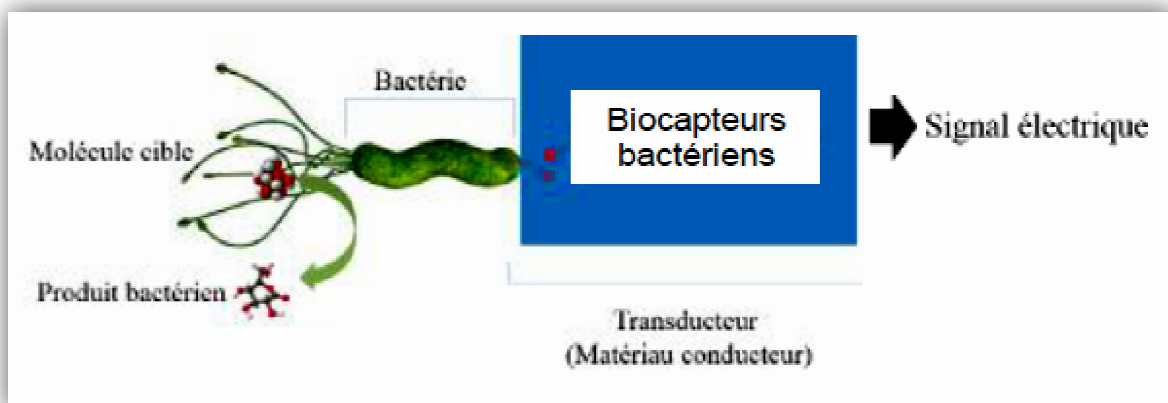


Figure 11 : Schéma d'un biocapteur bactérien (Osbildet al.,2015).

2.7. Méthodes d'immobilisation des biorécepteurs

Les stratégies d'immobilisation des biorécepteurs sont utilisées pour construire des biocapteurs stables et prêts à l'utilisation. Ces méthodes sont choisies pour garder une meilleure stabilité de l'élément biologique et pour adapter une architecture appropriée à la détection des analytes. Ces méthodes sont basées sur la création de liaisons chimiques ou physiques pour attacher le biorécepteur (enzyme, anticorps ; ADN, cellule, tissus....) à la surface solide du transducteur. Les méthodes les plus couramment utilisées sont : la réticulation, le piégeage, le couplage covalent, l'adsorption et l'encapsulation (Bensana 2020).

Dans notre cas nous avons utilisé un **couplage covalent** qui est une méthode basée sur la pré-activation de la surface de l'électrode par des réactifs multi fonctionnels avant le dépôt de l'anticorps tels que les groupements carboxyles, hydroxyles, amides et amines qui pourraient être utilisées pour lier des molécules d'anticorps.

3. Bactéries pathogènes et biodétection

Les bactéries ont généralement une taille comprise entre 0.5 et 5 μm , présentant différentes morphologies : cocci sphériques, bacilles en forme de bâtonnets et des spirilles ou des spirochètes en spirale. Contrairement aux cellules eucaryotes, la plupart des bactéries sont encapsulées par une paroi cellulaire qui est présente à l'extérieur de la membrane cytoplasmique (voir figure 12). La paroi cellulaire comprend principalement du peptidoglycane, une matrice polymère chargée négativement comprenant des chaînes réticulées de sucres aminés, à savoir la N-acétylglucosamine et l'acide N-acétylmuramique. Les bactéries peuvent être classées comme Gram positif ou Gram négatif selon l'architecture et l'épaisseur de la paroi cellulaire. Les bactéries Gram-positives conservent la coloration Gram violette en raison de leur épaisse couche de peptidoglycane à l'extérieur de la membrane cellulaire. En revanche, les bactéries Gram-négatives ne prennent pas la tâche, car leur couche de peptidoglycane plus mince est prise en sandwich entre deux membranes cellulaires. La membrane lipidique externe des bactéries à Gram négatif contient également des lipopolysaccharides (LPS), qui agissent comme des endotoxines et provoquent une forte réponse immunitaire chez les humains, ainsi que diverses protéines, y compris les porines. La paroi épaisse de peptidoglycane entourant les bactéries Gram-positives contient des composants supplémentaires tels que des lipides, des protéines de surface et des glycoprotéines. Les bactéries pathogènes à Gram négatif comprennent *Escherichia Coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Légionnelle*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*. Des exemples de bactéries Gram-positives

pathogènes comprennent *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Clostridium* (Kahlouche, 2018).

Le développement des biocapteurs pour des microorganismes entiers est difficile. En effet, ils nécessitent la détection d'analytes beaucoup plus grands (échelle micrométrique) que les analytes moléculaires typiques tels que les protéines (échelle nanométrique) et les bactéries. Ces dernières présentent de nombreux épitopes de surface pouvant entraîner des interactions non spécifiques avec la surface du capteur (Kahlouche, 2018). Voir figure 12

Dans notre travail, notre biocapteur va cibler la bactérie *Escherichia coli*.

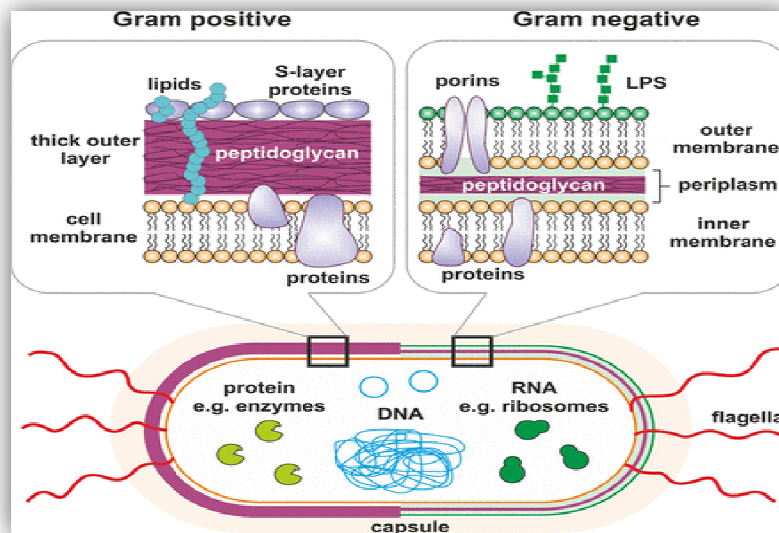


Figure 12 : Architecture bactérienne et cibles pour la biodétection. Les deux types de bactéries peuvent avoir des flagelles. Les cibles intracellulaires pour la biodétection comprennent les protéines, l'ADN et l'ARN (Kahlouche, 2018).

4. Bactérie d'intérêt (*Escherichia Coli*)

Escherichia coli est une bactérie fortement utilisée comme modèle en laboratoire grâce à ses grandes capacités biotechnologiques dues à sa croissance rapide et son génome plutôt simple, bien caractérisé et facile à manipuler. Elle est, de loin, la bactérie la plus utilisée, et cette vaste expérience dicte qu'elle est toujours choisie en premier lieu comme modèle (Lee, 1996).

4.1. Description biologique et origine de la bactérie

Escherichia coli (*E. coli*) est l'espèce type du genre *Escherichia* des entérobactéries. Appelée communément "colibacille" c.-à-d. "Bacille a colon". *E. coli* est un habitant de l'intestin et les

selles des animaux et des reptiles à sang chaud. Cette espèce qui a fait l'objet d'un très grand nombre d'études constitue le modèle des bacilles à Gram- aérobies. La plupart des *E. coli* se multiplient rapidement (18 à 24 h) sur les milieux habituels. Les colonies ont en moyenne 2 mm de diamètre, et 2 à 4 microns de long sur 0.4 à 0.6 μm de large. Elles sont rondes, plates et a bords réguliers comme montré dans la figure 13. C'est une protéobactéries, polynucléaires, neutrophiles, commensale, saprophytes (Boucenina, 2018). Voir fiche technique d'*Escherichia coli* en Annexe 03.

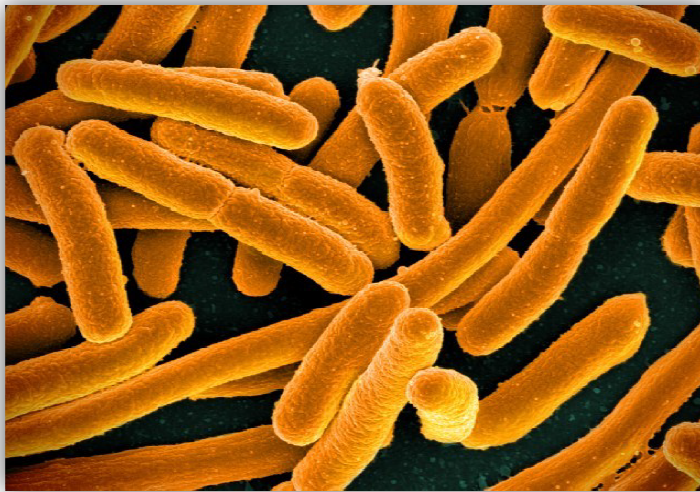


Figure 13: Illustration d'une colonie d'*Escherichia coli* (Bourget-Boulanger, 2020)

4.2 . Problèmes sanitaires liée à la bactérie

C'est une bactérie vivant principalement dans les intestins des animaux et les humains. Elle peut être excrétée et se retrouver dans la nature, principalement les sources d'eau douce. Elle possède une bonne capacité d'adaptation et de survie, et est ainsi utilisée comme indicateur de contamination dans les échantillons d'eau environnementale, due à sa présence presque universelle dans les selles humaines. La plupart des souches *E. coli* sont non pathogènes, mais certaines le sont grâce à la production de toxines (figure 14). Comme la souche *E. coli* entéro-pathogène qui cause principalement une diarrhée aiguë et prolongée chez les nouveau-nés ; la souche *E. coli* entérotoxinogène qui cause principalement la diarrhée chez les voyageurs adultes ; la souche entérohémorragique qui cause principalement des diarrhées sanglantes chez l'adulte et l'enfant ; la souche *E. coli* entéro-invasif qui cause la dysenterie bacillaire, une infection aiguë ulcéreuse du gros intestin et finalement ; et la souche *E. coli* uropathogène qui cause principalement des infections urinaires (Choinière, 2018).



Figure 14: Image réelle d'une souche E Coli pathogène indiquant l'organelle responsable de la pathogénicité (Kahlouche, 2018).

4.3. Cycle de vie de la bactérie

En milieu hydrique, la quantité en bactérie *Escherichia coli* est majoritairement d'origine urbaine par les rejets sanitaires des villes ainsi que d'origine agricole par les engrais de fumier. Cette bactérie passe donc d'un milieu favorable pour sa croissance à un milieu rude où de nombreux facteurs influencent sa persistance dans ce nouvel habitat. La figure 15 illustre les deux phases de son cycle de vie (Bélière, 2017).

La bactérie se multiplie par fission binaire : la bactérie grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la division, l'ADN se duplique ainsi que les autres constituants. Divers systèmes enzymatiques de synthèse et de dégradation participent à la division cellulaire (UMVF, 2014).

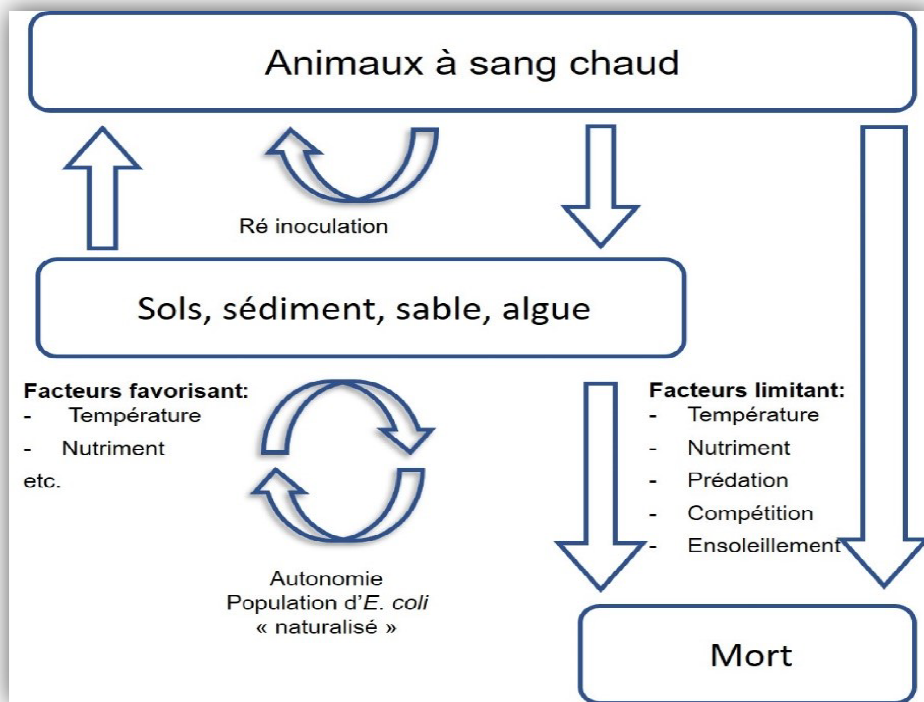


Figure 15: Cycle de vie de la bactérie *Escherichia coli* (Balière, 2017).

4.4. Facteurs influençant la survie d’*E. Coli* dans l’environnement

Plusieurs facteurs influencent le taux de survie d’*Escherichia coli* en milieu naturel. Ce sont des facteurs biotiques et abiotiques résumés dans le tableau 04 (Boulangier, 2020).

Tableau 04 : Facteurs influençant la survie d’*E. coli* dans l’environnement (Elsaset al. 2011 ; Campos et al. 2013 ; Balière, 2017).

Facteurs biotiques	Facteurs abiotiques
<ul style="list-style-type: none"> • Température • pH • Lumière (radiations solaires) 	<ul style="list-style-type: none"> • nutriment • microorganismes compétitifs • microorganismes prédateurs (protozoaires)

Chapitre 03

Matériel et méthodes

1. Objectif de l'étude

Notre présente étude porte sur l'analyse bactériologique des eaux de surface du barrage Taksebt en premier lieu, puis sur la recherche, l'identification et l'isolement de la bactérie *Escherichia Coli* par le biais de la méthode de détection classique en laboratoire, suivi d'un essai d'élaboration d'un biocapteur de type électrochimique visant à détecter cette dernière, et l'étude de son efficacité et sa limite de détection.

2. Zone d'étude

Le barrage de TAKSEBT est situé sur l'OUED AISSI, affluent du Sébaou, à environ 7 km au Sud-est de la ville de Tizi-Ouzou et 100 km à l'Est de la ville d'Alger. (Figure 16)

La retenue créée par le barrage a une capacité de 175 millions de m³ permettant une régularisation de 180 millions m³, destinée à l'alimentation en eau potable et répartie comme suite:

- 173 000 m³/j pour la wilaya de Tizi-Ouzou ;
- 60 000 m³/j pour la wilaya de Boumerdes ;
- 235 000 m³/j pour la wilaya d'Alger.



Figure 16 : Localisation du barrage de Taksebt (Google MAPS, 2021).

3. Lieu et durée de l'étude

Nos travaux de recherche sont réalisés en collaboration entre le laboratoire de traitement des eaux de l'UMMTO et le CDTA d'Alger. La première partie expérimentale ou on a traité la

caractérisation bactériologique classique de l'eau du barrage suivi de l'identification et l'isolement d' *Escherichia Coli*, s'est tenue dans le laboratoire de traitements des eaux de la faculté des sciences biologiques et agronomiques durant le mois de Mai, la deuxième partie qui porte sur la biodétection a été réalisée au sein du CDTA d'Alger durant la période allant du 10/06/2021 au 25/06/2021.

Le CDTA est un établissement public à caractère scientifique et technologique, qui a pour mission de mener des actions de recherches scientifiques, d'innovation technologique, de valorisation et de formation dans divers domaines.



Figure 17: Centre de développement et des technologies avancées (CDTA).

4. Prélèvement et échantillonnage de l'eau

L'étape de l'échantillonnage influence directement la qualité des résultats analytiques obtenus, des précautions élémentaires doivent être prises pour obtenir un échantillon représentatif, pour les eaux de surface le prélèvement doit être fait en forme de U. Les échantillons peuvent être contaminés par un manque de soin dans l'application des techniques d'échantillonnage, d'où il incombe au préleveur de respecter les conditions suivantes :

- Sélectionner convenablement le point d'échantillonnage ;
- Respecter strictement les procédures d'échantillonnage ;
- Conférer une conservation adéquate à l'échantillon.

La préparation du matériel nécessaire, soit ; flacons en verre, marqueur permanent; glacière et blocs réfrigérants; appareil photo...doit se faire préalablement , les flacons doivent être soigneusement lavés, puis rincés à l'eau distillée, ensuite séchés puis fermés et stérilisés à l'autoclave à $121 \pm 1^\circ\text{C}$ durant 15min.

5. Matériels et produits utilisés

- Bec-bunsen
- Rampe de filtration
- Portoirs
- Pince stérile
- Etuve 22 °C, 37 °C, 44 °C
- Bain marie
- Plaque chauffante
- Four pasteur
- Micro pipettes
- Embout stérile
- Pipettes pasteur
- Flacons stériles
- Eprouvettes
- Entonnoirs
- Etiquettes
- Filtres de 0.45µm
- Boîtes de pétri
- Tubes à essais stériles

6. Analyses bactériologiques par la méthode classique

L'analyse bactériologique est basée sur la recherche, le dénombrement et l'isolement des germes suivants :

- Les mésophiles aérobies totaux à 22°C et à 37°C norme NF V08-010 (**ISO 6222**) ;
- Les coliformes totaux (**ISO 9308-2**) ;
- Les coliformes fécaux (**ISO 9308-1**) ;
- Les Streptocoques fécaux (**ISO 7899-2**) ;
- Les germes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridium) (**ISO 6461-2**) ;
- Les Salmonelles (**ISO 6340**) ;
- Les Vibrios cholériques (**ISO 21872-1**).

L'analyse bactériologique peut se faire par trois méthodes différentes qui peuvent être utilisées en fonction du type de germe recherché, et de la disponibilité des milieux de culture à savoir :

- **Filtration sur membrane**

Consiste à faire passer à travers une membrane filtrante de porosité connue (pore de 0.45 µm de diamètre) sur une rampe de filtration, un volume de l'échantillon d'eau à analyser, puis la membrane est retirée pour être mise en culture sur un milieu gélosé d'où les bactéries puiseront les éléments nutritifs nécessaires à leur développement selon le germe recherché puis incubée à une température bien déterminée.

- **Méthode du milieu liquide**

Cette méthode consiste à mettre en culture un volume de l'échantillon d'eau à analyser ou des dilutions faite de cet échantillon dans un milieu de culture adéquat en forme de bouillon, elle compte deux temps : la recherche présomptive puis la recherche confirmative.

- **Méthode par incorporation (milieu solide)**

Consiste à introduire 1 ml de l'échantillon d'eau à analyser dans une boîte de pétri à laquelle on ajoute 10 à 20 ml de gélose fondue puis homogénéiser avec des mouvement en forme 8 et laisser se solidifier .après incubation à une température et un temps déterminé en fonction des germes recherchés on précède au comptage des colonies.

