

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة عمار تليجي بالاغواط

UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGOUAT

كلية العلوم

FACULTE DES SCIENCES

قسم البيولوجيا

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Science biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

Evaluation de l'effet de l'Aspirine et d'un extrait d'huile essentielle d'*Artimisia judaica* sur la formation *in vitro* de biofilm par des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*

Présenté par :

Chaknane Chaima Houria

Devant le jury composé de :

Président:

Gacem Mohamed Amine

Examineur:

Zerrouki Mohamed Hocine

Rapporteur:

Krantar Kamel

2020/2021

Remerciements

D'abord je remercie dieu pour le bon travail à la fin de cette étude dans la réalisation de ma thèse et je tiens à exprimer ma sincérité

Ma Gratitude à mon encadreur <<Mr. Krantar Kamel>> qui m'a aidé à faire cela pour l'entreprise.

Je tiens également à exprimer mes remerciements particulière à tout les enseignants de département biologie

A tous ceux qui m'ont aidé et encouragée de près ou de loin pour tout le monde nous disons.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A celle qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation et de ses
dévouement a ma chère mère*

*A celui qui s'est changé nuit en jour pour m'assurer les bonnes condition a mon cher
père*

A ma petite famille qui m'a toujours soutenu

Sommaire

<i>Remerciements</i>	2
<i>Dédicaces</i>	3
Liste des figures	7
Abréviations.....	10
Résumé	11
Summary	Erreur ! Signet non défini.
ملخص.....	13
Introduction	14
Chapitre I <i>Présentation de Pseudomonas aeruginosa</i>	3
I.1. Définition	4
I.2. Nomenclature	4
I.3. Taxonomie	4
I.4. Phylogénie	5
I.5. Habitat	5
I.6. Les caractères généraux de <i>P.aeruginosa</i>	5
I.6.1. Les caractères morphologique et structuraux	5
I.6.2. Les caractères cultural	6
I.6.3. Les Caractère métaboliques.....	7
I.6.3.1. Les Métabolismes.....	7
I.6.3.2 Production de pigments.....	7
I.6.4. Les caractères génomiques	7
I.7. Facteurs de virulences	8
I.7.1. Facteur de virulence de surface.....	10
I.7.2. Facteurs de virulence sécrétés	12
Chapitre II <i>Antibiorésistance</i>	
II.1. Différent type de résistance bactérienne	13
II.1.1. Résistance naturelle	13
II.1.2. Résistance acquis	13
II.2. Différents mécanisme de résistance de <i>P.aeruginosa</i> aux Béta lactamines	14
II.2.1. Mécanisme enzymatique	14
II.2.2. Mécanismes non enzymatiques	16
Chapitre III <i>La formation du bio film par la Pseudomonas aeruginosa et Quorum Sensing</i>	18
III.1.2. Historique	18
III.1.2. Définition	18

III.1.3.1.formation de biofilm	Erreur ! Signet non défini.
Partie II <u>Experimentale</u>	23
I <u>Matériels et méthodes</u>	Erreur ! Signet non défini.
I.1 Lieux de travail	24
I.2. Objectifs de l'étude	24
I.3. Matériel biologique	24
I.4. l'isolement et identification de souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	25
I.4. 1. L'isolement de souche <i>P.A</i>	25
I.4.2 identification de <i>P.aeruginosa</i>	25
IV.4..2.1 Examen de coloration de gram	25
I.4..2.2. Test d'oxydase	25
I.4.2.3 test de mannitol mobilité	26
I.4.2.4. Galerie ApI20E	26
I.4.2.5. Antibiogramme	27
I.5 Détection de la formation de biofilm par <i>P.aeruginosa invtro</i>	29
I.6.1 la méthode de culture microplaque	Erreur ! Signet non défini.
I.6.2. étude l'effet de l'aspirine et de huile essentielle sur la formation de biofilm par <i>P.aeruginosa invitro</i>	30
I.6.2.1es effet d'aspirine	30
I.6.2.1. Les effet des huile essentielle	
II <u>résultat et interprétation</u>	
II.1. l'isolement et identification	Erreur ! Signet non défini.
II. 1. 1.Le caractère cultural	35
II.2.Le Caractère biochimique	35
II.2.1. recherche d'oxydase	35
II.2.2. recherche de mannitol mobilité	36
II.2.3.les galleries API20E	36
II.2.4 antibiogramme	37
II.3.La détection de la formation de biofilm par <i>P.aeruginosa in vitro</i>	
II.3.1.Détection de la formation de biofilm par la méthode de " culture de microplaque avec coloration de cristal viole	
II.3.2.L'effet d'aspirine et les huiles essentielle d'artemisa judaice sur la formation de biofilm par le <i>P.aeruginosa</i>	
II.3.2.1.L'effet de l'aspirine	
II.3.2.2.L'effet de huile essentielle de artemisa judaice	
III.disscusion	44
Conclusion	48

Références bibliographiques
ANNEXE

Liste des figures

Figure 1 : La relation phylogénétique entre le différent groupe des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossis et al., 2000)

Figure 2 : Représente les différents aspects de colonies de *P.aeruginosa*

Figure 3 : Génome circulaire de *Pseudomonas aeruginosa* (Stoevr, 2000)

Figure 4: Mécanisme de pathogénicité de *P. aeruginosa* (Kipnis et al., 2004)

Figure 5 : Antibiotogramme de la souche sauvage de référence PAO1, (Mesaros et al., 2007).

Figure 6 : Structures des AHLs et de PQS chez *P. aeruginosa* de l'expression d'un très grand nombre de gènes (Juhas et al., 2005)

Figure 7. Mécanisme moléculaire du Quorum sensing chez *P. aeruginosa*. (Ruimy et Andreumont, 2004)

Figure 8: La préparation d'état frais

Figure9 : Méthode d'ensemencement

Figure10 : Les disques d'oxydase

Figure 11: Le milieu du mannitol mobilité

Figure12 : la préparation et l'inoculation de galerie

Figure 1 3: Emplacement des disques d'antibiotiques choisis

Figure14: La culture de plaque

Figure 15: Le teste de coloration de cristal viole

Figure16 : La préparation d'inoculum et le test

Figure 17: La culture d'une le milieu de PCA.

Figure18: L'aspect de colonie de *Pseudomonas aeruginosa* dans une boite de Pétri. (Musques, large, Small).

Figure19: Les bacilles Gram négatif de *Pseudomonas aeruginosa* à objectif 100X

Figure20 : Résultats positif d'oxydase chez le *Pseudomonase aeruginosa*

Figure 21: Résultats de mannitol mobilité (mannitol-, mobilité+) chez le *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 22 : Le résultat de galerieAPI20E chez le *Pseudomonas aeruginosa*

Figure 23: Les zones d'inhibition des antibiotiques testés.

Figure 24: Le résultat de culture de plaque après 24h d'incubation chez les souches isolées

Figure 25: Le pourcentage de Formation de bio films de *P. aeruginosa* sur polystyrène après 24 heures 48 heures et 72 heures d'incubation en bouillon nutritif par le culture de plaque

Figure 26 : le résultat de l'incubation de 24h de culture de bouillon nutritif pour quatre concentrations chez la souche de *Pseudomonas aeruginosa* (C1, C2, C3, C4) La lecture de ces résultats obtenus se forme de tableau

Figure 27 : le résultat de culture de plaque d'une 4 souche aux cette concentration La lecture de culture de plaque d'un tableau suivant

Figure 28 : le résultat de culture de plaque chez les deux souches (S2, S4) pour les différentes concentrations d'extrait d'*Artemisia* après de 24h

Figure 29: le résultat de culture d'une gélose PCA après 24heureschez les deux souches de *P. aeruginosa* pour les 4 concentrations

Liste des tableaux

Tableau1 : Taxonomie de *P. aeruginosa* (Ben Abid.2009)

Tableau 2. Classification des principaux antibiotiques actifs sur *P. aeruginosa* (Aissa, 2012).

Tableau 3:l'origine de souche

Tableau4 : antibiotique tester pour *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau5 : la concentration utilisée dans le test de l'inhibition de formation de bio film par la culture de plaque

Tableau 6: le résultat de mannitol mobilité chez Le *Pseudomonsa aeruginosa*

Tableau7 : la lecture de galerie d'API 20E chez Le *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau 8: la lecture pour la sensibilité / résistance aux antibiotique pour l souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 9 : la lecture de culture de plaque chez le *P. aeruginosa*

Tableau 10 : La lecture de culture de bouillon nutritif après de 24 heures pour les différentes concentrations.

Tableau 11 : La lecture de culture de plaque après 24heures chez les *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau 12 : La lecture de deux cultures d'une plaque et gélose PCA

Abréviations

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

ATB : Antibiotique

API : Appareillage et procédé d'identification

P.A : *Pseudomonas aeruginosa*

LCR : Liquide Céphale Rachique

LPS : Lipopolysaccharidie

IL : Interleukine

G+C : Guanine +cytosine

ETA : Exotoxine A

MBL : Métallo-béta-lactamases

ML : Métallo enzyme

EPS : Exopolysaccharides

BLSE : béta- lactamases a spectre étendue

MEB : le microscope électronique à balayage

MH: Mueller Hinton

AC: Anticorps

Ig (A, G) : immunoglobulin A,B

AI: autoinducteur

AHL: N-Acyl Homosérines Lactones

QS: Quorum Sensing

QQ: Quorum Quenching

BN: Bouillon Nutritif

CV : Cristal Violet

GN : Gélose Nutritive

Résumé

Le biofilm formé par *P. aeruginosa* est notamment impliqué dans la mucoviscidose, les infections du tractus urinaire et les infections des plaies. Plusieurs méthodes d'étude des biofilms *in vitro* existent. La méthode au CV est la plus utilisée dans la littérature. L'objectif principal de notre étude était de détecter *in vitro* la formation de biofilm chez huit souches cliniques de *P. aeruginosa* qui sont caractérisées par différents profils de résistance aux ATB. Nous avons pu observer une grande diversité dans la capacité des souches à former du biofilm, dans des conditions définies. Par ailleurs, la formation de biofilm semble diminuer en présence d'une concentration de 2 et 1,25mg/ml d'aspirine alors que la CMI de l'aspirine est de 1,25mg/ml

la formation de biofilm semble diminuer en présence d'une concentration de 0, 1125 et 0,45 µl/ml de huile essentielle de *l'Artémisa judaïque* alors que la CMI de l'aspirine est de 0,45µl/ml

.

.

Summary

The biofilm formed by *P. aeruginosa* is particularly involved in cystic fibrosis, urinary tract infections and wound infections. Several methods of studying biofilms in vitro exist. The CV method is the most used in the literature. The main objective of our study was to detect in vitro biofilm formation in eight clinical strains of *P. aeruginosa* which are characterized by different profiles of ATB resistance. We were able to observe a great diversity in the capacity of strains to form biofilm, under defined conditions. On the other hand, biofilm formation appears to decrease in the presence of a concentration of 2 et 1,25mg/ml aspirin while the MIC of aspirin is 1,25ml/mg

biofilm formation appears to decrease in the presence of a concentration of 0.1125 and 0.45 μ l / ml of essential oil of Judaic *Artemisia* whereas the MIC of aspirin is 0.45 μ l / ml

ملخص

يتدخل البيوفيلم المكون من *P. aeruginosa* بشكل خاص في التليف الكيسي والتهابات المسالك البولية والتهابات الجروح. توجد عدة طرق لدراسة الأغشية الحيوية في المختبر. طريقة السيرة الذاتية هي الأكثر استخدامًا في الأدبيات. كان الهدف الرئيسي من دراستنا هو الكشف عن تكوين البيوفيلم في المختبر في ثماني سلالات سريرية من *P. aeruginosa* والتي تتميز بمقاومات مختلفة لمقاومة ATB. تمكنا من ملاحظة تنوع كبير في قدرة السلالات على تكوين الأغشية الحيوية ، في ظل ظروف محددة. من ناحية أخرى ، يبدو أن تكوين الأغشية الحيوية الرقيقة يتناقض في وجود تركيز 2 و 1.25 مل/مغ. الأسبرين بينما MIC للأسبرين هو 1.25 مل/مغ. يبدو أن تكوين الأغشية الحيوية الرقيقة ينخفض في وجود تركيز 0.1125 و 0.45 ميكرو لتر / مل من الزيت العطري للشاي الأخضر بينما يكون MIC للأسبرين 0.45 ميكرو لتر / مل

Introduction

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est une souche opportuniste et nosocomiale de maladie humaine, en particulier chez les patients immunodéprimés. Elle peut provoquer une fibrose kystique, des infections des voies urinaires, des brûlures et de nombreuses autres affections. De plus, elle est associée à une incidence élevée de résistance aux antibiotiques et de formation de biofilm (Hentzer M, Givskov M. 2003). Les antibiotiques existants perdent la bataille contre *P. aeruginosa* en raison de la résistance bactérienne, ce qui a conduit les scientifiques à rechercher de nouvelles approches pour gérer les infections. Le système quorum sensing (QS) de *P. aeruginosa* est un régulateur clé du développement du biofilm (De Kievit TR. 2008), de la résistance aux antibiotiques (Høiby et al., 2010) et d'autres fonctions pathogènes, notamment l'expression de facteurs de virulence (Schuster M, Greenberg EP. 2006). Les inhibiteurs du quorum sensing (QSI) diminuent la pathogénèse de *P. aeruginosa* [5] et atténuent la virulence microbienne, permettant au système immunitaire de l'hôte d'éliminer l'infection sans se soucier de la résistance aux antibiotiques (Hentzer M, Givskov M. 2003). D'autres études ont évalué l'activité QSI des antibiotiques chez *P. aeruginosa* en utilisant des concentrations sublétales (Skindersoe ME. et al., 2008). Ceux-ci comprenaient la ceftazidime, la ciprofloxacine et les macrolides tels que l'azithromycine (Tateda K. et al., 2001). La capacité des médicaments connus à inhiber le quorum sensing bactérien a conduit à l'exploration d'autres composés pour une utilisation potentielle dans diverses applications médicales. Ici, nous étudions l'effet de l'aspirine et de l'huile essentielle d'*Artemisia judaica* sur la formation de biofilm. Cette étude se présente en deux parties, une partie bibliographique qui porte sur des généralités concernant *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, l'antibiorésistance et le quorum sensing, ainsi qu'une partie expérimentale dont les objectifs sont:

- Isoler et identifier *Pseudomonas aeruginosa* à partir de d'échantillons cliniques prélevés de patients hospitalisés à l'hôpital 240 lits de Laghouat.
- Détermination de l'antibiogramme des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolés
- Evaluer la capacité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolés à la formation de biofilm *in vitro*.
- Evaluer l'effet de l'aspirine et de l'huile essentielle d'*Artemisia judaica* sur la formation de biofilm *in vitro*.

I. Partie

Bibliographique

Chapitre I

**Présentation de *Pseudomonas*
*aeruginosa***

I.1. Définition :

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 (Plesiat, 2008).

