

N° d'Ordre :

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S.N.V.)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé du thème :

Contribution à l'évaluation de la résistance et la formation de biofilms de souches de *Pseudomonas aeruginosa* d'origine hospitalière

Présenté par : **Melle** Merabbi Nour El Houda

Melle Kadid Ikram

Mémoire soutenu devant l'honorable jury composé de :

Président de jury:	Mr Marroki Ahmed	(M.C.A/UDL/SBA)
Examinatrice :	Mme Khaldi Amina	(M.C.A/UDL/SBA)
Promoteur :	Mme Bousmaha Marroki Leila	(M.C.A/UDL/SBA)

Année universitaire 2019 - 2020

Session : « Septembre »

Remerciement

*Nous remercions en premier lieu **ALLAH** le tout puissant de nous avoir illuminé et ouvert les portes de savoir, et de nous avoir donné la volonté et le courage d'élaborer ce travail.*

*Nous tenons à remercier profondément et sincèrement tous ceux qui ont participés de près ou loin à la réalisation de ce travail et particulièrement, notre profond remerciement s'adresse en premier lieu à notre encadreur Mme **BOUSMAHA-MARROKI L.** Maitre de Conférences A à l'**UDL-SBA** d'avoir accepté de diriger ce travail, pour son aide, ses encouragements, ses précieux conseils, sa confiance, sa patience, tous au long de la réalisation de ce mémoire. Pour tout cela, nous tenons à vous exprimer nos sentiments de profonde gratitude.*

*Avec tous nos respects nous tenons à vous remercier Mr **MARROKI A.** Maitre de Conférences A à l'**UDL-SBA** d'avoir accepté de présider le jury et d'avoir veillé au bon déroulement de notre formation académique pour l'obtention d'un master en Microbiologie Appliquée.*

*Nos remerciements s'adressent à Mme **Khaldi A.** Maitre de Conférences A à l'**UDL-SBA** d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous remercions également les membres du laboratoire de bactériologie du **CHU** de Sidi Bel Abbès d'avoir accepté de vous recevoir pour un stage pratique. Ce stage fut interrompu par le fait de la crise sanitaire liée à la pandémie du Covid19.*

Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à :

Mes chers parents pour la patience et l'encouragement qu'ils ont constamment montré, que ce travail soit la récompense de tous leurs sacrifices, que dieu les protège et les garde. Je ne dirais jamais assez exprimer mon amour et mes remerciements :

Merci ma très chère mère et mon cher père

Mes très chères sœurs : Louiza et Abassia Malek

A tous les membres de ma famille A mon binôme

Akram

Enfin mon plus profond respect va tout droit à mes aimables professeurs dans tous les cycles de ma scolarité qui m'ont éclairé la voie du savoir

Et à tous la promotion de la microbiologie appliquée

Merabbi Nour El Houda

Dédicaces

Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à :
Mes chers parents pour la patience et l'encouragement qu'ils
ont constamment montré, que ce travail soit la récompense
de tous leurs sacrifices, que dieu les protège et les garde. Je ne
dirais jamais assez exprimer mon amour et mes
remerciements :

Merci ma très chère mère et mon cher père

Mes très chères sœurs : Khouloud et Amina

Mon cher frère : Oussama

A mon binôme Nour El Houda

A tous les membres de ma famille

Enfin mon plus profond respect va tout droit à mes aimables
professeurs dans tous les cycles de ma scolarité qui m'ont éclairé
la voie du savoir

Et à tous la promotion de la microbiologie appliquée

Kadid Ikram

Résumé

Résumé

Ce travail vise à contribuer à mettre en évidence le niveau de résistance de *P.aeruginosa* et sa capacité à échapper à l'action thérapeutique en milieu hospitalier. Cette espèce est une bactérie pathogène opportuniste responsable essentiellement d'infection nosocomiale chez les patients immunodéprimés. Cette espèce manifeste vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui aboutit à des problèmes thérapeutiques souvent aigus. Elle est susceptible d'être agent d'infections chroniques causées par la formation de biofilm.

Nous avons visé l'isolement, l'identification de souches de *P. aeruginosa* isolées dans divers services du CHU de Sidi Bel Abbes, mais notre étude pratique a été interrompu par le fait de la crise sanitaire liée à la pandémie du Covid-19. L'étude comptait une étape d'isolement de souches du milieu hospitalier. L'identification, l'étude de l'antibiorésistance et l'évaluation de l'aptitude à former des biofilms de souches été programmées dans le laboratoire de bactériologie du CHU de Sidi Bel Abbès.

LES MOTS CLES :

P. aeruginosa, milieu hospitalier, résistance aux antibiotiques, formation de biofilm.

ABSTRACT:

This work aims to help highlight the level of resistance of *P.aeruginosa* and its ability to escape therapeutic action in hospitals. This species is an opportunistic pathogenic bacterium mainly responsible for nosocomial infection in immunocompromised patients. This species manifests an increasing power of adaptation towards antibiotics, which results in often acute therapeutic problems. It is likely to be the agent of chronic infection caused by the formation of biofilm

We aimed for isolation, the identification of strains of *P.aeruginosa* isolated in various departments of the CHU of Sidi Bel Abbès, but our practical study was interrupted by the health crisis linked to the Covid – 19 pandemic. The study included a stage of isolating strains from the hospital environment. The identification study of antibiotic resistance and evaluation of the ability to form biofilms of strains were scheduled in the bacteriology laboratory of the CHU of Sidi Bel Abbès.

Key words:

P.aeruginosa, hospital environment, antibiotic resistance, biofilm formation

ملخص

يهدف هذا العمل إلى المساعدة في إثبات مستوى مقاومة *P aeruginosa* و قدرتها على الهروب من الإجراءات العلاجية في المستشفيات. هذا النوع من البكتيريا الممرضة الانتهازية المسؤولة بشكل رئيسي عن عدوى المستشفيات في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة. يظهر هذا النوع قوة تكيفية كبيرة بشكل متزايد تجاه المضادات الحيوية ، مما يؤدي غالبا إلى مشاكل علاجية حادة. من المحتمل ان يكون عامل العدوى المزمدة التي يسببها تكوين الأغشية الحيوية الدقيقة.

استهدفنا العزلة و تحديد لسلاطات *P aeruginosa* المعزولة في أقسام مختلفة من CHU في سيدي بلعباس ، لكن دراستنا العملية توقفت بسبب الأزمة الصحية المرتبطة بوباء Covid-19 . اشتملت الدراسة على مرحلة عزل السلالات من بيئة المستشفى. تم تحديد و دراسة مقاومة المضادات الحيوية و تقييم القدرة على تكوين الأغشية الحيوية للسلالات في مختبر علم الجراثيم في CHU بسيدي بلعباس.

الكلمات المفتاحية

P aeruginosa ، بيئة المستشفى ،مقاومة المضادات الحيوية ، تكوين الأغشية الحيوية .

Table de matière

TABLE DES MATIERES :

INTRODUCTION	1
Synthèse bibliographique.....	2
I .<i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	2
I.1.Généralité.....	2
I.2. Habitat.....	2
I.3.Taxonomie.....	3
I.4.Caractère bactériologiques.....	3
I.4.1.Caractères morphologique	3
I.4.2.Caractères biochimiques et métabolique.....	4
I.4.3.Caractères cultureux.....	4
I.4.4.Caractères génomique.....	5
I.5.Diagnostic bactériologiques.....	5
I.6.Infections causées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
I.7.Facteurs de virulence.....	6
II .Résistance aux antibiotiques des <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	7
II.1.Généralité sur la résistance.....	7
II.1.1.Résistance naturelle.....	8
II.1.2.Résistance acquise.....	8
II.2.Résistance aux b lactamines.....	8
II.2.1.Céphalosporinases codée par le gène chromosomique ampC.....	8
II.2.2.B lactamases acquises.....	9
II.2.3.Imperméabilité aux carbapénèmes.....	9
II.2.4.Système d'efflux actif.....	10
II.3.Résistance aux aminosides	10
II.4.Résistance aux fluoroquinolones.....	10
II.5.Résistance à la colistine	11
III. Méthode d'étude de la résistance aux antibiotiques.....	12
III.1.Méthode de diffusion par disque : l'antibiogramme.....	12
III.2.Méthode par dilution.....	13
III.3.E-test.....	13

IV. Biofilm à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
IV.1.Généralités sur les biofilm	13
IV.2.Biofilms médicaux.....	14
IV.3.Formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
IV.3.1.Quorum sensing chez <i>P .aeruginosa</i>	15
IV.3.2.Résistance par formation de biofilm.....	16
V. Méthode de détection de biofilm.	16
V.1.Méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	17
V.2.La méthode en tube(TM).....	18
V.3.La culture sur Rouge Congo Agar (RCA).....	18
Matériel et méthodes	20
I .Origine et prélèvement des souches bactériennes	20
II. Isolement et identification de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
II.1.Isolement.....	20
II.2. Identification.....	20
II.2.1.Examen macroscopique des cultures.....	20
II.2.2.Examen après coloration de Gram.	20
II.2.3.La recherche de l'oxydase..	20
II .2 .4.La pigmentation.	20
II.2 .5.Identification par le système API 20	21
III. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	21
IV .Etude de la production de b-lactamase	22
IV .1.Technique.....	22
IV.2.Lecture.....	23
V. Détection de la formation de biofilm de <i>P .aeruginosa</i>	23
V.1.La détection par la technique TCP et TM.	23
V. 2.La détection par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA).....	24
CONCLUSION,.....	25
Référence bibliographiques	26
Résumé	34

Liste des abréviations

ADH : Arginine di hydrolase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AHL : Acyle Homosérines Lactones

AI : Auto –Inducteur

ARN : Acide ribonucléique

ATB : Antibiotique

BCC : Bouillon Cœur Cerveau

BFRT: Biofilm Ring Test

BHIB: Bouillon Heart Infusion Broth

BLSE : Béta –lactamase à spectre large

BN : Bouillon Nutritif

CASFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice

CV : Cristal Violet

DO : Densité Optique

EPS : Exo Polysaccharides

G+C% : Guanine +Cytosine %

LDC : Lysine décarboxylase

LPS : Lipopolysaccharides

NE : Non Entérobactérie

ODC : Ornithine décarboxylase

ONPG: Orthonotrophényl –B-D- galacopyranoside

PAMP: Pathogene -Assosiated Molecular Pattern

PBS: Tampon Phosphate Salin

PIA: Polysaccharide Intercellular Adhesin

QS:Quorum Sensing

RCA: Rouge Congo Agar

TCP : Plaque de Culture de Tissus

TM : Méthode en Tube

Liste des figures

Figure 1 : Quelques individus de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
Figure 2 : Ciliature mono triche de <i>P. aeruginosa</i>	3
Figure 3 : Différents aspects de colonies de <i>P. aeruginosa</i>	4
Figure 4 : Antibiogramme.....	13
Figure 5 : Une coupe transversale d'une sonde urinaire en silicone à demeure L'image montre l'incrustation de la sonde par un biofilm.....	15
Figure 6 : Formation de biofilm en microplaque.....	18
Figure 7 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM.....	19
Figure 8 : Culture sur la gélose Rouge Congo,.....	19

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> , leurs modes d'actions et conséquences cliniques.....	7
Tableau 2 : Liste partielle d'infections humaines impliquant des biofilms.....	15
Tableau3 : Antibiotiques testés pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Tableau4 : Tests de formation de biofilm effectués.	23

Introduction

INTRODUCTION

Actuellement, *Pseudomonas aeruginosa* occupe une place majeure dans les établissements de santé comme agent d'infections nosocomiales graves, d'infections potentiellement mortelles chez les personnes immunodéprimées et d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose (**BenHaj Khalifa et al., 2011 ; Elyajouri, 2012**). La fréquence des infections à bacille pyocyanique s'accroît régulièrement en milieu hospitalier (**Diarra, 2009**).