Préparation des milieux de culture et des dilutions

Consiste à faire fondre les milieux gélosés dans un bain marie à une température de 100°C puis les maintenir en surfusion à 45°C jusqu'à l'utilisation. Conformément aux normes AFNOR NF V08-010 et ISO 6887-1, des dilutions successives décimales sont préparés pour chaque échantillon à l'aide d'eau distillée stérile dans des conditions aseptiques, ces dilutions suivent des séries logarithmiques dont les termes sont en progression géométriques : 0.1 ; 0.01 ; 0.001 ; ...

- ✓ Dilution 10^0 : prise directe de la solution (9ml d'eau distillée + 1ml de la solution mère)
- ✓ Dilution 10^{-1} = 1 ml de la dilution 10^0 + 9ml d'eau distillée ;
- ✓ Dilution 10^{-2} = 1 ml de la dilution 10^{-1} + 9ml d'eau distillée ;
- ✓ Dilution 10^{-3} = 1 ml de la dilution 10^{-2} + 9ml d'eau distillée.

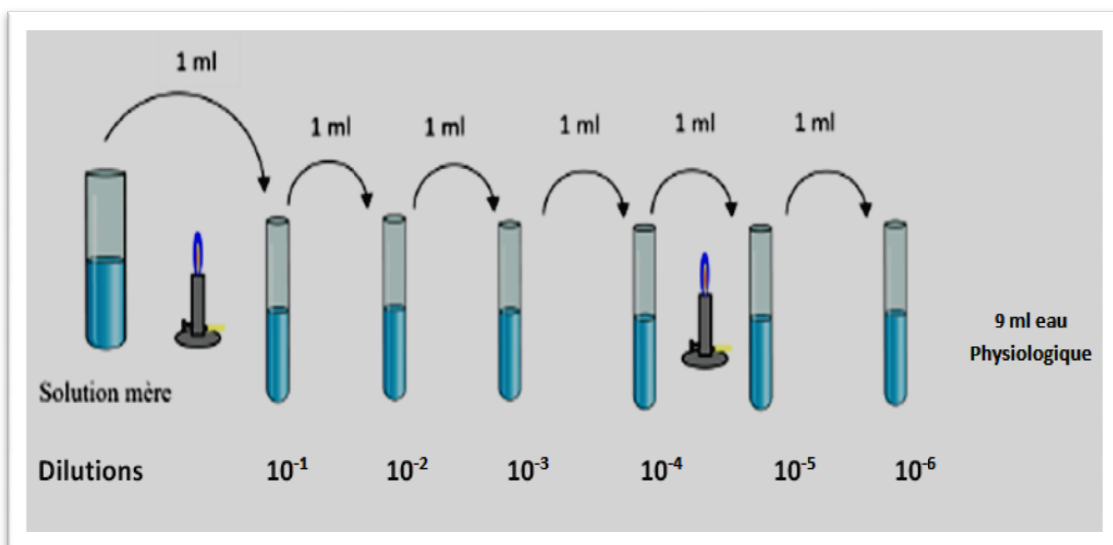


Figure18 : Principe des dilutions. '

6.1. Recherche et dénombrement de la flore aérobie mésophile totale

A partir de l'échantillon d'eau à analyser et des séries de dilutions déjà préparées, porter 1 ml de chaque dilution dans une boîte de pétri vides préparées à cet usage. Verser ensuite dans chacune des boîtes environ 15 ml de gélose TGEA et mélanger avec précaution en mouvement rotatoire puis laisser solidifier. Retourner les boîtes et incuber une série de boîtes à 37 °C et une autre série à 22°C pendant 24h à 48h (figure 19).

La lecture se fait après chaque 24 heures, ou on calcule 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 :

$$N = \frac{\sum \text{Colonies}}{V_{\text{ml}}(n_1 + 0.1n_2) \cdot d_1}$$

- ✓ N : nombre d'UFC par gramme de produit initial ;
- ✓ Σ Colonies: sommes des colonies des boîtes interprétable ;
- ✓ Vml: volume d'inoculum déposé par boîte (1ml) ;
- ✓ n1 : Nombre de boîtes considéré à la première dilution retenue ;
- ✓ n2 : Nombre de boîtes considéré à la seconde dilution retenue ;
- ✓ d1 : Facteur de la première dilution retenue.

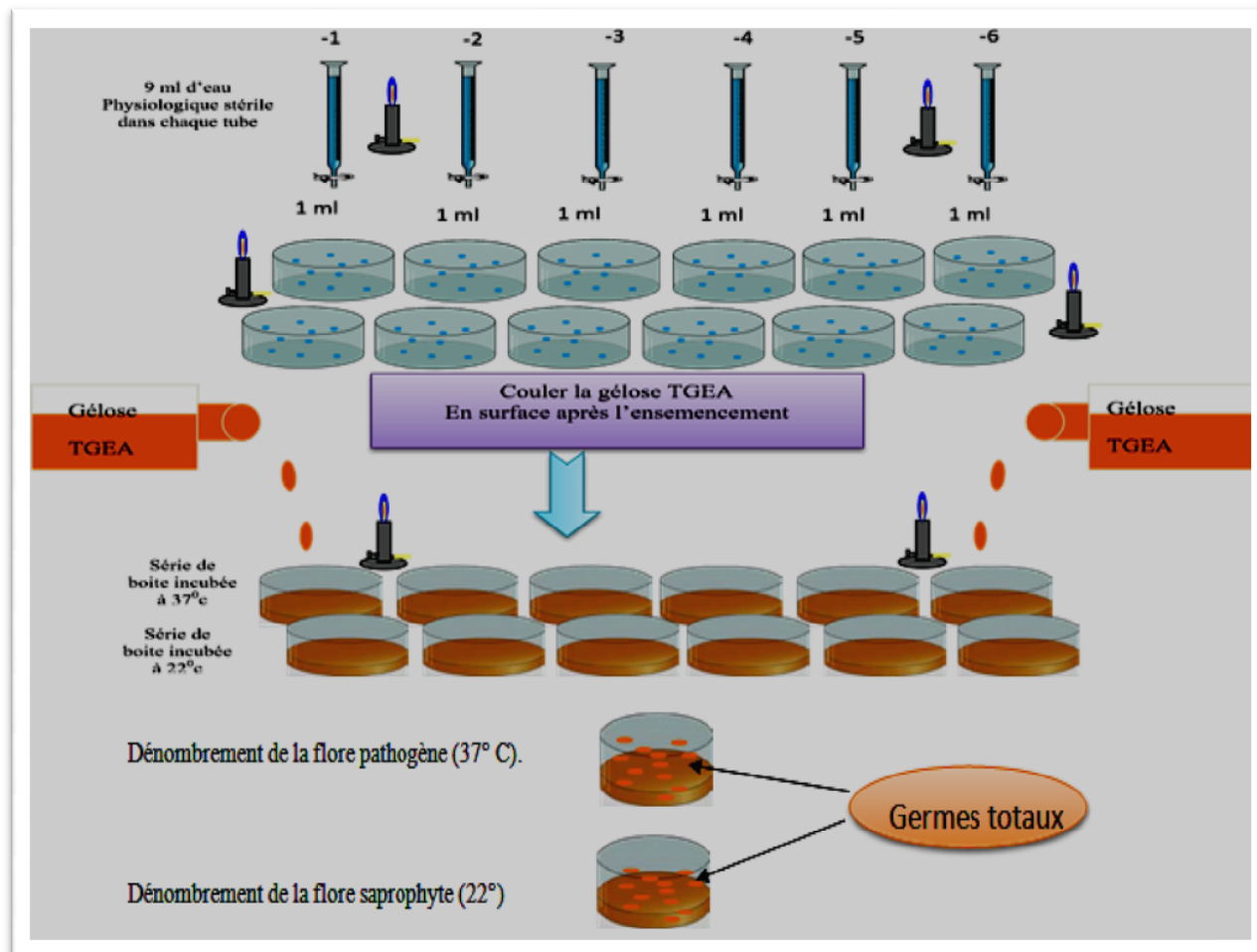


Figure 19 : Dénombrement de la flore mésophile totale.

6.2. Dénombrement des coliformes totaux et Coliformes fécaux

Dans la recherche de ces groupes de germes, nous avons eu recours à deux méthodes, voir :

6.2.1. Méthode du milieu liquide

➤ Test présomptif

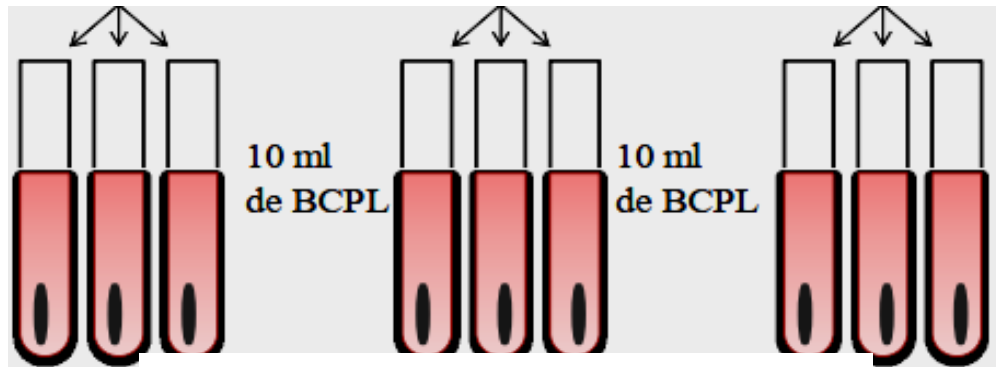
A partir de l'échantillon d'eau à analyser, on ensemence 9 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL (S/C), puis on chasse le gaz présent éventuellement dans les cloches et bien mélanger le milieu. (Figure 20)

- 3 fois 1 ml de la dilution 10^{-1} dans 3 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL (S/C) muni d'une cloche Durham.
- 3 fois 1 ml (10^{-2}) dans 3 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL (S/C) muni d'une cloche Durham.
- 3 fois 1 ml (10^{-3}) dans 3 tubes contenant 10 ml de milieu BCPL (S/C) muni d'une cloche Durham.

L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures. On considère comme positif(+); les tubes

présentant à la fois un dégagement de gaz (supérieur à 1/10 de la hauteur de la cloche) et un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune, (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu). La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table de MacGrady NPP (Voir Annexe 08).

1ml de la dilution 10^{-1} 1ml de la dilution 10^{-2} 1ml de la dilution 10^{-3}



Incubation à 37°C pendant 24h

Figure 20: Dénombrement des coliformes totaux et fécaux (Test présomptif)

➤ Test de confirmation

Après agitation, prélever de chacun des tubes positifs quelques gouttes à l'aide d'une pipette pasteur pour faire le repiquage dans un tube contenant le milieu Schubert muni d'une cloche Durham. Chassez le gaz présent éventuellement dans les cloches et bien mélanger le milieu. L'incubation se fait à 44°C pendant 24 heures. On considère comme positifs(+) les tubes présentant à la fois un dégagement du gaz (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche, un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par *Escherichia coli* après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs. La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table du NPP (voir Annexe 08). La figure 21 nous résume le protocole.

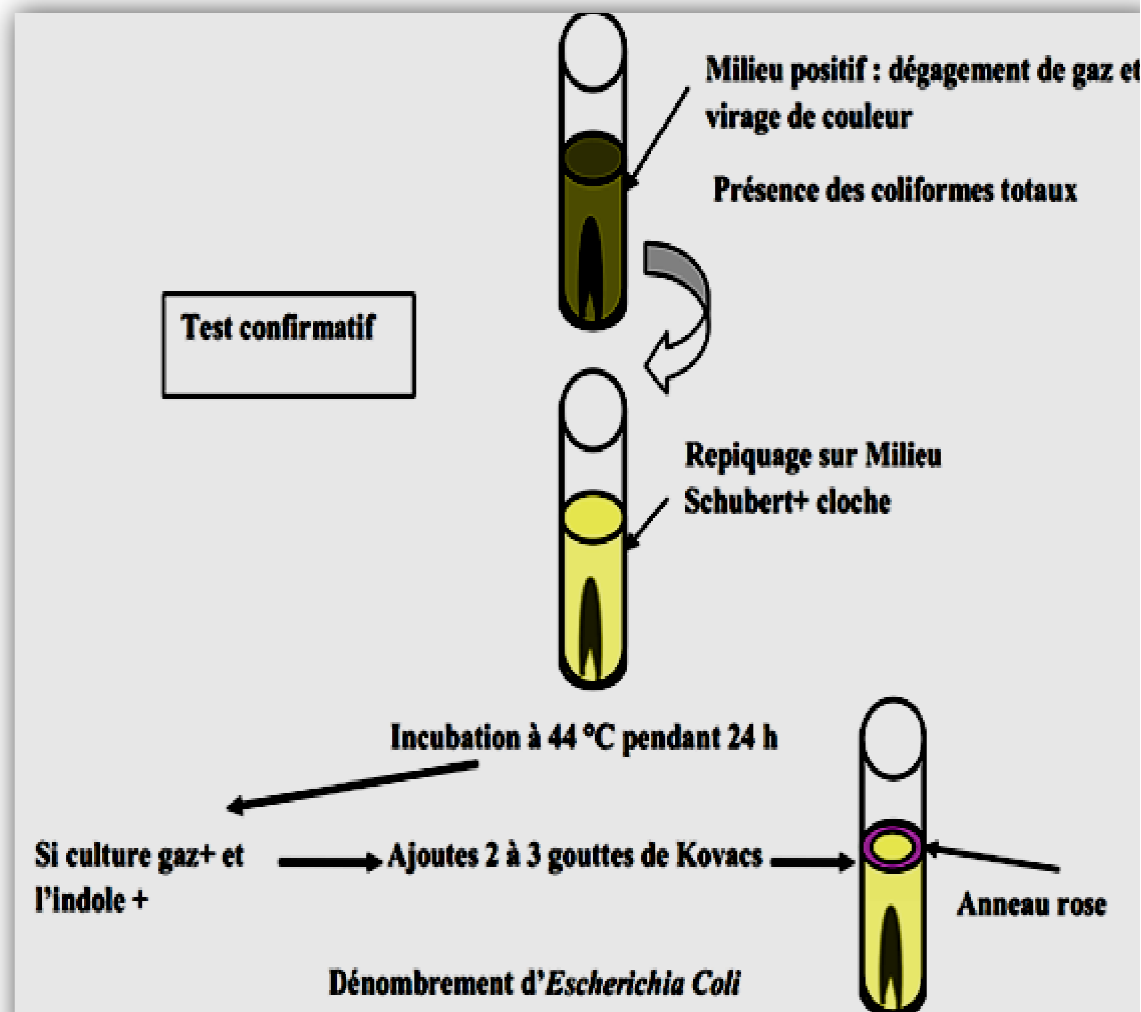


Figure 21: Dénombrement des coliformes totaux et fécaux (test de confirmation)

6.2.2. Méthode du milieu solide

La recherche des coliformes fécaux et totaux sur milieu solide consiste comme à suivre les étapes ci-dessous :

- Stériliser l'entonnoir gradué en verre ainsi que le filtre poreux ;
- Flamber la pince et déposer dans des conditions d'asepsie la membrane sur le filtre ;
- Fixer le dispositif avec la pince ;
- Verser aseptiquement l'échantillon à analyser ;
- Actionner la pompe à vide, une fois l'eau aspirée transférer la membrane sur gélose TTC préalablement préparée.
- Incuber les boîtes de, pétries couvercle en bas à 37°C, pendant 24h à 48h pour les coliformes totaux, et à 44°C pendant 24heures pour les coliformes fécaux.

- Considérer les colonies lactose positif comme caractéristiques des coliformes, quelle que soit leur taille, si le milieu présente une coloration jaune sous la membrane.
- Repiquer, de préférence, toutes les colonies caractéristiques, ou un nombre représentatif (au moins dix), sur :
 - Gélose non sélective comme Désoxycholate, incuber à 37 °C pendant 24 h.
 - Bouillon au Tryptophane, incuber à 44 °C pendant 24 h.
- Après incubation, réaliser le teste d'oxydase sur les colonies isolées sur gélose, et le test d'indole sur le bouillon
- Les colonies ayant une réaction négative à l'oxydase sont considérées comme coliformes, et celles ayant une réaction positive à l'oxydase mais négative à l'indole sont des *E. coli*.

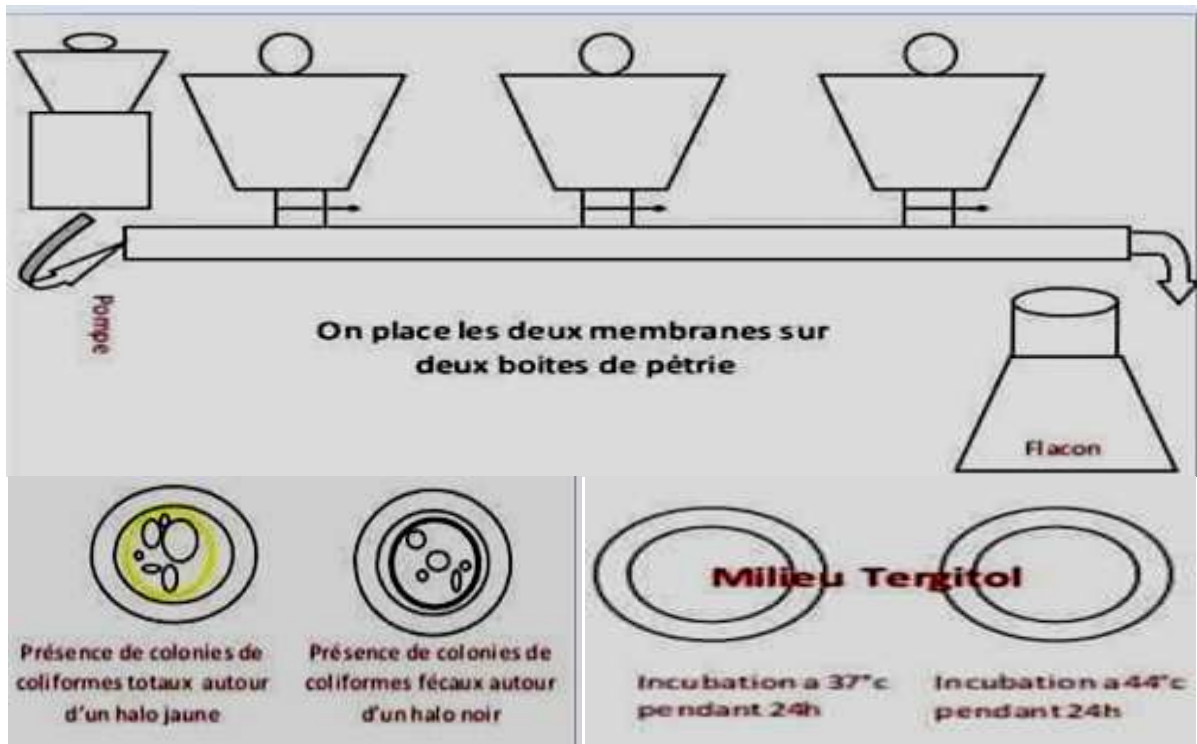


Figure 22: Recherche des coliformes par la méthode de filtration sur membrane

6.3. Recherche des entérocoques intestinaux (par filtration sur membrane)

La recherche des entérocoques ou streptocoques du groupe D se déroule par la méthode de filtration sur milieu Slanetz et Bartley. 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* sera faite par transfert de la membrane à l'aide d'une

pince stérile sur un milieu à l'esculine préalablement chauffé à 44°C puis incubé à 44°C pendant 2 heures. Les colonies présentant une coloration foncée à noire sur cette gélose seront dénombrées comme des entérocoques. Cette coloration est due à l'hydrolyse de l'esculine présente dans le milieu. (Figure 23).