I.2. Nomenclature :

P. aeruginosa est l'espèce-type du genre *P. aeruginosa* la plus étudiée, plus communément appelé bacille pyocyanique « pus bleu » (Lessner. R. 2000). Cette nomenclature vient du Grec Puons = pus, Kuanos = bleu foncé (pyocyanique) et de latin aeruginosus = couvert de rouille (Chakerh. 2012).

I.3. Taxonomie :

La classification de *P. aeruginosa* a d'abord été fondée sur l'étude de leurs caractères phénotypiques (morphologique, biochimiques...) puis sur leur caractères génotypique (Aissa, 2012). Seule la composition en G+C % et qui est égale à 67 fût rajouté comme caractéristique génétique (Madigan et Martinko, 2007 ; Mezaache, 2012).

Selon la 9^{ème} édition de bergy's manuel of systématique bactériologie (1994). Et représenté par une tableau 1

Tableau 1 : Taxonomie de *P. aeruginosa* (Benadir. 2009)

Règne	Bactérie
Embranchement	Procaryote
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonales
Famille	Pseudomonaceae
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>P. Aeruginosa</i>

I.4. Phylogénie :

Le genre de *P. aeruginosa* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe Gamma de prote bactéries. La figure 1 représente la relation phylogénétique entre le différent groupe des protéobactéries. (Figur1)

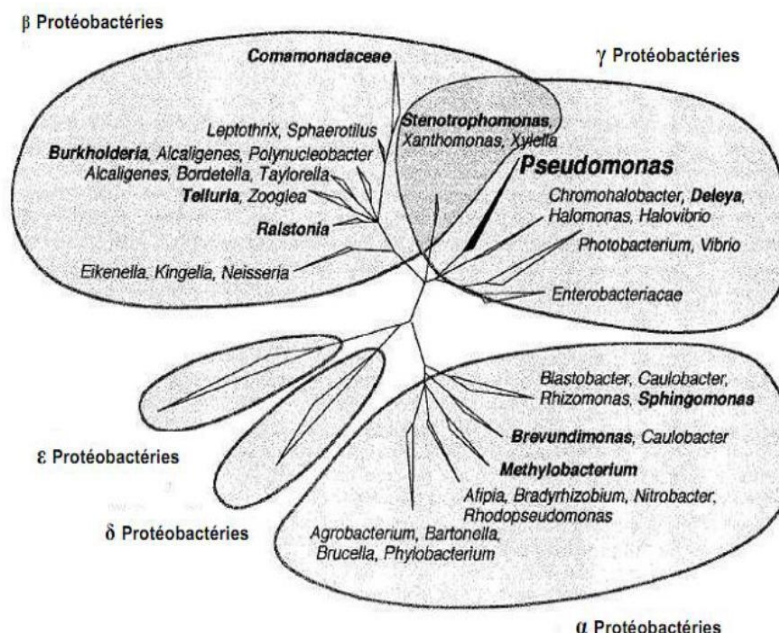


Figure1: la relation phylogénétique entre le différent groupe des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossis et al., 2000)

I.5. Habitat :

P. aeruginosa ou bacille pyocyane 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 trouvée sous forme planctonique, mobile ou en biofilm (Mear, 2014).

I.6. Les caractères généraux de *P. aeruginosa* :

I.6.1. Les caractères morphologique et structuraux :

P.A est un bacille gram négatif en forme de bâtonnet, 0,5 à 0,8 μm de diamètre sur 1 à 3 μm de long. Mobile grâce à un flagelle polaire généralement unique, dépourvu de spores et de capsules de parois des bacilles pyocyaniques et caractéristiques de celle des bactéries à gram négatif (Sadolff, Artenstein, 1974). Elle est constituée d'une membrane externe et d'un espace péri plasmique et du peptidoglycane. La membrane est une bicouche asymétrique

constituée de lipopolysaccharidique (LPS) ou se trouve de nombreuses protéines telles que les porines qui assurent la diffusion de divers types de molécules à travers la membrane externe (Pages, 2004). Chez les *P.A* on distingue un plusieurs types de porines : OprD1 et OprD2 et OprE1 et OprE2, OprH1 et OprH2, OprG et OprF qui représentent la majorité des porines non spécifiques dans cet organisme (Nikado et al., 1991). La membrane de *P.A* est aussi caractérisée par l'existence de nombreuses pompes d'efflux telles que MexA-MexB-OpmM, MexC-MexD-OprJ, qui jouent un rôle important dans l'injection de l'agent antimicrobien (Xavier et al., 2010).

I.6.2. Les caractères culturels :

Le bacille pyocyanique est une bactérie aux besoins très limités croissant sur des milieux synthétiques simples, elle pousse facilement en 24 heures à 37°C. Elle peut croître entre 5 et 42°C avec un optimum de 30°C. Par contre, elle supporte de faibles variations de pH (6,5 à 7,5) avec un pH optimal de 7,2. *P.A* est un aérobie strict mais capable d'utiliser les nitrates en condition anaérobie (Souley, 2002). Elle est caractérisée par une odeur florale (Flandrios, 1997). Un milieu sélectif à base de cétrimide (ammonium quaternaire) permet la recherche et l'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* à partir de produit biologique (selles, urines, pus, liquide céphalo-rachidien (LCR)...) en bactériologie médicale (Delarras, 2007). Les cultures dégagent une odeur caractéristique de raisin ou de seringine *in vitro* (Khalilzadeh, 2009 ; Essoh, 2013) et il existe trois types de colonies de *P. aeruginosa* :

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

La Figure 4 : représente les différents aspects des colonies de *P.aeruginosa*.

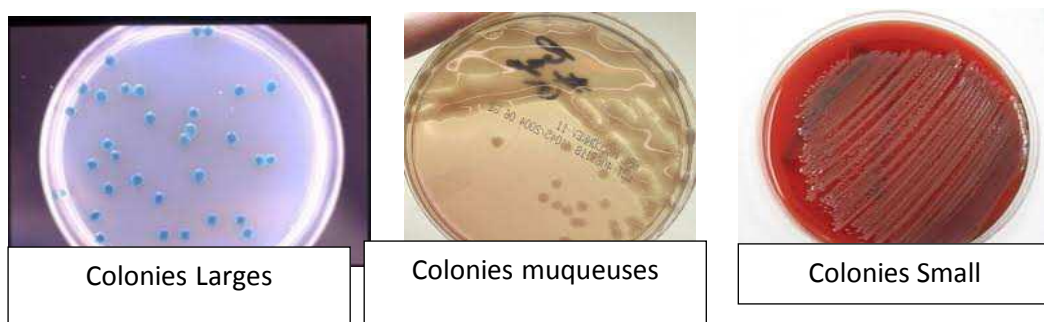


Figure 2 : les différents aspects des colonies de *P.aeruginosa*..(Aissa, 2012).

I.6.3.les Caractère métaboliques

I.6.3.1.les Métabolismes :

Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* possède :

-Une oxydase

-Une nitrate-réductase (réduction des nitrates pouvant aller jusqu'au stade de N gazeux).Métabolisme oxydatif des sucres appréciable sur le milieu MAVAG (milieu pur étude de la voie d'attaque de glucide une arginine- di hydrolase).

I.6.3.2 Production de pigment :

D'après Delarras(2007), P.A produit deux type de pigments (fluorescent ou non) qui servent à son identification ils peuvent être mise en évidence dans le milieu king A et B.

- Pyoverdine : pigment jaune-vert fluorescent soluble dans l'eau, insoluble du chloroforme
- Pyocyanine : (phénozinique) : pigment bleu vert non fluorescent soluble de l chloroforme, cette espèce est le seul produire

I.6.4. les caractères génomique :

Le génome de la souche de PA01 de *Pseudomonas aeruginosa* a été complètement séquencé en 2000. Il est le plus grand génome contenant 5570 gènes, la plupart sont riches en Guanine et Cytosine (G+C)(66,6). Seule 6,7% de ces gènes ont une fonction bien connue. Le pourcentage de séquence régulatrice est plus important dans le génome entier de *Pseudomonas aeruginosa* (8,4%) (Stover et al.,2000).Le chromosome de cette bactérie code notamment pour la plupart les facteurs de pathogénicité environ 200 à300 gènes ce qui représente de 5% de génome (Kohler et Delden,2009).

Le bacille pyrocyanique contient plusieurs plasmides donnant différents caractères phénotypiques (résistance aux antiseptiques et aux antibiotiques, modification de taux de croissance, acquisition d'activités cataboliques sur certains substrats) ceci peut compliquer la connaissance de cette espèce(Flandros.1997).

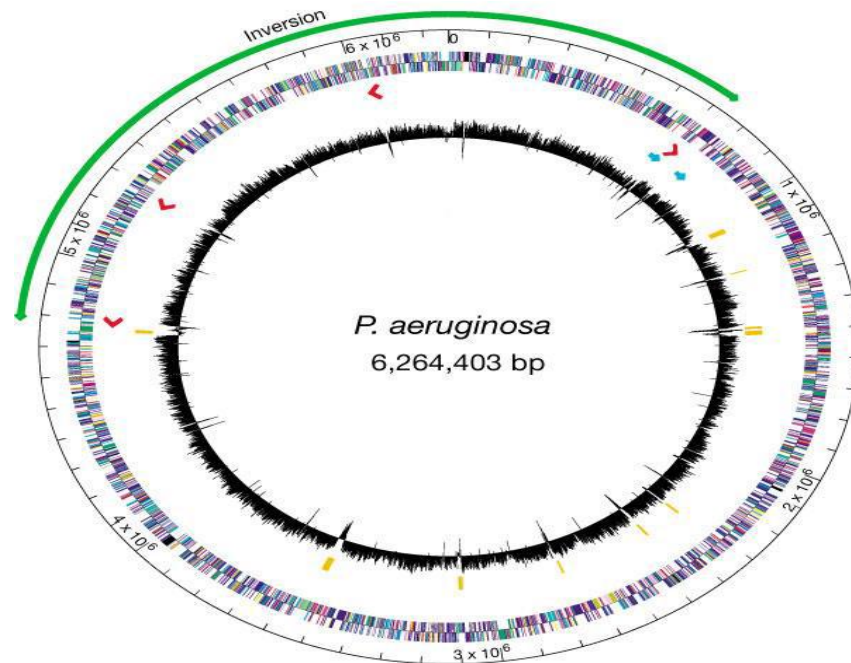


Figure 3 : Génome circulaire de *Pseudomonas aeruginosa*(Stover ,2000).

I.7. Facteur de virulence :

Pseudomonas aeruginosa est invasive en raison de la production de facteur de virulence de surface (qui lui permettent de s'attacher, de coloniser et d'envahir les tissus), et secrétés (qui endommagent les tissus et déclenchent de processus inflammatoires).il souvent difficile de distinguer entre colonisation et invasion pathogène en d'outil diagnostic A déquot (Mesaros et al ..,2007). Cesfacteurs sont impliqués dans les diverses phases d'infection (tableau2)(Mesaros et al. 2007).

Tableau 2. Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*: leurs modes d'action et leurs 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
Flagelle	Adhésion aux cellules épithéliales respiratoires	Diffusion bactérienne
Pili	Adhésion aux mucines Mobilité : rôle dans l'internalisation	Pathogénicité respiratoire
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
Exoenzyme S	Effet cytotoxique Prolifération des LT	Nécrose tissulaire Entraîne des lésions du glycopeptide, de la membrane et des IgG et IgA
Exoenzyme U	Rôle antiphagocytaire	Lésions des cellules épithéliales Responsable de bactériémie voire de choc Septique
Rhamnolipide	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'élastase 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 vascularite d'artères pulmonaires
Lectines solubles	Inhibition des battements ciliaires des cellules pulmonaires	Pathogénicité respiratoire Rôle dans l'infection chronique
Phospholipase C	Effet cytolytique local	Lyse des cellules cibles Rôle dans l'infection aiguë et chronique.
Protéase alcaline	Protéolyse	Rôle dans les infections cornéennes

On distingue 2 classes de facteurs de virulence :

-Les facteurs de virulence associés à la bactérie :

le biofilm, les flagelles, les pili type IV, facteur d'attachement de type Fimbriae et le lipopolysaccharide (Didier, 2007).

-Les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie:

les toxines (exemple les Exotoxines), les enzymes protéolytiques (élastases, protéase IV, protéase alcaline),

Enzymes lipolytiques (lipase, estérase et phospholipase C), rhamnolipides et Chromophores (Kukavica-Ibrulj, 2007).

I.7.1. facteur de virulence se surface :

Les facteurs de virulence de surface incluent le flagelle, le pili, les LPS et l'alginate-**flagelle** : *Pseudomonas aeruginosa* possède un seul flagelle polaire qui est responsable de la mobilité type « Swimming » mais qui intervient également dans la mobilité type « Swimming » (Kohler et al., 2000). Le flagelle bactérien est une structure rotative actionnée par un moteur situé à la base, qui entraîne un filament agissant comme une hélice (Bardy, 2003). Le flagelle serait également impliqué dans l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires (Feldman et al., 1998). Par l'intermédiaire d'un composant commun de membrane asialo-GMA, le flagelle participe aussi à la virulence en induisant une réponse inflammatoire par l'interaction avec récepteurs Toll, TR5 et TR2, ce qui a pour conséquence la production d'IL8, d'IL-6 et de la mucine (Adamo et al., 2004). Le flagelle est très immunogène, surtout à la cour d'infection chronique. *P.A* s'adapte à cette situation en sélectionnant des mutants dépourvus de flagelle pour contourner la réponse de l'hôte il joue aussi un rôle important dans le stade précoces du développement du bio film bactérien in vitro (O'toole et al., 1998).

-Le pili de type IV :

Est la principale adhésion de *P.A* responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales (Hahn, 1997). Le pili de type IV sont impliqués dans la mobilité de type « Swimming », de plus ces structures interagissent in vitro avec la région glycolyse des glycosphingolipides asialo GM1 et GM2, située à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Hobos et al., 1993).

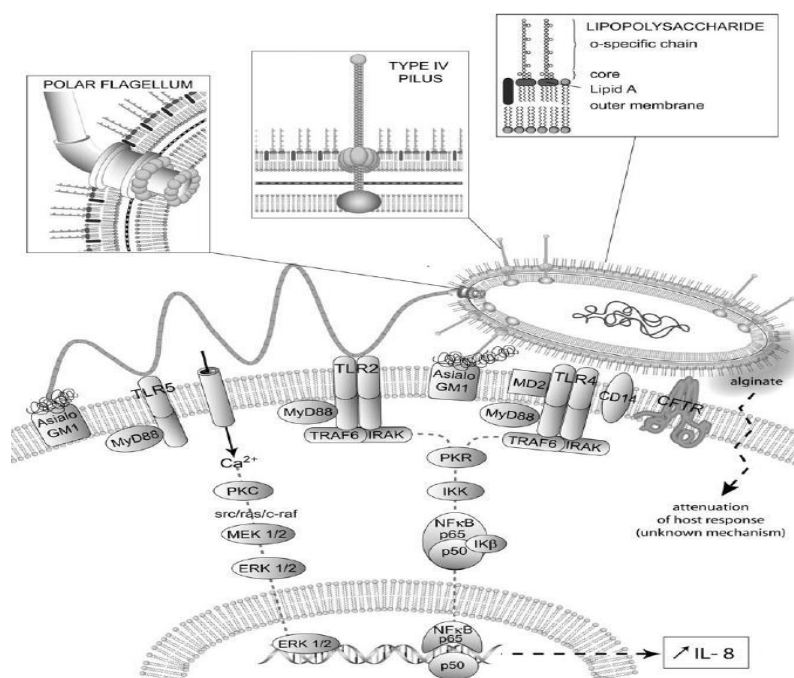


Figure4: Mécanisme de pathogénicité de *P.aeruginosa* (Kipnis et al., 2004)

- lipopolysaccharide (LPS) : Le LPS peut être divisé en trois parties (Rochetta, 1999) :
 - **lipide A**, aussi appelé endotoxine, est responsable d'une stimulation excessive de système immunitaire pouvant provoquer choc septique et conduire à la mort (Lynnet al., 1992).
 - **Cœur oligopolysaccharide**
 - **l'antigène O** qui est une région polysaccharidique variable.