Au cours de la dernière décennie, les infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* ont été rapportées partout dans le monde, avec une émergence rapide et croissante de souches multirésistantes (**Gaynes et Edwards, 2005**). Une enquête méditerranéenne de prévalence en 2010 attribue à *P. aeruginosa* la responsabilité de 9,2 % de l'ensemble des infections nosocomiales, le plaçant ainsi au 3^{ème} rang des espèces isolées (**Amazian et al., 2010**).

La surveillance épidémiologique des résistances aux antibiotiques des bacilles à Gram négatif, dont les souches de *P. aeruginosa*, montre ces dix dernières années en Algérie l'émergence de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques (**Drissi et al., 2008**). Ceci reflète la problématique des souches multirésistantes, présentant des résistances associées à au moins 3 classes d'antibiotiques, pour lesquelles la colistine reste souvent la seule molécule active, compliquant ainsi la prise en charge thérapeutique des patients (**Samonis, 2012**).

P. aeruginosa, produit des agrégats structurés ou biofilms maintenus par une matrice protectrice (**khalilzadeh, 2009**). Le biofilm est important dans la pathogénie de *P. aeruginosa* car il lui permet de persister sur les dispositifs médicaux implantables et de constituer un réservoir, notamment dans les hôpitaux et de résister aux antibiotiques et aux désinfectants. Il est directement impliqué dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose et les infections sur matériels médicaux (**Méar, 2014**).

Le présent manuscrit se scinde en deux parties : a) une revue bibliographique présentant l'agent pathogène *Pseudomonas aeruginosa*, ses mécanismes de résistance aux antibiotiques les plus couramment utilisés dans le traitement des infections causées par ce germe, incluant, les β -lactamines, les aminosides, les fluoroquinolones ainsi que la colistine et son potentiel à former des biofilms ; b) une partie expérimentale dans laquelle nous présentons l'ensemble des méthodes que nous avons prévues d'effectuer. Ces expérimentations n'ont pas été réalisées vu la crise sanitaire liée à la pandémie du Covid-19.

Synthèse bibliographique

I .*Pseudomonas aeruginosa* :

I .1.Généralités

Pseudomonas aeruginosa a été isolé pour la première fois en 1882 par Gessard. Il l'a appelé *Bacillus pyocyaneus* du nom du pigment pyocyanique, diffusible dans le milieu extracellulaire et à l'origine de la coloration des cultures (**Touati, 2013**) .

P. aeruginosa est responsable d'infections graves communautaires et surtout nosocomiales. Cette espèce, se distingue par sa grande adaptation aux différentes conditions environnementales, par sa capacité à acquérir des résistances aux antibiotiques (ATB) et par la diversité de ces facteurs de virulence (**Mérens et al., 2013**). *P. aeruginosa* est donc considéré comme l'exemple type des bactéries pathogènes opportunistes et pratiquement inoffensives chez l'individu sain (**Figure 1**).



Figure1 :Quelques individus de *Pseudomonas aeruginosa*(Dubois, 2013).

I .2. Habitat

P. aeruginosa ou bacille pyocyanique est une bactérie ubiquiste, saprophyte dans les eaux douces et marines, dans l'air, dans les sols humides ou sur les végétaux. Elle est commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, mais aussi pathogène pour eux. Cette bactérie se rencontre dans l'environnement hospitalier au niveau du matériel médical ou chirurgical, et dans des solutions d'antiseptiques (**Delarras, 2007**). Dans son habitat naturel, *P. aeruginosa* peut être sous forme planctonique, mobile ou en biofilm (**Méar, 2014**).

I .3. Taxonomie

La classification de *P. aeruginosa* d'abord été fondée sur l'étude des caractères phénotypiques (morphologiques, biochimiques) puis les caractères génotypiques(**Aissa,**

2012). Seule la composition en G+C % qui est égale à 67 fût rajouté comme caractéristique génétique (Madigan et Martinko, 2007 ; Mezaache, 2012). Selon la 9^{ème} édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (1994), *P. aeruginosa* est classée comme suit :

Domaine: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Classe: *Gammaproteobacteria*

Ordre: *Pseudomonadales*

Famille: *Pseudomonaceae*

Genre: *Pseudomonas*

Espèce: *Pseudomonas aeruginosa*

I.4. Caractères bactériologiques

I.4.1. Caractères morphologiques

P. aeruginosa, bactérie à Gram négatif, se présente sous forme de bacilles fin droits de 0,5 à 0,8 μm de diamètre sur 1,5 à 3,0 de longueur, se présentant de manière isolée ou groupée par deux, mobiles grâce à une ciliature mono triche (Figure 2), et dépourvus de spores et de capsule (Khalilzadeh, 2009 ; Touati, 2013).



Figure 2 : Ciliature monotriche de *P. aeruginosa* (Aissa, 2012).

I.4.2. Caractères biochimiques et métaboliques

P. aeruginosa présente un métabolisme oxydatif (non fermentant), réduit généralement les nitrates au-delà des nitrites (Delarras, 2007) et produit de l'ammoniac à partir de la dégradation de l'acétamide (Pecastaings, 2010). Elle donne des réponses positives pour les tests : catalase, oxydase, ADH, citrate de Simmons, et la gélatinasse et des réponses négatives pour les tests suivants : LDC, ODC, indole, β -galactosidase (quelques souches hydrolysent l'ONPG au moyen d'une enzyme différente de la β -galactosidase) (Diarra, 2009 ; Touati, 2013).

I.4.3. Caractères cultureux

C'est une bactérie hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique, par conséquent, elle peut être isolée en culture sur milieu ordinaire ou sur milieu rendus sélectifs par addition d'inhibiteurs tel que le cétrimide (Essoh, 2013). Les cultures dégagent une odeur caractéristique de raisin ou seringa *in vitro* (Khalilzadeh, 2009 ; Essoh, 2013) et il existe trois types de colonies de *P. aeruginosa* (Figure 3):

- **Les colonies larges 'la'** : sont grandes, rugueuses convexes et lisses.
- **Les colonies muqueuses 'M'** : sont bombés, opaques visqueuses, filantes ou par fois coulantes. Elles possèdent une pseudo-capsule consiste d'alginate.
- **Les colonies Small 'Sm'** : sont rondes petites, convexes et lisses (Touati, 2013).

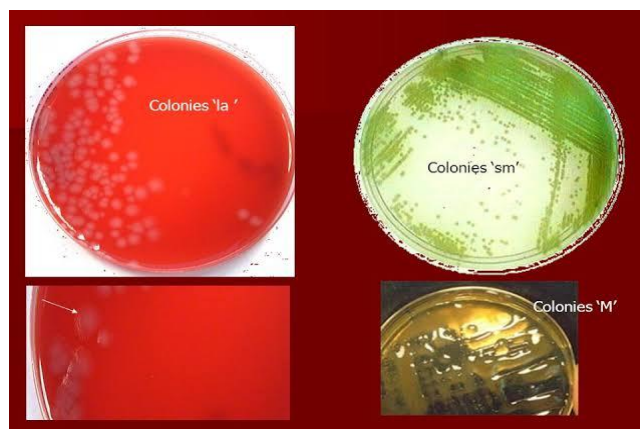


Figure 3 : Différents aspects de colonies de *P. aeruginosa* (Aissa, 2012).

Leur température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C mais elles tolèrent aussi une température de 42°C. Aucune culture n'est obtenues à 4° C ou à 46° C (**Khalilzadeh, 2009 ; Sausseureau, 2013**). La grande majorité des souches de *P. aeruginosa* synthétisent de la pyocyanine (bleu-vert), de la pyoverdine (jaune-verts) et plus rarement de la pyomélanine (brun-noire ou acajou) ou de la pyorubine (brun-rouge) (**Khalilzadeh, 2009 ; Aissa, 2012 ; Sausseureau, 2013**).

I.4.4. Caractères génomiques

Le génome de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé en 2000, il s'agit d'un des plus grands génomes bactériens connus, avec 6,3 méga bases. Il est constitué d'une partie conservée qui représente jusqu'à 90% et d'une partie variable caractérisée par les échanges horizontaux de gènes (**Essoh, 2013**). Le génome chromosomique code notamment pour la plupart des facteurs de pathogénicité et pour les multiples protéines, conférant la résistance aussi à différentes classes d'ATB. La proportion de gènes de régulations est la plus importante de tous les génomes bactériens séquencés connus. *P. aeruginosa* possède aussi de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction. La taille, la complexité et la variabilité de génome de *P. aeruginosa* reflètent une évolution adaptative de l'espèce qui lui confère la capacité d'utiliser un grand nombre de composés organiques et ainsi de se développer dans de nombreuses niches écologiques même pauvres en nutriments (**Filopon, 2005 ; Aissa, 2012**).

I.5. Diagnostic bactériologique

Le diagnostic présomptif du genre *Pseudomonas* doit être évoqué lorsque les bactéries sont mobiles, à Gram négatif, aérobies strictes, oxydase positive et non indologène. *P. aeruginosa* se développe facilement sur milieux ordinaires tels que : la gélose nutritive et l'eau peptonée. L'isolement à partir de prélèvements plurimicrobiens peut être facilité par l'utilisation des milieux sélectifs au cétrimide (**Delarras, 2007 ; Smahi, 2008**). Sur les milieux sélectifs pour entérobactéries, la bactérie forme des colonies lactose négatif. Le diagnostic bactériologique des souches typiques est très facile. Il est fortement orienté par l'aspect des colonies (colonies plates à bord irrégulier et prenant un aspect irisé métallique avec le temps) et l'odeur des cultures (odeur de seringa). La mise en évidence de la pyocyanine (milieu de King A) et de la pyoverdine (milieu de King B) suffit à assurer le diagnostic. Certaines souches peuvent présenter des caractères différents : leurs colonies sont non pigmentées ou être colorées en brun ou en rouge (dû à la production de pyomélanine ou

pyorubrine) (Clave, 2011). Pour les souches atypiques quant à leurs caractères culturels, la réalisation d'une identification biochimique pourra être lancée à l'aide d'une galerie API 20 NE (système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux): les caractères principaux sont la production d'une arginine dihydrolase, gélatinase, nitrate réductase et l'assimilation de certains hydrates de carbone comme le glucose (Pellerin, 2006 ; Clave, 2011).