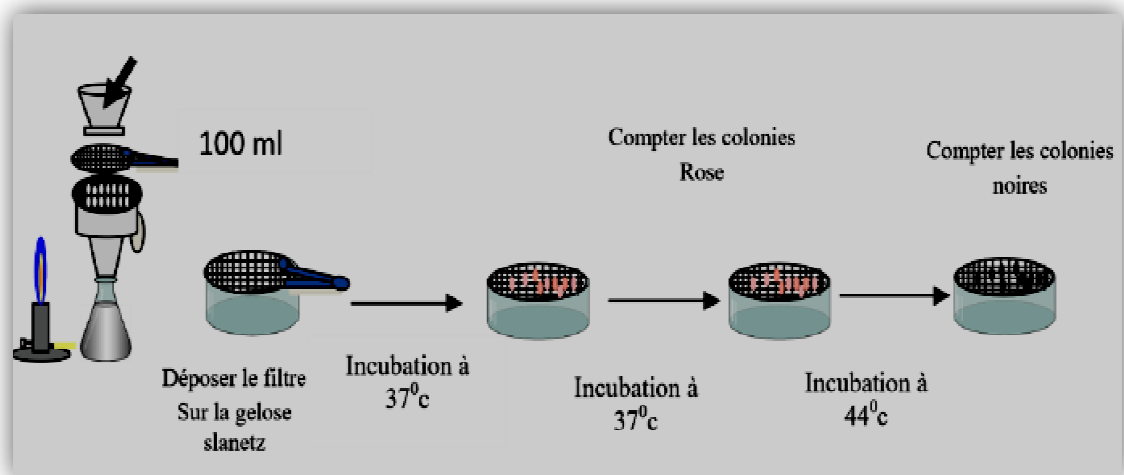


Figure 23: Recherche des entérocoques par la méthode de filtration sur membrane

6.4. Recherche des Clostridium sulfito-réducteurs

Pour la recherche des Clostridium sulfito-réducteur, il suffit de prendre 20 ml de l'eau à analyser qu'on verse dans un flacon stérile. Ce dernier sera par la suite soumis à un chauffage à 80 °C pendant 8 à 10 minutes, dans le but de détruire toutes les formes végétatives (les ASR éventuellement présentes et reste seulement la forme sporulée des bactéries sulfito-réductrices). Après chauffage, il faut refroidir immédiatement le flacon en question, sous l'eau de robinet (choc thermique), répartir ensuite le contenu de ce flacon, dans 4 tubes différents et stériles, à raison de 5 ml par tube; puis ajouter environ 20 ml de gélose viande foie, fondue puis refroidie à 45± °C, et 1 ml d'Alun de fer et 4 gouttes de Sulfite de sodium et on couvre par une couche de paraffine pour assurer l'anaérobie. Mélanger avec précaution et doucement le milieu et l'inoculum en évitant les bulles d'air et en évitant l'introduction d'oxygène. Laisser solidifier sur paille pendant 30 minutes environ. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures (voir figure 24).

Seront considérés comme positifs, les tubes contenant des grosses colonies noires qui correspondent au Clostridium sulfito-réducteur. La première lecture doit absolument être faite à 16 heures d'incubation car très souvent les colonies des ASR sont envahissantes ; auquel on se trouverait en face d'un tube complètement noir rendant ainsi l'interprétation difficile voire impossible et l'analyse sera à refaire en utilisant des dilutions décimales de 10⁻¹ voir 10⁻³.

La deuxième lecture se fera après 24 heures et la troisième et dernière lecture après 48 heures. Les résultats sont exprimés par le nombre des Clostridium sulfito-réducteurs par 20 ml de l'échantillon à analyser.

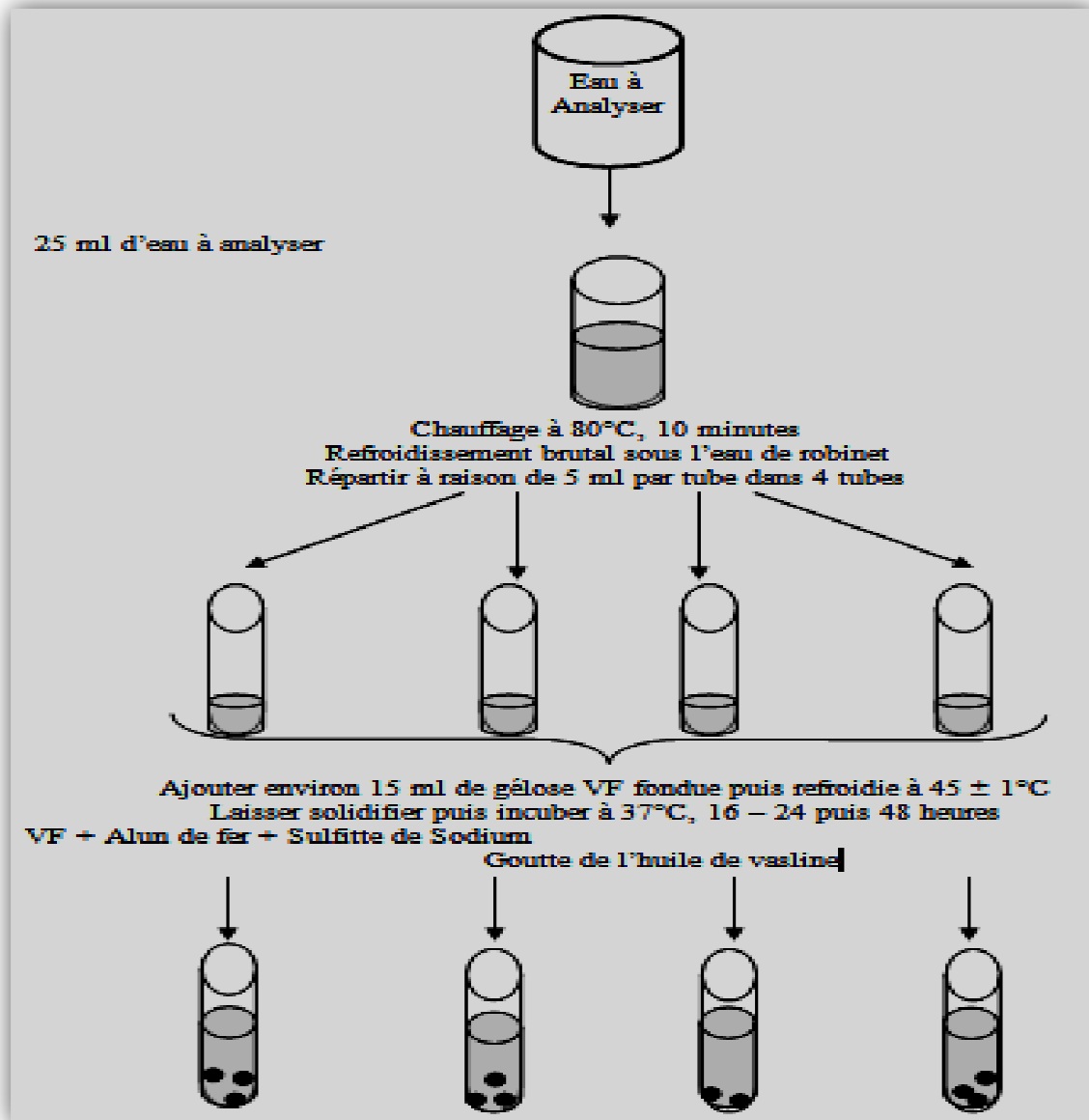


Figure24:Dénombrement des Clostridium sulfito-réducteurs.

6.5.Recherche des salmonelles

La recherche des salmonelles comprend deux phases, à savoir :

- **Phase d'enrichissement :**

A partir de l'échantillon d'eau à analyser on ensemence 9 tubes contenant 10ml de milieu SFB (S/C) (figure 25), on rajoute 1 ml de la dilution 10^{-1} aux trois premiers tubes, puis on procède de même pour les dilutions 10^{-2} et 10^{-3} . Ensuite, bien mélanger le milieu et l'inoculum et l'incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures. Pour la lecture, on considère comme

positifs (+) ; les tubes présentant un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu en jaune.

Incubation à 37 ° C pendant 24 h



Figure 25: Recherche des salmonelles (enrichissement)

- **Phase d'isolement :**

A partir du tube positifs (+), effectuer un isolement sur deux boîtes d'Hektoen. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h. Les colonies de salmonelles sont de tailles moyennes, lisses colorées en vert (couleur du milieu) avec un centre généralement noir exprimé par 100 ml.

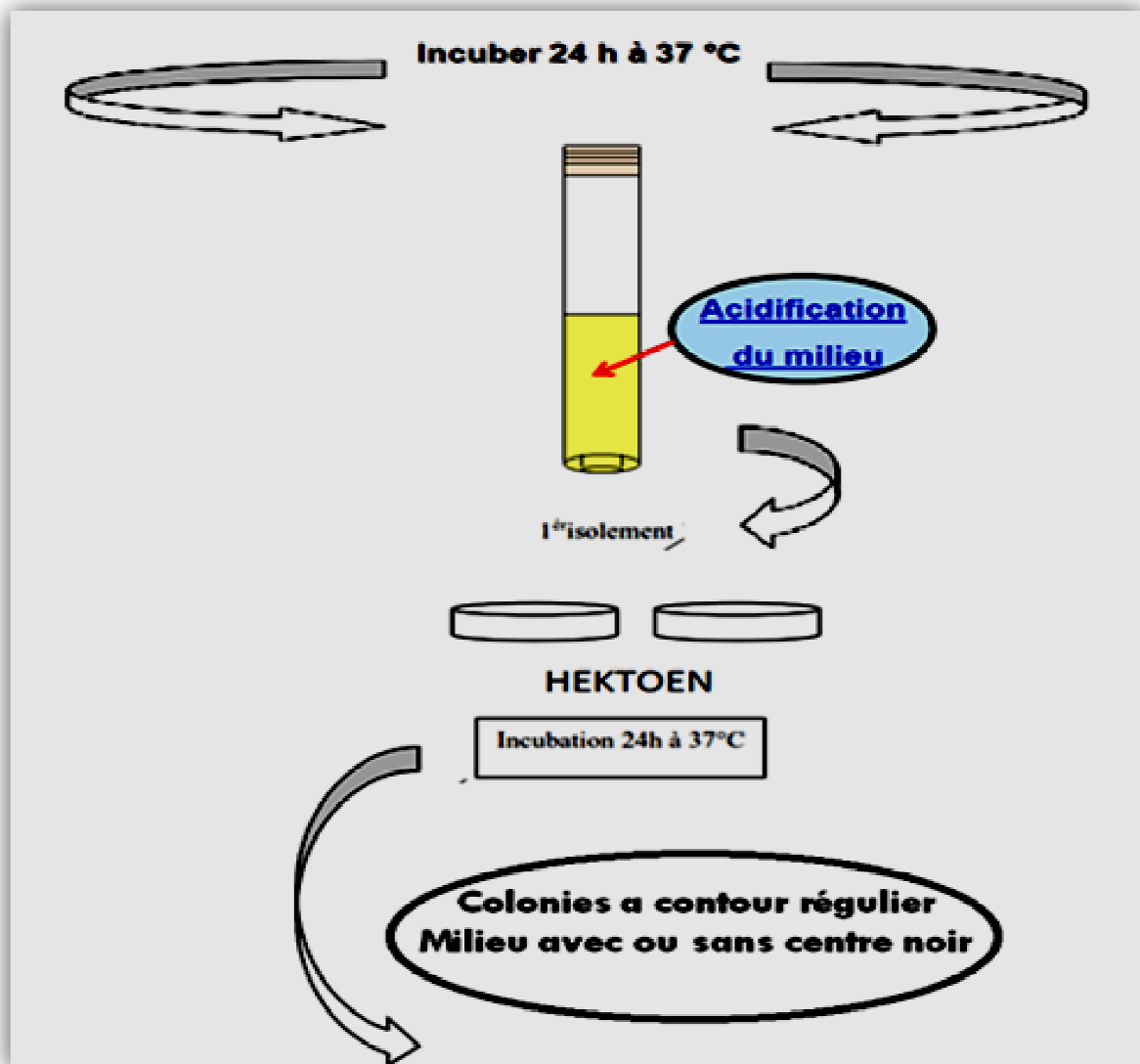


Figure 26: Recherche dessalmonelles(isolement)

6.6. Isolement du vibriion cholérique

La recherche des vibrions comprend deux étapes :

- **Phase de prélèvement et du pré-enrichissement :** Mettre 450 ml d'eau à analyser directement dans un flacon contenant 50 ml du milieu de culture (EPA concentrée 10 fois). Incuber pendant 24 h à 37 °C (figure 27).
- **Phase d'enrichissement :** A partir du premier enrichissement (EPA1) on effectue un premier isolement sur gélose GNAB1. On réalise un deuxième enrichissement en portant 1ml de flacon d'enrichissement sur eau peptone (EPA2). On incube pendant 24 h à 37 °C. On effectue un deuxième isolement à partir du deuxième enrichissement sur gélose GNAB2 et on incube pendant 24 h à 37°C (figure 27).

La présence de colonies typique de vibron (colonies plates et transparentes) sur les milieux gélosés sélectifs n'est pas une preuve suffisante de la présence de cette bactérie, il faut établir l'identification morphologique (état frais, coloration de gram) et une mini galerie biochimique (test d'oxydation, LDC, ODC, ADH) ainsi qu'un repiquage sur le milieu KIA et une GN inclinée en stries et incubée à 37°C pendant 24h. La confirmation de la présence de ce germe nécessite l'établissement d'un test d'agglutination avec de l'eau physiologique et le sérum polyvalent.

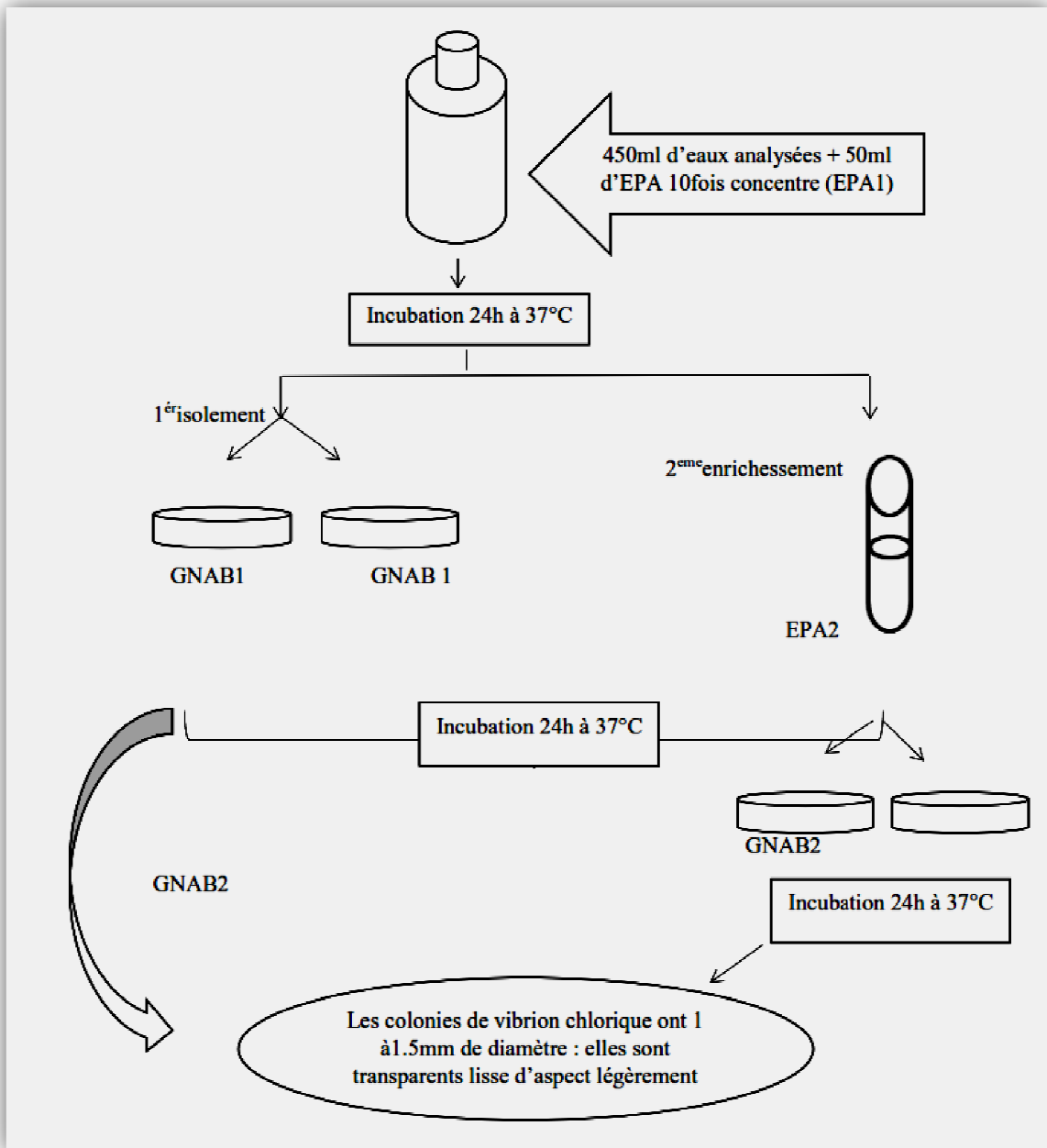


Figure 27: Recherche du vibron cholérique

7. Identification et isolement de la bactérie d'intérêt *E. coli*

Afin d'identifier et d'isoler notre bactérie d'intérêt, nous avons procédé en premier lieu à son isolement sur milieu Chromagar à partir des colonies apparues sur milieu TTC, puis nous avons effectué des tests biochimiques pour confirmer son identification.

7.1. Etude macroscopique : consiste à effectuer une observation à l'œil nu des colonies de souches bactériennes isolées afin de déterminer les caractères suivants : forme, relief, contour, consistance, surface, opacité, couleur et centre.

7.2. Etude microscopique : consiste à analyser l'arrangement spécifique des bactéries et la composition pariétale de ces dernières par coloration de gram. Pour cela on procède à l'établissement d'un frotti bactérien

- A partir d'une culture liquide, prélever un aliquote de suspension à l'aide d'une anse (ou pipette stérile) après avoir homogénéisé le milieu. Dans le cas d'un milieu solide il faut réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou pipette stérile), puis l'étaler sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame. Le frottis réalisé doit être mince et homogène, étendu sur la lame sans toucher les bords.

- Le séchage se fait à la température du laboratoire, si possible ou bien à chaleur douce : platine chauffante à 37°C ou au-dessus de la veilleuse du bec bunsen, à hauteur suffisante (Ne jamais chauffer brutalement).