P.A est capable de synthèse des deux formes des LPS A et LPS B (Lam et al., 1989). Selon que l'antigène O est présent ou absent sur le cœur oligopolysaccharidique, on parle respectivement de phénotype lisse ou rugueux, le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent qu'un mutant iso génique possédant un phénotype rugueux (Cryz, 1984). De plus ; les souches 'rugueuses' de *Pseudomonas aeruginosa* sont lysées par le sérum humain, alors que les souches possédant un LPS lisse sont résistantes au sérum (Dasgupta et al., 1994). La variabilité de chaîne polysaccharidique des antigènes O est la base du stéréotype de *P.A*.

- Alginate :

L'alginate est une exopolysaccharide de mucoïde composé de polymères d'acide mannuronique associé avec l'acide glucuronique. *P.Aeruginosa* produit l'alginate pour s'adapter dans certaines situations environnementales inappropriées au développement bactérien (Carpentier et al., 2003). La production d'alginate par ces souches permet la formation d'une biofilm qui favorise l'adhésion aux cellules épithéliales et protège la bactérie de la phagocytose, les anticorps (AC), l'action des antibiotiques (ATB) et désinfectants (Ruimy et Andertant, 2004).

I.7.2. Facteur de virulence sécrétée :

À la cour de phase d'adhésion *P.aeruginosa* un grande facteur de virulence pour provoquer une lésion tissulaire (Gueryet al., 2009).

- Sidérophores :

Le fer est un élément essentiel la croissance de tout l'organisme vivant, mais dans la majorité des milieux- la concentration du fer bio disponible est largement en décades niveaux requis pour la croissance de bactérie comme *P. Aeruginosa*(Ratlidge etDover ,2000).

P.aeruginosa produit sidérophore majeur appelé pyoverdine chargée de fer transportée via le récepteur membranaire FpvA .La pyoverdine peut également agir comme molécule de signalisation induisant la sécrétion de deux autres facteurs de virulence :

L'exotoxine A, l'end protéase Prpl (protéase IV).L'interaction de la Ferri-pyoverdine avec FpvA transduit un signal de type ECF, PvdS la régulateur transcriptionnelle clé du métabolisme du fer chez *P.aeruginosa* (Beare et al.,2003).

-Pyocyanine :

La pycyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie que est impliqué dans de nombreux mécanismes pathogènes (Kipnis et al.,2004). Elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte, induit l'apoptose de neutrophiles et augment la production de l'interleukine IL-8. La pyocyanine au rôle crucial dans la virulence de *P. aeruginosa* .plusieurs auteurs ont montré ses propriétés oxydoréductives : la pyocyanine oxyde le glutathion et inactive la catalase dans la cellule épithéliales respiratoires et la cellule endothéliales, participant ainsi au stress oxydatif et entraînant une nécrose du tissus respiratoire (Lau et al.,2004).

-Protéase alcaline :

La protéase alcaline est une protéase qui dégrade la fibrine. Elle est sécrétée par le système de sécrétion de type I(Guzzo et al. 1991). Son rôle pathogène est documenté dans les infections coréennes comme toutes les protéases produites chez *P. aeruginosa*. Elle participe aussi dans la physiologie des pneumopathies aiguës (Kipnis et al. 2004).

- L'exotoxine A :

L'exotoxine A (ETA) est un composé protéique la plus toxique par la *P. aeruginosa* avec une DL50 de 0,2mg chez la souris. Elle est sécrétée sous forme pro-toxine inactive de 71 KDa. L'ETA est un composée de deux domine : la domine A (26KDa) qui possède de l'activité mono-ADP-ribosyltrnférase (D'argenoiet al., 2001). Et la domine B (45KDa) qui interagit spécifiquement avec le récepteur présent à la surface de la cellule hôte et entrain une arrêt de la synthèse protéique et provoque la mort de la cellule cible par nécrose (Bell et Iseberg, 1996).

- Les rhamnolipides :

La rhamnolipide est des glycolipides extracellulaires amphiphile que possèdent un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire, ce qui les rend ainsi plus accessibles aux phospholipases bactériennes. Les rhamnolipides perturbent le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire humain (Read et al., 1992). De plus, ils inhibent la phagocytose, ils contribuent donc à l'invasion de tissus pulmonaire par *P. aeruginosa* comme le flagelle et les pili de type IV. Les rhamnolipides sont impliqués dans la mobilité de type 'swarming' (Kohler et al., 2000) et la formation de biofilm (Davey et al., 2003).

- l'élastase :

L'activité élastase de *P.A.* médiée par l'action combinée de deux enzymes protéolytiques, Las A et Las B l'élastase Las A (également nommée protéase staphylolytique ou staphylolysine) est un protéase à sérine qui agit en synergie avec Las B augmentant ainsi le pouvoir de dégradation. Las A coupe l'élastine et la rend ainsi plus accessible à l'action d'autres protéases comme Las B l'élastase (également nommée protéase Las B ou pseudo lysine). Est un métallo protéase à zinc qui a une activité protéolytique très importante (Galloway, 1991). Cette protéase dégrade l'élastine mais elle est également capable d'inactiver de nombreuses protéines comme les IgA et IgG, des composants du complément, des constituants majeurs de la matrice de l'épithélium pulmonaire comme l'élastine, le collagène et la fibrine (Park et al., 1996). Le système « Las » contrôle notamment l'expression de gènes de élastase (Las A et Las B), de la protéase alcaline, de l'exotoxine A et des protéines de la machinerie de sécrétion de type II (Ledgham et al., 2003).

- Les phospholipases C :

Les phospholipases sont d'enzyme extracellulaire thermolabiles d'environ 80KDa contenant des ions zinc essentielle à l'activité enzymatique sécrétées par le système de sécrétion de type II. Trois phospholipases C (PLC) de spécificité de substrat différents ont été identifiées chez *P.A.* (Stonehouse et al., 2007).

Facteurs de virulence sécrétés via système de sécrétion de type III :

- l'exo enzyme S

- l'exo enzyme T

- l'exo enzyme U

- l'exo enzyme

Chapitre II

Antibiorésistance

II.1. Différent type de résistance bactérienne :

La résistance bactérienne aux antibiotiques définie par la capacité d'une bactérie à survivre et la capacité de résistance à une concentration bien déterminée de cette molécule (Weiss, 2002). et détermine la résistance bactérienne par différents types.

II.1.1. Résistance naturelle :

Pseudomonas aeruginosa possède une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibée par le clavulanate, et une mauvaise perméabilité membranaire. *Pseudomonas aeruginosa* est donc naturellement résistante aux pénicillines des groupes V, G, M et A, à la plupart des céphalosporines de troisième génération (Figure 5). *Pseudomonas aeruginosa* est aussi résistante à la kanamycine (Poole, 2004). A ces différents mécanismes naturels.

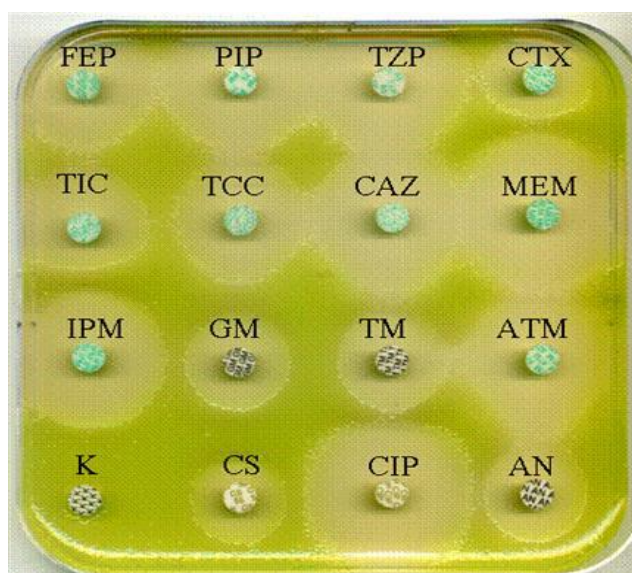


Figure 5 : Antibiogramme de la souche sauvage de référence PAO1, (Mesaros et al. 2007).

II.1.2. Résistance acquise :

Elle est très fréquente et résulte de l'accumulation de mécanismes de résistances liés à des mutations chromosomiques et à l'acquisition des gènes transférables. Ces mécanismes sont :

- L'impérmeabilité 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 (Cattoen, 2009 ; Elyajouri, 2012 ; Dubois, 2013).

P. aeruginosa n'est sensible qu'à quelques ATB (Bricha et al., 2009) présentés dans le tableau suivant :

Tableau 3. Classification des principaux antibiotiques actifs sur *P. aeruginosa* (Aissa,2012).

Antibiotiques	Familles	Mode d'action
Ticarciline Aztréonam Imipénèmes Céftazidime	Carboxypénicillines Monobactames Carbapénèmes Céphalosporine de 3 ^{ème} génération	Les β -lactamines agissent au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane, entraînant une lyse bactérienne.
Gentamicine Amikacine	Aminoglycosides	Ils perturbent la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome entraînant la destruction bactérienne. Ils sont bactéricides.
Colistine	Polymyxine	Agit au niveau de la membrane cytoplasmique bactérienne entraînant l'éclatement de la bactérie.
Ciprofloxacine	Quinolone de 2 ^{ème} génération ou fluor quinolone	Les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-gyrase" en empêchant la réplication et la transcription de l'ADN bactérien.

II.2. Différent mécanisme de résistance de *P.aeruginosa* aux Bêta lactamine :

II.2.1. Mécanisme enzymatique :

A l'heure actuelle, la production d'enzymes hydrolytiques appelées bêta-lactamases est le mécanisme de résistance prédominant des bactéries à Gram négatif vis-à-vis des bêta-lactamines. (F, 2009).

-**les bêta-lactamine** composent une des grandes familles d'antibiotique. Elles comportent même plusieurs sous-familles, comme les pénicillines, les pénicillines avec inhibiteur de bêta-lactamase et céphalosporines.

-les bêta-lactamase :

Les bêta-lactamases sont des enzymes bactériennes qui hydrolysent la liaison amide du cycle Beta-lactame des bêta-lactamines pour donner un acyle-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. L'hydrolyse

Irréversible du noyau bêta-lactame entraîne alors l'inactivation de l'antibiotique et la perte totale de son activité antibactérienne (Van et al. 2010).

Pseudomonas aeruginosa peut produire un nombre important de bêta-lactamases des quatre classes moléculaires, mais aussi les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu appartiennent de ces classes (Thomson et Bonoma, 2005).

- Résistance par hyperproduction de la céphalosporines Amp C

Peut impliquer la surexpression constitutive du gène Amp C codant la bêta-lactamases C'est Le mécanisme enzymatique le plus fréquent, il s'effectue par une mutation chromosomique de gènes régulateurs Amp C et la surexpression constitutive du gène affect principalement l'activité de la ticarcilline -tazobactame, ceftazidime Habituellement l'enzyme est produit en petite quantité, toutefois la production d'Amp C peut augmenter de 100 à 1000 fois (Bagge N et *al.*, 2002). Cette hyperproduction de céphalosporinase de type Amp C permet à

P.aeruginosa de résister à toutes les betas lactamines a l'exception des carbapénèmes, le niveau de résistance sera donc en relation et variable Selon la quantité d'Amp C produit (Livermore D, 1995). Les bêta-lactamases chromosomiques sont codée par le gène Amp C et la régulation de ce gène est sous la dépendance d'un système de régulation avec en particulier les gènes Amp R, Amp D, Amp G

-Amp R : qui joue le rôle d'activateur transcription elle du gène Amp C qui est inductible en présence de b-lactamines et réprimé par la protéine code par le gène Amp D

-Amp G : code une protéine transmembranaire qui agit comme une perméase pour les 1,6-anhydromura peptides qui sont considérés comme molécules de signale impliquer dans l'induction de Amp C

-Récemment il a été démontré que deux autres gènes interviennent dans la surexpression d'Amp C et qui sont AmpDh2 et AmpDh3 ; Contrairement aux entérobactéries, il n'a pas encore été trouvé chez les *Pseudomonas* de céphalosporinase plasmidique.

- Résistance par production de pénicillinas

Il existe plusieurs types de pénicillinas PSE-1 ou encore dénommé CARB-2, PSE-4 (CARB-1), PSE-3, CARB-3, CARB-4 (Bert F et *al.*, 2002) mais d'après les études du GERPB (groupe d'étude de la résistance de *P.aeruginosa* aux b-lactamines), La pénicillinase majoritaire est PSE-1 (représente 90% des cas)

Ces pénicillinas ont la capacité d'hydrolyse les carboxypénicillines, uréidopénicillines, céf sulodines et Inactives sur les : ceftazidime et les carbapénèmes Les pénicillinas d'origine plasmidique appartiennent à trois groupes :

- groupe PSE ou CARB (PSE-1, PSE-2, PSE-3, PSE-4)

- groupe OXA (OXA 1 à 10)

- groupe TEM (variants de TEM1 et 2) (Clave D, 2011)

- Résistance par production de bêta-lactamases a spectre étendue : BLSE

La diffusion des gènes de classe A de BLSE joue un rôle important dans la diffusion de la résistance aux ATB et peut limiter ainsi les possibilistes de traitement des infections causées par *P.aeruginosa* Il existe plusieurs types de BLSE :

- PER-1, VEB (1a, 1b, 2), GES (1, 2, 5, 8, 9), BEL-1, KPC

- Entre 1992 et 1998 : l'apparition des *P. aeruginosa* productrice de TEM en France : TEM-42 (Mugnier P et al., 1996), TEM-4 (Poirel L et al., 1999), TEM-21 (Dubois V et al., 2002), TEM-24 (Marchandir H, 2000)

- En 1995 : la détection des *P. aeruginosa* productrice de SHV-2a en France (Naas, 1999) et plus tard en Thaïlande et en Pologne (CHanaong A et al., 2001) Elles ont la capacité d'hydrolyser les carboxy pénicillines, uréido pénicillines, céphalosporines (ceftazidime et cefépime)

- Résistance par production de carbapénémase :

Aujourd'hui les métallo-bêta-lactamases (MBL) (carbapénémase) sont décrites non seulement chez les entérobactéries mais également chez *P. aeruginosa* et La détection et la confirmation de ces carbapénémase sont réalisées par biologie moléculaire. Elles appartiennent aux différentes classes :

- Classe B : métalloenzymes ML Bs Plusieurs types de métalloenzymes sont décrits mais les plus connues sont les IMP (de 1 à 18) et les VIM (de 1 à 12)

- Classe A : KPC

- Classe C : oxacillinases

Sont capable d'hydrolyse les carbapénèmes et autres b-lactamines sauf aztréonam (Clave D, 2011).