I.6. Infections causées par *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes. L'opportuniste de ce pyocyanique est à l'origine de sepsis graves sur les terrains fragilisés : brûlures graves, immunodéprimés, malades de réanimation, ventilation assistée invasive, dispositifs invasifs (sonde, cathéters périphériques et centraux) (Chaibdraaetal., 2008). Chez les patients atteints de mucoviscidose, *P. aeruginosa* est aujourd'hui le principal pathogène et pose des problèmes tout à fait spécifiques (Mesaroset al., 2007). *P. aeruginosa* est capable de coloniser une grande diversité de tissus provoquant entre autres des bactériémies, ou des infections oculaires, intestinales, ou urinaires, des méningites et ostéomyélites en infectant le système nerveux central et les structures osseuses .

I.7. Facteurs de virulence

P. aeruginosa est invasif en raison de la production de nombreux facteurs de virulence. Ces facteurs sont impliqués dans les diverses phases d'infection (Mesaroset al., 2007). On distingue 2 classes de facteurs de virulence :

- **Les facteurs de virulence associés à la bactérie :** le biofilm, les flagelles, les pilis de type 2, facteurs d'attachement de type fimbriae et lipopolysaccharide.
- **Les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie :** les toxines (exemple les exotoxines), les enzymes protéolytiques (élastases, protéase alcaline), enzymes lipolytiques (lipase, estérase et phospholipase C), rhamnolipides et chromophores.

Tableau 1 : Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*, leurs modes d'actions et conséquences cliniques (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011)

Facteurs de virulence	Mécanisme de virulence	Effet pathogène induit
Lipopolysaccharide(LPS)	Stimulation de la production de cytokines	Choc
Pili	Adhésion aux cellules épithéliales	Pathogénicité respiratoire
Flagelles	Adhésion aux mucines Mobilité : rôle dans l'internalisation	Diffusion bactérienne
Alginate	Provoque le phénotype muqueux Adhésion aux cellules trachéales Inhibition de la phagocytose, de l'action des antibiotiques et de la réponse immunitaire	Pathogénicité respiratoire Résistance aux défenses de l'hôte (phagocytose) et aux ATB Responsable du caractère mucoïde des souches
Exotoxine A	Inhibition des synthèses protéiques des cellules Cibles	Mort cellulaire : nécrose tissulaire Rôle important dans la virulence
Phospholipase C	Effet cytolytique local	Lyse des cellules cibles Rôle dans l'infection aiguë et chronique.
Exoenzyme S	Effet cytotoxique Prolifération des LT	Nécrose tissulaire Entraîne des lésions du glycopeptide, de lavimentine et des IgG et IgA
Exoenzyme U	Rôle antiphagocytaire	Lésions des cellules épithéliales Responsable de bactériémie voire de choc Septique
Rhamnolipides	Effet détergent	Hydrolyse du surfactant
Elastases (LasA +LasB)	Dégradation de l'élastine, de la fibrine, de l'interféron, du complément et du collagène	Destruction des tissus contenant de l'élastine Rôle important dans la virulence
Pyocyanine +Pyoverdine)	Action bactéricide sur les autres bactéries Augmentation de la libération d'éclatasse Inhibition des battements des cils Captage du fer Induisent la synthèse de radicaux libres	Favorise l'émergence du bacille pyocyanique Diminution de la clairance des bacilles Rôle dans la survenue de vascularité d'artères pulmonaires.
Lectines solubles	Inhibition des battements ciliaires des cellules pulmonaires	Pathogénicité respiratoire Rôle dans l'infection chronique
Protéase alcaline	Protéolyse	Rôle dans les infections cornéennes

II. Résistance aux antibiotiques des *Pseudomonas aeruginosa*

II.1. Généralité sur la résistance

P. aeruginosa multi-résistant aux antibiotiques possède deux types de résistances (**Faure et al., 2009**). Les souches appartenant à l'espèce *P. aeruginosa* peuvent véhiculer une résistance naturelle et/ou une résistance acquise.

II.1.1. Résistance naturelle

P. aeruginosa présente un niveau très élevé de résistance naturelle à de nombreux ATB (**Diarra, 2009**) par différents mécanismes (**Cattoen, 2009 ; Elyajouri, 2012 ; Dubois, 2013**) :

- Faible perméabilité de la membrane externe
- Production d'une β -lactamase à large spectre
- Systèmes d'efflux.

II.1.2. Résistance acquise

La résistance acquise est très fréquente chez les souches de *P. aeruginosa* et résultante de l'accumulation de mécanismes de résistances liées à des mutations chromosomiques et à l'acquisition des gènes transférables. Ces mécanismes sont selon **Cattoen (2009), Elyajouri(2012) et Dubois (2013)** :

- L'imperméabilité accrue de la membrane externe (sélective ou non sélective par modification des porines).
- L'hydrolyse enzymatique.
- La surexpression de l'efflux actif.
- La modification de cible.

II. 2 Résistance aux β -lactamines

II.2.1. Céphalosporinase codée par le gène chromosomique *ampC*

P. aeruginosa exprime naturellement une céphalosporinase inductible codée par le gène chromosomique *ampC*, proche de celui qui est retrouvé chez les *Enterobacteriaceae* du groupe III. Chez les souches sauvages, *ampC* est réprimé de façon complexe par les produits des gènes qui lui sont associés, *ampR* et *ampD*, et n'est que faiblement exprimé (**Lister et al., 2009**);). Son expression peut être fortement induite par certaines P-lactamines, notamment

l'imipénème, l'acide clavulanique (à la différence du tazobactam) et les céphamycines. Cette hyperexpression induite et réversible confère une résistance à l'ensemble des pénicillines et des céphalosporines anti-*Pseudomonas*, et à l'aztréonam. Dans ce cas, seuls les carbapénèmes restent des antibiotiques actifs. La fréquence de sélection d'un mutant hyperproducteur d'*ampC* sous traitement par β -lactamines varie selon les séries entre 15 % et 50 %. Le risque d'échec thérapeutique lié à l'émergence de cette résistance n'est donc pas négligeable et n'est pas complètement contrôlé par l'association avec une autre classe d'antibiotiques (les aminosides notamment)(**Lister et al.,2009**).

II.2.2. β -lactamases acquises

P. aeruginosa est probablement l'espèce bactérienne pathogène présentant la diversité la plus large en termes de β -lactamases acquises (**Bonomo et Szabo,2006**). Ces enzymes sont quasi exclusivement codées par des plasmides. Les β -lactamases de classe A d'Ambler (sérine- β -lactamases, sensibles aux inhibiteurs) les plus fréquentes chez *P. aeruginosa* sont celles du groupe PSE(CARB). Il s'agit le plus souvent de pénicillinases à spectre étroit n'hydrolysant que les carboxy- et les uréido-pénicillines, l'activité des inhibiteurs (clavulanate, tazobactam), des céphalosporines, de l'aztréonam et des carbapénèmes étant conservées. De nombreuses β -lactamases à spectre élargi (BLSE) de classe A ont cependant été décrites dans cette espèce. Celles appartenant au groupe PER sont particulièrement répandues, y compris chez les souches multirésistantes épidémiques. Les groupes GES, VEB et IBC sont décrits de façon plus occasionnelle. Les BLSE de types TEM, SHV et CTX-M, endémiques chez les *Enterobacteriaceae*, sont très rares (**Nordmann,2010**).Sauf dans des cas exceptionnels (pour GES-2 et imipénème par exemple), ces BLSE de classe A n'hydrolysent pas les carbapénèmes, seule classe d'antibiotique restant active. Cependant, des souches productrices de carbapénémases diffusent actuellement de façon alarmante dans toutes les régions du monde. Si *bla_{KPC}*, codant pour une carbapénémase de classe A, a été récemment décrit chez des souches de PAMR, ces carbapénémases appartiennent le plus souvent à la classe B. À l'exception de l'aztréonam, l'ensemble des β -lactamines, y compris les carbapénèmes, sont hydrolysées par ces métallo- β -lactamases, dont VIM et IMP sont les types les plus disséminés. Enfin, des gènes codant pour des β -lactamases de la classe D d'Ambler (*bla_{OXA}*) ont également été décrits chez les PAMR, ces oxacillinases pouvant avoir un spectre d'hydrolyse de type BLSE.

II.2.3 Imperméabilité aux carbapénèmes

Le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa* reste l'imperméabilité par mutation inactivatrice d'*oprD*, gène codant la protéine D2 (**Lister et al., 2009**).

La perte de cette porine de la membrane externe confère une résistance de haut niveau à l'imipénème et une diminution variable de la sensibilité au méropénème et au doripénème, mais n'affecte pas l'activité des autres β -lactamines. Le risque de sélection d'un mutant résistant par perte de D2 au cours du traitement d'une infection à *P. aeruginosa* par imipénème est de l'ordre de 20 à 30 % et ne semble pas significativement réduit par l'association avec un aminoside. (**Riera ,2011**)

II. 2.4. Systèmes d'efflux actif

L'hyperexpression acquise des systèmes naturels d'efflux transmembranaire est un mécanisme majeur de multirésistance chez *P. aeruginosa* (**Lister et al., 2009**). Ces systèmes, multiples, déterminent certaines résistances naturelles de l'espèce. Les mutations activatrices portant sur l'opéron *MexAB-oprM* (expression constitutive faible) sont les plus fréquemment impliquées dans l'émergence de résistances aux β -lactamines. Ce système associe une pompe (MexB), une lipoprotéine de liaison à la membrane (MexA), et la porine (oprM) par laquelle l'antibiotique est expulsé de la cellule. L'hyperexpression de MexAB-oprM confère une diminution de la sensibilité, voire une résistance, à la ticarcilline, à l'aztréonam et au méropénème, l'imipénème n'étant pas un substrat de la pompe MexB. L'hyperexpression du système MexCD-oprJ, plus rare, peut réduire la sensibilité au céfépime(**Poonsuk,2014**).