- La fixation se fait dans le but de tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame, soit par chaleur pour les frottis effectués à partir de cultures bactériennes. Passer la lame-frottis situé sur le dessus dans la flamme chauffante, lentement et 3 à 4 fois de suite et laisser refroidir. Soit par l'alcool quel que soit le produit traité, en recouvrant la lame pendant 5 min avec de l'alcool puis rincer à l'eau déminéralisé et égoutter le frottis avant coloration.

- Le principe de la coloration permet de distinguer les bactéries GRAM + des GRAM – (tableau 05) grâce à leurs différences de nature de paroi.

Tableau 05 : Coloration de gram (Diakite et Mounkoro, 2015)

ETAPES	MODE OPERATOIRE	TEMPS	PRINCIPE
Coloration primaire	- Recouvrir la lame de crystal violet ou violet de gentiane - Rincer à l'eau distillée et récupérer le cristal violet dans un bêcher (ne pas le jeter dans le bac à coloration)	1 minute	Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes
Mordantage	- Recouvrir de Lugol - Rincer à l'eau distillée et l'égoutter	2 fois 45sec	Il se forme un complexe chimique entre le violet et le Lugol qui fixe le violet et colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.
Décoloration	-Tenir la lame inclinée et faire couler pendant quelques secondes de l'alcool à 95°C jusqu'à écoulement incolore. - Rincer immédiatement à l'eau distillée et égoutter	30 secondes environ	L'alcool dissout le violet de gentiane, si la paroi bactérienne est perméable à l'alcool (les lipides sont dissous par l'alcool), celui-ci pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme : les bactéries deviennent incolores. Si les bactéries ont une paroi imperméable à l'alcool (épaisse et sans lipides), elles restent colorées en violet et elles sont dites GRAM + ou positif.
Coloration secondaire	- Recouvrir la lame de fuschine - Rincer à l'eau distillée	1 minute	La fuschine recolore en rose les bactéries précédemment décolorées : les bactéries Gram – ou négatif.
Séchage	- Egoutter entre 2 morceaux de papier-filtre et laisser sécher		

7.3. Etude biochimique : nous avons utilisé des galeries de tests biochimiques miniaturisés API 10 S) afin d'identifier *E. Coli* permettent l'obtention des résultats sous 18h à 72h, un temps très réduit en comparaison avec les techniques classiques qui peuvent demander jusqu'à trois semaines, et nous offre en ce temps la possibilité de mettre en évidence environ 700 bactéries ou virus.

Ces galeries sont de réalisation très facile et de très hautes performances, elles se présentent sous la forme d'une série de petits tubes nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique, chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions

particulières, chaque tube contiens un substrat défini (ONPG,ADP,GEL...) et avec lequel les microorganismes réagissent différemment.(voir figure 28)



Figure 28 : Galerie biochimique API 10 S

8. Biodétection d'*Escherichia Coli*

Le biocapteur faisant l'objet de notre expérience va cibler la bactérie *Escherichia Coli*. Le type de transducteur utilisé est le transducteur **électrochimique**, le biorécepteur est à base d'**anticorps**. L'ensemble forme un Immunocapteur à base d'oxyde de graphène réduit/polyéthylèneimine pour la détection électrochimique sélective et sensible d'*Escherichia coli*.

8.1. Matériels et produits utilisés

Matériel

- Spectromètre RAMAN
- Microscope électronique à balayage MEB
- Potentiostat
- Spectrophotomètre UV
- Electrodes d'or
- Homogénéisateur

Produits

- Polyéthylèneimine branchée (PEI, Mw~25,000) ;
- Carbodiimide hydrosoluble monohydrochloride 1-ethyl-3[3-diméthylaminopropyl] (EDC.HCl) ;
- N-hydroxysuccinimide (NHS) ;
- Le tampon phosphate salin (PBS, 10 mM, pH 7.4) ;
- Potassium ($[K_4Fe(CN)_6]$) ;
- Chlorure d'hexaammineruthénium(III) ($[Ru(NH_3)_6]Cl_3$)

- Acide 1-pyrenecarboxylique (97%, Pyr-COOH) ;
- Carbonate de N,N'-disuccinimidyle ($\geq 95.0\%$, DSC) ;
- Dichlorométhane (CH_2Cl_2) ;
- Triéthylamine ($\geq 99.5\%$, TEA) ;
- Oxyde d'éthylène O-(2-aminoéthyl)-O'-(2-méthyléthyl) heptaéthylène glycol ($\geq 90\%$, $\text{NH}_2\text{-PEG}_8\text{-N}_3$) ;
- Oxyde de graphène (GO).



Figure 29: Microscope électronique à balayage (JOEL)



Figure 30: Spectromètre Raman (Horiba Jobin-Yvon)



Figure 31: Spectrophotomètre UV9200 (BIOTECH ENGINEERING)



Figure 32: Potenziostat (AUTOLAB)

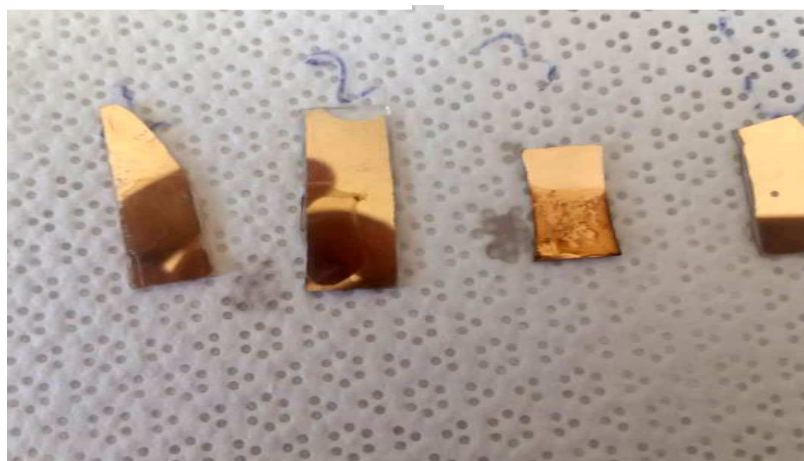


Figure 33: Electrodes d'or utilisées

8.2.Activations de l'électrode d'or

Les électrodes d'or seront revêtues par une couche de rGO / PEI, par la suite on procède au greffage d'anticorps anti-fimbriae *E. Coli* UTI89 aux groupes amine de PEI par une liaison covalente, (figure 34 et 35).

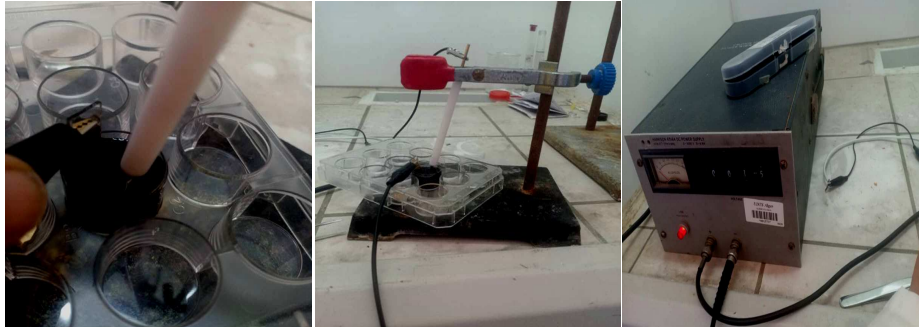


Figure34: photos de dépôt du couple GO/PEI

❖ **Première étape : Modification par électrodéposition du GO/PEI**

La figure 35 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 (voir la synthèse du pyrène-PEG).

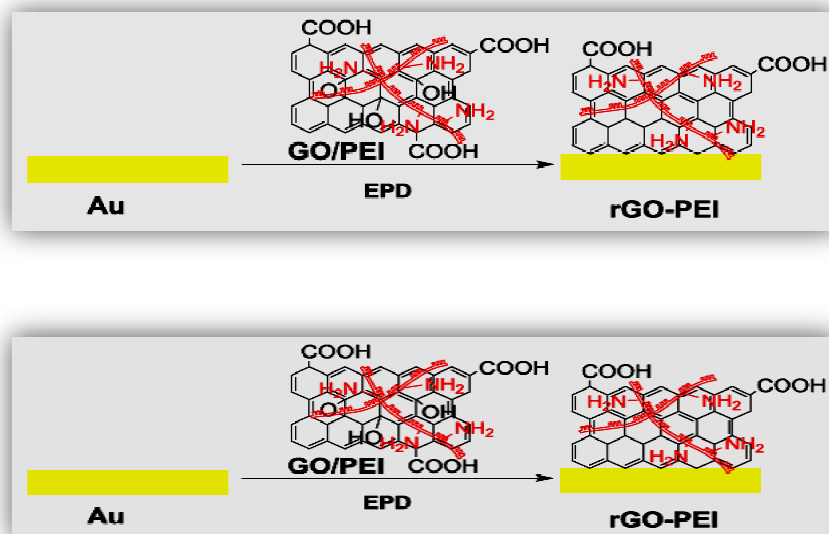


Figure 35: Différentes étapes utilisées pour la construction de l'immunocapteur pour la détection électrochimique sélective d'*E. Coli* UTI89

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.

La figure 36 montre la morphologie d'une électrode d'or avant et 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 d'environ 4 nm d'épaisseur déterminé par des mesures de profilométrie.

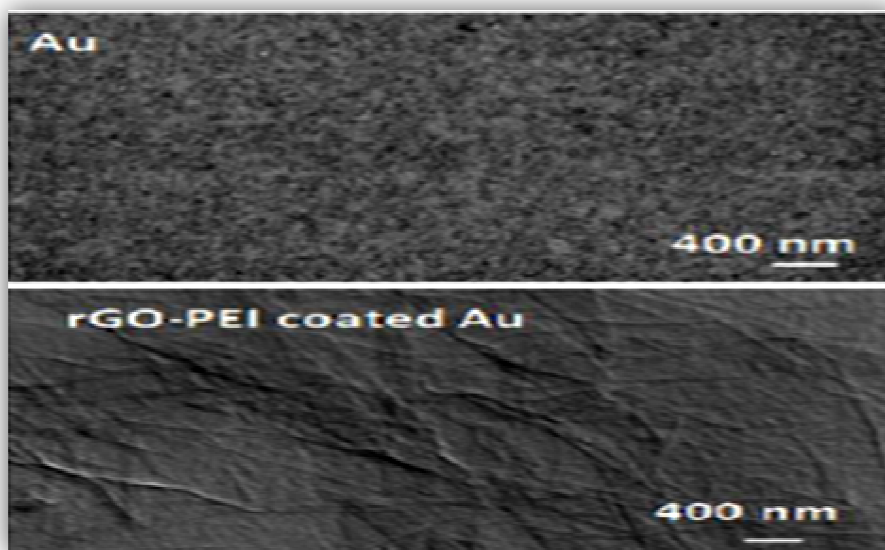


Figure 36 : Morphologie d'une électrode d'or avant et après revêtement électrophorétique avec rGO/PEI. Lors de l'application de +15 VDC pendant 4 min.

La figure 37 montre les voltammogrammes d'impulsion différentielle du film mince d'électrode d'or, avant et après revêtement avec rGO/PEI par dépôt électrophorétique en utilisant $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ comme sonde redox. Par rapport à l'électrode d'or nue, la

fonctionnalisation avec un film mince de rGO/PEI a entraîné une augmentation significative du courant redox.

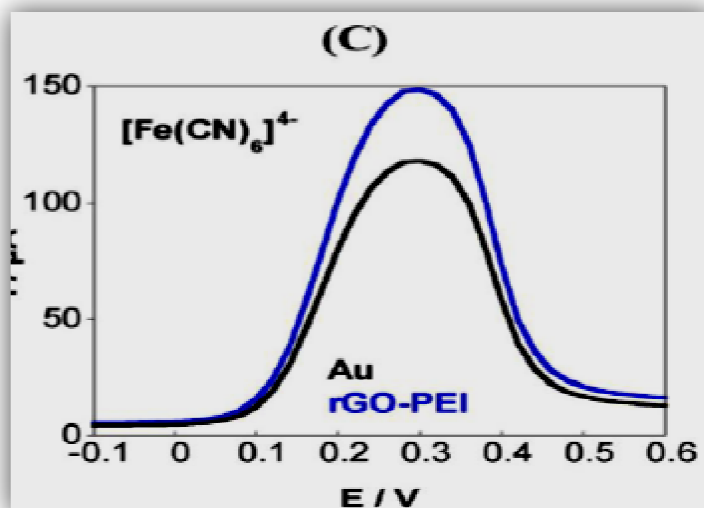


Figure 37: Voltammogramme d'impulsions différentielles d'or (noir) et d'or recouvertes de rGO/PEI (bleu) enregistrées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M).

8.3. Caractérisation des électrodes

Nous avons eu recours à trois méthodes de caractérisation qui sont :

- La caractérisation morphologique par Microscopie électronique à balayage (MEB)
- La caractérisation physico-chimique des électrodes par spectromètre Raman
- La caractérisation électrochimique par voltammétrie cyclique (CV).

8.3.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

Le microscope électronique à balayage (MEB) (ou SEM Scanning Electron Microscope) est un appareil, pouvant fournir rapidement des informations sur la morphologie et la composition chimique d'un objet solide. Son utilisation est courante en biologie, chimie, métallurgie, médecine, géologie...etc. Il faut savoir que le grandissement des microscopes optiques est limité à une valeur d'environ 1000 fois. En effet il n'est pas possible de séparer deux points plus proches l'un de l'autre que la longueur d'onde de la lumière utilisée. De plus la profondeur de champ aux forts grandissements devient très faible et nécessite alors des moyens plus sophistiqués.

Le MEB utilise un faisceau d'électron à la place des photons utilisés dans un microscope optique. Ceci permet de résoudre les deux inconvénients de la source lumineuse. La longueur d'onde du faisceau électronique est 100000 fois plus faible que celle de la lumière,

et d'autre part l'ouverture de ce faisceau est très faible. Il en résulte que cette technique permet de faire agrandissements jusqu'à 100 000 fois sur la plupart des matériaux solides.

Cette technique peut être utilisée pour plusieurs fins en plus de l'étude morphologique. Elle permet aussi d'avoir la taille des grains et la composition élémentaire. La figure 38, schématise le fonctionnement d'un microscope électronique à balayage (Zerrouki et Tayeb, 2019)

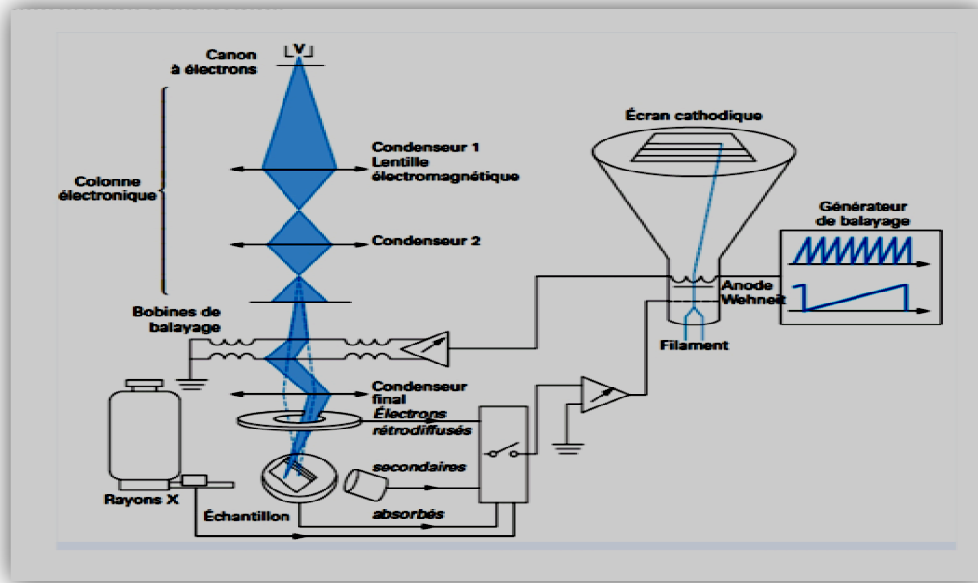


Figure 38: Schéma du principe de fonctionnement du MEB.

8.3.2. Spectrophotométrie Raman

En spectrométrie Raman, l'analyse se fait par excitation du matériau porte à un niveau énergétique virtuel par une puissante source lumineuse monochromatique de type laser, il réémet ensuite une radiation de fréquence ou énergie différente qui est collectée puis analysée par un détecteur adéquat. Cette radiation comporte deux types de signaux. Le premier très majoritaire correspond à la diffusion Rayleigh : la radiation incidente étant diffusée élastiquement (c'est-à-dire sans changement d'énergie). Le second correspond à des photons en nombre très limité pouvant interagir avec la matière. Celle-ci absorbe (ou cède) de l'énergie aux photons incidents produisant ainsi les radiations Stokes (ou anti-Stokes). La variation d'énergie observée sur le photon nous renseigne alors sur les niveaux énergétiques de rotation et de vibration de la molécule concernée (Kengne-momo, 2011) ; (figure 39).

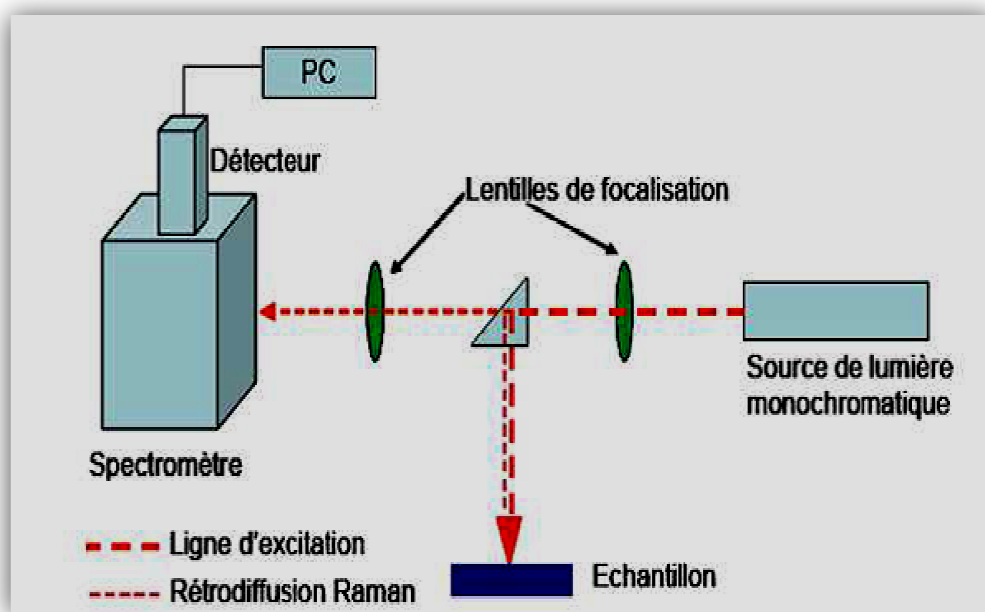


Figure 39: Schéma illustrant le principe de la Spectrophotométrie Raman (Kengne-momo, 2011).