II.2.2. Mécanismes non enzymatiques

Soit par L'acquisition d'une bêta-lactamases intrinsèque ou bien par La surproduction d'un système d'efflux actif ou un déficit en porine Opr D qui permet le passage des carbapénèmes à travers la membrane externe. C'est un mécanisme connu depuis longtemps et touche l'ensemble des carbapénèmes Plusieurs protéines agissent en tant que composant actifs des systèmes d'efflux Opr M, Opr J, Opr N et sans oublier le système Mex AB-Opr M (Clave D, 2011).

Le système d'efflux actif :

Le séquençage entier du génome de *Pseudomonas aeruginosa* a permis d'identifier des gènes codant pour plusieurs pompes d'efflux dont 12 codant pour un transporteur de type RND (Resistance Nodulation cell Division), et l'implication de quatre d'entre elles a été prouvée dans la résistance aux antibiotiques. Chacune de ces pompes est composée de trois protéines (Figure 6).

1. Une protéine de la membrane cytoplasmique de la famille RND (MexB, MexD, MexF, MexY) qui agit comme une pompe utilisant la force protomotrice pour fonctionner et montrant une large spécificité pour les substrats à rejeter,
2. Une seconde protéine, OMF (Outer Membrane Factor family : OprM, OprJ, OprN, OprM) qui est intégrée dans la membrane externe,
3. Une troisième protéine, MFP (Membrane Fusion Protein family : MexA, MexC, MexE, MexX) qui est localisée dans l'espace périplasmique. Elle assure l'association entre les deux autres et est fixée à la membrane interne par une accroche N-terminale. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, ces pompes confèrent la Résistance à la plupart des bêta-lactamines (Schweizer, 2003).

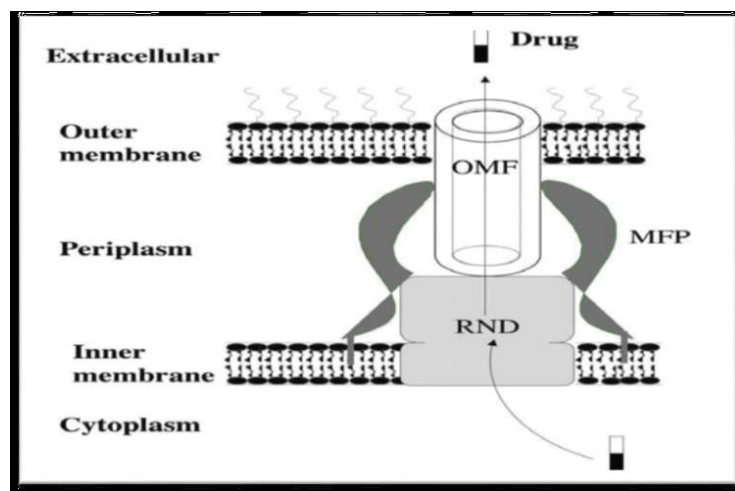


Figure 6: Mécanisme de transport proposé pour les pompes d'efflux de la famille RND (Schuldiner, 2006).

Chapitre III

**La formation du bio film par la
pseudomonas aeruginosa et Quorum
Sensing**

III.1. Description du biofilm bactérienne :

III.1.2. Historique :

La découverte des biofilms microbiens est attribuée à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek, le premier qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés microbiennes adhérentes à la surface des dents (Roux et Chigo, 2006). 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 ; Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Kara Terki, 2014). Plus récemment, les études sur les biofilms étaient développées dans divers domaines industriels, environnementaux et médicaux. Beaucoup de travaux dans les deux dernières décennies ont compté sur les outils tels que : la microscopie électronique à balayage (MEB) ou les techniques de cultures microbiologiques standards pour la caractérisation des biofilms (Donlan, 2002).

III.1.2. Définition :

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, surfaces alimentaires ou coques des navires) ou médicales (prothèse, cathéter, valves cardiaques) (Branger *et al.*, 2007 ; Bellifa, 2014).

III.1.3. Formation de bio film :

Les différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quel que soit l'environnement (Haras, 2005).

III.1.3.1. Adhésion initiale réversible :

C'est l'étape préliminaire de la formation de biofilm et le résultat de l'interaction entre les bactéries et un substrat solide (attractions correspondantes aux forces de Van der Waals et des forces de répulsion électrostatiques). Les cellules s'adsorbent sur une surface pendant un certain temps, mais peuvent se détacher (Branger *et al.*, 2007 ; Pecastaings, 2010 ; Mulleret Guaguere, 2014).

III.1.3.2. Adhésion initiale irréversible :

Dans un deuxième temps, l'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas des

interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe (Bellifa, 2014 ; Branger *et al.*, 2007).

III.1.3. 3.Colonisation de la surface :

L'adhésion irréversible va conduire à la présence de cellules isolées, voire d'agrégats, à la surface du matériau ou de la muqueuse. L'étape de colonisation consiste en une accumulation plus ou moins intense et rapide par division cellulaire des bactéries adhérees, mais aussi par recrutement continu de bactéries planctoniques. La colonisation peut être divisée en 5 phases, caractéristiques d'une croissance de biomasse (Capdeville et Nguyen, 1990):

- Phase de latence qui inclut la phase d'adhésion initiale avec adaptation des cellules bactériennes à leurs nouvelles conditions de vie,

Phase d'accélération caractérisée par une forte augmentation de la biomasse fixée et par une consommation élevée des nutriments (azote et oses) en liaison avec les réponses adaptatives,

- Phase d'accumulation linéaire qui correspond aux vitesses et taux maximaux de production de biomasse, de protéines et de polysaccharides au sein de la structure,

- Phase de ralentissement conditionnée par la nature et la disponibilité en substrats au sein de la phase liquide, mais également au sein de la structure (Samrakandi *et al.* 1997), par la surface disponible (Belkhadir *et al.* 1988), l'hydrodynamique du système,

- Enfin, la phase de stabilisation apparente caractérisée par un équilibre dynamique entre la perte de biomasse (mortalité bactérienne et détachement) et la persistance d'une multiplication bactérienne (Flemming et Wingender, 2001).

III.1.3.4.Maturation du bio film :

C'est l'étape clé de la formation de biofilm. Elle est caractérisée par la sécrétion d'exopolymères contribuant à la forte adhésion des cellules les unes aux autres d'un côté et à la surface d'un autre côté. Le biofilm grandit jusqu'à devenir macroscopique en condition optimales (Branger *et al.* 2007 ; Alnnasouri, 2010).

III.1.3. 5.Dispersion du biofilm

Le détachement des cellules associées aux biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition ou modification de la nature des nutriments disponible.

Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur Développement. Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement (Haras, 2005 ;

Parot, 2007).

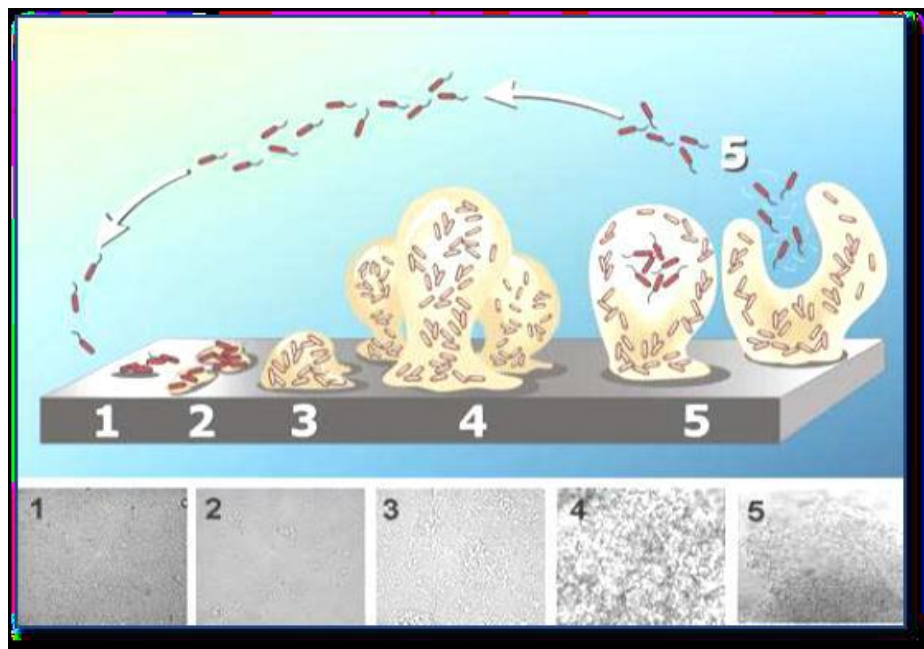


Figure 7 : Représentation des différentes étapes de développement d'un biofilm. (Besassier *et al.*, 2005).

III.2. Le Quorum Sensing :

Le Quorum Sensing est un système de régulation primordial dans l'expression de la virulence de *P. aeruginosa*. En effet, son impact a été démontré à différents niveaux, de la phase d'adhésion à la formation du biofilm, dans l'expression des facteurs de virulence et dans la persistance de la bactérie au niveau pulmonaire (Imamura *et al.* 2005; Smith et Iglewski, 2003). Les auto-inducteurs mis en évidence pour la communication intercellulaire chez *P. aeruginosa* correspondent à des AHLs et des molécules proches des quinolones (Pseudomonas Quinolone Signal : PQS) (Juhas *et al.* 2005) (Figure 8).

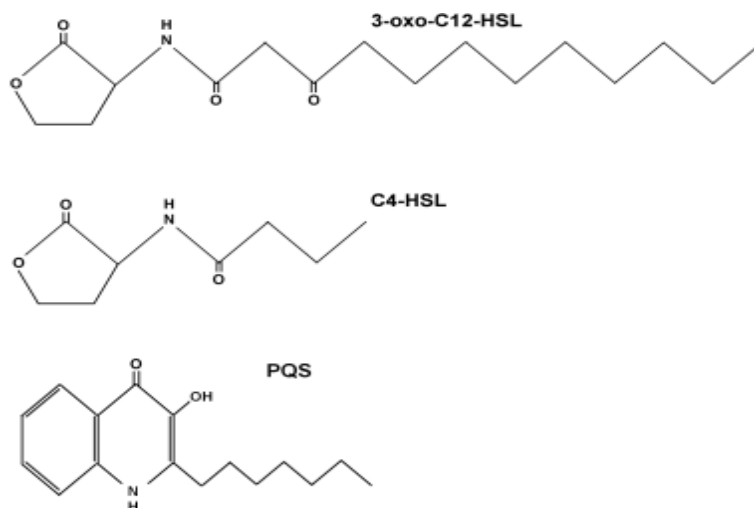


Figure 8. Structures des AHLs et de PQS chez *P. aeruginosa* (Juhas *et al.* 2005)

Chez *P. aeruginosa*, deux systèmes effecteur/récepteur impliquant les AHLs coexistent et interviennent dans la régulation de l'expression d'un très grand nombre de gènes. Le système LasI/R fait intervenir une 3-oxo-C12-homosérine lactone (3OC12-HSL), le système RhII/R une C4-homosérine lactone (C4-HSL). C4-HSL diffuse librement à travers la structure pariétale bactérienne, alors que la 3-oxo-C12-HSL fait intervenir un transport actif par pompes d'efflux (Pearson *et al.* 1999). LasI, appartenant à la famille des synthases de type LuxI, synthétise la 3-oxo-C12-HSL (*Pseudomonas* autoinducer 1: PAI1) qui se lie au régulateur LasR, homologue de LuxR (Gambello et Iglewski, 1991; Pearson *et al.* 1994). Le couple LasR/PAI1 régule l'expression de nombreux gènes, dont notamment ceux correspondant à des facteurs de virulence comme LasA, LasB et l'exotoxine A. Par ailleurs, il régule positivement certains gènes impliqués dans l'appareil de sécrétion de type II, couplant ainsi l'expression et l'export de certaines toxines (Smith et Iglewski, 2003). La fixation de PAI1 sur LasR induit également une activation de *lasI* créant une boucle d'auto-induction (Seed *et al.* 1995). Le second système de régulation est codé par les gènes *rhlI* et *rhlR*. *RhlI* permet la synthèse de PAI2 ou C4-HSL (Ochsner et Reiser, 1995) qui se lie au régulateur RhlR. L'activation de ce dernier permet la régulation de gènes impliqués dans la synthèse des rhamnolipides et la production de métabolites secondaires, tels que la pyocyanine. Ces deux systèmes interagissent, et il existe une hiérarchie dans cette interaction: LasI/R est requis pour l'induction de *rhlI*/R et certains promoteurs reconnus par RhlR peuvent aussi être reconnus par LasR (Fuqua et Greenberg, 2002). La régulation de ces systèmes fait appel à différents mécanismes; ainsi les synthases produisent d'autres homosérines que PAI1 et PAI2 capables de moduler les interactions autoinducteur-récepteur (Pearson *et al.* 1994; Winson *et al.* 1995);

de même PAI1 est capable d'entrer en compétition avec PAI2 pour la liaison à RhlR, résultant en un complexe inactif (Pesci et Iglewski, 1997).

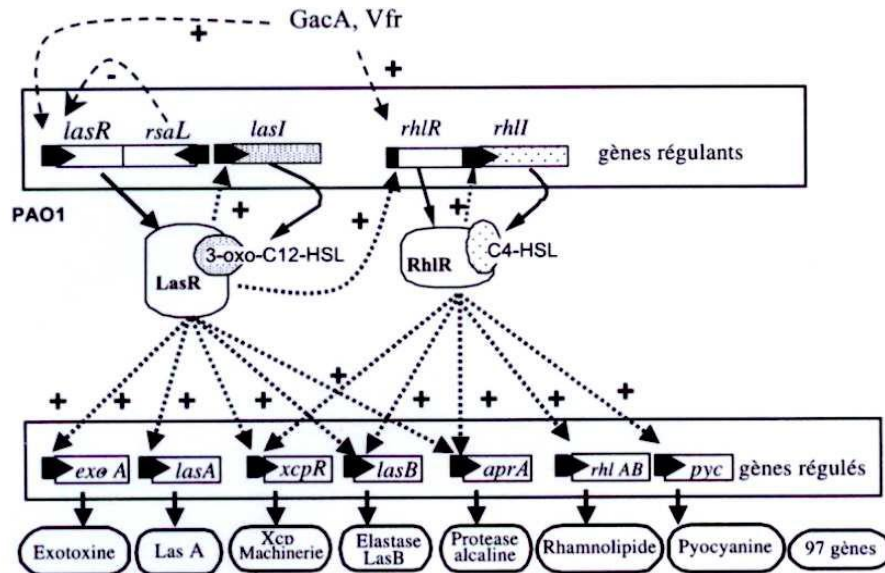


Figure 9. Mécanisme moléculaire du Quorum sensing chez *P. aeruginosa*.