II.3. Résistance aux aminosides

La résistance aux aminosides est liée le plus souvent à l'acquisition d'enzymes inactivatrices (notamment AAC(6')-I et APH(3')-II) et/ou d'un efflux actif (MexXYoprM) .L'acquisition de plusieurs enzymes peut conférer une résistance croisée à l'ensemble des aminosides. Plus rares sont les résistances de haut niveau dues à l'acquisition de méthylases(ribosomal methyltransferase ou Rmt) de l'ARNr 16S, cible de cette classe d'antibiotiques (**Francisco,2015**).

II.4. Résistance aux fluoroquinolones

Depuis la découverte de l'acide nalidixique, en 1962 (**Lesheret et al., 1962**), les quinolones ont évolué et sont devenues des agents importants et efficaces dans le traitement des infections bactériennes. En 1978, apparurent les fluoroquinolones ou quinolones de 2^{ème} génération qui résultent de modifications de la structure chimique des molécules initiales par l'adjonction d'un atome de fluor en position 6 et d'un cycle azoté en position 7 (**Ball, 2000**). Les fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase et la topoisomérase IV bactérienne, enzymes qui démêlent l'ADN pendant la réplication. Les fluoroquinolones, en particulier la ciprofloxacine, sont souvent utilisées dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*, ce qui a conduit à l'émergence de résistance acquise au sein de l'espèce. Deux principaux mécanismes conduisent à la résistance de haut niveau aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa*: des changements structurels dans les enzymes ADN gyrase et topoisomérase IV qui représentent les cibles des FQs et l'efflux actif (**Lee et al., 2005**). La modification de la cible primaire pour les fluoroquinolones (ADN gyrase, également connue sous le nom de topoisomérase II) se produit par des mutations ponctuelles dans la région où se fixe l'antibiotique appelées QRDR (Quinolone Resistance Determining Regions) dans les gènes *gyrA* / *gyrB*, qui code les deux sous unités de l'enzyme ADN gyrase, GyrA, (97-kDa) et GyrB (90-kDa). Les modifications de la cible secondaire (topoisomérase IV) se produisent à la suite de mutations ponctuelles dans les gènes *parC* et *parE* codant deux sous-unités de cette enzyme, ParC (75 kDa) et ParE (70 kDa) respectivement (**Jacoby, 2005**). La surproduction des pompes d'efflux MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN est à l'origine d'une résistance modérée aux fluoroquinolones ainsi qu'à d'autres classes d'antibiotiques (**Wang et al., 2007**). Un nouveau membre de la famille des pompes à efflux tripartite, MexV (protéine de fusion de membrane) -MexW (de type RND protéinemembranaire) -OprM, qui confère une résistance aux fluoroquinolones, a été décrit chez *P. aeruginosa* en 2003 (**Li et al., 2003**). Ainsi, le haut niveau de résistance aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* est attribuable à l'association des surproductions de pompes à efflux et des mutations dans les gènes codant ADN gyrase et la topoisomérase IV (**Nakajima et al., 2002**).

II.5. Résistance à la Colistine

Les polymyxines forment une famille d'oligopeptides cycliques antimicrobiens synthétisés par la bactérie à Gram positif, *Bacillus polymyxa*. L'effet bactéricide des polymyxines est obtenu par action au niveau de la membrane cytoplasmique. Ces antibiotiques déplacent les ions

Mg²⁺ et Ca²⁺ qui stabilisent les molécules du lipopolysaccharide (LPS), principaux constituants de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif, modifiant ainsi la perméabilité de leur membrane externe (Lee *et al.*, 2014). Il s'en suit une fuite des composés cellulaires et la mort des bactéries (Falagaset *al.*, 2010). La colistine (polymyxine E) a également une activité anti-endotoxine en neutralisant le peptide A du LPS (Falagas et Kasiakou, 2005). L'émergence et la propagation de souches de *P. aeruginosa* multi résistantes aux antibiotiques a conduit à la résurgence de l'utilisation des antibiotiques polymyxines telles que la polymyxine B et la colistine comme agents thérapeutiques (Nation et Li, 2009). Pourtant, les bacilles pyocyaniques sont parvenus à modifier la composition de leur membrane externe de façon à la rendre imperméable à ces deux agents par une modification déterminée de la composante lipidique A du LPS (Moskowitz *et al.*, 2004), ce qui entraîne une réduction de la charge nette négative de la membrane externe (Vidailiac *et al.*, 2012), soit par des mutations ou par l'activation de systèmes membranaires complexes appelés « systèmes de régulation à deux composants » (Muller *et al.*, 2011). Ceci a conduit à l'apparition de souches *P. aeruginosa* résistantes aux polymyxines signalées à travers le monde entier (Landman *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2011).

III. Méthodes d'étude de la résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques étant un problème de santé public, il est particulièrement important de pouvoir la mesurer. Les médecins doivent savoir quels antibiotiques utiliser pour traiter une infection bactérienne et les chercheurs doivent pouvoir suivre le développement de nouvelles résistances. La mesure du niveau de résistance des bactéries est donc une technique de routine par les labos de recherches ou les hôpitaux.

III.1. Méthode de diffusion par disque : L'Antibiogramme

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques supposés ou connus, repose sur la compétition entre la croissance d'une souche bactérienne et la diffusion d'un antibiotique à partir d'un disque de papier pré imprégné de l'antibiotique, dans un milieu gélosé. La mesure du diamètre permet de classer les bactéries en S (sensibles) R (résistantes) I (intermédiaires) vis-à-vis à l'antibiotique, en comparant les résultats obtenues en CMI avec des concentrations critiques définies par la société Française de microbiologie (Masson, 2011).

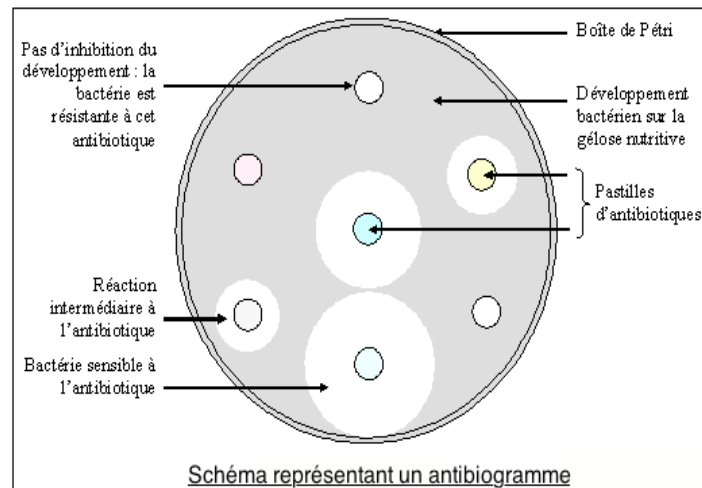


Figure 4 : Antibiogramme (Société Française de Microbiologie, Comité de l'antibiogramme, 2009)

III .2.Méthode par dilution

La méthode par dilution, méthode quantitative, est basée sur la dilution de l'antibiotique à tester .Les bactéries sont mises à pousser dans des petits puits en plastique en présence de concentration décroissante d'antibiotique .Lorsque les bactéries ont poussé, on identifie le dernier puits qui contient des bactéries, il s'agit de la plus haute concentration d'antibiotique dans laquelle les bactéries sont capables de pousser.

III.3.E-test

Un gradient de concentrations d'antibiotique est obtenu dans bandelette plastifiée. Il suffit de déposer l'une de celle-ci (une bandelette par antibiotique) à la surface d'une boîte de Pétri ensemencée par la suspension de la bactérie à tester puis après un nuit d'incubation à 37°C dans une étuve, de lire directement la valeur de la CMI au niveau de la zone à lire

IV. Biofilms à *Pseudomonas aeruginosa*

IV .1. Généralités sur les biofilms

En 1978, Costerton *et al.* Ont proposé les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes. Ils ont proposé pour la première fois la théorie de « biofilms », qui a expliqué les mécanismes par lesquels les microorganismes adhèrent aux surfaces vivantes et inertes et les avantages accumulés par cette niche écologique (**Branger *et al.*, 2007**). Plus récemment, les études sur les biofilms étaient développées dans divers domaines industriel, environnementale et médicale.

Le biofilm est un ensemble de microorganismes, formé de la même espèce ou d'espèces différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il est constitué d'un ensemble de cellules et de micro-colonies associées entre elles et à des surfaces biotiques ou abiotiques. Ces surfaces peuvent prendre plusieurs formes ; minérales (roche, interface air-liquide) ou organiques (peau, tube digestif des animaux, racines et feuilles des plantes), industrielles (canalisation, surface alimentaires ou coques des navires)(**Kalai et al., 2018 ; Malek, 2019**)ou médicales (prothèse, cathéter, valves cardiaques) (**Branger et al., 2007 ; Bellifa, 2014**).

Le biofilm est constitué essentiellement de microorganismes et de la matrice qu'ils synthétisent. Les microorganismes représentent 2 à 5 % de la matrice du biofilm selon l'espèce impliquée alors que la matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée du biofilm (**Branger et al., 2007**). Il est composé d'agrégats de microorganismes séparés par des canaux assurant la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments à la bactérie et l'élimination de leur produits de dégradation. Le biofilm n'est pas un environnement homogène, car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments, (qui présentent des valeurs de PH différents), les régions au centre des agrégats sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (**Roux et Ghigo ; 2006**).

IV.2. Biofilms médicaux

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'homme. En effet, 65 % des infections sont dues à des biofilms. Plus de 80 % des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (**Chalvet de Rochemonteix, 2009**). La formation des communautés sessiles et leurs résistances inhérentes aux agents antimicrobiens sont la base de plusieurs infections bactériennes persistantes et chroniques. Ces infections peuvent être causées par une seule espèce ou d'espèces mixtes de bactéries ou de moisissures (**Tableau 2**) (**Costerton et al., 1999**). La tendance naturelle des microorganismes à adhérer aux surfaces provoque dans le domaine médical la formation de biofilms au niveau des dispositifs médicaux tel les prothèses et les implants (**Herard, 1998**). Les biofilms peuvent se développer sur d'autres dispositifs médicaux parmi lesquelles : les cathéters centraux veineux, les lentilles de contact, les sondes endotrachéales, les sondes stériles, les joints prothétiques, les sondes urinaires.

Tableau 2 : Liste partielle d'infections humaines impliquant des biofilms (Costerton *et al.*, 1999).