8.3.3. Voltammétrie cyclique (CV)

La voltammétrie cyclique est l'une des méthodes électrochimiques les plus répandues pour l'analyse d'espèces électro-actives en raison de sa simplicité expérimentale et d'analyse. Elle est définie comme la mesure du courant I générée par le balayage cyclique d'un potentiel V sur l'électrode de travail immergée dans un liquide électrolytique sans agitation. Le potentiel appliqué en fonction du temps prend la forme montrée sur la figure 40, où le potentiel est balayé dans le sens positif d'une valeur V_{min} jusqu'à V_{max} avec un taux v (V/s), ensuite dans le sens négatif avec un taux $-v$. Les résultats sont typiquement présentés sous la forme d'un voltammogramme du courant en fonction du potentiel tel que montré à la figure 40 (Dallaire, 2015).

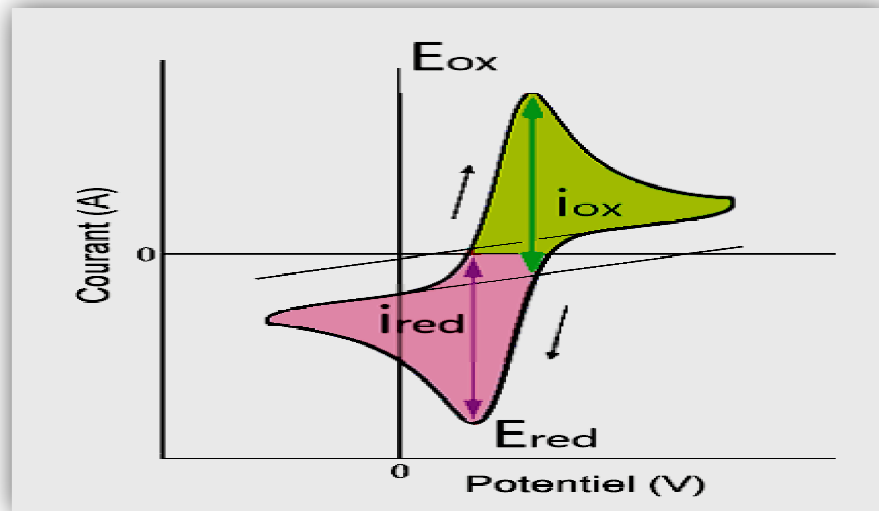


Figure 40: Représentation d'un voltammogramme cyclique (Hassani, 2018).

8.4. 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 $-NH_2$ de PEI avec les fonctions $-COOH$ des anticorps anti-fimbriae *E. Coli* en utilisant EDC/NHS comme agents de réticulation. Brièvement, l'interface de l'or recouvert de PEG / rGO / PEI a été incubée dans une solution aqueuse d'anticorps anti-fimbriae *E. Coli* ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), 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 (figure 41).

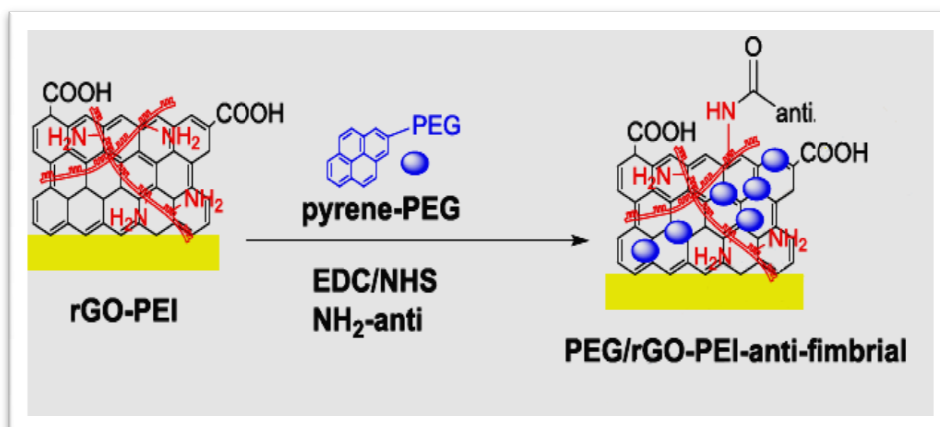


Figure 41: Immobilisation covalente d'anticorps anti-fimbriae d'*E. Coli* sur l'Électrode PEG / rGO / PEI (PEG/rGO/PEI-anti-fimbrial)

8.5. Biodétection d'E. Coli sur interface modifiée PEG/rGO/PEI

A partir des colonies de la bactérie *E. Coli* identifiées et isolées par la méthode classique, sur milieu Chromagar, nous avons réalisé une série de dilutions pour tester l'efficacité et la sensibilité du biocapteur, une série de concentrations de cellules bactériennes allant de 1×10^1 à 1×10^8 ufc ml^{-1} dans 100 μl de volume ont été incubées sur des anticorps anti-fimbriae *E. Coli* des électrodes fonctionnalisés PEG/rGO/PEI pendant 30 min pour obtenir l'immobilisation des cellules bactériennes. Après incubation, l'électrode fonctionnalisée a été soigneusement rincée avec de l'eau Milli-Q pour enlever les cellules planctoniques en excès et ensuite les conserver dans du tampon PBS ou dans un milieu de croissance à 4°C pour une analyse plus approfondie. Enfin, la réponse électrochimique dans la solution redox 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans 0,1 M KCl a été enregistrée en utilisant DPV.

Chapitre 04

Résultats et discussion

1. Résultats des analyses bactériologiques par la méthode classique

Les résultats des analyses bactériologiques des eaux brutes prélevés au mois de Mai au barrage de Taksebt (eau de surface), dont la turbidité était de 26 NTU sont résumés dans le tableau 06.

Tableau 06 : Récapitulatif des résultats d'analyses bactériologiques de l'eau du barrage de Taksebt

Germes	Milieu de culture	Température d'incubation	Temps d'incubation	Résultat observés
Flore aérobie mésophile totale (UFC/ml)	PCA/TGEA	22°C	24h	Indénombrable
		37°C	24h	Indénombrable
Coliformes totaux (UFC/ml)	BCPL/ Schubert TTC/gélose Désoxycholate	37°C	24h à 48h	Positif (+) <300
Coliformes fécaux (UFC/ml)	TTC bouillon au tryptophane BCPL/ SHUBERT	44°C	24h	Positif (+) 10
Escherichia coli (UFC/ml)	Bouillon au tryptophane Schubert	37°C	24h	Colonies bleu Positif (+)
Streptocoques fécaux (germes/100ml)	Slanetz Bartley	37°C	24h	Négatif (-)
Clostridium sulfito-réducteurs (spores/ 20ml)	Viande Foie (VF)	37°C	24h	Négatif (-)
Salmonelles	EPA/Hektoen Rappaportvassiliadis	37°C	24h	25
Vibrions	EPA/GNAB	37°C	24h	Positif (+)

Comme indiqué sur le tableau, nous avons enregistré des résultats positifs sur l'ensemble de la flore mésophile totale, les coliformes totaux et fécaux, *Escherichia coli*, les salmonelles et les vibrions, et des résultats négatifs pour les streptocoques fécaux et les clostridiums sulfito-réducteurs. L'identification de notre bactérie cible *E. coli* a été confirmée par la présence de colonies rondes bleuâtres sur milieu Chromagar et une galerie biochimique Api 10 comme montré en figure 42 et 43.

Les résultats enregistrés concernant la flore mésophile aérobie totale, dans l'eau brut du barrage sont indénombrables pour les deux températures d'incubation 22 °C et 37 °C. Ces résultats s'accordent avec ceux de Arab et Ouedfel (2015) à 22 °C, mais sont largement supérieurs à ceux trouvés à 37 °C (entre 44 et 148 UFC/ml). Cette importante charge en germes totaux peut s'expliquer par la sécheresse de longue durée qui a réduit nettement le niveau de l'eau du barrage.

Nos résultats en coliformes totaux, s'accordent avec ceux trouvés par Saadi et Mechache (2017) sur le barrage Taksebt (<300 UFC/ml), mais s'opposent largement à ceux trouvés par Lawani et al (2017) sur les eaux de surface au Bénin (>2000 UFC/ml).

Dans une autre étude comparative avec les résultats trouvés par Orelien (2017) sur l'eau du sous bassin versant de Ravine Diable (Anse-à-Veau), nous remarquons que nos résultats s'accordent du point de vue coliformes totaux, mais s'opposent en ce qui concerne les coliformes fécaux et les *E coli* (CF > 200 colonies/ml, *E coli* = 184 colonies/ml). Nos résultats en coliformes fécaux corroborent aussi avec ceux de Saadi et Mechache (0 à 10 UFC/ml), mais diffèrent de ceux trouvés par Lawani (2017) et Merhabi (2019) respectivement 78 UFC/ml et entre $14 \cdot 10^4$ UFC/100 ml - $25 \cdot 10^5$ UFC/100 ml.

Notre eau est exempte de streptocoques fécaux, ce qui répond aux exigences des normes européennes pour la production de l'eau potable (voir annexe 06), ce résultat diffère de celui de Dahmane et Djadi (2016) qui ont enregistré 100 à 1650 NPP dans l'eau brute de souk el djemaa, ainsi que Merhabi et al (2019) qui a trouvé $32 \cdot 10^4$ UFC/100 ml sur la rivière de Kadicha au Liban.

Pour ce qui est des Clostridium sulfito-réducteurs, Dahmane et Djadi (2016) ont révélé la présence de 20 à 145 UFC/ml dans l'eau brute de souk el djemaa, Arab et Ouedfel ont trouvé 9 à 73 UFC/100 ml dans l'eau de Taksebt, ce qui s'oppose à notre résultat négatif.

Pour ce qui est des vibrions, leur absence est recommandée par les normes nationales et internationales, car leurs existence dans l'eau de consommation peut se traduire par le cholera maladie ayant marqué beaucoup d'événement dans l'histoire de la santé publique et de la microbiologie (Bernier, 2007).

2. Résultats de l'identification et isolement d'*E. Coli*

2.1. Par méthode classique sur Chromagar

Après incubation d'*E. Coli* sur milieu Chromagar à 37 °C pendant 24 h, nous avons observé des colonies bleues rondes, de taille moyenne avec un contour régulier, ce type de colonies est affirmatif de la présence d'*E coli* (figure 42).



Figure 42: Colonies d'*E. Coli* sur boîte de pétridu milieu Chromagar

2.2. Par galerie biochimique API 10

En se référant au tableau de lectures des galeries API présenté en annexe 8, nous confirmons la présence de la bactérie *E. Coli* à travers les nuances des tubules présentés dans la figure 43 ci-dessous



Figure 43: Galerie biochimique API 10 d'identification d'*E. Coli*

3. Résultats de la caractérisation des électrodes

3.1. Par microscopie électronique à balayage (MEB)

La figure 44 nous montre les micrographies d'électrodes par microscope électronique à balayage avant et après le revêtement électrophorétique avec nanofeuillets de rGO/PEI lors de l'application de 15 VDC pendant 4 min. L'analyse de la structure et de la morphologie des électrodes avant le revêtement montre une certaine rugosité contrairement à la micrographie prise après revêtement, où la structure est un peu plus lisse. Cette rugosité offre une grande surface assurant une meilleure distribution des nanofeuillets de rGO/PEI selon Bensana (2020).

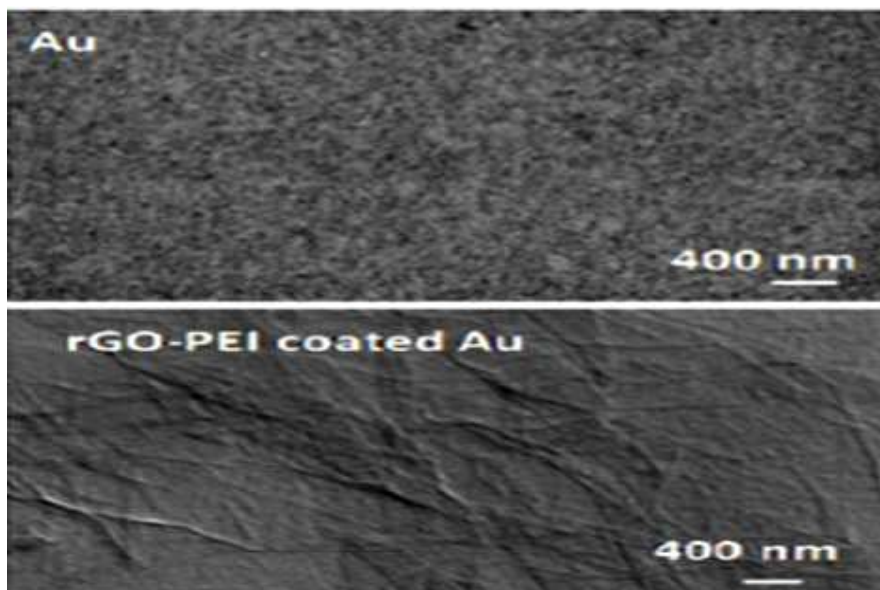


Figure 44: Micrographies des électrodes d'or par microscope électronique à balayage avant et après le revêtement avec le graphène.

La figure 45, nous montre la morphologie de l'électrode d'or après revêtement électrophorétique avec rGO/PEI, ou on remarque la présence d'un film homogène de nanofeuillets constitués de deux produits de couleur différente, l'oxyde de graphène réduit en gris foncé et le PEI en gris clair.

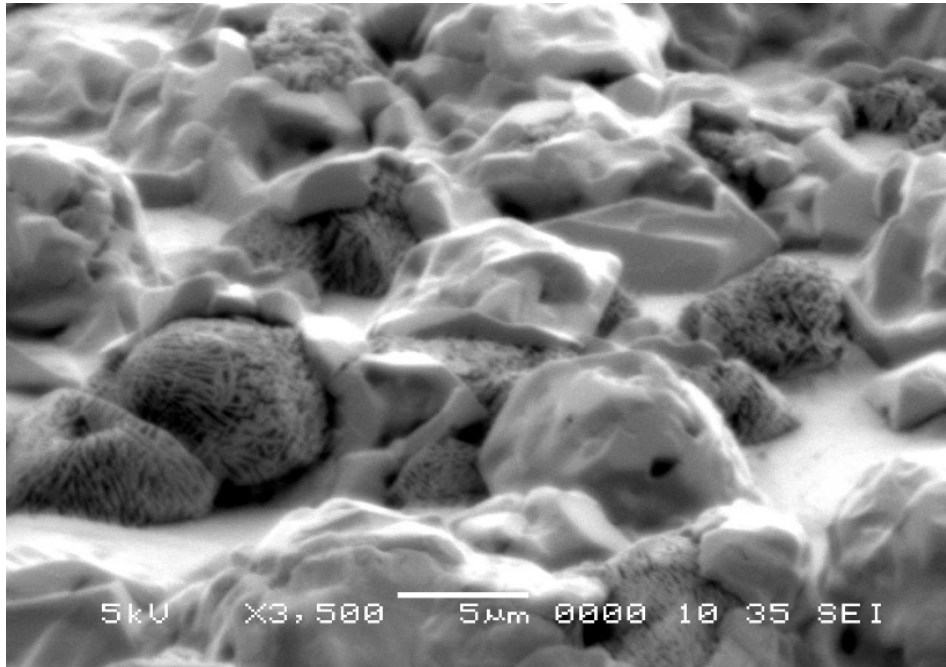


Figure 45 : Revêtement avec rGO/PEI de l'électrode d'or sous MEB

3.2. Parspectrophotométrie RAMAN

Les résultats de la spectrophotométrie Raman présentés ci-dessus (figure 46) montrent deux pics nettement remarquables aux longueurs d'ondes 1329.1cm^{-1} correspond à la liaison d'élongation C-NO₂ et 1595.7cm^{-1} relatif à la liaison d'élongation C=C du carbone. Ces deux pics correspondent à deux formes de carbone précurseur principal du graphène, le carbone et le noir d'ivoire.

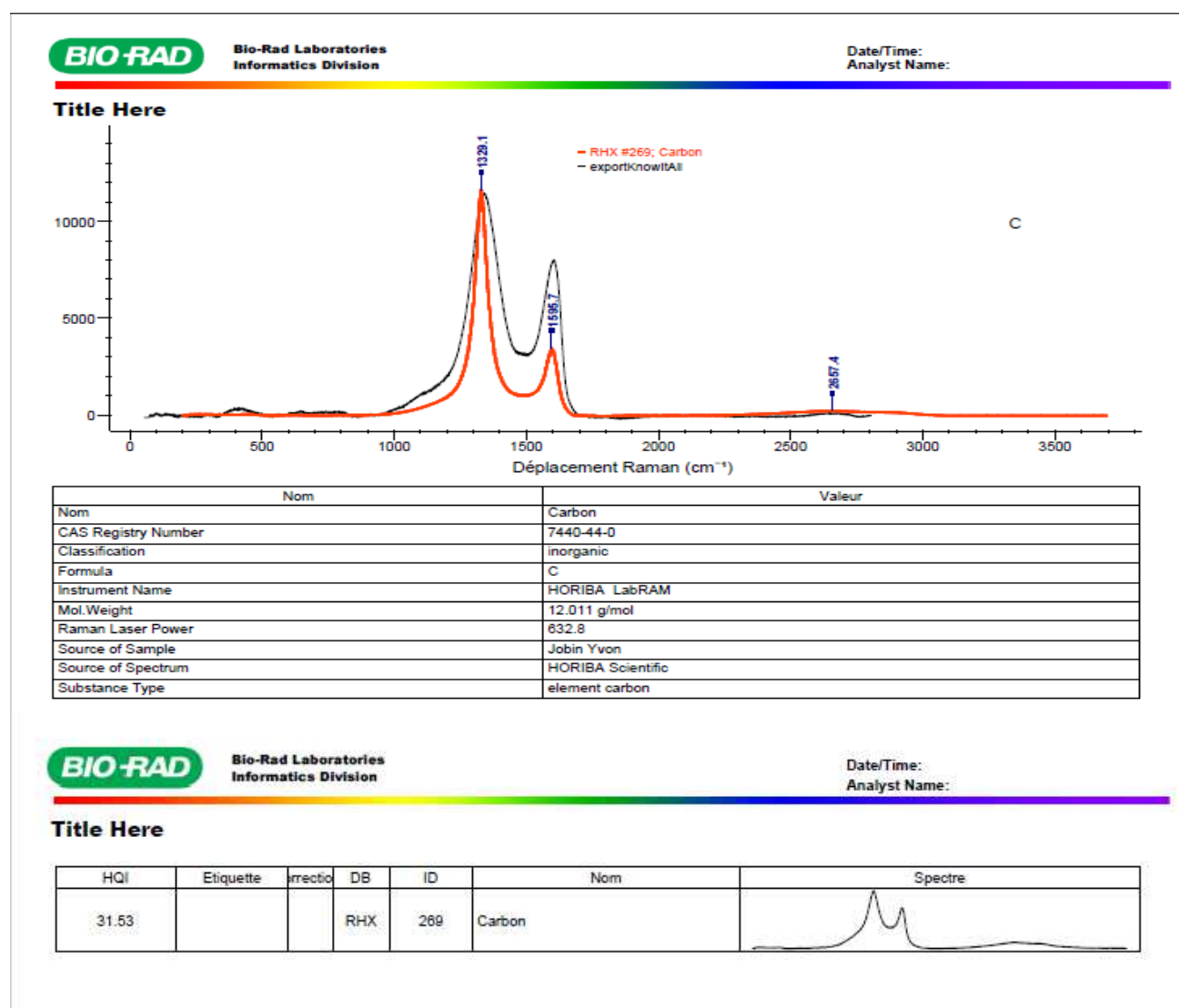


Figure 46 : Spectroscopie Raman

3.3. Par voltammétrie cyclique (CV)

La caractérisation électrochimique du transducteur est réalisée dans une solution tampon GO /PEI, contenant le couple ferrocyanure/ferrocyanure de potassium $[Fe(CN)_6]^{3/4}$. Le KCl (0,1 M) a été choisi comme sel de fond car il est compatible avec l'utilisation de biomolécules (Anticorps) et la détection des bactéries. Bensana (2020) a également choisi ce milieu tampon pour caractériser le comportement de nano particules d'or par des mesures identiques.

