

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

*UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT*



FACULTE DES SCIENCES.  
DEPARTEMENT: De Biologie.  
DOMAINE: Science de la nature et de la vie.  
Filière: Sciences biologiques.

## *Mémoire*

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

Option: Microbiologie  
SPECIALITE: Microbiologie Appliquée

## *Thème*

**Etude de la sensibilité du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* aux acides acétique et lactique.**

*Présenté par:*

*BERROUBI Faïza.*

*BENMOUSSA Abdennour*

*Devant le jury composé de :*

*Président: GACEM Mohamed Amine (MCB)*

*Examineur: ZERROUKI Mohamed Hocine (MAA)*

*Rapporteur: KRANTAR Kamel (MAA)*

**Année universitaire 2021-2022**

# *Remerciements :*

*Premier merci à dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et*

*La valonté d'entamer et de Terminer ce Mémoire.*

*En seconde lieu, nous tenons à remercier notre chère Encadreur*

*" Mr. Krantar Kamel" pour ses précieux Conseilles sa confiance et*

*Son aide durant toute la Période du travail.*

*Nous tenons à remercier sincérement les membres du jury Mr.Gacem*

*Mohamed Amine et Mr. Zerrouki Mohamed Hocine qui qui nous fait*

*le grande honneur d'évaluer notre travail*

*A tous ceux qui m'ont aidé et encouragée de prés ou De loin pour tout*

*Le monde nous disons.*



# *Dédicaces*

*Nous dédions ce modeste travail :*

*À nos chères parents, nous n'oublions jamais vos sacrifices*

*Exprimés À notre égard, votre attention correctrice et*

*Votre dévouement pour Notre éducation.*

*A nos chères sœurs, nos chères frères A nos chères amies,*

*Pour tous les moments qui nous avons partagé.*

*A tous les membres de nos familles. Et A la mémoire des*

*Gents qui nous à quittés et que dieu le tout Puissant*

*L'accueille en son vaste paradis.*



## Résumé:

**Le titre: Etude de la sensibilité du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* aux acides acétique et lactique.**

Les biofilms, communautés structurées de micro-organismes fixées à une surface, semblent être l'élément clé de nombreuses infections. Le biofilm formé par *Pseudomonas 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. Les résultats chiffrés que la méthode au CV et la méthode RCA sont les plus utilisées.

L'objectif principal de notre étude la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* aux acides organiques. Les résultats montrent également que l'acide acétique est plus efficace que l'acide lactique sur les souches testées aussi bien à l'état libre qu'en biofilms (technique de cristal violet).

## ملخص

دراسة حساسية البيوفيلم من الزائفة الزنجارية لأحماض الاستيك و اللاكتيك.

الاعشبية الحيوية هي عبارة عن مجتمعات منظمة من الكائنات الدقيقة التي تلتصق بالسطح، فتتسبب في الكثير من الامراض الغشائية الحيوية الذي تشكله الزائفة الونجارية يتدخل خاصة في التليف الكيسي، و التهابات المسالك البولية و التهابات الجروح. توجد عدة طرق لدراسة الاعشبية الحيوية في المختبر منها طريقة CV و طريقة RCA الاكثر استعمالا.

الهدف الرئيسي من دراستنا هو تشكيل بيوفيلم في الزائفة الزنجارية مع الأحماض العضوية. أظهرت النتائج أيضًا أن حمض الأسيتيك أكثر فعالية من حمض اللاكتيك على السلالات المختبرة في كل من الحالة الحرة والأغشية الحيوية (تقنية الكريستال البنفسجي).

## Summary:

**Title: Study of the sensitivity of the biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* to acetic acids and lactic.**

Biofilms, structured communities of microorganisms attached to a surface, seem to be the key component of many infections. The biofilm formed by *P. aeruginosa* is particularly implicated in cystic fibrosis, urinary tract infections and wound infections. Several methods for studying biofilms in vitro exist. The method to CV and the RCA method are the most used.

The main objective of our study is the formation of biofilm in *P. aeruginosa* to organic acids. The results also show that acetic acid is more effective than lactic acid on the strains tested both in the free state and in biofilms (crystal violet technique).