Infections	Espèces bactériennes communément impliqués
Caries dentaires	Cocci à gram positif acidogène
Périodontites	Bactéries anaérobies orales à Gram négatif
Otites moyennes	Souches d' <i>Haemophilus influenzae</i>
Mucoviscidose pulmonaire	<i>P. aeruginosa</i>
Endocardites	<i>Streptococcus</i> sp. et <i>Staphylococcus</i> sp.
Ostéomyélites	Bactéries Entériques
Infections de tractus biliaire	Plusieurs espèces bactériennes et fongiques souvent mixés
Prostatites bactériennes	Bactéries à Gram négatif

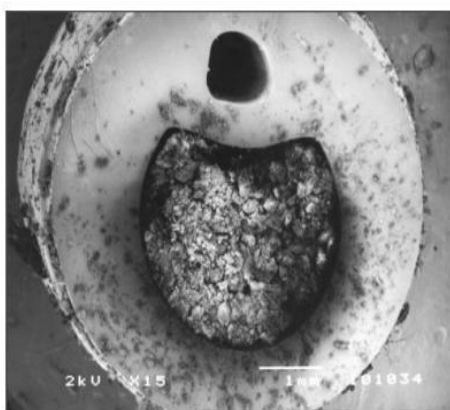


Figure 5 : Une coupe transversale d'une sonde urinaire en silicone à demeure. L'image montre l'incrustation de la sonde par un biofilm (Stickler, 2008).

IV.3 Formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, comme d'autres bactéries à Gram négatif, produit des agrégats structurés ou biofilms maintenue par une matrice (Khalilzadeh, 2009). Cette dernière est composée majoritairement d'un mélange comprenant en proportions des alginates (exopolysaccharide), des polyoses ainsi que des protéines et des rhamnolipides (Pecastings, 2010 ; Ben Haj Khalifa *et al.* , 2011 ; Barakat, 2012). Dès que la bactérie a réussi à s'implanter, elle devra survivre et ce malgré la présence des défenses de l'hôte innées et acquises, et d'événements répétés d'antibiothérapie pour réussir la formation de biofilms (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011). La formation d'un biofilm mature chez *P. aeruginosa* a lieu dans 5 à 7 jours (Soussereau, 2013). Ce mode de croissance est associé à la nature chronique d'infections ultérieures et à leur résistance inhérente aux antibiotiques (Costerton *et al.*, 1999). Les infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose sont généralement associées aux biofilms à *P. aeruginosa* (Stewart et Costerton, 2001). De plus, différentes

infections nosocomiales liées à l'utilisation de cathéters veineux centraux, cathéters urinaires, prothèses de valves cardiaques et appareils orthopédiques, sont clairement associées à la formation de biofilms qui adhèrent à la surface du biomatériau (Stewart et Costerton, 2001).

IV.3.1. Quorum sensing chez *P. aeruginosa*

Ce mécanisme de communication cellulaire a été retrouvé chez des bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*. Il contrôle des processus ayant lieu au sein des cellules par des facteurs moléculaires diffusibles « les auto-indicateurs ». C'est le phénomène de comportement communautaire « Biofilm » où les bactéries communiquent entre elle (Chalvetde Rochemonteix, 2009). Ce mécanisme est lié à l'accroissement de la densité de la population bactérienne, qui conduit à l'augmentation de la concentration d'une molécule signal (AI) dans l'environnement extracellulaire. Quand la concentration d'une molécule signal atteint un niveau seuil, capable d'activer la production des gènes cibles, cela induit la réponse correspondante aux signaux, comme la production d'EPS (Alnasouri, 2010 ; Pecastaings, 2010). Il existe plusieurs molécules signal chez les micro-organismes parmi lesquelles les Acylhomoserine lactones (AHL) produites par les bactéries à Gram négatif.

IV.2. Résistance par formation de biofilm

La formation d'un biofilm, ou la production d'une quantité massive d'alginate (polymère d'acide D-mannuronique et d'acide L-guluronique) par les souches de *P. aeruginosa* crée une barrière permettant aux bactéries de persister et de se protéger des défenses immunitaires de l'hôte et l'action bactéricide des antibiotiques (Costerton *et al.*, 1999).

Plusieurs études ont rapporté que les fluoroquinolones, comme l'ofloxacine et la ciprofloxacine, pénètrent les biofilms de *P. aeruginosa* facilement tandis que les aminoglycosides, tels que la tobramycine et la gentamicine, diffusent plus lentement. Ces études suggèrent que la liaison des aminosides chargés positivement aux polymères extracellulaires de matrice du biofilm à charge négative, tel que l'alginate, retarde la pénétration de ces agents (Stewart, 2002). Bien que cela puisse être le cas de certains agents antimicrobiens, il a été montré que pour d'autres, ils peuvent pénétrer la matrice mais ne peuvent pas tuer les cellules dans le biofilm (Walters *et al.*, 2003)

Les souches de *P. aeruginosa* formant un biofilm sont beaucoup plus résistantes à la tobramycine que les souches vivant à l'état planctonique. Alors qu'une autre étude suggère que la formation de biofilms peut être une réaction spécifique, défensive, induite par la présence d'antibiotiques tel que les aminoglycosides (Hoffman *et al.*, 2005).

Chez *P. aeruginosa*, neuf pompes RND (Resistance Nodulation cell Division) ont été identifiées et caractérisées comme mécanisme de résistance des formes planctoniques (**Zhanget Mah, 2008**). Il a été suggéré qu'elles jouaient également un rôle dans la résistance aux antibiotiques des biofilms. Une étude suggère que MexAB-OprM et MexCD-OprJ sont impliqués dans la résistance du biofilm de *P. aeruginosa* à l'azithromycine macrolides (**Gillis et al., 2004**). Par la suite, Zhang et Mah ont mis en évidence un nouveau système d'efflux spécifique aux biofilms de *P. aeruginosa* contribuant à la résistance à plusieurs antibiotiques (**Zhang et Mah, 2008**). Un nouveau mécanisme de résistance à la colistine, impliquant une pompe à efflux, a été mis en évidence dans une population particulière du biofilm. Il s'agit d'une combinaison du rôle de la pompe MexAB-OprM et de l'opéron prm, qui modifie la structure du LPS (**Pamp et al., 2008**).

V. Méthodes de détection de biofilms

Il existe différentes méthodes pour détecter la production d'un biofilm, parmi lesquelles ; la méthode de Plaque de culture de tissus (TCP), la méthode en Tube (TM), la culture sur milieu rouge Congo (RCA) et le Biofilm Ring Test (BFRT).

V.1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

La méthode de plaque de culture de tissus (TCP) permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm (**Bellifa, 2014**). Les biofilms mono-espèces peuvent se former sur des supports en polystyrènes en utilisant des microplaques à 96 puits. A partir d'une culture de 18 heures dans le milieu Bouillon infusion cœur cerveau (BHIB), les puits d'une microplaque de 96 puits sont inoculés avec des bactéries. Les microplaques sont incubées par la suite pendant 24 heures à 37°C. Les puits sont lavés trois fois avec de tampon phosphate salin (PBS) (**Figure 6**). Les biofilms ainsi formés par l'adhésion des bactéries sessiles sont colorés avec du Cristal Violet (CV) à 0,1%. En fonction de la lecture des densités optiques (DO) de la phase biofilm, les bactéries sont classées comme suit : non formatrices du biofilm, formation modérée, fortement formatrice du biofilm (**Mathur et al., 2006 ; ; Bellifa, 2014**).

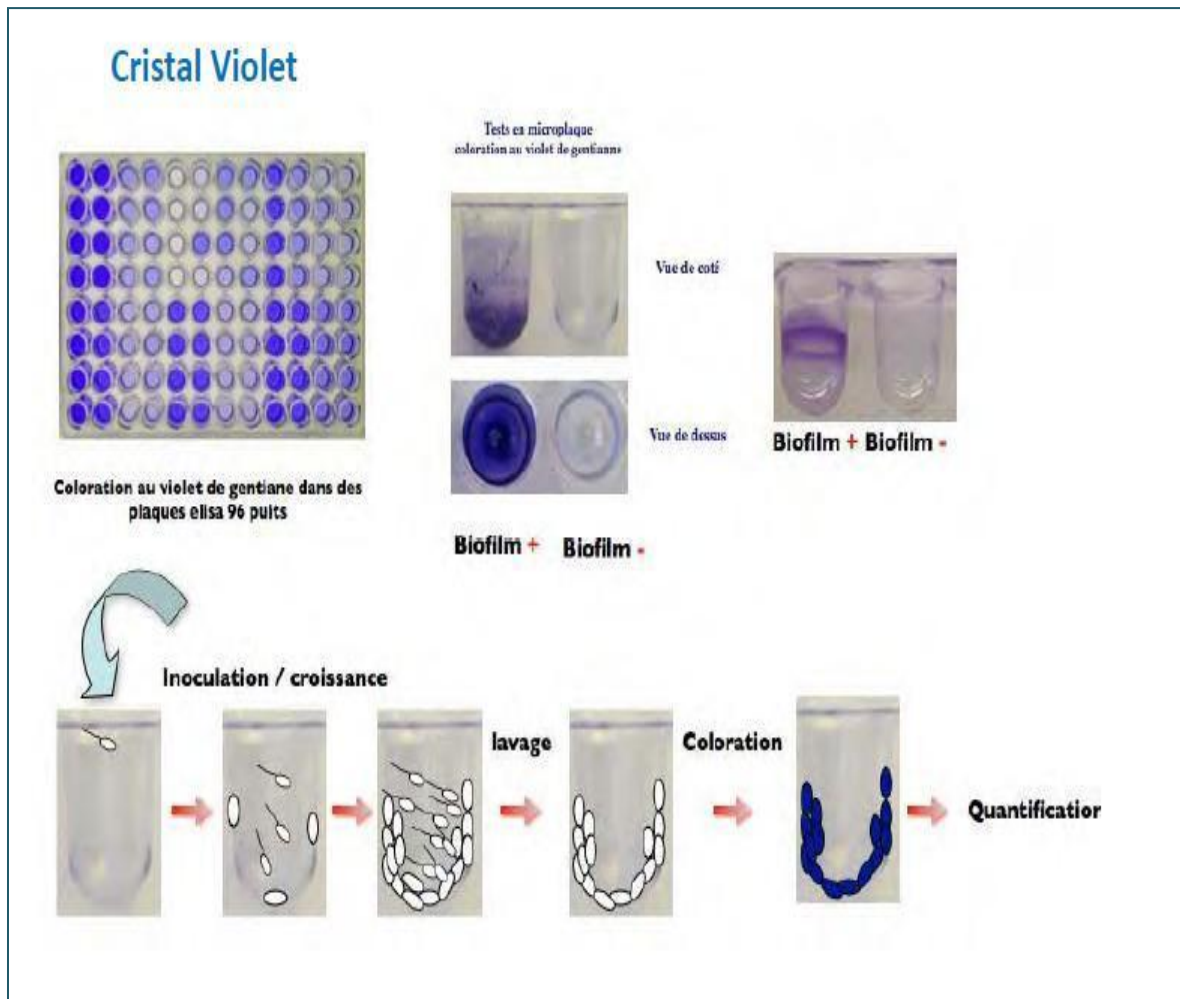


Figure 6 : Formation de biofilm en microplaque (Bellifa, 2014).