La figure 47 et les annexes 4/A et B nous montrent la voltammétrie cyclique des électrodes d'or obtenues avant et après activation.Ces voltammogrammeprésentent des pics d'oxydation et de réduction dont l'intensité varie suivant la capacité des ions ferri/ferrocyanure à s'oxyder et à se réduire à la surface de l'électrode. La CV de l'électrode nue est de 0.008 (A), celle de l'électrode après fonctionnalisation avec leGO/PEI est de 0,002

(A). La CV de l'électrode d'or nue présente un pic quasi réversible caractéristique de l'oxydoréduction du couple redox à la surface de l'électrode, on remarque que le revêtement en rGO/PEI a engendré une diminution de l'intensité indiquant que la couche bloque partiellement le transfert d'électrons selon Montrose(2013). Nous pouvons donc dire que les nanofeuillets d'oxyde de graphène ont formé une barrière au transfert des électrons de la solution vers la surface de l'électrode ce qui valide la fonctionnalisation des électrodes.

Nos résultats corroborent avec ceux de Sboui (2016) qui a travaillé sur la biodétection de *Lagionellapneumophila*, dont les voltammogrammes des électrodes nues et fonctionnalisées (ITO et ITO-GRTMS) présentent aussi une diminution du courant après activation.

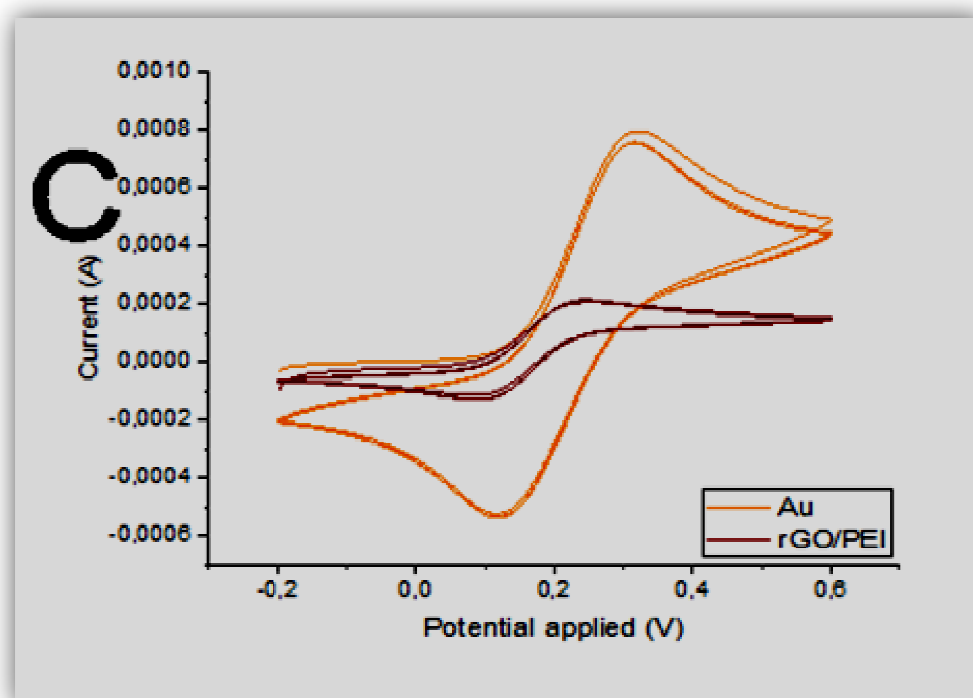


Figure 47: Voltammétrie cyclique (CV) de l'électrode d'or (Au) dans $K_3Fe(CN)_6$ (10 mM) / KCl (0.1 M); vitesse de scan $20mVs^{-1}$.

3.4. Par Voltammétrie Différentielle Pulsée DPV

La figure 48 montre les voltammogramme d'impulsion différentielle du film mince d'électrode d'or, avant et après revêtement avec rGO/PEI par dépôt électrophorétique en utilisant $[Fe(CN)_6]^{4-}$ comme sonde redox. Par rapport à l'électrode d'or nue, on remarque que la fonctionnalisation avec un film mince de rGO/PEI a entraîné une augmentation

significative du courant redox ($150 \text{ I}/\mu\text{A}$ à $0.3 \text{ E}/\text{V}$), l'intensité du courant obtenue en utilisant rGO/PEI (couche bleu) est plus élevée que celle obtenue par l'électrode d'or nu (couche noir) mais les deux enregistrent un pic à $0.3 \text{ E}/\text{V}$. La netteté du pic montre clairement que la composite rGO/PEI utilisée est efficace pour améliorer la cinétique du processus électrochimique grâce à l'effet synergique de l'oxyde de graphène selon Bensen (2020).

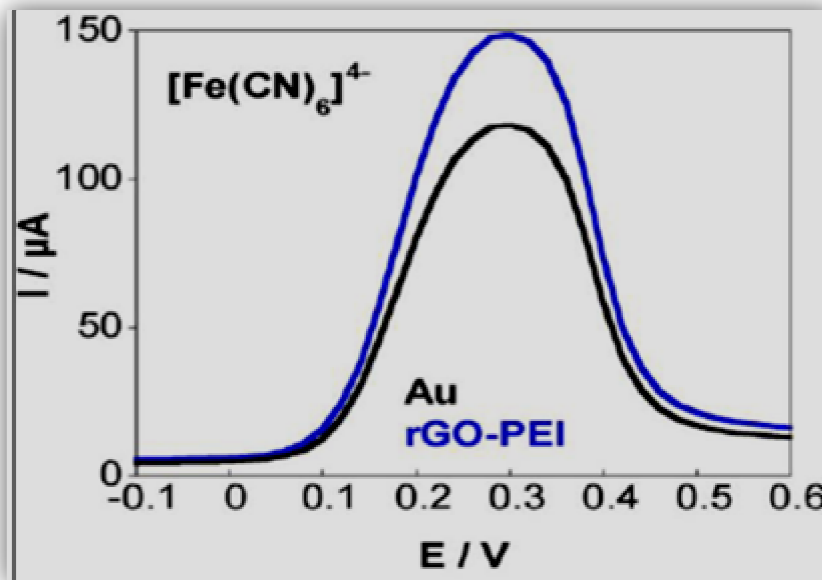


Figure 48: Voltammogramme d'impulsions différentielles d'or (noir) et d'or recouvertes de rGO/PEI (bleu) enregistrées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M).

Les Voltammogramme d'impulsions différentielles DVP (figure 48) de l'électrode d'or revêtues de rGO/PEI, de celle avec l'anticorps AC-*E. Coli*, et celle avec une concentration de $10^2 \text{ UFC} / \text{ml}$ nous montrent qu'il y a une réponse potentiométrique sur l'intervalle 0.1 et 0.3 (V). Un pic de courant plus significatif de 7.10^{-5} (A) situé à 0.2 (V) a été observé en utilisant l'électrode activée avec le nanocomposite rGO/PEI en comparaison avec le AB, BSA et le BAC. Cette augmentation est due à l'excellente conductivité de l'oxyde de graphène et à sa grande surface de contact.

Cette intensité du courant diminue jusqu'à $2,7 \cdot 10^{-5}$ (A) après addition de l'anticorps, et à $1,3 \cdot 10^{-5}$ (A) après addition d'*E. Coli* à une concentration de $10^2 \text{ UFC}/\text{ml}$. Cette diminution est due aux formations de couches à la surface de l'électrode, qui bloquent le passage des électrons entre cette dernière et le couple redox et les autres éléments rajoutés.

Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par Bensenna (2020) sur ce composé lors de son application pour la détection du phénol avec une même vitesse de balayage (100mv/s), ainsi que ceux de Sboui (2016) qui a noté des diminutions significatives des pics de courants après ajout de l'ITO-GPTMS-MAb

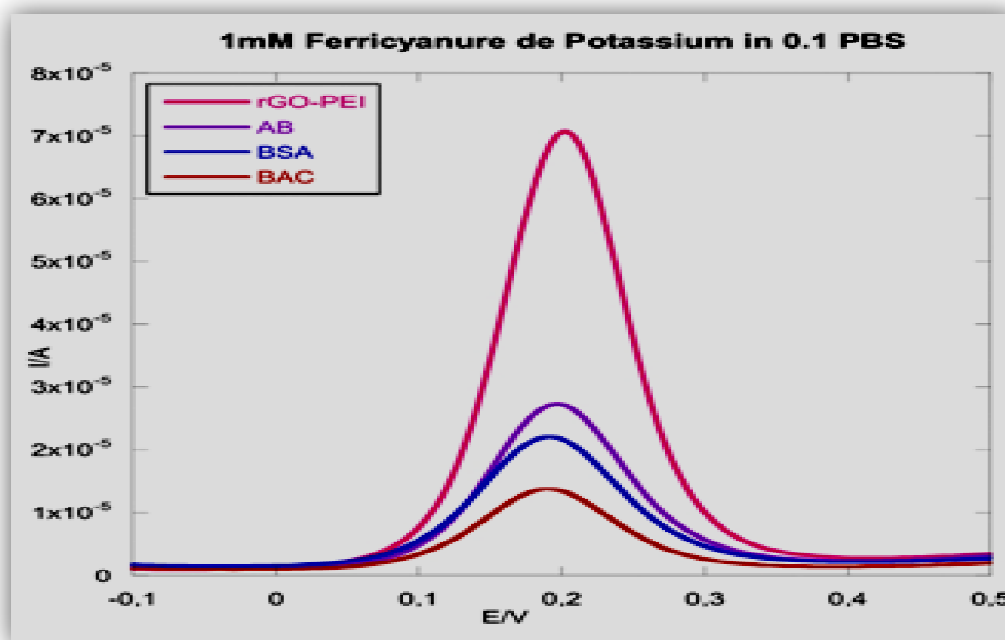


Figure 49: Voltampérogrammes d'impulsions différentielles (DPV) mesurés dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 Mm) / PBS (0.1M) après E. Coli incubation pendant 30 min avec Anticorps AC-E. Coli ($200\mu\text{g} / \text{ml}$) [AC] = $200\mu\text{g}/\text{ml}$, [BAC] = $10^2\text{CFU}/\text{ml}$, [BSA], vitesse de balayage 100 mv/s.

4. Résultats de la Biodétection

Les figures 50 et 51 montrent la superposition des ondes du courant dans, on remarque que l'intensité du courant est inversement proportionnelle à la concentration bactérienne, la concentration (10^9UFC ml^{-1}) est relative au bas pic (0.6 I), tandis que la concentration $0\text{UFC}/\text{ml}$ enregistre un pic plus haut (1.2 I), ce qui s'explique par l'absence des bactéries adhérentes à l'électrode qui peuvent entraver le passage du courant. Ces résultats corroborent avec ceux de Kahlouche 2018, et le même constat a été fait par Sboui (2016) lors de son revêtement des électrodes avec l'ITO-GPTMS et l'ITO-GPTMS-Mab.

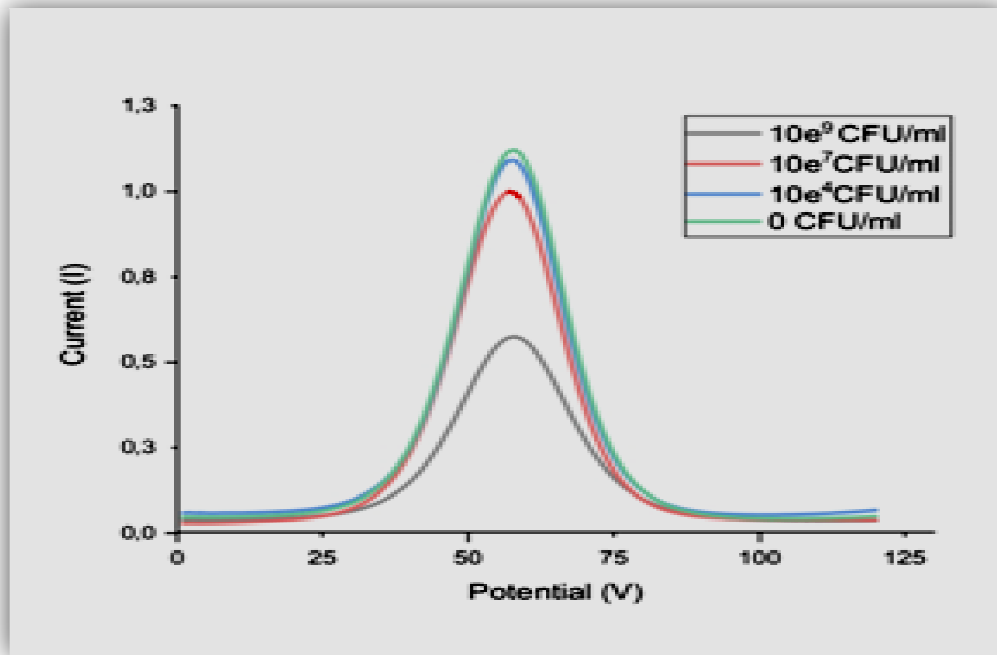


Figure 50 : Voltampérommes d'imputions différentielles(DPV) mesurées dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3/4}$ (5mM)/PBS(0,1M) après *E. coli*.Incubation pendant 30 min avec AC-*E. coli*(200 μg /mL)pour différentes concentrations :0 UFC ml⁻¹(vert) ,10⁴ UFC ml⁻¹(bleu) ,10⁷ UFC ml⁻¹(rouge) ,10⁹ UFC ml⁻¹(noir) Vitesse de balayage 100mV /s.

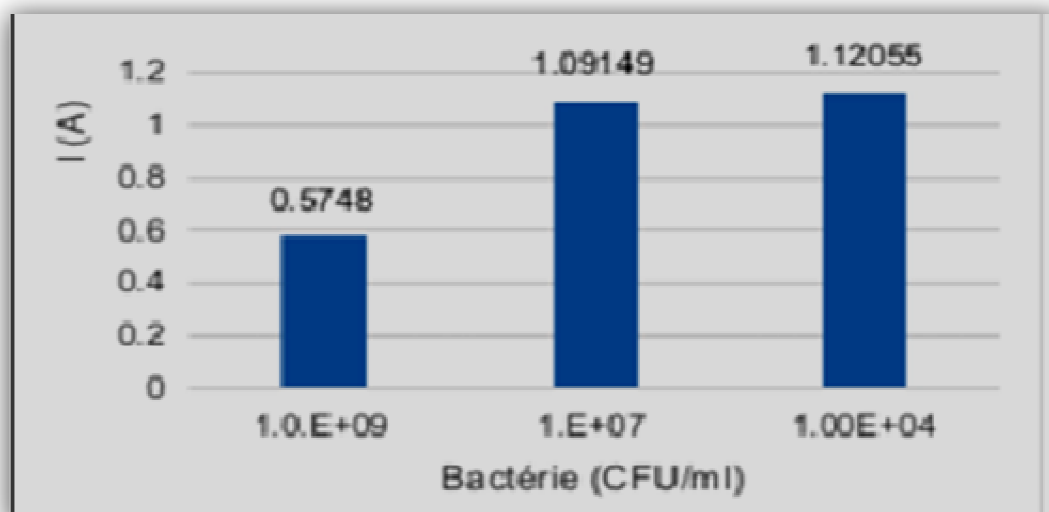


Figure 51: Diagramme de la variation du pic du courant en fonction de la concentration bactérienne

En résumé, nous constatons donc que la composite rGO/PEI représente un support adéquat pour le revêtement des électrodes grâce à l'amélioration de la cinétique du processus électrochimique qu'elle nous offre, et forme un support idéal pour la fixation des anticorps de notre bactérie cible, ce qui favorise la réponse potentiométrique en sa présence, en comparaison aux autres composites (AB, BSA, BAC) dans notre expérience. De même l'étude de Bensen 2020 sur un capteur à base de GCE/MWCNTs-AuNPs-Go-Cs qui a confirmé son efficacité pour la détection électrochimique rapide des composés phénoliques.

Les résultats de voltammétrie cyclique s'opposent à ceux trouvés par Guinelet (2017) qui a démontré que le PBS est un milieu non-électro actif car il a donné une réponse inerte sur la voltammétrie cyclique en comparaison à l'électrode d'or, mais avec une vitesse de balayage de 50 mV/s alors que dans notre cas elle n'est que de 20 mV/s. Parallèlement, les mêmes résultats s'accordent du point de vue des voltammogrammes où il a utilisé le SiO₂-NPs⁺ équivalent à notre composite rGO/PEI qui a aussi donné une diminution de l'intensité des pics, et une augmentation de la différence de potentiel.

La différence de concentration des bactéries a marqué un écart nettement constatable dans la mesure du courant et a montré une proportionnalité inverse car plus les bactéries sont abondantes, leur adhésion aux anticorps fixés sur l'électrode entrave le passage du courant. Les mêmes constats ont été approuvés par les travaux de Guemmoudi (2012) et Choinière (2018).

Dans un même concept de détection d'*E. Coli* par photoluminescence Duplan 2011 a démontré que la charge négative de bactéries immobilisées à la surface de microstructures fonctionnalisées par les anticorps, contribue à l'augmentation des signaux de photoluminescence, cette méthode a permis la détection d'*E. Coli* à 10⁴ UFC/ml en moins de 120 min.

Conclusion

L'eau fait partie des principales sources de propagation d'épidémies bactériennes ou virales, c'est la raison pour laquelle le contrôle de sa qualité est indispensable, et demande un grand intérêt. Pour mieux évaluer la qualité de nos échantillons prélevés, nous avons eu recours à des analyses classiques au laboratoire qui ont démontrés l'existence des germes pathogènes comme, les salmonelles, les vibrions, les coliformes fécaux et principalement *Escherichia coli*, sur laquelle on s'est basée afin d'établir une méthode alternative pour sa détection qui consiste à élaborer un biocapteur basé sur l'association d'une entité biologique faisant office de biorécepteur qui est l'antigène de *E. coli* à un transducteur électrochimique. Ce biorécepteur assure la bio-reconnaissance lors de l'interaction avec l'analyte cible (la bactérie *E. coli*). Cette bio-reconnaissance est aisément mesurable et peut être directement associée à la concentration d'*E. coli* présente dans l'échantillon.

Au cours de notre étude, nous avons fait appel à trois méthodes de caractérisation qui sont la spectroscopie Raman qui offre en quelques secondes des spectres qui ne sont pas destructifs ni invasifs, et qui permettent d'analyser de très petits volumes d'échantillon. La Microscopie électronique à balayage (MEB) nous a aussi permis grâce à son grossissement élevé de visualiser la morphologie et la composition des nano particules immobilisées sur les électrodes d'or, ainsi que la voltammétrie cyclique (CV) qui mesure le courant I générée par le balayage cyclique d'un potentiel V sur l'électrode de travail immergée dans un liquide électrolytique.