Deux systèmes de Quorum sensing ont été identifiés chez *P. aeruginosa* : le système *las* et *rhl*. Le système est constitué d'un gène régulateur *lasR* codant pour la protéine LasR, d'un gène *lasI* codant pour une synthase auto-inductrice LasI participant à la synthèse d'une petite molécule de la famille des homosérines lactones : 3-oxo-C12-HSL. Le complexe LasR/3-oxo-C12-HSL

est activateur transcriptionnel de gènes de virulence (indiqué en bas de la figure) et de *lasI*. Selon le même modèle, le système *rhl* est constitué de gènes *rhlR*, *rhlI* et d'une autre HSL : C4-HSL. Ce système active

gènes en commun avec le système *las* et propre comme le rhamnolipide. Le système *las* contrôle le système *rhl*. Le système *las* est contrôlé négativement par le produit du gène *rsaL* et positivement par GacA et Vfr. Récemment, 97 gènes dont la majorité ont une fonction hypothétique viennent d'être impliqués dans le QS (Ruimy et Andremont, 2004).

Partie II

Experimental

I. Matériel et méthodes :

I.1 Lieux de travail :

Ce travail a été fait, qui consiste à isoler et identifier les bactéries de *P.aeruginosa* de différents échantillons cliniques au niveau du laboratoire central bactériologie de l'hôpital Ahmed ben ajila - Laghouat du 07 Février 2021 à 21 Février 2021, afin qu'une étude soit réalisée sur la capacité des bactéries à la formation de bio film et étudier l'effet de quelque molécule sur la capacité de bactérie pour former le bio film au niveau du laboratoire pour spécialité du microbiologie appliquée à l'université Ammar thlidji- Laghouat.

I.2. Objectifs de l'étude :

- isolement et identification de *Pseudomonas aeruginosa* à partir d'échantillon clinique
- étudier la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.
- étudier la capacité de bactérie pour former bio film
- étudier l'effet de quelque molécule sur la capacité des bactéries à former de biofilm c'est-à-dire à ce que cette molécule inhibe la croissance et la capacité des bactéries à former le bio film ou non.

I.3. Matériel biologique (l'origine de souche) :

Nous avons utilisé 9 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées à partir de différents prélèvements cliniques (différents échantillons) de patients de deux sexes et des différents services.

Tableau 3: l'origine de souche

N° de prélèvement	N° de référence	Sexe	Nature de prélèvement	services
1	115	Homme	Pus	Chirurgie homme
2	124	Femme	Pus	Ch. Femme
3	90	Homme	Pus	Ch. Homme
4	6	Femme	Crachat	Phistose
5	7	Femme	Crachat	phistose
6	Laboratoire privé	Femme (38ans)	Urine	privé
7	440	Homme sujet âgé	Urine	Chirurgie .homme
8	8	Homme	Crachat	phistose
9	9	Femme	LCR	P.U

I.4 l'isolement et identification de souche de *Pseudomonas aeruginosa* :

I.4.1 L'isolement de souche *P.A* :

L'isolement pratique sur la milieu hektoen préalablement coulés en boîtes de pétri, sont ensemencement, en stries serrés sur la surface de gélose hektoen, de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation de 37°C à 24heures.

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.

I.4.2 identification de *P.aeruginosa* :

Identification de *P.aeruginosa* est habituellement facile, cette identification basée sur :

I.4.2.1 Examen de coloration de gram :

Principe : la coloration de gram est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi en bactéries à gram positif et bactéries à gram négative (Denensi, 2007). Dans la paroi des bactéries à gram positif sont caractérisées par un peptidoglycane par rapporte la paroi de bactéries à gram négative contient un couche mince de peptidoglycane mais les bactéries à gram positif contient une couche épaisse cela l'aide à préserver la coloration de la viole (elle ne pas lave par l'alcool), ce qui lui donne la propriété de gram positif par contre les bactéries à gram il jeu peu lave par l'alcool puisque elle contient une couche mince de peptidoglycane cela lui fait perdre la viole et devient rose quand je tache la rose de fishine.

L'étape de coloration :

- Préparation un frottis ou étalement : prend une lame propre mettez dans la lame une goutte d'eau physiologie stérile, ensuite par pipette pasteur bouchonnée stérile prélève une colonie isolée ajoute les colonies sur la lame et dissociée dans les gouttes d'eau physiologie après fixer les frottis prépare par sèche avec la flamme de bec benzine et refroidie la lame.

- Puis :

- Recouvre la lame par le violet de gentiane pendant 1min

Après lave par l'eau de robinet.

- puis recouvre la lame totalement par lygole pendant 2min après lave par l'eau.

- ensuite ajoute alcool jusqu'à disparition de la couleur violette pendant 30 secondes et rince avec l'eau.

- puis colore la lame par la solution de fishine pendant 45 secondes et lave par l'eau.

- al 'fine observe par la microscope avec une objectif $\times 100$, à l'aide d'huile d'immersion.

4

I.4.2.2. Test d'oxydase :

Cette teste détermine l'activité d'oxydase pour les bactéries à été détermine par la méthode de disque d'oxydase, alors à l'aide une pipette pasteur boutonnée et prend un colonie et dépose les colonie sur le disque. La réaction positive est révèle par l'apparition d'une tache violette, réaction négative ne pas observe une tache violette.



Figure11 : les disques d'oxydase

I.4.2.3 test de mannitol mobilité :

Le milieu mannitol- mobilité nitrate est utilisé pour l'identification présomptive des entérobactéries basée, sur la fermentation du mannitol, la mobilité et sur le réduction des nitrat en nitrites.

Technique :

-à l'aide de pipette pasteur stérile prélève une ou deux colonie à culture de 24heures et on réalise un piqure centrale à travers le milieu et ouvre la couver de tube, ensuit incubé à étuve à 37°C durant 24heures.

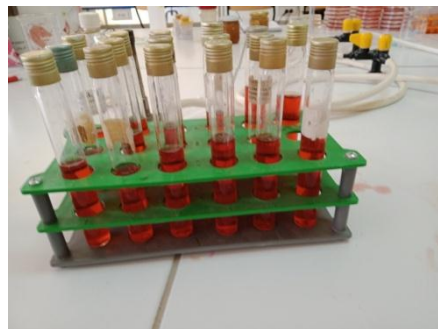


Figure 12: le milieu du mannitol mobilité

I.4.2.4. Galerie ApI20E :

ApI20E est un système standardisé pour l'identification des bacilles a gram négatif non fermentaires comme le *Pseudomonas aeruginosa*

Principe :le système API Bio Mérieux (Appareillage et Procédé d'identification) est une version miniaturisée et standardisée des techniquesbiochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries.

Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la micro galerie (contenant des substrats de déshydratés), les métabolismes produits durant la période d'incubation se traduisant par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

Elle permet l'identification d'une centaine de bacilles à gram négatif dont les entérobactéries elle comprend 20 tests biochimiques et le 21^e test c'est le test d'oxydase.

Préparation de galerie :

Nous mettons dans le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation environ 5 ml d'eau distillée et la distribuons dans la boîte d'incubation afin de préserver l'humidité de la chambre et éviter la sécheresse de la galerie et après cela nous sortons une galerie (les galeries en 20 micro tube) de son emballage individuel et nous la mettons dans une boîte d'incubation pour que l'on mette dans chaque micro tube la suspension bactérienne après nous la mettons dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Préparation de suspension :

- Prendre une colonie (identique pour chaque échantillon) bien isolée à partir d'une culture de 24 heures par une pipette pasteur stérile boutonnée. Et ensemencement d'un tube essai contenant une eau physiologique et homogénéiser la suspension.
- Réaliser une suspension égale 0,5 de **McFarland**.

Méthode d'inoculation de la galerie :

Remplir les tubes des tests NO₃ à ONPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incubé à 37 °C pendant 24 heures.

I.4.2.5. Antibiogramme :

C'est une technique de laboratoire qui étudie la sensibilité et la résistance des souches de *P.aeruginosa* aux antibiotiques (ATB), vis-à-vis différentes familles d'antibiotiques, on généralise la famille la plus utilisée c'est la Béta-Lactamine.

Cette étude pour la test de sensibilité e la souche elle ensemencement sur la gélose Mueller Hinton(MH).

Le tableau suivant montre la liste d'ATB qui teste sur le *P.aeruginosa*.

Tableau5 : antibiotique tester pour *Pseudomonas aeruginosa*

N°	Antibiotique	Abréviatio n	La charge de disque	famille
1.	Ticarcilline-Acide clavulanique	TCC	75/10µg	Béta-Lactamine
2.	Tobramycine	TOB		aminosides
3.	Colistine	CL		polypeptides
4.	Imipenème	IPM		Béta-Lactamine
5.	Gentamicine	GEN		aminosies
6.	Céfazoline	CN		Béta-lactamine
7.	Céfazidime	CZ		Béta-Lactamine
8.	Ofloxacin	OF		quinolones
9.	Lévofoxacin	LE		Béta-Lactamine
10.	Amikacine	AK		Béta-Lactamine
11.	Céftazidime	CAZ		Béta-Lactamine

Méthode de culture d'antibiogramme :

Préparation de la suspension :

D'une culture pure a 24heures prend 2à 3 colonie bien isolée à l'aide de pipette pasteur boutonnée stérile mette la colonie dans une l'écouvillon stérile contient une eau physiologie de homogénéise l'inoculum après ensemencement à la surface de gélose de MH.

Méthode d'ensemencement :

D'une boîte pétri coulé la gélose de MH ensuite nous apportons une suspension préparée dans l'écouvillon stérile et forme de haut en bas une stries serrée à la surface de gélose de MH -répété l'opération a quatre fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement réalise par frottement de l'écouvillon à la totalité de gélose dans la boîte pétri.

Application de disque d'antibiotique :

Les disques choisis sont posés à l'aide d'une pince stérile, les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement une distance doit séparer un disque périphérique au bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés pour que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas.



Figure 13: Emplacement des disques d'antibiotiques choisis

I.5 détection de la formation de biofilm de *P.aeruginosa* :

I.5 .1 Méthode de culture de plaque :

C'est une méthode qui étudie l'évolution quantitative de la formation de bio film d'une certaine souche bactérienne comme le *pseudomonase aeruginosa* par une culture a 24heures pour utilise d'un inoculum qui compose à un bouillon nutritif et une colonie bactérienne à incube a24 heures.

- la bio film forme sur supports en polystyrènes en utilisant de microplaque à96puits.

La préparation d'inoculum :

Prendre une colonie bien isolée à partir d'une culture de 24 heures et ensemencer 5ml de bouillon nutritive qu'on incube à 37°C pendant 18à24heures

- faire de dilution pour obtenir une concentration de 10^8 UFC/m ($0,08$ à $10D$ $9,630nm$).

Méthode de culture de plaque :

- dépose de 100 à $150\mu l$ de cette suspension dans le puits d'une microplaque de 96 puits incube à 37°C pendant 24heures.

- après 24h vider les puits de leur contenu puis laver 3foie consécutive avec $150\mu l$ d'eau physiologie stérile pour éliminer les bactérie libre ajouter $25\mu l$ de solution 1% de cristal violette pendant 10à15 min

- ensuit laver un 3 foie avec l'eau distille à $150\mu l$ le puits pour élimine la coloration non fixe.

- pour la confirmation a ce que les bactéries forme un bio film dans la puits elle va teste par la coloration de cristal viole c'est-à-dire la couleur fixe dans les puits présence de formation de bio filme par contre le couleur ne pas fixe absence la formation de bio film.

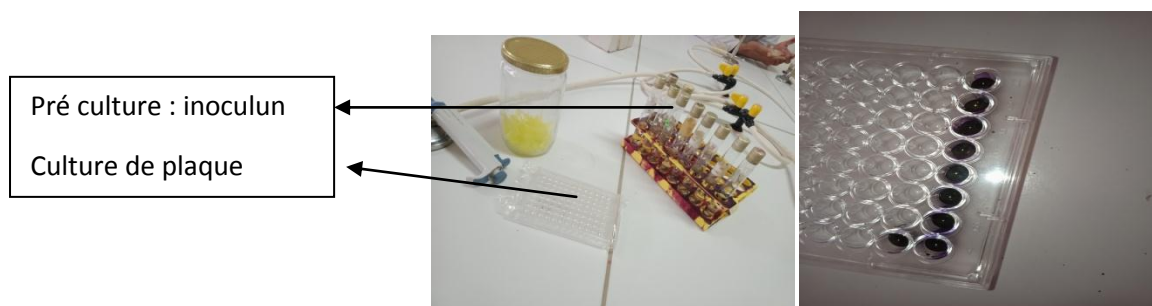


Figure14: la culture de plaque **Figure 15 :**le teste de coloration de cristal viole

I.5.2. étude l'effet de aspirine et l'huile essentielle d'artemisia judaïque:

I.5.2.1 l'effet 1d'aspirine :

Le but du teste d'aspirine est de savoir si les molécules d'aspirine ont un effet et étude la concentration minimal inhibitrice (CMI) sur la croissance et le développement des bactéries et leur capacité à former un bio film en prenant différent concentration de la solution d'aspirine et en plaçant à l'inoculum prépare à culture pure à 24heures, ensuit homogenèse la suspension et incube a l'étuve a 37°C pendant 24heures, après je observe la présence ou absence la croissance bactérienne.

Ensuit prendre la CMI d'aspirine qui inhibe la croissance de bactéries et va culture d'une la plaque.

La préparation de solution d'aspirine :

On prendre une quantité de 250mg de poudre d'aspirine mette la poudre d'une tube essai contient une 10ml d'eau physiologie stérile et homogenèse la solution

250g	10ml	250mg	20ml
12,5g	1ml	12,5	1ml

On va diluée la solution prépare pour la deuxième concentration ci prépare un 250mg de aspirine par un 20ml d'eau physiologie

Préparation d'inoculum :

Prendre une ou deux colonie bien isolée à culture pure de 24heures par une pipette pasteur stérile boutonnée à etensemencer d'un 10ml de bouillon nutritive qu'on incube à 37°C durant 18h-24heures.

Après utilise l'inoculum d'une le test.

Méthode de culture de test :

On utilise la première concentration 250mg aspirine / 10ml eau physiologique

Prendre une 8 tube essai et un inoculum préparé de 4 souche.

1ère volume : le volume total est 5ml, 250mg/10ml

1) d'un 4 tube mettez un 1 ml d'inoculum + 1ml solution d'aspirine + 3ml de bouillon nutritif (BN) pour chaque souche.

2) D'une d'autre 4 tube mettez un 500µl de aspirine + 1ml inoculum + 3,5ml de BN.

250mg	25mg	5mg/ml
10ml	1ml	500µl

On prépare un inoculum contient un 4ml de BN+ 1ml de inoculum préparé ci la suite

2ème volume : le volume total est 10ml (la solution diluée) 250mg/20ml

250mg	12,5g
20ml	1ml

1) Mettez d'un tube le volume suivant : 8ml bouillon nutritif + 1ml d'inoculum + 1ml d'aspirine

2) Ci-lui même étape mais change le volume : 8,5ml BN + 500µl aspirine + 1ml inoculum.