V.2. La méthode en tube (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm (Nagaveni *et al.*, 2010 ; Rewatkar et Wadher, 2013; Kara Turki,2014).A partir d'une culture de 18-24 heures, une colonie estensemencée dans de BHIB supplémenté de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24 h. Les tubes sont lavés avec du PBS puis séchés. Chaque tube est ensuite coloré par le CV (Figure 7).La formation du biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvre le mur et le bas du tube (Mathur *et al.*, 2006 ; Alnnasouri, 2010 ; DjelloulDaouadji, 2010 ; 2012 ;Bellifa,2014).

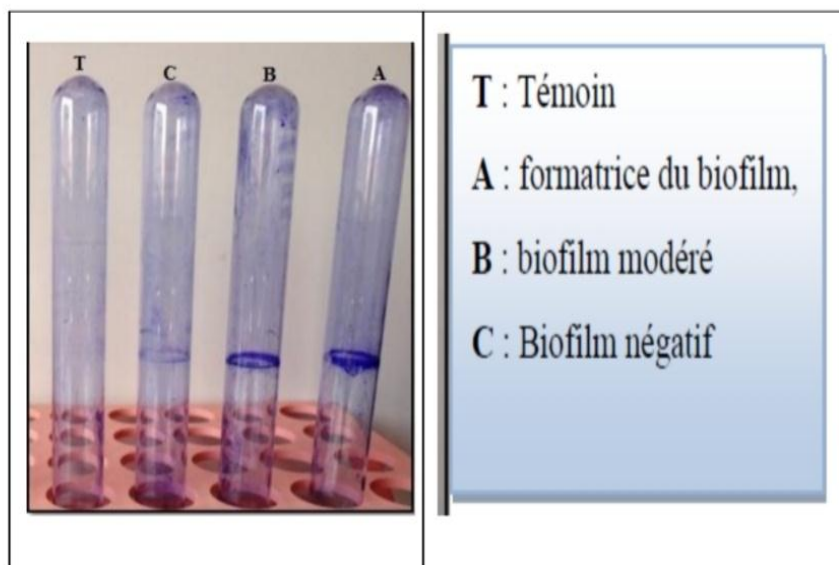


Figure 7 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM (Bellifa, 2014).

V.3. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA) :

La gélose Rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime (Nagaveni *et al.*, 2010 ; Kara Turki, 2014) (Figure 8). Sur ce milieu les souches exprimant le Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA) donnent des colonies noires contre des colonies de couleur rouge pour les souches PIA négatives. Les souches à phénotype variable donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Mathur *et al.*, 2006 ; Rewatkar et Wadher, 2013 ; Bellifa, 2014).

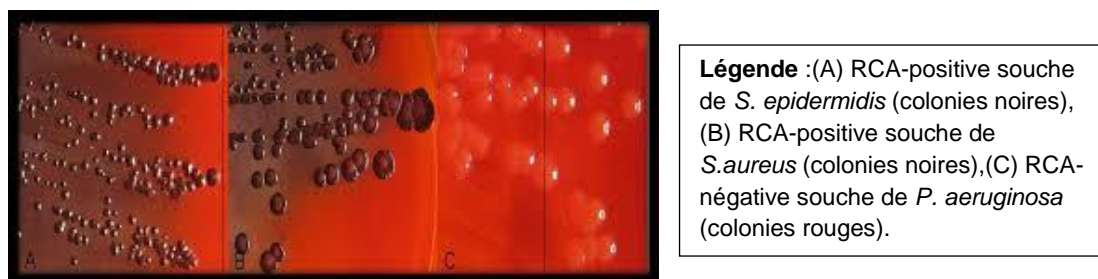


Figure 8. Culture sur la gélose Rouge Congo (Hou *et al.*, 2012).

Matériels et méthodes

I. Origine et prélèvement des souches bactériennes

Nous avons prévu l'isolement de souches de *Pseudomonas aeruginosa* de patients sujets à des infections nosocomiales, hospitalisés au niveau du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Abd El Kader Hassani-Sidi Bel Abbès.

II. Isolement et identification de souches de *Pseudomonas aeruginosa*

II.1. Isolement

L'isolement doit être pratiqué sur le milieu gélose au sang préalablement coulé en boîtes de Pétri. Les milieux sontensemencés, en stries serrées sur la surface, de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation à 37 °C pendant 24 heures. Des repiquages successifs sont effectués sur les milieux d'isolement d'origine afin de confirmer la pureté des souches pour entreprendre l'étape d'identification.

II.2. Identification

II.2.1. Examen macroscopique des cultures

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué. Seules les colonies caractéristiques du genre *Pseudomonas* seront prises en considération accompagnées par une odeur caractéristique de seringa. La majorité des souches de bacille pyocyannique sont immédiatement repérées par la présence de leurs pigments.

II.2.2. Examen après coloration de Gram

La coloration de Gram permet d'observer la morphologie de cellules des *Pseudomonas* et leurs modes de regroupement, et le Gram négatif de cette espèce.

II.2.3. La recherche de l'oxydase

Ce test est employé couramment pour l'identification des bacilles à Gram négatif. A l'aide d'une pipette Pasteur boutonné, une partie de la culture est étalée sur un disque oxydase. La réaction est considérée comme étant positive après apparition d'une couleur violette. Les cultures de *P. aeruginosa* présentent une réaction d'oxydase positive.

II.2.4. La pigmentation

Sur la plupart des milieux, *P. aeruginosa* élabore 2 pigments diffusibles (Pellerin, 2006) : la pyocyanine et la pyoverdine. L'ensemencement est réalisé à partir d'une culture pure faisant

des stries sur la pente de des deux milieux à savoir ; les géloses King A et King B. Par la suite, ces milieux sont incubés à 37 °C pendant 24 heures. La pyocyanine (pigment bleu) est synthétisé par *P. aeruginosa* sur le milieu King A, alors que la pyoverdine (pigment jaune fluorescent) sur le milieu King B.

II.2.5. Identification par le système API 20 NE

La galerie API 20 NE (BioMérieux Marcy l'Etoile, France) est constituée de 20 micro- tubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révèlés par l'addition de réactif.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

III. Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité de toutes les souches, vis-à-vis différentes familles d'antibiotiques, est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) recommandées par l'OMS (La standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, avec collaboration de l'OMS 6^{ème} édition, 2011). Le tableau 4 donne la liste des antibiotiques testés sur *P. aeruginosa* selon les recommandations du CLSI.

Tableau 4 : Antibiotiques testés pour *Pseudomonas aeruginosa* (CLSI, 2011)

Antibiotique	Abréviation	Charge(µg)	Famille
Ticarcilline	TIC	75	β-Lactamines
Pipéracilliméne	PIP	100	
Céftazidime	CAZ	30	
Aztréonam	ATM	30	
Céfépime	FEP	30	
Imipénème	IPM	10	
Amoxicilline	AML	25	
Céfazoline	KZ	30	
Augmentin	AMC	30	
Céfoxitine	FOX	30	
Céfotaxime	CTX	30	
Ciprofloxacine	CIP	5	Fluoroquinolones

La méthode de l'antibiogramme est réalisée sur milieu Mueller- Hinton préalablement coulé en boîte de Pétri. Les géloses doivent être séchées avant l'emploi. Cette technique est réalisée à partir d'une culture de 16-18 heures sur milieu d'isolement approprié. À l'aide d'une anse de platine repiquer quelques colonies bien isolées de la souche pure, et ensemercer l'inoculum dans un tube contenant le milieu BHIB. Incuber à 37°C pendant 18 heures pour obtenir une culture en phase exponentielle de charge microbienne de 10^6 à 10^7 UFC/ml (opacité de 0.5 à l'échelle de Mac Falland).

À l'aide d'un écouvillon stérile ensemencée la culture obtenue sur la surface de la gélose Mueller- Hinton par des stries serrées, en tournant la boîte de 60°. À l'aide d'une pince flambée, les disques d'antibiotiques sont appliqués sur la surface de gélose. Avant l'incubation, un temps de 15 mn à est nécessaire pour une diffusion des antibiotiques dans le milieu gélosé.

Les boîtes sont ensuite, incuber pendant 24 heures à 37 °C. Les différents diamètres des zones d'inhibition, obtenus autour des disques d'antibiotiques, sont mesurés. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par les recommandations de CLSI.

IV. Étude de la production de β -lactamase

La recherche de β -lactamase à spectre étendu (Lee et al., 2005) se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme, en disposant des disques d'antibiotiques ceftazidime et aztréonam à une distance de 20 à 30 mm du disque contenant de l'acide clavulanique. Pour les souches de *P. aeruginosa* résistantes à la ceftazidime, l'inhibition de l'hyperproduction de céphalosporinases est réalisée sur gélose Muller Hinton additionnée de cloxacilline avec une concentration finale de 500 mg/l (De Champs et al., 2002). Ce test est significatif lorsque le diamètre de la zone d'inhibition au tour des disques d'antibiotiques céphalosporines de troisième génération augmente d'au moins 8 mm avec un rétablissement de la sensibilité.

IV.1 Technique

A partir d'une culture pure de 18-24 heures sur milieu gélosé non sélectif, réaliser une suspension de 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ UFC/ml) dans 5 ml d'eau physiologique (0,9% NaCl). Réaliser une dilution de $1/10^6$ ($\sim 10^7$ UFC/ml) dans 10 ml d'eau physiologique à 0,9%, puis homogénéiser la suspension bactérienne au vortex. Ensemencer cette dilution par écouvillonnage sur des boîtes de pétri contenant 20 ml de gélose Mueller-Hinton. Appliquer

les disques d'antibiotique à l'aide d'une pince stérile en disposant les disques d'antibiotiques céphalosporines de 3^{ème} génération et aztréonam à une distance de 20 à 30 mm du disque contenant l'acide clavulanique. Laisser les boîtes 20 mn à température ambiante pour permettre un pré diffusion de l'antibiotique, puis les incubent pendant 18-24h à 37°C.

IV.2. Lecture

La lecture se fait en mesurant avec précision les différents diamètres des zones d'inhibition. Comparer ces résultats aux valeurs critiques figurant dans le CASFM et classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante. Interpréter les phénotypes de résistance aux β -lactamines.

V. Détection de la formation de biofilm de *P. aeruginosa*

Afin de mettre en évidence la capacité de formation d'un biofilm, chez les sept isolats de *P. aeruginosa*, deux méthodes sont choisies à savoir ; la méthode standard de coloration au Cristal Violet (CV) et la méthode de culture sur gélose au Rouge Congo (RCA).