Les résultats obtenus par la méthode de milieu de culture sont de grande importance pour les germes revivifiables (indénombrable) et les coliformes totaux (<300 UFC/ ml), pour les coliformes fécaux nous avons dénombrés 10 UFC/ml avec une présence d'*E. Coli* qui a été confirmé par une galerie biochimique, par contre nos résultats étaient négatifs concernant les Streptocoques fécaux et les Clostridium sulfite-réducteurs. mais nous avons aussi révélé la présence des vibrions et de 25 salmonelles.

La fonctionnalisation des électrodes d'or (Au) par dépôt électrophorétique de rGO / PEI dans une solution électrolytique de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M) est bien adaptée pour concevoir des plates-formes de détection

Les différentes méthodes de caractérisation ont démontré dans un premier temps que, l'utilisation de la solution électrolytique $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (10 mM) / KCl (0,1 M) a amélioré la cinétique du processus électrochimique, ensuite le revêtement des électrodes par une couche

derGO/PEI a bien été mis en évidence par la microscopie électronique à balayage et forme un bon support pour l'adhésion des anticorps

Les Voltampérogrammes d'impulsions différentielles (DPV) ont montré une repense potentiométrique sur l'intervalle 0.1 et 0.3 E/V en la présence de la bactérie *E. Coli*. Un pic de courant plus significatif de 7.10^{-5} I/A situé à 0.2 E/V a été observé en utilisant le nanocomposite GO/PEI en comparaison avec les autres nanocomposites AB, BSA et le BAC.

L'étude de la différence de concentration des bactéries allant de 0 UFC ml⁻¹ à 10⁹ UFC ml⁻¹ montre une repense potentiométrique dans un intervalle de potentiel qui varie entre 40 à 70 V avec Vitesse de balayage 100mV /s. Les ondes enregistrées sont superposées de manière inversement proportionnelle à la concentration ce qui s'explique par l'adhésion des bactéries aux anticorps fixés sur l'électrode qui empêche le passage du courant.

A l'avenir, de nombreuses perspectives sont envisageables afin d'améliorer les performances de ce biocapteur, de compléter et de compatibiliser les résultats d'une analyse classique avec ceux de la biodétection, et surtout s'élargir sur de nouvelles broches pouvant faire l'objet de prochaines études :

- ✓ Valider la spécificité de ce biocapteur par un autre essai sur une autre souche bactérienne (Salmonelles, Pseudomonas...);
- ✓ Etudier l'influence de la concentration en anticorps sur l'efficacité de la détection ;
- ✓ Etudier l'influence du temps d'incubation ;
- ✓ Etudier l'influence de la vitesse de balayage ;
- ✓ Faire un essai sur autre matériau à la place des électrodes d'or
- ✓ Faire appel à d'autres méthodes de caractérisation comme la photoluminescence, la microbalance de quartz ...

Références
bibliographiques

- © UMVF., 2014. Université Médicale Virtuelle Francophone : *Croissance des bactéries Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène.*
- Akil A., Hassan T., Lahcen B., Abderrahim L., 2014. *Etude de la qualité physico-chimique et contamination métallique des eaux de surface du bassin versant de Guigou, Maroc. EuropeanScientific Journal, 10(23).*
- Amrani C., 2017. *Etude de la qualité de l'eau du barrage Taksebt (Tizi-Ouzou)* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Arab L et Ouadfal N., 2015. *Evaluation de la qualité Physico-chimique et bactériologique des eaux brutes et traitées du barrage de TAKSEBT de la ville de TIZI OUZOU*, (Mémoire de master, Université Mouloud Mameri)
- Arhab T et Chebli T., 2021. *Evaluation de l'efficacité des grains de Moringa Oleifera dans la décontamination de l'effluent secondaire liquide de la STEP Est de la ville de Tizi-Ouzou* (Mémoire de Master, Université Mouloud Mameri).
- Avril J. L., Denis F., Dabernat H., Monteil H., 2000. *Bactériologie clinique*. 2ème édition Marketing, paris.
- Babou L et M'zyene N., 2018. *Suivi des paramètres physico-chimiques et biologiques des eaux brutes et traitées de la STEP Est de Tizi-Ouzou* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Balière C., 2016. *Les Escherichia coli potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral: cas des STEC et des EPEC* (Doctoral dissertation, Université de Bretagne Occidentale). Repéré à <https://archimer.ifremer.fr/doc/00312/42322/41653.pdf>
- Behloul S., 2009. *Evaluation de la matière organique dans l'eau du barrage de Timgad* (Doctoral dissertation, Batna, Université El Hadj Lakhdar. Faculté des Sciences de l'Ingenieur).
- Belghiti M. L., Chahlaoui A., Bengoumi D., El Moustaine R., 2013. *Etude de la qualité physico chimique et bactériologique des eaux souterraines de la nappe plio-quaternaire dans la région de Meknès (Maroc)*. LARHYSS Journal P-ISSN 1112-3680/E-ISSN 2521-9782, (14).
- Benkaddour N., 2016. *Contribution à l'étude de l'efficacité de la graine de Moringa Oleifera dans la dépollution des eaux d'Oued Safsaf*. Université de Science de la terre et de l'univers Abou Baker Belkaid, Telemcen

- **Bensena A., 2021.***Développement d'un Biocapteur pour la détection des polluants organiques: étude expérimentale et modélisation.* (Thèse Doctorat, Université ferhatabbas - setif1)
- **Berne F., Jean C., 1991.** *Traitement des eaux*, Édition TECHNIP, 1991, 306 p.
- **Bernier J. L., 2007.***Transfert technologique et validation de tests microbiologiques sur un laboratoire mobile conçu pour la surveillance de la qualité de l'eau en régions éloignées.*
- **Boucenina H., 2018.***Analyse bactériologique des eaux de certaines écoles à la wilaya de Mila.* Mémoire de master.
- **Boulanger., 2020.***Les traces de la bactérie escherichia coli dans le fleuve saint-laurent : pister la bactérie à l'aide de paramètres géographiques et temporels* (Maîtrise en environnement+Master Gestion Intégrée de l'Environnement, de la Biodiversité et des Territoires).UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE (Québec, Canada)
- **Bourget-Boulanger M. È., de l'Environnement M. G. I., 2020.***Sur les traces de la bactérie escherichia coli dans le fleuve saint-laurent: pister la bactérie à l'aide de paramètres géographiques et temporels.*
- **Camille D., 2003.** *Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : réglementation, prélèvement, analyse.*
- **Campos C. J., Kershaw S. R., Lee R. J., 2013.***Environmental influences on faecal indicator organisms in coastal waters and their accumulation in bivalve shellfish.* Estuaries and coasts, 36(4), 834-853. Repéré à [https://link-springer-com.ezproxy.usherbrooke.ca/content/pdf/10.1007/s12237-013-9599-y.pdf](https://link.springer.com.ezproxy.usherbrooke.ca/content/pdf/10.1007/s12237-013-9599-y.pdf)
- **Chevalier P., 2003.** *Coliformes Fécaux.* Groupe scientifique sur l'eau Institut national de santé publique du Québec. Fiche Coliformes fécaux.
- **Choinière S., 2018.***Comparaison de différentes stratégies de capture d'Escherichia coli sur des surfaces afin d'être appliquées aux biocapteurs.*
- **Dahmane A et Djadi S., 2016.** *Evaluation des paramètres physicochimiques et biologiques (bactéries et algues) des eaux brutes et traitées de la station de Souk El Djemaa (Daïra de Ain El Hammam)* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- **Dallaire A. M., 2015.** *Biocapteur plasmonique à sélectivité accrue basé sur des interrupteurs bio-électrochimiques* (Doctoral dissertation, École Polytechnique de Montréal).

- **Degremont., 2005.** *Mémento technique de l'eau*. Tome II. 10^{ème} édition. Lavoisier Tec et Doc, Paris. Dépôt légal (EAU SEINE NORMANDIE).
- **Derwich E., Benaabidate L., Zian A., Sadki O., Belghity D., 2010.** *Caractérisation physico-chimique des eaux de la nappe alluviale du haut Sebou en aval de sa confluence avec oued Fès*. LARHYSS Journal P-ISSN 1112-3680/E-ISSN 2521-9782, (8).
- **Diakite A., Mounkoro P., 2015.** *Recherche et étude du vibrion cholerae dans les eaux usées de l'oued Boumezroug*. (Mémoire de master, Université des Frères Mentouri Constantine)
- **Duplan V., Dubowski J. J., Frost E. H., Charlebois S., Hierneaux, P., 2011.** *Conception d'un biocapteur basé sur la photoluminescence du GAAS (001) pour la détection de micro-organismes*. Université de Sherbrooke.
- **El Hassani N. E. A., 2018.** *Conception et Réalisation de Capteurs et de Biocapteurs Electrochimiques à Base de Nanomatériaux pour le Contrôle de la Qualité en Agroalimentaire et pour l'Analyse Biomédicale* (Doctoral dissertation, Université de Lyon; Université Moulay Ismaïl (Meknès, Maroc). Faculté des sciences).
- **Gadin-Goyon N., 2002.** *Qualité bactériologique de l'eau et impact en élevage bovin laitier* (Doctoral dissertation).
- **Ghazali D et Zaid A., 2013.** *Etude de la qualité physico-chimique et bactériologique des eaux de la source Ain Salama-Jerri (Région de Meknès-Maroc)*. LARHYSS Journal P-ISSN 1112-3680/E-ISSN 2521-9782, (12).
- **Guergazi S et Achour S., 2005.** *Caractéristiques physico-chimiques des eaux d'alimentation de la ville de Biskra*. Pratique de la chloration. Larhyss Journal, 4, 119-127.
- **Guillet F., Bonnefoy C., Leyral G., Verne-Bourdais É., 2002.** *Microbiologie et Qualité dans les industries agroalimentaires*.
- **Haddad H et Ghoualem H., 2014.** *Caractérisation physico-chimique des eaux du bassin hydrographique cotier algérois*. LARHYSS Journal P-ISSN 1112-3680/E-ISSN 2521-9782, (18).
- **Hind A., 2017.** *Evaluation des teneurs en nitrates dans les sols et dans les eaux captées et émergentes en zones à vocation agricole*.

- **Kahlouche K., 2018.** *Microsystème pour la nanomédecine: application aux maladies nosocomiales et à la détection des agents pathogènes* (Doctoral dissertation, Bourgogne Franche-Comté).
- **Kengne-Momo R. P., 2011.** *Mise en oeuvre des surfaces spécifiques en vue de la détection de bactéries pathogènes par diffusion Raman* (Doctoral dissertation, Le Mans).
- **Leduc F et Vaurette D., 2016.** *Contrôle bactériologique de la potabilité des eaux*, TRESOR SOLIDARITE NIGER.
- **Lee S. Y., 1996.** *High cell-density culture of Escherichia coli*. Trends in biotechnology, 14(3), 98-105. [Http://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](http://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9).
- **Lounnas A., 2009.** *Amélioration des procédés de clarification des eaux de la station Hamadikroma de Skikda*. Mémoire de Magister Option: pollution chimique et environnementale à la Faculté des sciences.
- **Madigan M et Martinko J., 2007.** *Biologie des microorganismes*. 11eme édition. 1047p.
- **Maiga A. S., 2005.** *Qualite organoleptique de l'eau de consommation produite et distribue par l'EDM. SA dans la ville de Bamako*.
- **Makhoukh M., Sbaa M., Berrahou A., Van Clooster M., 2011.** *Contribution à l'étude physico-chimique des eaux superficielles de l'Oued Moulouya (Maroc oriental)*. LARHYSS Journal P-ISSN 1112-3680/E-ISSN 2521-9782, (9).
- **Massicotte G., 2013.** *Biocapteur ampérométrique intégré pour une unité de détection dédiée aux neurotransmetteurs* (Doctoral dissertation, École Polytechnique de Montréal).
- **Mathélié-Guinlet M., 2017.** *Etude de l'interaction nanoparticules-bactéries: application à l'élaboration d'un biocapteur: Study of the interactions between nanoparticles and bacteria: application in the design of a biosensor for bacteriadetection* (Doctoral dissertation, Bordeaux).
- **Melghit M et Afri-Mehennaoui F. Z., 2012.** *Qualité physico-chimique, pollution organique et métallique des compartiments Eau/Sédiments de l'Oued Rhumel, et des barrages Hammam Grouz et Beni Haroun* (Doctoral dissertation, Université Mentouri Constantine).

- **Merabet S., 2010.** *Évaluation de la qualité physico-chimique des eaux brutes et distribuées du barrage réservoir de Beni Haroun* (Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine)
- **Merhabi F., Amine H., Halwani J., 2019.** *Evaluation de la qualité des eaux de surface de la rivière Kadicha*. Journal Scientifique Libanais, 20(1), 10-34.
- **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* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- **Orelien F., 2017.** *Etude de la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine dans le sous-bassin versant de Ravine Diable (Anse-a-Veau)*.
- **Osbuild D., Babut M., Vasseur P., 2015.** *Biosensors for Environmental Monitoring and Water Control: Review - State of the Art, Les biocapteurs appliqués au contrôle des eaux: Revue - État de l'art* Revue des sciences de l'eau Journal of Water Science.
- **Painchaud J., 1997.** *La qualité de l'eau des rivières du Québec: état et tendances*. Ministère de l'environnement et de la faune.
- **Pardoux E., 2019.** *Détection à large spectre de pathogènes bactériens à l'aide de peptides antimicrobiens* (Doctoral dissertation, Université Grenoble Alpes (ComUE)).
- **Pierre S., Gilles B., Tamara G-A., Isabelle G., Alexandre G., Sylvie T., 2009.** *La contamination microbienne dans le bassin de la Seine* .programme inter disciplinaire de recherche sur l'environnement de la seine.
- **Pourcher S., 2007.** *Apport diagnostique du dénombrement de Clostridium perfringens dans l'intestin grêle des ruminants suspects d'entérotoxémie* (Doctoral dissertation).
- **Ramade F., 2000.** *Dictionnaire encyclopédique des pollutions: les polluants: de l'environnement à l'homme*. Ediscience international.
- **Ran L et Djikpo A., 2017.** *Effets des pratiques agricoles sur la pollution des eaux de surface en République du Bénin*. Larhyss Journal, 30, 2017.
- **Recoules L., 2015.** *Biocapteur pour la surveillance de la qualité de l'eau: Application aux eaux pluviales et de stations d'épurations* (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- **Riether K. B., 2001.** *Développement d'un biocapteur bactérien pour la détection de métaux lourds* (Doctoral dissertation, Université Paul Verlaine-Metz).

- **Rodier J., 2005.***L'analyse de l'eau naturelle, eaux résiduaires, eaux de mer.* 8ème Edition DUNOD technique.
- **Rodier J., Legube B., Merlet N., 2009.***L'analyse de l'eau.* 9eme édition entièrement mise à jour. Dunod paris, 1526p.
- **Roland V., 2003.** *Eau, environnement et santé publique, introduction à l'hydrologie* 2emeédition, Lavoisier 397p.
- **Saadi B et Mechache R., 2018.** *Suivi de la qualité bactériologique des eaux de consommation avant et après distribution du barrage Taksebt TO* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- **Samantha P., 2018.** *Méthodes d'identification bactérienne par PCR quantitative applique à un modèle de biofilm oral pluri espèces dynamique université de bordeaux collège des sciences de la sante UFR des sciences odontologiques.*
- **Sari H., 2014.***Contribution à l'étude de la qualité physico-chimique et bactériologique de l'eau de la source «Attar»(Tlemcen).* Mémoire de Master. Université Abou-BekrBelkaid, Tlemcen, 9-10.
- **Savary., 2010.***Guide des analyses de la qualité de l'eau.* Edition Territorial Voiron. P261.
- **Sboui D., 2016.** *Développement et évaluation d'un micro-biocapteur électrochimique pour l'immuno-détection en temps réel de Legionellapneumophila dans les échantillons environnementaux* (Doctoral dissertation, Lyon).
- **Tarbague H., 2011.** *Étude et mise au point d'une plateforme de biodétection de micro-organismes couplant immunocapteur a ondes de love et dispositfs PDMS microfluidiques* (Doctoral dissertation, Université Sciences et Technologies-Bordeaux I).
- **Thayer B., Riahi K., Boudhraa H., 2007.** *Élimination de la turbidité par oxygénation et filtration successives des eaux de la station de Sfax (Sud de la Tunisie).* Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science, 20(4), 355-365.
- **Van Elsas J. D., Semenov A. V., Costa R., Trevors J. T., 2011.** *Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects.* The ISME journal, 5(2), 173-183. Repéré à <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.80>

ANNEXE 01**Maladies transmissibles par voie hydrique
(Jean-Luc Bernier, 2007)**

Tableau 1 : Microorganismes pathogènes transmissibles par consommation d'eau (Source : [29], [30] et [31])

Microorganismes	Maladies	Symptômes cliniques	Persistence dans l'eau	Résistance au chlore
Virus				
Hépatite A	Hépatite virale	Hépatite	> 1 mois	modérée
Virus de l'Hépatite E	Hépatite virale	Hépatite	> 1 mois	modérée
Norovirus et Sapovirus	Gastroentérite	Diarrhées, vomissement	> 1 mois	modérée
Entérovirus	Variés dont poliomyélite	Variés	> 1 mois	modérée
Adénovirus (sérotype 40-41)	Gastroentérites		> 1 mois	modérée
Autres virus entériques				
Bactéries				
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra	Large spectre de diarrhées	> 1 mois	faible
<i>Salmonella</i> spp.	Salmonellose	Diarrhées et fièvre	> 1 mois	faible
<i>Salmonella typhi</i>	Fièvre typhoïde	Fièvre, douleur abdominale et mortalité	> 1 mois	faible
<i>Shigella</i> spp.	Shigellose (dysenterie bacillaire)	Diarrhées avec perte de sang	> 1 mois	faible
<i>Campylobacter</i> spp.	Campylobactériose et fièvre de Pontiac	Diarrhées avec perte de sang	> 1 mois	faible
<i>Legionella</i>	Légionellose	Diarrhées liquide	> 1 mois	faible
<i>E. coli</i> enterotoxigène		Diarrhées avec perte de sang	> 1 mois	faible
<i>E. coli</i> entérohémorragique		Fièvre, diarrhées et douleur abdominale	> 1 mois	faible
<i>Yersinia</i> spp.	Yersiniose	Lésions purulentes ou mucocutanées avec symptômes de typhoïde	> 1 mois Non-établi	faible Non-établi
<i>Francisella tularensis</i>	Tularémie	Lésions multiples (respiratoire, peau, etc.)	Non-établi	Non-établi
<i>Helicobacter pylori</i>	Variés		Possibilité de multiplication	
<i>Mycobacteria</i> spp. (sauf <i>M. tuberculosis</i>)	Cancer gastrique			élevée
Parasites				
<i>Schistosoma</i> spp.	Schistosomiase	Infection urinaire, cancer de la vessie	> 1 mois	modérée
<i>Dracunculus medinensis</i>	Dracunculiasis	Ulcers	> 1 mois	modérée
<i>Giardia duodenalis</i>	Giardiase	Diarrhées et douleurs abdominales	> 1 mois	élevée
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Cryptosporidiose	Diarrhées prolongées	> 1 mois	élevée
<i>Cyclospora cayentanensis</i>	Cyclosporiase	Diarrhées et douleurs abdominales	> 1 mois	élevée
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amibiase	Diarrhées	> 1 mois	élevée
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmose	Fièvre glandulaire, mortalité du fœtus	> 1 mois	élevée

ANNEXE 02

Principaux groupes et genres d'agents pathogènes responsables de maladies d'origine hydrique (Pierre *et all* 2009).