3) 7,4ml de BN + 1,6 aspirine + 1ml inoculum. 12,5mg → 1ml

20mg → 1,6ml

4) 7,8ml de BN + 1,2 aspirine + 1ml inoculum

12,5mg	15mg
1ml	1,2ml

1,92ml aspirine + 1ml inoculum + 7,08 ml BN

12,5mg	24mg
1ml	1,92ml

5) 1,84ml aspirine + 8,16ml BN + 1ml inoculum (23mg/1,84)

6) 1,76ml aspirine+8,24 ml BN + 1ml inoculum (22mg/1,76ml)



Figure16: la préparation d'inoculum et le teste

- 7) Ont préparé un inoculum contient un 9ml de BN+ 1ml de inoculum préparé ci la timon
- Afin de préparation de tub à incube a 37°C pendant 24heures. Après 24heures observe la présence ou absence la croissance de bactérie, et observe la concentration minimal inhibitrice du développement de bactérie et culture d'un la plaque pour étude l'inhibition de la formation de bio film.

Pour l'inhibition de formation de bio film d'une la culture de microplaque on va teste la concentration suivant :

- 1,25mg/ml aspirine : prendre une 30µl aspirine+ 120µl de BN+150µl inoculum et mette d'un puits
- 0,625mg/ml : prendre 15µl aspirine+ 135µl de BN+150µl inoculum et mette d'un puits
- 0,3125mg/ml : 7,5µl aspirine+ 142,5µl de BN+150µl inoculum et mette d'un puits
- Ensuite incube la culture de plaque à 37heures pendant 24heures. Après l'incubation vider le puits et lave3foie par un 150µl d'eau physiologie stérile et ajoute un 150µl de cristal viole durant a 15min après lave 3foie par 150µl d'eau distille, et observe la fixation de couleur ou non.

I.6.2.2 l'effet l'huile essentielle d'*Artemisia judaïca* :

Prendre un extrait d'artemisia à Tamanrasset et inoculum (pré-culture) (5mlBN+ une ou deux colonie bien isolée) à culture de 24heures. Pour l'inhibition de formation de bio film on va tester la concentration suivant dan une la culture de microplaque à 96puits :

Tableau6 : la concentration utilisée dans le test de l'inhibition de formation de biofilm par la culture de plaque

C d'huile	C1 : 0,4 5μl	C2 : 0, 225μl	C3 : 0,1 125μl	C4 : 0,0 562μl	C5 : 0, 02812μl	C6 : 0,0 140μl	C7 : 0,0 07μl	t imon
C Inoculum	15 0μl	1 50μl	15 0μl	15 0μl	1 50μl	15 0μl	15 0μl	1 50μl
C .BN	14 9,55μl	1 49,75μl	14 9,88μl	14 9,94μl	1 49,97μl	14 9,98μl	14 9,99μl	

Après le ensemencement d'une la culture de plaque va incube d'une étuve à 37°C pendant 24heure après l'incubation sont culture le inoculum d'une le milieu de Plate count agar (PCA) par la méthode de raton et incube durant 24h à 37°C.Pour conforme a ce que extrait d'artemisia présent en effet sur le formation de bio film ou sur la croissance de bactérie ou mortalité le cellule.



Figure 17 :la culture d'une le milieu de PCA.

résultats et interprétations

II.4 l'isolement et identification de 9 souche de *Pseudomonas aeruginosa* :

II. 4.1 Le caractère culturel :

II. 4.1.1 Morphologie (aspect de colonie) :



Figure18 : l'aspect de colonie de *Pseudomonas aeruginosa* dans une boîte de Pétri. (musques, large, Small) .

II. 4.1.2. la Coloration de gramme :

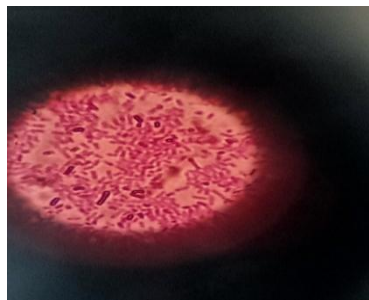


Figure19: Les bacilles Gram négatif de *Pseudomonas aeruginosa* à objectif 100X

II.4.2 Le Caractère biochimique :

II.4.2.1 recherche d'oxydase :

La zone réactionnelle sur le disque d'oxydase est colorée en bleu ou bleu-violet, ce qui suggère la présence du cytochrome oxydase.



Figure20 : résultat positif d'oxydase chez le *Pseudomonase aeruginosa*

II.4.2.2 recherche de mannitol mobilité :

Tableau 7: le résultat de mannitol mobilité chez le *Pseudomonas aeruginosa*

	1 P	2 P	3 P	4 P	5 P	6 P	7 P	8 P	9 P
Ma nnitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mo bilité	+	+	+	+	+	+	+	+	+



Figure21 : résultat de mannitol mobilité (mannitol-, mobilité+) chez le *Pseudomonas aeruginosa*.

II.4 .2.3.les galeries API20E :

-après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture.

- le test nécessitant l'addition de réactif :

-test TDA : ajouter 1goutte de réactifTDA . Une couleur **marron-rougeâtre** indique une réaction positif à noter sur la fiche de résultats.

-test IND : ajouter un goutte de réactif de JAMES.une couleur **rose** diffusion dans toute la cupule indique c'est de réaction positive, noter sur le fichier de résultat

-test VP : ajouter un goutte de réactif de VP1 et VP2.attendre une 10minutes.une couleur **rouge ou rose** c'est des réactions positive et noter d'une la fiche de résultat. Faible coloration rose après 10minutes c'est réaction négative.

Chapitre II Résultat et interprétation

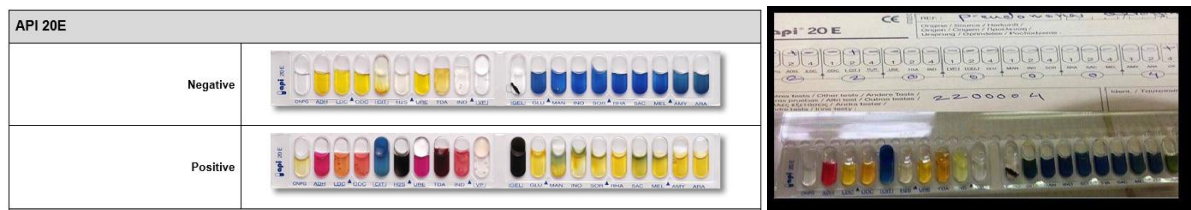


Figure22 : le résultat de galerieAPI20E chez le *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau8 : la lecture de galerie d'API 20E chez Le*Pseudomonas aeruginosa*

Test /p	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : indique qu'il y'a un changement de couleur dans le milieu

- : indique qu'il n'y'a aucun changement de couleur

II.4.2.4 antibiogramme :

La lecture de l'antibiogramme consiste à déduire à partir de la mesure de ces diamètres, le caractère sensible, résistant ou intermédiaire. Les résultats de l'antibiogramme réalisés sont résumés dans le tableau.

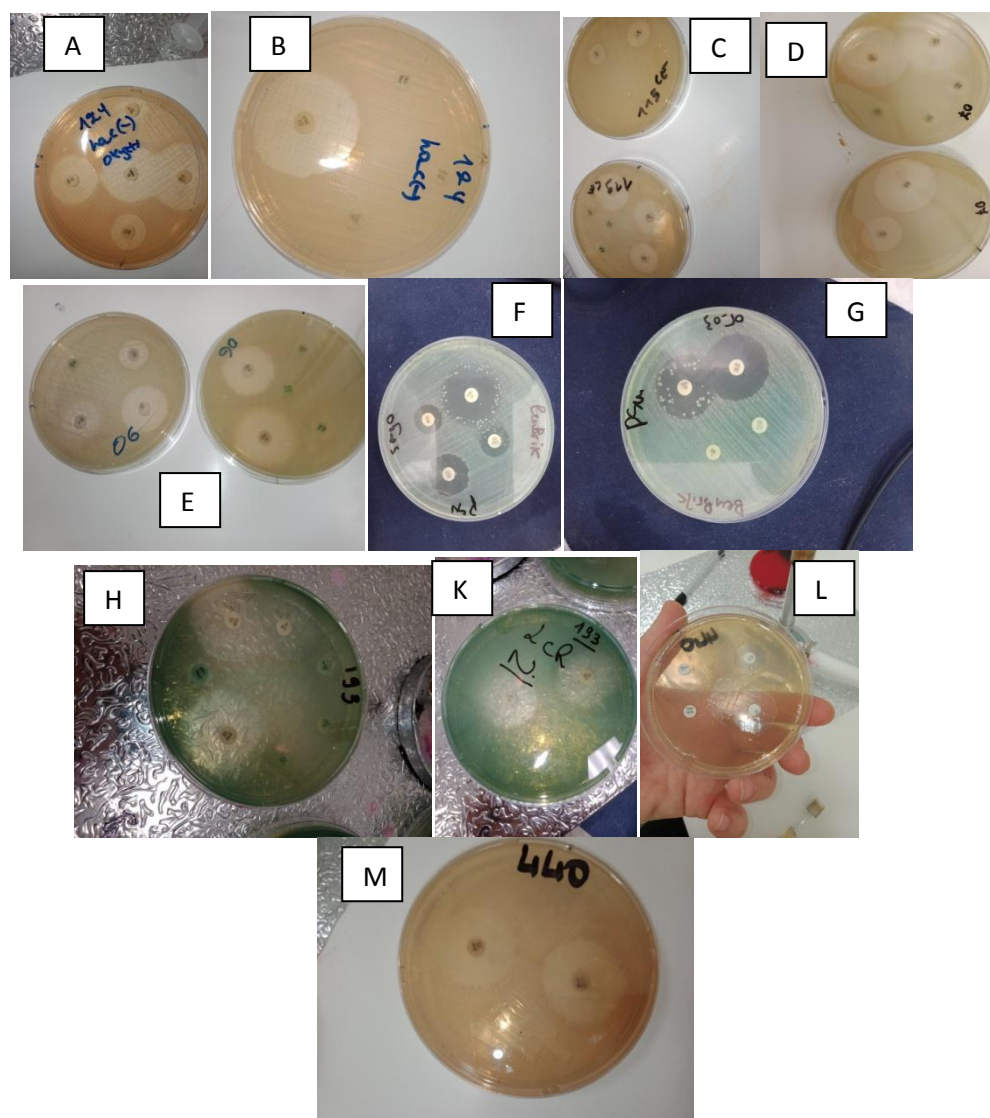


Figure 23: Les zones d'inhibition des antibiotiques testés.

A : OF , CL ,TOB,AK,GEN

B :IPM, PRL,CAZ,TCC

C :CL,GEN,CAZ,TCC,PRL,OF,AK

D : CL,GEN,CAZ,TCC,PRL,OF,AK

E : CL, GEN,CAZ,TCC,PRL,OF,AK,CN

F :GEN,CAZ,OX,CZ

G :CL,CAZ ,TOB,R5

H :TOB,CAZ,TCC,IPM,OF,LE,PRL

K : TOB,IPM

L :TCC,CL,AK ,LE

M :IPM,TOB

Tableau 9: la lecture pour la sensibilité / résistance aux antibiotique pour l souches de *Pseudomonas aeruginosa*

ATB/so uche	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TCC	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TOB	S	S		S	S	S	S	S	S
CL	S	S		S	S	S	S	S	S
GEN	S	S				S			
CN				R			R		
CZ						R			S
LE							S	S	S
AK	S	S		S	S	S	S		S
CAZ	R	R	S	R	R	S	R	R	R
IPM		S	S	S	S		S	S	S
OF	S	R		S		R		S	R
PRL	F	F		F	F		F	F	F

II.5. la détection de la formation de bio film de *P.aeruginosa* :

Dans cette étude, la détection de la formation de biofilm de *P. aeruginosa* est basée sur une seul techniques, couramment décrites dans ce contexte à savoir ; la coloration du biofilms formés au cristal violet(CV).

.II.5.1.la détection de formation de bio film par la technique de coloration de cristal viole par la culture de plaque :

Après 24heures d'incubation à 37 °C sur polystyrène vide les plaque et lave la culture 3foie par l'eau physiologie et ajouté le coloration de cristal viole pendant une 15min et laver 3foie, répète la expérience un 3foi pour conforme la résultat,Les résultats obtenus sont fixe la couleur de cristal viole d'une le puits pour quatre souches de *P. aeruginosa* isolées sur surface hydrophobe (polystyrène) mais pour d'autre souche il ne pas fixe la cristal viole d'une le puits après culture en bouillon nutritif (BN) (Figure27).

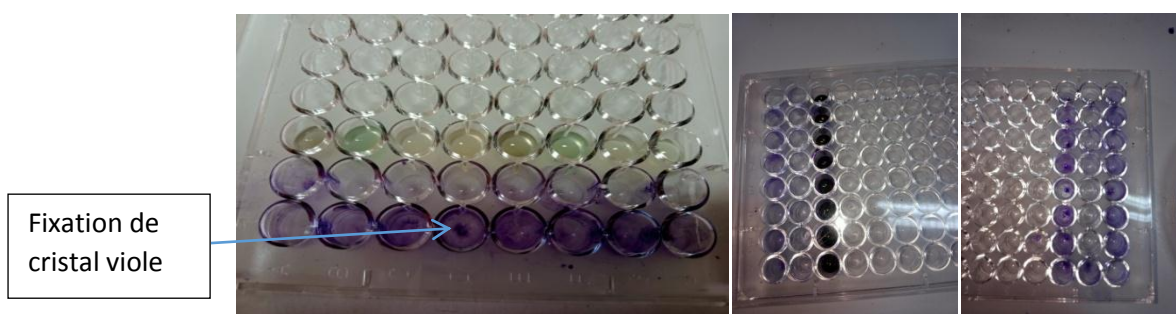


Figure24 le résultat de culture de plaque après 24h d'incubation chez les souches isolées.

Le tableau suivant donne la lecture de culture de microplaque.

Tableau10 : la lecture de culture de plaque chez le *P.aeruginosa*

Test/souche	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
T1	-	-	-	+	+	-	-	+	+
T2	-	-	-	+	+	-	-	+	+
T3	-	-	-	+	+	-	-	+	+

- : absence la viole d'une le puits

+ : présence la viole d'une le puits.