V.1. La détection par la technique TCP et TM

Cette technique de quantification est parmi les méthodes indirectes d'estimation de la production de biofilm sur différents types de support (**Djordjevic et al., 2002**). La coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci (**Musk et al., 2005**). Le tableau 5 répertorie les informations sur les différents tests de formation de biofilms effectués.

Tableau 5 : Tests de formation de biofilm effectués (Saxena, 2014)

Test	Milieu de culture	Tubes	Incubation
01	Bouillon nutritif (BN)	En polystyrène de 5 ml	24h
02		En polystyrène de 5 ml	48h
03	Bouillon cœur cerveau (BCC)	En polystyrène de 5 ml	24 h
04		Tubes à vis en verre de 23 ml	7 jours

Une suspension bactérienne (DO 600 = 0,8) est préparée, dans un tubebouillon nutritifou bouillon cœur - cervelle, à partir d'une culture de 24 heures de *P. aeruginosa*. La suspension est répartie dans des tubes en polystyrène de 5 ml à raison de 2 ml par tube ou dans des tubes en verre à raison de 7 ml par tube. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant des périodes déjà mentionnés dans le tableau 5. Après chaque période d'incubation et pour chaque tube,

l'absorbance de la culture bactérienne résultante est mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Après, chaque tube est soigneusement vidé de la culture bactérienne, et rincés 3 fois à l'eau distillée en vue d'éliminer les cellules planctoniques non adhérentes. La biomasse fixée sur les parois du tube (formation de biofilm) est révélée après coloration à l'aide d'une solution aqueuse de cristal violet à 1 % (m/v). Après un temps de contact de 45 minutes, l'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'eau distillée (jusqu'à l'obtention des gouttes transparentes). Les tubes sont enfin égouttés et mis à sécher à l'air libre. Le cristal violet fixé sur les parois du tube est solubilisé à l'aide d'une solution constituée d'un mélange éthanol-acétone (75 :25 v/v). Après 1 heure de temps, l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La masse bactérienne accumulée au sein des biofilms formés est ainsi quantifiée. La quantité de colorant retenue étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries fixées.

V.2. La détection par la méthode de Rouge Congo agar (RCA)

Le Rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime et donnant des colonies noires sur milieu RCA contrairement aux colonies non productrices qui restent rouge (**Rewatkar et Wadher, 2013 ; Kara Turki, 2014**). Ce milieu est préalablement préparé en additionnant 0,8 g de Rouge Congo et 37 g de saccharose à 1 L de Bouillon cœur - cervelle et 10 g d'agar. Le milieu est ensuiteensemencé par des striés serrés à l'aide d'une anse de platine, à partir des cultures de 24 heures sur gélose nutritive, puis incubé à 37° C pendant 24 heures à 48 heures. Les souches de *P. aeruginosa* productrices de slime donnent des colonies noires (résultat positif), contrairement aux souches non productrices qui donnent des colonies rouges (résultat négatif)

Conclusion

CONCLUSION

Ce manuscrit permet de mettre en évidence le pouvoir pathogène *P. aeruginosa* autant qu'opportuniste rencontré dans l'environnement hospitalier en Algérie et dans différents pays. *P. aeruginosa* est un pathogène responsable d'infections graves communautaires et surtout nosocomiales et fréquemment isolé de matériel médical ou chirurgical (cathéter, sonde urinaire et autre). Les infections à *P. aeruginosa* sont récurrentes à cause de leur capacité de résistance aux antibiotiques, leur traitement nécessite un diagnostic précis et un choix rationnel d'antibiotiques basé sur un antibiogramme. Nous avons mis en avant dans la synthèse bibliographique l'apparition de nouvelle résistance dans le milieu hospitalier apparentées à la circulation des gènes responsables.

Nous avons détaillé la capacité des cellules de *Pseudomonas aeruginosa* de s'associer entre elles pour former une structure hétérogène appelée biofilm. Dans ce cas, les bactéries s'entourent d'une matrice complexe formée de polymères et de protéine adhérents aux surfaces. Cette forme de vie communautaire adhérente à des surfaces sessiles s'oppose à la vie planctonique. La formation de biofilm s'accompagne d'une forte augmentation de la résistance aux antibiotiques ainsi qu'aux mécanismes de défense de l'hôte.

Face à ce problème de santé publique les solutions ne résident pas uniquement dans la recherche des molécules actives sur cette bactérie mais dans la prévention contre la diffusion de ce pathogène résistant. Cette lutte est basée sur : l'application sérieuse de mesures d'hygiène dans le milieu hospitalier et le bon usage des antibiotiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

- 1) **Aissa K. (2012)**. Profil de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques aux services de réanimation à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de rabat entre 2006 et 2010. Thèse de doctorat. Université Mohammed V - faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.
- 2) **Amaziane K., Rossello J., Castella A., Sekkat S., Terzaki S., Dhidah L (2010)**. Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region. *East Mediterr Health J* **16** : 1070-1078.
- 3) **Alnnasouri, M. (2010)**. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.

-B-

- 4) **Ball P (2000)**. Quinolones generations : natural history or natural selection. *J Antimicrob Chemother* **46** p : 17-24.
- 5) **Barakat R. (2012)**. Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la pyocyanine , pigment redox- actif produit par *Pseudomonas aeruginosa* . Thèse de doctorat . Université de la Rochelle de France.
- 6) **Bellifa S (2014)** . Evaluation de la formation du biofilm des souches de *klebsielle pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux aux CHU Tlemcen . Université Abou bekr belkaid .
- 7) **Ben Haj Khalifa ., Moissenet D., Vu Thien H., Khedher M .(2011)** . Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulation .
- 8) **Bonomo RA, Szabo D (2006)**. Mechanisms of multi drug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* ; **43** (suppl 2) : 49-56.
- 9) **Branger A, Richer M-M., Roustel S. (2007)** . Quelques système microbiens : les biofilms dans : *Microbiologie et alimentation* . p : 131-164.

-C-

- 10) **Cattoen C.(2009)**. Epidémiologie des infections à *Pseudomonas Duacai* , Valenciennes.

11)ChaibdraaA., Medjellekh M.S, Saouli A. Et Bentakouk M.C (2008).Le *Pseudomonas* : Expérience du Centre des Brûlés D'Annaba et Revue de la Littérature. Ann Burns Fire Disasters. 21(4): 210–218.

12) Chalvet de Rochemonteix A. (2009). Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale D'alfort Paris.

13)Clave D. (2011).*Pseudomonas aeruginosa*. Fiche technique bactériologie. Laboratoire de bactériologie hygiène CHU Toulouse, France, 4p.

14)Costerton J.W., Stewart Philip S., Greenberg E.P. (1999). Bacterial Biofilms: Common Cause of Persistent Infections. Science. 284: 1318 – 1322.

-D-

15)Dallars ,C.(2007).*Pseudomonas* et ex-*Pseudomonas*. Dans : Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition médicales internationales, Paris : Technique Et Documentation Lavoisier, Vol.1: p339-340. ISBN-10: 2743009454, ISBN-13: 978-2743009458.

16) De Champs C. , Chanel C. , Sirot D. , Baraduc C. , Romaszko J.P. , Bonnet R. , et al , (2004) . Frequency and diversity of Class A extended – spectrum beta – lactamases in hospitals of Auvergne, France .Antimicrob Agents chemother p : 634-639.

17)Diarra F. (2009). Fréquence d'isolement des *Pseudomonas aeruginosa* au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel Toure de 2002 à 2008. Thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali.

18)Djelloul Daouadji, S. (2010). Détection de biofilm a *staphylocoques* sur cathéters veineux. Mémoire de Magister. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.

19)Djordjevic D., Wiedmann M. And Mclands borough L.A. (2002). Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Applied and environment al microbiology; Vol. 68, No. 6: 2950– 2958.

20)Dubois. (2013).*Pseudomonas aeruginosa* : réservoir, virulence et résistance. Laboratoire de Microbiologie, UMR CNRS 5234 « Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité»

21)Drissi M., Ahmed Z.B.,Dehecq B., Bakour R., PlesiatP P., and Hocquet D(2008) .Antibiotic susceptibility and mechanisms of beta – lactam resistance among clinical strains of

Pseudomonas aeruginosa : first report in Algeria .Eur J Microbiol Infect Dis **29** : 1457 - 1458.

-E-

22) El yajouri A .(2012) .Actualités des infections à *Pseudomonas aeruginosa* .Thèse de doctorat .Université Mohamed V-Souissi faculté de médecine et de pharmacie - Rabat.

23)Essoh C .Y. (2013).Étude épidémiologique de souches de médecine *Pseudomona aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique. Thèse de doctorat. Université PARIS-SUD XI. Paris, France.

-F-

24) Falagas M.E ., and Kasiakou S .K (2005) . Colistin : the revival of polymyxins for the management of Egypte : an underlying threat to anti – pseudomonal treatment options .Antimicrob Chemother p : 187-190.

25) Falagas M.E ., Rafailidis P.I., Matthaiou D.K., (2010). Resistance to polymyxins : Mechanisms , frequency and treatment options .Drug Resist Updat 13 p :132-138

26) Faure K., Kipnis E ., Guery B.(2009) .Pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* . Mapare. Pathologies infectieuses : 547-563.

27)Filopon D. (2005).mécanismes de régulation impliqués dans la pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* : système de sécrétion de type III, Epigénèse et quorum sensing. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier – Grenoble I, France.

28) Fransisco G.R., Nora S.T., Bueno M.F.,Da Silva Filho LV ., De Oliveira Garcia D (2015).Identification of aminoglycoside-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing RmtG 16SrRNAmethyltransferase in a cystic fibrosis patient . Antimicrob Agents Chemother : 2967-2970

-G-

29) Gaynes R., Edwards J R (2005). Overview of nosocomial infections caused by gram – negative bacilli .Clin Infect Dis **41** :848-854.

30) Gillis RJ .,Iglewski BH(2004).Azithromycin retards *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation (2004). *J Microbiol* : 5842-5850.

-H-

31) Herard A. (1998). Rôle du biofilm en urologie. Progrès en Urologie ; 8 : 413– 414.

32) Hoffman LR., Darginio DA., Maccoss MJ., Zhang Z., Jones RA., Miller SI (2005). Aminoglycoside antibiotic biofilm formation. Nature ; 1171-5

33) Hou W., Sun X., Wang Z. et al, (2012), Investigative Ophthalmology & Visual Science, the Association for Research in Vision and Ophthalmology. (53) : 9. 5624.5631.