GROUPES DE MICRO-ORGANISMES	PATHOGENES	PATHOLOGIES
VIRUS	Entérovirus (polio, écho, coxsackie)	Méningite, paralysie, fièvres, myocardie, problèmes respiratoires et diarrhée
	Hépatite A et E	Infections hépatiques
	Calicivirus humains	
	Norovirus	Diarrhée/gastro-entérite
	Sapporovirus	Diarrhée/gastro-entérite
	Rotavirus	Diarrhée/gastro-entérite
	Astrovirus	Diarrhée
	Adenovirus	Diarrhée, infections oculaires et problèmes respiratoires
	Reovirus	Problèmes respiratoires et entériques
BACTÉRIES	<i>Salmonella</i>	Fièvre typhoïde et diarrhée
	<i>Shigella</i>	Diarrhée
	<i>Campylobacter</i>	Diarrhée (cause première des intoxications alimentaires)
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Diarrhée
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 et certaines autres souches	Diarrhée risque de complications (urémie hémolytique) chez les enfants en bas âges
	<i>Legionella pneumophila</i>	Pneumonie et autres infections respiratoires
PROTOZOAIRES	<i>Naegleria</i>	Méningo-encéphalite
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Dysenterie amibienne
	<i>Giardia lamblia</i>	Diarrhées chroniques
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Diarrhée sévère, mortelle chez les individus immuno-déprimés
	<i>Cyclospora</i>	Diarrhée
	<i>Microsporidies</i> incluant <i>Enterocytozoan</i> spp., <i>Encephalitozoan</i> spp., <i>Septata</i> spp., <i>Pleistophora</i> spp., <i>Noaxema</i> spp	Diarrhées chroniques, affaiblissement, problèmes pulmonaires, oculaires, musculaires et rénaux
CYANOBACTÉRIES	<i>Microcystis</i>	Diarrhée par ingestion des toxines produites par ces organismes (la toxine microcystine est impliquée dans des lésions hépatiques)
	<i>Anabaena</i>	Pathologies neurologiques liées à l'ingestion de neurotoxines
	<i>Aphanizomenon</i>	Pathologies neurologiques liées à l'ingestion de neurotoxines
PHYTOPLANKTON TOXIQUE	<i>Dinophysis</i>	Intoxications diarrhéiques
	<i>Alexandrium</i>	Pathologies neurologiques liées à l'ingestion de neurotoxines
HELMINTHES	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariasis

ANNEXE 03/A**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 Tél. : 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, thrombocytopénie 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 ypet Mac Conkey, Drigalski.

ANNEXE 03/B

- **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*.

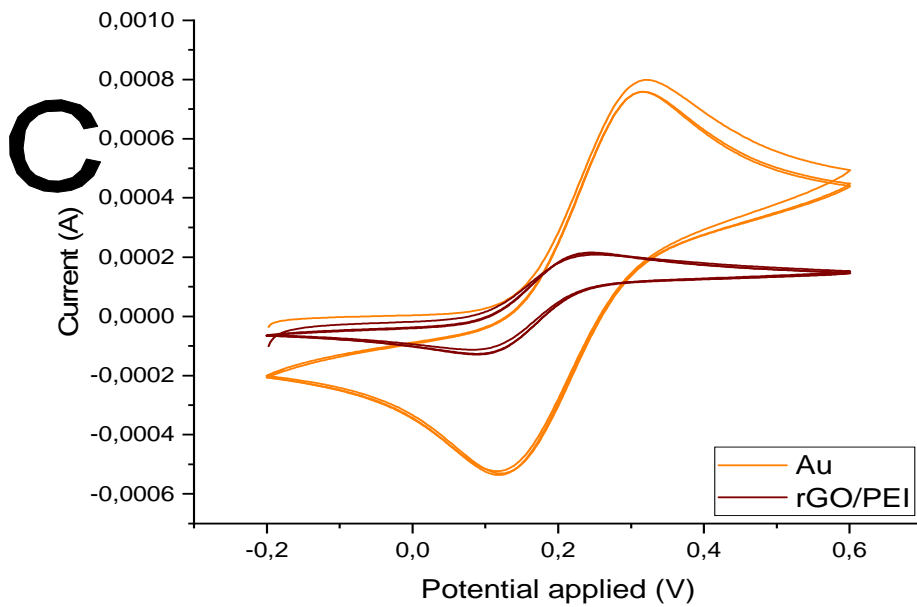
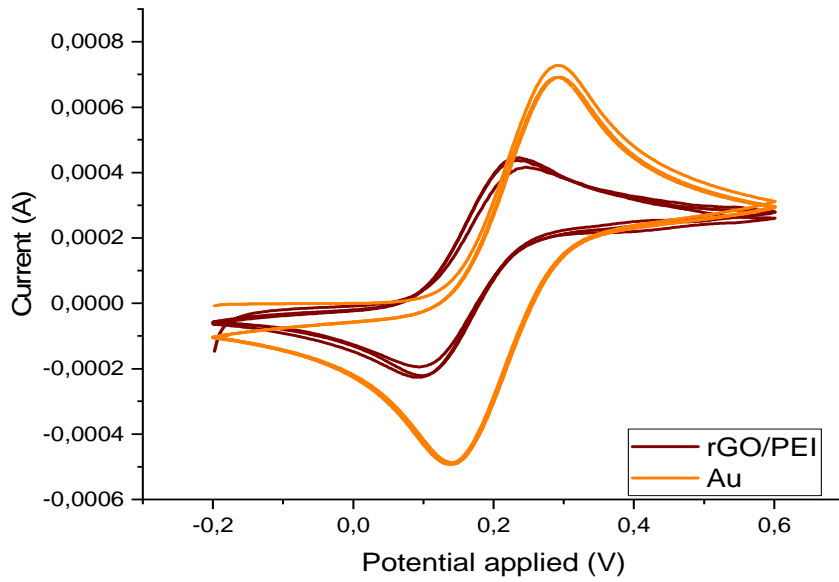
Le mécanisme de résistance acquise résulte le plus fréquemment d'une modification de cible. Repérer si la souche a un profil sauvage ou de résistance acquise : les entérobactéries de profil sauvage sont S à l'acide nalidixique.

4-autres :

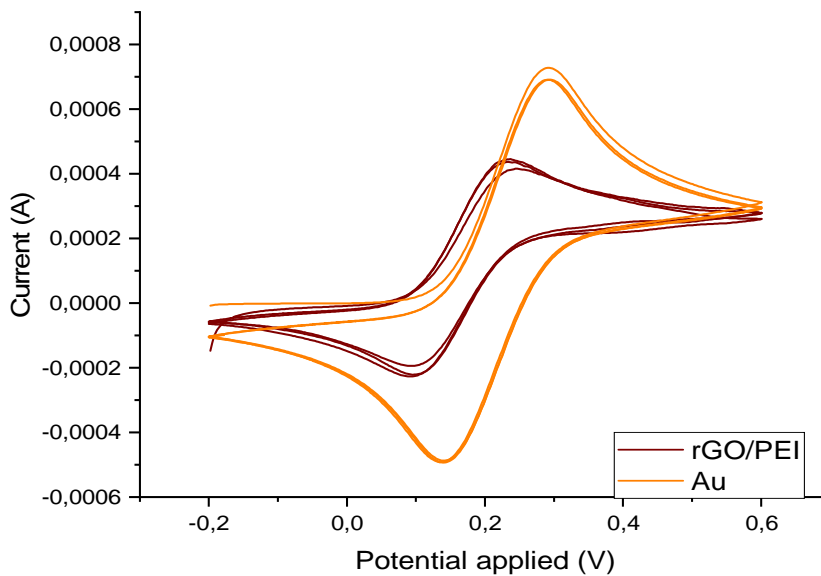
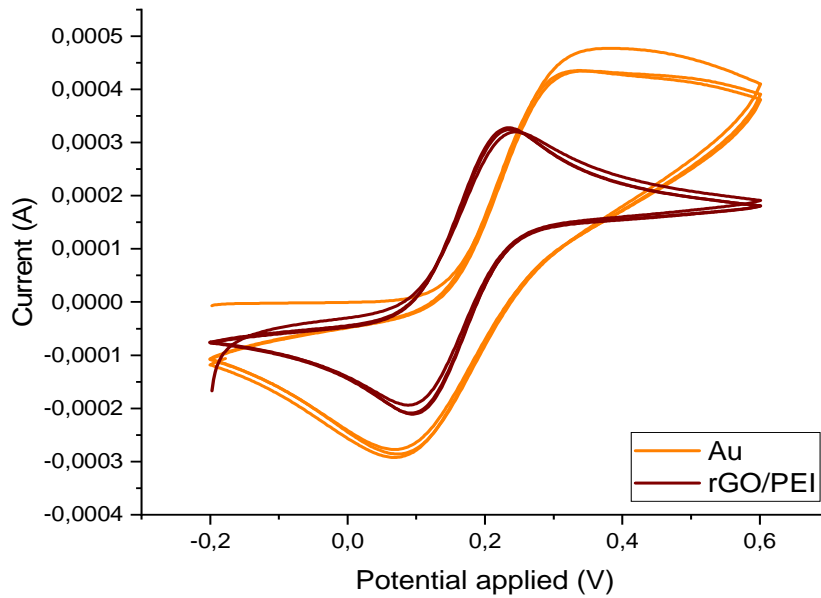
Taux de sensibilité fort et stable pour fosfomycine-trométanol et nitrofurantoïne.

Dr. Danielle CLAVE
Expert biologiste -Bactériologie
CHU TOULOUSE

Fiche technique _ Bactériologie 153

ANNEXE 04/A

**Voltamétrie cyclique (CV) de quatre (04) électrodes d'or (Au) dans $K_3Fe(CN)_6$ (10 mM) / KCl (0.1 M);
vitesse de scan $20mVs^{-1}$**

ANNEXE 04/B

**Voltamétrie cyclique (CV) de quatre (04) électrodes d'or (Au) dans $K_3Fe(CN)_6$ (10 mM) / KCl (0.1 M);
vitesse de scan $20mVs^{-1}$**

ANNEXE 05/A

**Domaines d'applications des biocapteurs
(KENGNE - MOMO 2011)**

Domaine d'application	Types de biocapteur	Utilisation
Agroalimentaire	optique	<ul style="list-style-type: none"> - quantification des divers acides carboxyliques comme l'acide ascorbique (dans les jus de fruits) et l'acide citrique (fruits, jus de fruits, boissons pour sportifs) [21]
		<ul style="list-style-type: none"> - l'évaluation du taux d'antioxydant (les polyphénols) dans l'huile d'olive, le vin et le thé vert [67] - détection des contaminants (pathogènes, pesticides, microorganismes et toxine) [2, 8, 10-17]; - détection de sulfaméthazine dans le lait et dans des échantillons de bile de porc, en utilisant un seuil déterminé de 0,4 µg/ml ;
Station d'épuration	ampérométrique	<ul style="list-style-type: none"> - mesure des métaux lourds (Cr, Mn, Mo) [8, 9] - mesure de polluants organiques (cyanure d'éthyl-n-dimethylphosphoramide, phosphonofluorure d'isopropylmethyle,

ANNEXE 05/B

**Domaines d'applications des biocapteurs
(KENGNE - MOMO 2011)**

		<p>phosphonofluorure de picacolyméthyle),</p> <ul style="list-style-type: none"> - détection de carbamate⁸(carbofuran : 0,01nM) [5-7, 68]; - mesure de pesticides organophosphorés de concentration de l'ordre de 10^{-12} mol / l [11]
Santé	ampérométrie	<ul style="list-style-type: none"> - estimation du glucose, urée [69], cholestérol, glutamate[2-4]; - concentration du lactate dans le sang des athlètes pour prévenir la fatigue musculaire et les crampes [16] ; - détection de l'éthanol dans le souffle, la salive et le sang humain [16] ; - permet d'étudier l'effet des pesticides sur les paramètres cytogénétiques et biochimiques des souris et leurs embryons [70] ; - détection des pathogènes à l'exemple du <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, <i>Vibrio cholerae</i>, <i>Treponema pallidum</i> ; <i>salmonella</i> [71] ; - traitement de la maladie d'Alzheimer [72]
Environnement	potentiométrie	<ul style="list-style-type: none"> - détection du trichlorfon⁹(2.10^{-4} nM)[69] - détection des composés organophosphorés (toxiques)[5-7, 17, 22, 25, 28]

ANNEXE 06

Qualité bactériologique requise pour les eaux douces superficielles utilisées pour la production d'eau livrée à la consommation humaine (Directive du Conseil des Communautés européennes du 16/06/1975 (n° 75/440)).
(Pierre Servais et al2009)

	Valeur guide A1	Valeur guide A2	Valeur guide A3
Coliformes totaux	50 / 100 ml	5000 / 100 ml	50000 / 100ml
Coliformes fécaux	20 / 100 ml	2000 / 100 ml	20000 / 100 ml
Salmonelles	Absence dans 5 l	Absence dans 1 l	
Streptocoques fécaux	20 / 100 ml	1000 / 100 ml	10000 / 100 ml

A1, A2, A3 : procédés de traitements types permettant la transformation des eaux superficielles en eau alimentaire.

Tableau 3 : Qualité bactériologique requise pour les eaux douces superficielles utilisées pour la production d'eau livrée à la consommation humaine (Directive du Conseil des Communautés européennes du 16/06/1975 (n° 75/440)).

A1, A2, A3 : procédés de traitements types permettant la transformation des eaux superficielles en eau alimentaire.





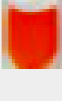
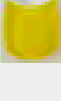
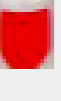
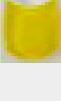


















A1 : traitement physique simple et désinfection, par exemple filtration rapide et désinfection.

A2 : traitement normal physique, chimique et désinfection, par exemple préchloration, coagulation, floculation, décantation, filtration, désinfection (chloration finale).

A3 : traitement physique, chimique poussé, affinage et désinfection, par exemple chloration, coagulation, floculation, décantation, filtration, affinage (carbone actif), désinfection (ozone, chloration finale).

ANNEXE 07

Tableau de lecture de la galerie biochimique Api 20 E

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou Indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β -galactosidase	Lecture directe		
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Lecture directe		
LDC	Lysine	Lysine décarboxylase			
ODH	Ornithine	Ornithine décarboxylase			
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétolne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d'o-naphtol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ ⁻ / NO ₃ ⁻	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Annexe 08TABLE DE MAC GREDY

Nombre Caractéristique	Nombre de Micro-organismes	Nombre Caractéristique	Nombre de Micro-organismes
000	0,0	222	3,5
001	0,3	223	4,0
010	0,3	230	3,0
011	0,6	231	3,5
020	0,6	232	4,0
100	0,4	300	2,5
101	0,7	301	4,0
102	1,1	302	6,5
110	0,7	310	4,5
111	1,1	311	7,5
120	1,1	312	11,5
121	1,5	313	16,0
130	1,6	320	9,5
200	0,9	321	15,0
201	1,4	322	20,0
202	2,0	323	30,0
210	1,5	330	25,0
211	2,0	331	45,0
212	3,0	332	110,0
220	2,0	333	140,0
221	3,0		

Résumé

La présence des bactéries pathogènes comme *Escherichia Coli* dans l'eau de consommation peut générer des épidémies et menacer la santé publique. Les méthodes traditionnelles de détection des bactéries nécessitent plusieurs jours, des laboratoires complexes, et demandent un capital notable. L'utilisation de biocapteurs permet une économie du temps, du matériel et d'espace par leur rapidité d'exécution, et une surveillance prospective à distance et la portabilité des appareils. L'objectif de notre travail a été en premier lieu, d'évaluer par la méthode classique des milieux de cultures la qualité bactériologique d'une eau de surface (barrage Taksebt), par laquelle on a constaté la présence d'une flore mésophile totale indénombrable à 22 °C et 37 °C, Coliformes totaux < 300 UFC/ml, coliformes fécaux 10 UFC/ml, 25 salmonelles, des résultats positifs sur *Escherichia Coli* et les vibrions, et négatif pour les Streptocoques fécaux et les Clostridium sulfite-réducteurs. Le deuxième volet de l'étude, et après avoir détecté et isolé notre bactérie cible *Escherichia Coli*, comprend la mise au point d'un biocapteurs électrochimique qui a commencé par la fonctionnalisation des électrodes d'or par électrodéposition de rGO/PEI suivi d'un greffage d'anticorps anti-fimbriae *E. Coli* UTI89 aux groupes amine de PEI par une liaison covalente, puis incubation d'une série de concentration bactérienne sur des anticorps anti-fimbriae *E. Coli*, nos électrodes fonctionnalisées sont ensuite caractérisées par voltammétrie cyclique, spectrométrie Raman et MEB. Enfin la réponse électrochimique enregistrée montre que le signal électrochimique diminue avec l'augmentation de la concentration bactérienne ou nous avons enregistré des valeurs de courant respectivement de 1,120 A -1,09 A et 0,57 A correspondant à 10^4 UFC/ml 10^7 UFC/ml et 10^9 UFC/ml.

Mots-clés : Anticorps, biorécepteur, méthode électrochimique, voltammétrie cyclique, spectrophotométrie Raman, MEB. rGO/PEI.

Abstract

The presence of pathogenic bacteria such as *Escherichia Coli* in drinking water can cause epidemics and threaten public health. Traditional methods of detecting bacteria require several days, complex laboratories, and are capital intensive. The use of biosensors allows saving of time, material and space due to their speed of execution, and prospective remote monitoring and portability of the devices. The objective of our work was first to evaluate the bacteriological quality of a surface water (Taksebt dam) by the classical method of culture media, by which we noted the presence of a total mesophilic flora that could not be counted at 22 °C and 37 °C, Total coliforms < 300 CFU/ml, faecal coliforms 10 CFU/ml, 25 salmonella, positive results for *Escherichia Coli* and vibrios, and negative for faecal Streptococci and sulphite-reducing *Clostridium*. The second part of the study, and after detecting and isolating our target bacterium *Escherichia Coli*, includes the development of an electrochemical biosensor which started with the functionalization of gold electrodes by rGO/PEI electrodeposition followed by grafting of anti-fimbriae *E. Coli* UTI89 to the amine groups of PEI by covalent bonding, followed by incubation of a bacterial concentration series on anti-fimbriae *E. Coli*, our functionalized electrodes are then characterized by cyclic voltammetry, Raman spectrometry and SEM. Finally the electrochemical response recorded shows that the electrochemical signal decreases with increasing bacterial concentration where we recorded current values of 1.120 A -1.09 A and 0.57 A respectively corresponding to 10^4 CFU/ml 10^7 CFU/ml and 10^9 CFU/ml.

Keywords: Antibody, bioreceptor, electrochemical method, cyclic voltammetry, Raman spectrophotometry, SEM. rGO/PEI.