II.5.2.le effet de molécule sur la capacité de bactéries à forme un bio film :

Pour étudier l'inhibition de formation de bio film pour les quatre souches à forme bio film il va tester la molécule d'aspirine et l'extraire d'artémisia Tamanrasset par une différente concentration sur la souche à forme de bio film. Le but d'étude effet et recherche sur concentration minimal inhibiteur il va utiliser premièrement quatre concentrations pour l'aspirine (25mg, 20mg, 15mg, 12,5mg)

II.5.2.1 : l'effet d'aspirine sur la souche qui forme bio film :

Après l'incubation de 24 heures d'une culture de bouillon nutritif pour les quatre concentrations (25mg, 20mg, 15mg, 12,5mg) on obtient le résultat suivant :



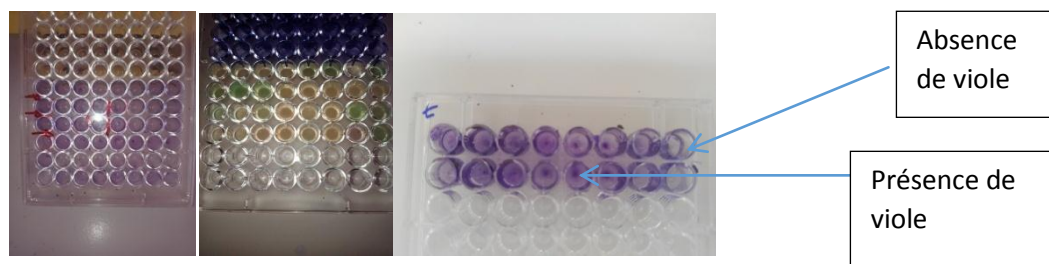
Figure25 : la résultat de l'incubation de 24h de culture de bouillon nutritif pour quatre concentrations chez la souche de *Pseudomonas aeruginosa* (C1, C2, C3, C4) La lecture de ces résultats obtenus se forme de tableau :

Tableau11 : la lecture de culture de bouillon nutritif après de 24 heures pour les différentes concentrations

C /souche	S1	S2	S3	S4
C1 :25mg	-	-	-	-
C2 : 20mg	+	+	+	+
C3 :15mg	+	+	+	+
C4 :12,5	++	++	++	++
Timon	+++++	+++++	+++++	+++++

+ : trouble de culture

- : claire de culture

**Figure26** : le résultat de culture de plaque d'une 4 souche aux cette concentration La lecture de culture de plaque d'un tableau suivant :**Tableau12** : la lecture de culture de plaque après 24heures chez les *Pseudomonas aeruginosa*

Souche/C	S1	S2	S3	S4
C1	-	-	-	-
C2	-	+	-	+
C3	-	++	-	++
C4	-	+++	-	+++
Timon	-	++++	-	+++++

+ : présence de couleur viole d'une le puits de plaque- : absence de couleur viole d'une le puits de plaque

II.5.2.2 : l'effet de l'extrie d'artemisiasia Tamanrasset :

Donc on va tests les extrie d'artemisiasia Tamanrasset sur les deux souche a forme de bio film qui inhibe pas par l'aspirine, tests avec une culture de plaque et après un culture d'une gélose de Plate count agar (PCA).après incubation de 24Hde culture de plaque et 48h de culture sur gélose PCA donnée la résultat suivant :

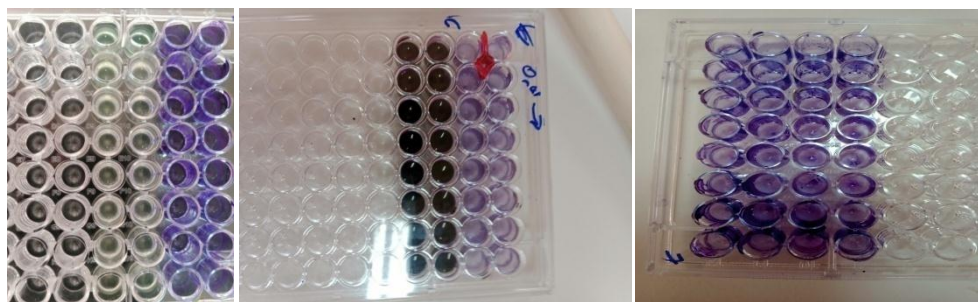


Figure27 : la résultat de culture de plaque chez les deux souches (S2,S4) pour les différent concentration de extrie d'artemisias après de 24h

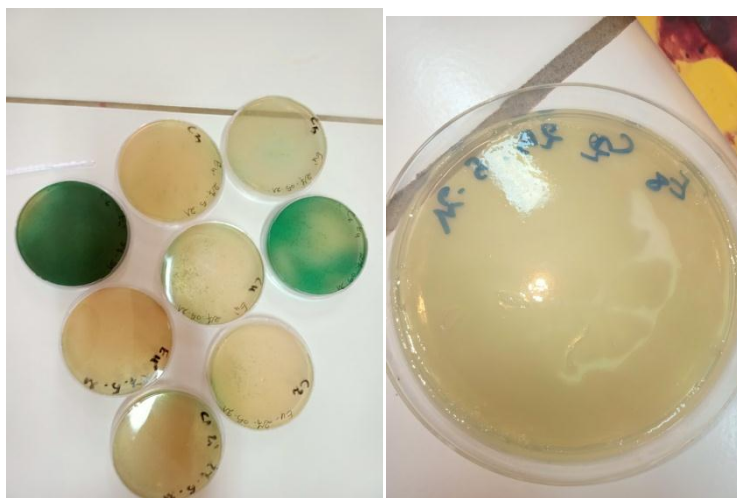


Figure28 : le résultat de culture d'une gélose PCA après 24heureschez les deux souchesde *P.aeruginosa* pour les 4 concentrations.La lecture de ces résultats obtenus se forme un tableau.

Tableau13 : la lecture de deux cultures d'une plaque et gélose PCA

Concentration/ culture	Formation de Bio film d'une culture de plaque		La culture de gélose PCA (croissance bactérienne)	
	S2	S4	S2	
Timon	++	-	+++	
C1	-	-	+	
C2	-	-	++	
C3	-	-	+++	
C4	+	-	+++	
C5	+	-	+++	
C6	+	-	+++	
C7	++	-	+++	

III. discussion

III. Discussion :

A partir des cultures des différents prélèvements, à plusieurs souches bactériennes d'aspects morphologiques différents ont été isolée. La souche change la couleur de milieu par couleur vert c'est-à-dire les souches elle produit un pigment vert, diffusant dans tous les boîtes pétri sur la surface de gélose. De plus, une odeur caractéristique de la fleur de « seringa » due à la production d'orthoamino-acétophénone, provient de ces cultures. La forme des colonies isolées sont de grande taille avec un aspect bombé au centre présentant le reflet métallique et au contour irrégulier (Eyquem Et Montagnier, 2000).

L'antibiogramme des souches isolées montre des diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe. Dans cette étude, les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une sensibilité élevée pour les TOB, CL, LE, AK, IPM, GEN par la plupart les antibiotiques testés, quelque souche parmi ces souches présentes un profil de résistance par les TCC, PRL, OF, CAZ à haut niveau correspond à la production de Céphalosporinase et Quilones urinaires. (Résistance à la céphalosporine de troisième génération et le fluor quinolones de la première génération).

La formation de biofilm par certaines souches isolées dans ce travail montre la présence de couleur de violet d'une le puits pour quatre souche de *Pseudomona aeruginosa*, cela indique former de biofilm sur la surface hydrophobe (polystyrène), c'est-à-dire les bactéries a la capacité à forme de bio film, cela signifie qu'il y a une communication entre la cellule par produite d'auto-inducteur (AHL), ce qui a conduit à la formation d'un bio film. Mais par d'autre souche c'est absence la couleur viole d'une la surface de puits c'est-à-dire les bactéries qu'ne pas forme un bio film c'est à dire communication entre la cellule bactérienne représente le pourcentage de formation de biofilm de *P. aeruginosa* sur polystyrène après 24 heures 48 heures et 72 heures d'incubation en bouillon nutritif par la culture de plaque. La trouble de culture montre la présence de croissance bactérienne

- claire de culture montre la absence de croissance bactérienne
- alors que pour la premier concentration l'aspirine elle inhibée la croissance bactérienne (inhibition total) par l'inhibition de la communication entre la cellule mais ça ne tue pas une cellule. Pour l'autre concentration (C1, C2, C3, C4) elle présence de croissance, cela signifie qu'il y a une communication entre la cellule de bactérie.

discussion III

-a la fine la concentration de 1,25mg/ml d'aspirine « 250mg » n'a pas inhiber la croissance des 4souche testées, par contre la concentration de 2,5mg/ml « d'aspirine 259mg » à inhiber la croissance de 4souche tester, c'est-à-dire la concentration minimal d'inhibition (CMI) 2,5mg/ml et 1,25mg/ml

2,5mg/ml > CMI > 1,25mg/ml

-après en ensemencement la concentration précédent sur la culture de plaque a durant 24h, ceci afin de sa confirme que l'aspirine a affecté à la capacité des bactéries à forme une bio film ou non, on observe le résultat d'une figure 30 et la lecture de tableau 11

Après la culture de 24h on observe pour les S2et S4, une plus concentration d'aspirine d'une la culture faible, plus forme un bio film , alors que l'aspirine il ne pas inhibe la formation de bio film c'est-à-dire présence une croissance bactérienne indique survenu d'une communication entre la cellule, ce qui signifie que l'aspirine il ne pas inhibe la système de quorum sensing et ne pas inhibe la production d'auto-inducteur(AHL) et la système de Las r et active le RHL.par rapport les d'autre deux souche c'est absence une couleur viole d'une le puits pour les quatre concentration cela indique que le bio film ne se forme pas et que la communication entre la cellule ne se produit pas, alors que l'aspirine il inhibe la signaux de quorum sensing(QS) par les inhibition de la système Las I/R.

-alors que l'inhibition du QS est une méthode potentielle pour contrôle l'infection microbiennes. L'influence de divers composés naturels et synthétiques sur QS chez les *P.aeruginosa* à été étudié. *Pseudomonas aeruginosa* QS est composé de circuits las, rhl et pqs sous command du système las I/R.par conséquent, l'inhibition de las R sera accompagnée d'une perte de signaux QS en aval. À la concentration en dessous de la CM, l'aspirine a montré une inhibition significative des deux signaux de détection de quorum :3-OH-C12-HSL et C4-HSL. Cependant, la croissance et la viabilité de *P.aeruginosa* POA1 n'ont pas été réduites, prouvant que l'effet de l'aspirine a été obtenu grâce à l'inhibition du QS pas en tuant des cellules. En fin, nous constatons que l'inhibition de QS conduit à l'inhibition de formation de bio film car la production de bio film concerne l'activation de système de régulation (las et rhl) de QS.

Donc pour la souche 4 on va élimine par ce queles bactéries perte la capacité pour forme bio film dans tout les concentrations et les pré-cultures, par rapport les souches 2,pour la C1,C2,C3 il ne pas forme de bio film mais présence une croissance bactérienne de la culture de milieu c'est-à-dire l'effet de l'huile d'abtsinthe sur la système de quorum sensnig alors que inhibe les activation de système de las I/R par inhibe la fixation des auto-inducteur AHL sur la régulateur de rhl, ce qui ne conduit pas formation de bio film, et pour d'autre

discussion III

concentration C4,C5 ,C6,C7 il ne pas inhibe les formation de bio film avec une présence une croissance bactérienne et une pigmentation. Alors que les bactéries il produisant un pigment de Pyocyonine cette le pigment on va change la couleur de milieu ver le jaune-vert.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

P.aeruginosa a fait l'objet d'étude assez la sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques et la capacité de bactéries pour former bio film avec une bute d'étude l'effet des molécules d'aspirine et l'extrait de l'artémisia Tamanrasset sur la capacité de souche à former biofilm.

Dans cette étude les souches ont été isolées à partir d'un échantillon clinique : à partir de pus (S1,S2,S3), des crachats(S4,S5,S8), des urines(S6,S7), LCR(S9).l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* a été effectuée selon la méthode conventionnelle ses souches ont fait l'objet d'étude de leur profil de résistance aux antibiotiques ainsi que leur capacité à produire de bio film et l'inhibition de bio film par in vitro, selon la technique de culture de microplaque par la méthode de coloration de cristal violet avec le milieu de culture BN.

L'étude de l'anti bio résistance a montré que les souches 2, 4, 7,9 ont la plus résistance par rapporte la souche 1, 3, 4, 5, 6,8 c'est plus sensible aux antibiotiques.

Pour l'autre partie d'étude la capacité de souche à former de bio film, les résultats obtenus, à l'issue de la méthode de cristal violet par la technique de culture de plaque, qui ont montré les souches 4, 5, 8,9 sur les toutes souches isolées on va former un bio film à la culture de 24 heures de microplaque après la coloration de cristal violet fixée d'une le puits par rapporte les d'autres souches ne pas former bio film on va éliminer, les souches on va former les bio film sur le milieu de BN. Alors que pour l'étude d'effet d'aspirine et l'extrait d'artémisia Tamanrasset sur la capacité de bactérie pour former un bio film, pour le résultat de test d'aspirine obtenu on va inhiber la formation de bio film pour la souche S5 et S8 pour toute concentration par contre la souche S4 et S9 on va produire bio film pour la concentration différente, on a proposé de tester d'extraits d'artémisia on montre l'inhibition de formation de bio film pour la souche9 pour les toutes concentrations d'une la culture de puits mais présence une croissance bactérienne sur la gélose de PCA, par contre les souches 4il ne pas inhiber la production de bio film par l'extraits d'artémisia pour les concentrations 4,5,6,7 avec une présence de croissance bactérienne et production de pigment et formation de bio film sur la gélose de PCA.

Les souches 4sont des souches isolées à partir de prélèvement de crache c'est le profil atypique.

Références bibliographiques

Références bibliographiques:

A

Auger M. (2012). Formation de biofilm in vitro par des souches cliniques d'*Escherichia coli* : impact de la modification des conditions expérimentales. Thèse de doctorat. Université de Nantes, France

.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.

Adamo R., Sokel S., Soong G., Gomez MI. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialo GM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. Am J Respir Cell Mol Biol; 30 : 627-34.

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.

.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

Ben Haj Khalifa A., Moissenet D., Vu Thien H., Khedher M. (2011). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. Ann Biol Clin; 69(4) : 393-403.

Benabid D. 2009. Rôle de l'élastase du neutrophile dans les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*. Université de Reim Champagne-Ardenne. Thèse de doctorat en Immunologie. P161.

Bossis E., Lemanceau P., Latour X., Gardan L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agronomie .20: 51-63

Bardy SL., Jarrel KF. 2003. Prokaryotic motility structures. Microbiology; 149 : 295-304. bioMérieux SA API® 20 NE. 2003. Système d'identification non fastidieux, non entérique des Gram négatif.

Beare PA., For RJ., Martin LW., Lamont IL. 2003. Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa* : divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. Mol Microbiol ; 47 : 195-207.

Bell CE., Eisenberg D., Crysta .1996. Structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. Biochemistry; 35: 1137-49.

Bagge N., Ciofu O., Hentzer M. et al., 2002. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. Antimicrob Agents Chemother; 46: 3406-11.

Bert F., Branger C., Lambert-Zechovsky N. 2002. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother. 50: 11-8.

Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007). Quelque système microbien : Les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, Dijon. p.131-164.

Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007). Quelque système microbien : Les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, Dijon. p.131-164.

Références bibliographiques

Bellifa S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen.

Belkhadir, F.R., Capdeville, B., Roques, H. ; 1988 ; Fundamental descriptive study and modelization of biological film growth. *Water Res.* 22(1): 59–69

Bellifa S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen.

Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007). Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon. p.131-164.

C

Chalvet de Rochemonteix A. (2009). Le bio film et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'alfort Paris

Chaker H. 2012 .Régulation de l'adaptation de la bacterie *Pseudomonas aeruginosa* a son Hôte : implication des metabolites du tryptophane.

Cryz SJ., Pitt TL., Furer E., Germanier R.1984.Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun ; 44 : 508-13*

Carpentier JP., Morillon M., Petrognant R., Cavallo JD.2003. Infections à bacille pyocyanique. *EMC 8-025-B-50, 23p.*

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

Clave D. 2011. Fiche technique bactériologie *Pseudomonas aeruginosa* centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique.

Chanawong A., M'Zali FH., Heritage J., Lulitanond A., Hawkey PM. 2001.extended-spectrum bêta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. *J Antimicrob Chemother*;48: 839-52.

Clave D. 2011. Fiche technique bactériologie *Pseudomonas aeruginosa* centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique.

Clave D. 2011. Fiche technique bactériologie *Pseudomonas aeruginosa* centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique.

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

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

Capdeville, B., Nguyen, K.M.; 1990; Kinetics and modeling of aerobic and anaerobic film. *Wat Sci Tech.* 22: 149-170

D

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

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

D'Argenio DA., Gallagher LA., BERG CA., Manoil C., Drosophila .2001.as a model Host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol*; 183 : 1466-71.

Delarras C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Tec & Doc Lavoisier. 476 pages

- Delarras, 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.
- Dasgupta T., Kievit TR., Masoud H., Altman E., Richards JC., Sadovskaya I. 1994.** Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from Serotypes O3, O5, and O6. *Infect Immun* 1994 ; 62 : 809-17.
- D'Argenio DA., Gallagher LA., BERG CA., Manoil C., Drosophila .2001** .as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol*; 183 : 1466-71.
- .Davey ME., Caizza NC., O'toole GA. 2003.** Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* ; 185 : 1027-36
- Dubois. (2013).** *Pseudomonas aeruginosa* : réservoir, virulence et résistance. Laboratoire de Microbiologie, UMR CNRS 5234 « Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité ».
- Dubois V., Arpin C., Noury P., Quentin C. 2002.** Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a bla (TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother*; 46: 3624-6.
- Donlan R.M. (2002).** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*; 8, 9: 881– 890.

E

- Essouh C .Y. (2013).** Étude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique. Thèse de doctorat. Université PARIS-SUD XI. Paris, France.
- Elyajouri A. (2012).** Actualités des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- Souissi faculté de médecine et de pharmacie – Rabat.

F

- Flandrois J-P. 1997.** Bactériologie médicale. Presse universitaire de Lyon, Lyon. P207.
- Feldman M., Bryan R., Rajan S., Scheffler L., Brunnert S., Tang H. 1998.** Role of Flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* ; 66 : 43-51.
- Faures .2009.** Transfert d'un gène de résistance aux bêta-lactamine bla CTX-M-9 entre *Salmonella* et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. Université de RENNES : thèse de doctorat. P190.
- Flemming, H.C., Wingender, .J; 2001;** Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs). Part I: Structural and ecological aspects. *Water Sci Technol.* **43**: 1–8
- Fuqua C. & Greenberg, E.P.; 2002;** Listening in on bacteria: acylhomoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell. Biol.* **3**: 685-695

G

- Guerey B., E Kipnis ., G Beraud., K Faure. 2009** Pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* aspects thérapeutiques. MAPAR. P206-215.
- Guzzo J., Pages JM., DUONG F., Lazdunski A., Murgier M. 1991.** *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease : evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol* ; 173 : 5290-7.
- Galloway DR. 1991.** *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited : recent developments. *Mol Microbiol* ; 5 : 2315-21.

Gambello, M.J. et Iglewski, B.H.; 1991; Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol.*173(9): 3000-3009

I

Imamura, Y., Yanagihara, K., Tomono, K., Ohno, H., Higashiyama, Y., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mizuta, Y., Kadota, J., Tsukamoto, K., Kohno, S.; 2005; Role of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems in a mouse model of chronic respiratory infection. *J Med Microbiol.*54(6): 515-518

H

Hahn HP. 1997.The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*.

Gene; 192 : 99-108.

Hobbs M., Collie ES., Free PD., Livingston SP., Mattick JS.1993.pilS and pilR, two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*; 7 : 669-82.

Haras D. (2005) .Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. Matériaux & Techniques 93, 27–41 Hors-Série.

K

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

Kohler T., Curty LK., Barja F., Van delden C., Pechere JC. 2000.Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol*;
182 : 5990-6

Kukavica-Ibrulj I. (2007). Chapitre 1. Introduction. Collection mémoires et thèses électroniques .Université Laval. Québec, Canada

KOHLER T., CURTY LK., BARJA F., VAN DELDEN C., PECHERE JC. 2000.Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol*;
182 : 5990-6.

KIPNIS E., GUERY BP., TOURNOYS A., LEROYT X., ROBRIQUE L., FIALDES P.2004. Massive

alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa* induced acute lung injury. *Shock* ;
21 : 444-51.

KIPNIS E., GUERY BP., TOURNOYS A., LEROYT X., ROBRIQUE L., FIALDES P.2004. Massive

alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa* induced acute lung injury. *Shock* ;
21 : 444-51.

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

Klein G. (2011). Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale, Bretagne.

Kukavica-Ibrulj I. (2007). Chapitre 1. Introduction. Collection mémoires et thèses électroniques Université Laval. Québec, Canada.

L

LESNE R R.2002. pression thermique climat pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* En dehors

de la mucoviscidose

LAM MY., MCGROARTY EJ., KROPINSKI AM., MACDONALD LA., PEDERSON SS.,

HOIBY N.1989.Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of

Pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol 1989 ; 27 : 962-7

LAU GW., HASSETT DJ., RAN H., KONG F.2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends Mol Med 2004 ; 10 : 599-606.

LEDGHAM F., VENTRE I., SOSCIA C., FOGLINO M., STURGIS JN., LAZDUNSKI A.2003.Interactions of the quorum sensing regulator QscR : interaction with it self and the other regulators of

Pseudomonas aeruginosa LasR and RhlR. Mol Microbiol; 48 : 199-210.

LIVERMORE D M. 1995.bêta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev;8: 557-84.

Liesse Iyamba J-M. (2012).Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France

M

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

Madigan M. Et Martinko J. (2007).diversité des procaryotes : les bacteria. Dans : biologie des micro-organismes. Pearson 11^{ème}édition .Paris, France.P.333 – 411.

Mezaache S. (2012).Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la Rhizosphère de la pomme de terre. Université Ferhat Abbas, Sétif.

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.

Madigan M., J Martinko O.2007.Biologie des micro-organismes, PEARSON, FRANCE, P279.

Mesaros N., Nordmann P., Plesiat P.2007.*Pseudomonas aeruginosa*:resistance and therapeutic

options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect 2007 ;13(6):560-78.

Mesaros N., P Nordmann., P Plesiat ., M Roussel-Delvallez., J Van Eldere., Y Glupczynski., Y Van Laethem., F Jacobs., P Lebecque ., A Malfroot ., P M Tulkens., F Van Bambeke.2007. *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutique à l'aube du deuxième millénaire. ANTIBIOTIQUES. P.189-198

Mesaros N., P Nordmann., P Plesiat ., M Roussel-Delvallez., J Van Eldere., Y Glupczynski., Y Van Laethem., F Jacobs., P Lebecque ., A Malfroot ., P M Tulkens., F Van Bambeke.2007*Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutique à l'aube du deuxième millénaire. ANTIBIOTIQUES. P.189-198.

Marchandin H., Jean-Pierre H., DE CC., et al., 2000.Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum bêta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*.Antimicrob Agents Chemother;44: 213-6.

Muller A.et Guaguere E. (2014).L'Antibiothérapie n'est pas la seule source d'antibiorésistance : notion de biofilm. Conflits AFVAC. Médecine interne / maladies infectieuses. Paris - la Défense.

Références bibliographiques

Marchal M. (2010). Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg, France

N

.NIKAIDO D., S HARAYAMA.1991. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. The journal of biological chemistry P770-779.

O

O'TOOLE GA., KOLTER R.1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways : a genetic analysis. *Mol Microbiol*; 28 : 449-61

Ochsner, U.A. et Reiser, J.; 1995; Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(14) : 6424-6428

P

PLESIAT P. 2011. GDR pseudomonas centre national de la recherche scientifique

PAGES J M.2004. Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. Médecine/Sciences P.51-346.

PARK PW., BIEDERMANN K., MECHAM L., BIESSETT DL., MECHAM RP. 1996. Lysozyme binds to elastin and protects elastin from elastase-mediated degradation. *J Invest Dermatol*; 106 : 1075-80.

POOLE K.2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Jan; 10(1):126.

POIREL L., et al. 1999. Extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. *J Antimicrob Chemother* ;43: 157-8.

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.

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.

Pearson, J.P., Van Delden, C., Iglewski, B.H.; 1999; Active efflux and diffusion are involved in transports of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol*. 181(4): 1203-1210

Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P.; 1994; Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91(1):197-201

Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P.; 1994; Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91(1):197-201

Pesci, E.C. et Iglewski, B.H.; 1997; The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. *Trends Microbiol*. 2: 132-134

R

Références bibliographiques

ROCHETTA HL., BURROWS LL., LAM JS.1999. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Mol Biol Rev; 63 : 523-53.

RUIMY R., A ANDREMONT.2004. Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* mécanisme moléculaire, impact clinique et inhibition .Réanimation .P176-184.

RATLEDGE C., DOOVER LG.2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. Ann Rev Microbiol ; 54 : 881-941.

READ RC., ROBERTS P., MUNRO N., RUTMAN A., HASTIE A., SHRYOCK T.1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. J Appl Physiol; 72 : 2271-7.

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

.Ruimy, R. et Andremont, A.; 2004; Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. *J Reaurg.* **13**: 176-184
S

SOULEY LIE MOUSTAPHA F S. 2002. Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du point G .Université de BAMAKO Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. P95

SCHWEIZER HP.2003. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria : unanswered questions. Genet Mol Res 2003 ;2:48-62.

Samrakandi, M.M, Roques, C., Michel, G.;1997; Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Can J Microbiol.* **43(8)**: 751 – 758

Smith, R.S. et Iglewski, B.H.; 2003; *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. Curr Opin Microbiol. **6(1)**: 56-60

Seed, P.C., Passador, L., Iglewski, B.H.; 1995; Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol.* **177(3)** : 654-659
T

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.

THOMSON J M., R BONOMO.2005. The thread of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria. β -lactamin peril .Current Opin in Microbiology **8** :518-524.
V

VAN BAMBEKE F., PAGES JM., LEE VJ.2010. Inhibitors of bacterial efflux pumps as

Références bibliographiques

adjuvants in antibacterial therapy and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Frontiers in Anti Infective*

Drug Discovery 2010;1:138–175.

W

WEISS C .2002.La résistance bactérienne : nouvelle guerre froide. *Le médecin du Québec* 37, (3) :41-4

ANNEX

ANNEX

Annexes 1 : Préparation de solutions et milieu de culture

Milieu de culture :

Le milieu gélose nutritive : c'est un milieu non sélectif ordinaire permettant la culture de bactéries non exigeantes comme les *Pseudomonas aeruginosa*.

Formule de milieu :

- | | |
|--------------------------|-----------------------|
| -Extrait de viande 1,0g | - Peptone 5,0g |
| -Extrait de levure 3,0g | - Agar 15,0g |
| -Chlorure de sodium 5,0g | -Eau distillée qsp 1L |
| -PH : 7,4 | |

Stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 20 minutes

Milieu de gélose héктоene :

C'est un milieu non sélectif qui permet l'isolement des bactéries à gram négative.

Formule de milieu :

- | | |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| -Peptone 12,0g | -Chlorure de sodium 5,00g |
| -Extrait de levure 3,0g | -sels biliaires 9,00g |
| -lactose 12,00g | -salicine 2,00g |
| -saccharose 12,00g | -Thiosulfate ferrique 5,00g |
| -Citrate ferrique ammoniacal 1,5g | - Bleu debromothymol 0,065g |
| -Fuchsine acide 0,10g | -Agar 14,9 g |
| -Eau distillée qsp 1L | -PH 5,7g |

Milieu Mueller Hinton

- | | |
|------------------------------------|-------------|
| -Infusion de viande de bœuf 300,0g | -Agar 17,0g |
| -Hydrolysate de caséine 17,5g | -Amido 1,5g |
| -Eau distillée qsp 1L | -PH 7,0 |

Stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 20 minutes

Milieu de conservation : ce sont des milieux semi-solides

ANNEX

- Extrait de viande 1,5g
- Na Cl 1,5g
- Agar Agar 5g
- Peptone protéase 5g
- Di sodium phosphate 0,4g
- Eau distillée 500ml

Stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 20 minutes

Milieu plate count agar :

- Peptone de caséine 5,00 g
- Glucose 1,00g
- Eau distillée 1L
- Extrait de levure 2,50g
- Agar 15,00g
- PH 7,2

Stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 20 minutes

Milieu de mannitol de mobilité :

- Peptone de caséine 2g
- Nitrate de potassium 0,25g
- Agar 0,87g
- PH 7,8
- Mannitol 1,87g
- Rouge de phénol 0,01g
- Eau distillé 250ml

Stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 20 minutes

La préparation de solution :

Solution de cristal viole :

- Cristal viole 0,1g
- Eau distillée 10ml

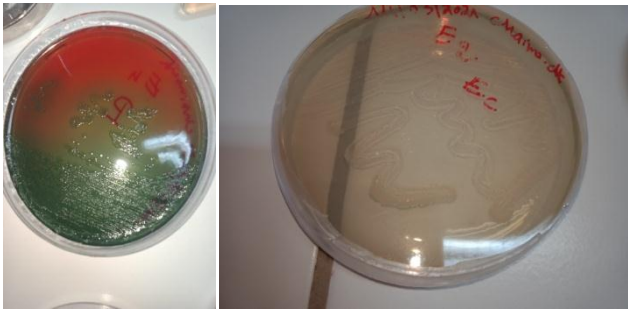
Stérilisation à l'autoclave : 120°C pendant 20 minutes

Solution d'aspirine :

- Eau physiologie 20ml
- Poudre d'aspirine 250mg

Annexes 2 : Résultats d'ensemencement de *Pseudomonas Aeruginosa*

ANNEX



Annexe 3 : Valeurs critiques des diamètres des zones d’inhibition pour *P. aeruginosa*

Antibiotiques testés	Charge desdisques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Ticarcilline + ac. Clavulanique	75 / 10 µg	≤ 15	16 -23	≥ 24
Céftazidime	30 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Imipenème	10 µg	≤ 15	16 - 18	≥ 19
Amikacine	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Tobramycine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 15	16 - 20	≥ 21
Lévofloxacine	5 µg	≤ 13	14 - 16	≥ 17
Colistine	10 µg	≤ 10		≥ 11

Annexe 4 :Detection de la formation de biofilm de *P.aeruginosa* après coloration au CV