-J-

34) Jacoby G.A (2005). Mechanisms of resistance to quinolones .Clin Infect Dis 41 p :120-126

-K -

35) Kara Turki, I. (2014). Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de *staphylocoques* isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

36) Kalai A., Malek F., Bousmaha-Marroki L (2018). Effect of *Thymus ciliatus* oil – based disinfectant solutions against biofilms formed by *Bacillus cereus* strains isolated from pasteurized-milk processing lines in Algeria .South Asian Journal of Experimental Biologie ; Vol . 8 :1-12

37) Khalilzadeh P. (2009). Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat d'Université de Paul Sabatier - Toulouse III. Toulouse.

-L-

38) Landman D., Bratus S., Alam M., and Quale J (2005). Citywide emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains with reduced susceptibility to polymyxin B. J Antimicrob Chemother 55 p : 954-957.

39) Lee J.K ., Lee, Y.K ., Park Y.K., and Kim B.S . (2005) .Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin –resistant clinical isolated of *Pseudomonas aeruginosa* .Int J Antimicrobs

Agents 40 p : 290-295.

40) Lee J.K. , Na I.K. , Park Y.K. , and Ko K S . , (2014). Genomic variations between colistin-susceptible and resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates and their effects on colistin resistance . *Antimicrob Chemother* 69 p : 1248-1256.

41) Leshner G.Y., Froelich E.J ., Grunett M.D., Bailey J.H., and Brundage R.P(1962). A new class of chemotherapeutic agents . *Hosp Infect* 31p:177-187.

42) Li Y., Mima T., Komori Y., Morita Y., Kuroda T., Mizushima T., and Tsuchiya T.(2003). A new member of the tripartite multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* . *J Antimicrob Chemother* 52 p :330-338.

43) Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol* ; 22 : 582-610.

-M-

44) Madigan M., Martinko J. (2007). diversité des procaryotes : les bactéries Dans : biologie des micro-organismes. Pearson 11^e édition .Paris, France : 333 – 411.

45) Malek F. (2019) .Bactéries sporulés et biofilms : un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombinaison pasteurisé. *Canadian Journal of Microbiologie*, Vol.65 :405-420

46) Masson E (2011). Bactériologie médicale : techniques usuelles. Issy- les Moulineaux p : 611.

47) Mathur T., Singhal S. , Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24 (1):25-9

48) Méar J-B. (2014). Étude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Thèse de doctorat. Université Lille nord de France, France.

49) Mérens A., Jault P., Bargues L., Cavallo J.-D. (2013). Infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Résumé. Elsevier Masson SAS.

50) Mesaros N., Nordmann M., Pleisiat P., Roussel M., Van E., Glupczynski

Y(2007).*Pseudomonas aeruginosa* : Résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. Clin Microbiol Infect 13 p : 560-578.

51) Moskowitz S., Ernst R., Miller S (2004).PmrAB , a two component regulatory system of

Pseudomonas aeruginosa that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoraarabinose to lipid A. J Bacteriol 186 p :575 -579.

52) Muller C., Plesiat P., Jeannot K ., (2011) . A two componet regulary system interconnects resistance to polymyxins , aminoglycosides , fluoroquinolones , and beta – lactams in *Pseudomonas aeruginosa* .Antimicrob Agents Chemother 55 p : 1211- 1221.

53) Musk D.J., Banko D.A., and Hergenrother P.J. (2005). Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. Chemistry & Biology; Vol. 12: 789– 796.

-N-

54) Nagaveni S., Rajeshwari H., Ajay Kumar Oli., Patil S.A., AND Kelmani Chandrakanth R (2010). Evaluation of boifilm forming ability of the multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. The Bioscan; 5(4) : 563-566.

55) NakajimaA., Sugimoto Y., Yoneyama H., Nake T., (2002) .High level fluroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation .Microbial Immunol 46p/391-395.

56) Nation R.L., Li J. (2009). Colistin in the 21 st century . Curr Opin Infect Dis 22 p : 535-543.

57) Nordmann P(2010). Resistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. MedSci (Paris) ; 26 : 950-990.

-P-

58) Pamp SJ., Gjermansen M., Johansen HK ., Tolker – Nielsen T (2008).Tolerance to the antilicrobiol peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells , and depend on the pmr and mex AB-opr M genes .Mol Microbiol :223-240.

59) Pecastaings S. (2010). Apport de modèles de biofilms à*Pseudomonas aeruginosa* et

Legionella pneumophila à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.

60) Pellerin J.L. (2006). Les Genres *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Unité de Microbiologie-Immunologie. Libre Livre.

61) Perrin, C. (2009). Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'*Escherichia coli* K-12. L'Université Lyon I - Claude Bernard, France.

62) Poonsuk K., Tribuddharat C., Chauancheun R. ,(2014). Simultaneous overexpression of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* non – cystic fibrosis clinical isolates .Can J Microbiol :437-443.

-R-

63) Rewaktar A. ,Waldher B. , (2013) . *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm formation methods .IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences .Volume 8 : 36-40

64) Riera E., Cabot G., Mulet X., Garcia-Castillo M., Del Campo R., Juan C., Canton R., Oliver A. ,(2011) .*Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain :impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem .J Antimicrob Chemother :2022-7

65) Roux A., Chigo J-M. (2006). Les biofilms bactériens. Communication, Bull. Acad : 261-268.

-S-

66) Samonis G., Mraki S., Voulounamou E. , Georgantzi GG., Kofteridis DP., Falags ME (2012). Antimicrobial susceptibility of non – fermenting Gram – negative isolates to isepamicin in a region with high antibiotic resistance .Eur J Clin Microbiol Infect Dis : 3191-9

67) Saxena S., Banerjee G., Garg R., Singh M (2014). Comparative study of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients of lower respiratory tract infection .Journal of Clinical and Diagnostic Research :JCDR 8 , DC09.

68) Saussereau E. (2013). Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité. Thèse

de doctorat d'Université Pierre et Marie Curie. Paris VI.

69) Smahi A. (2008). Contrôle biologique de la Fusariose vasculaire de la Tomate causé par *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*. Thèse de Magister. Université d'Oran Es Senia, Algérie.

70) Stewart PS(2002).Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilm .Int J Med Microbiol : 107-13

71) Stewart PS., Costerton JW (2001) .Antibiotic resistance ; of bacteria in biofilms .Lancet : 135-8

72) Stickler D.J. (2008).Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. Nature clinical practice Urology; 5 no 11: 598 – 608

73)Société Française de Microbiologie , Comité de l'Antibiogramme , Recommandation 2009.

-T-

74) Touati M. (2013). Antibio-résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar-Annaba

-V-

75) Vadaillac C., Benichou L., Duval R (2012). In vitro synergy of colistin combinations against colistin *Actinobacter baumannii* , *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiellapneumoniae* isolates .Antimicrob Agents Chemother 56 p : 4856 – 4861.

-W-

76) Waltetrs MC., Roe F., Bugnicourt A., Franklin MJ., Stewart PS (2003).Contributions of antibiotic penetration , oxygen limitation , and low metabolic activity to telerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin .Antimicrob Agents Chemother : 317-323.

77) Wang D.D., Sun T.Y., Hu Y . J., (2007) .Contributions of efflux pumps to high level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin .Chin Med J 120 p: 68-70.

-Z-

78) Zhang L.,Mah TF(2008).Involvement of a novel efflux system in biofilm – specific resistance to antibiotic .J Bacteriol p :4447-4452.

Résumé

Ce travail vise à contribuer à mettre en évidence le niveau de résistance de *P.aeruginosa* et sa capacité à échapper à l'action thérapeutique en milieu hospitalier. Cette espèce est une bactérie pathogène opportuniste responsable essentiellement d'infection nosocomiale chez les patients immunodéprimés. Cette espèce manifeste vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui aboutit à des problèmes thérapeutiques souvent aigus. Elle est susceptible d'être agent d'infections chroniques causées par la formation de biofilm.

Nous avons visé l'isolement, l'identification de souches de *P. aeruginosa* isolées dans divers services du CHU de Sidi Bel Abbes, mais notre étude pratique a été interrompu par le fait de la crise sanitaire liée à la pandémie du Covid-19. L'étude comptait une étape d'isolement de souches du milieu hospitalier. L'identification, l'étude de l'antibiorésistance et l'évaluation de l'aptitude à former des biofilms de souches été programmées dans le laboratoire de bactériologie du CHU de Sidi Bel Abbés.

LES MOTS CLES :

P. aeruginosa, milieu hospitalier, résistance aux antibiotiques, formation de biofilm.

ABSTRACT:

This work aims to help highlight the level of resistance of *P.aeruginosa* and its ability to escape therapeutic action in hospitals. This species is an opportunistic pathogenic bacterium mainly responsible for nosocomial infection in immunocompromised patients. This species manifests a n increasing power of adaptation towards antibiotics ,which results in often acute therapeutic problems . it is likely to be the agent of chronic infection caused by the formation of biofilm

We aimed for isolation, the identification of strains of *P.aeruginosa* isolated in various de partments of the CHU of sidi bel abbes, but our pratical study was interrupted by the health crisis linked to the Covid – 19 pandemic .the study included a stage of isolating strains from the hospital environment .the identification study of antibiotic resistance and evaluation of the ability to form biofilms of strains were scheduled in the bacteriology laboratory of the CHU of sidi bel abbes.

Key words:

P.aeruginosa, hospital environment, antibiotic resistance, biofilm formation

ملخص

يهدف هذا العمل إلى المساعدة في إثبات مستوى مقاومة *P aeruginosa* و قدرتها على الهروب من الإجراءات العلاجية في المستشفيات . هذا النوع من البكتيريا الممرضة الانتهازية المسؤولة بشكل رئيسي عن عدوى المستشفيات في المرضى الذين يعانون من نقص المناعة . يظهر هذا النوع قوة تكيفية كبيرة بشكل متزايد تجاه المضادات الحيوية ، مما يؤدي غالبا إلى مشاكل علاجية حادة . من المحتمل ان يكون عامل العدوى المزمنة التي يسببها تكوين الأغشية الحيوية الدقيقة .

استهدفنا العزلة و تحديد لسلاطات *P aeruginosa* المعزولة في أقسام مختلفة من CHU في سيدي بلعباس ، لكن دراستنا العملية توقفت بسبب الأزمة الصحية المرتبطة بوباء Covid-19 . اشتملت الدراسة على مرحلة عزل السلالات من بيئة المستشفى . تم تحديد و دراسة مقاومة المضادات الحيوية و تقييم القدرة على تكوين الأغشية الحيوية للسلالات في مختبر علم الجراثيم في CHU بسيدي بلعباس .

الكلمات المفتاحية

P. aeruginosa ، بيئة المستشفى ، مقاومة المضادات الحيوية ، تكوين الأغشية الحيوية .