# Sommaire

---

## Sommaire

<b>Résumé</b> .....	-
<b>ملخص</b> .....	-
<b>Summary</b> .....	-
<b>LISTE DES FIGURES:</b> .....	-
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	-
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	-
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>PartieI: Synthèse Bibliographique.</b> .....	<b>3</b>
1. Présentation de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . .....	<b>3</b>
1.1. Définition: .....	<b>3</b>
1.2. Taxonomie.....	4
1.3. Habitat .....	4
1.4. Caractères généraux de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : .....	<b>5</b>
1.4.1. Caractères morphologique: .....	<b>5</b>
1.4.2. Caractères culturels .....	5
1.4.3. Caractères biochimiques et antigéniques.....	6
1.4.4. Caractéristiques de métabolisme .....	6
1.6. Les facteurs de virulence .....	6
2. Antibiorésistance de <i>pseudomonas aeruginosa</i> . .....	<b>8</b>
2.1. Différents types de résistance bactérienne: .....	8
2.1.1. La résistance naturelle .....	8
2.1.2. La résistance acquise .....	8
2. Les différents mécanismes de résistance de <i>pseudomonas aeruginosa</i> aux Béta lactamine .....	9
2.1. Mécanisme enzymatique .....	9
2.2. Mécanismes non enzymatiques .....	10
3. La formation du bio film par la <i>pseudomonas</i> .....	<b>11</b>
<i>aeruginosa</i> et Quorum Sensing. ....	<b>11</b>
3.1. Description du biofilm bactérienne .....	11
3.1.1. Historique .....	11
3.1.2. Définition: .....	11
3.1.3. Formation de biofilm.....	11
3.2. Le Quorum Sensing.....	13

# Sommaire

---

## Partie II Experimental

<b>1. Matériel et méthodes.....</b>	<b>14</b>
1.1. Lieux de travail.....	14
1.2. Objectifs de l'étude .....	14
1.3. Matériel biologique .....	14
1.4. L'isolement et identification des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
1.4.1. L'isolement:.....	16
1.4.2. L'identification.....	16
1.5. Détection de la formation de biofilm par les souches isolées <i>P.aeruginosa</i> .....	19
1.5.1. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA):.....	19
1.5.2. Méthode de culture de plaque: .....	20
1.5.3. Coloration des biofilms au Cristal violet.....	20
1.6. Etude l'effet des acides organiques sur la formation de biofilms de bofilm par <i>p.aeruginosa</i> invitro .....	20
1.6.1. Détermination de l'activité antimicrobienne des acides lactique et acétique:.....	20
<b>2. Résultats et discussion. ....</b>	<b>23</b>
2.1. Isolement et identification de 2 souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
2.1.1. Le caractère cultural .....	23
2.1.2 .Le Caractère biochimique.....	23
2.2. Détection de la formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : .....	26
3.2.1. La méthode de culture sur rouge Congo agar (RCA).....	26
2.2. La formation des biofilm par la technique au Cristel violet: .....	28
2.3. L'effet des acides organiques sur la formation de biofilms de bofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : .....	30
<b>Conclusion.....</b>	<b>30</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>32</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>38</b>

### **LISTE DES FIGURES:**

**Figure N°1: Photo au microscop electronique de la bacterie *Pseudomonas aeruginosa* (Dubois, 2013).**

**Figure N°2: Les différents aspects de colonies de *Pseudomonas aeruginosa*. (Touati, 2013).**

**Figure N°3: Les différents mécanismes de la résistance bactérienne aux Antibiotique. (Faure et al., 2009).**

**Figure N°4: Représentation des différentes étapes de développement d'un biofilms (Haras, 2005).**

**Figure N°5: Le milieu du mannitol mobilité.**

**Figure N°6: Les bacilles Gram négatif de *Pseudomonas aeruginosa* à objectif 100X immersion.**

**Figure N°7: Résultat positif d'oxydase chez le *Pseudomonase aeruginosa*.**

**Figure N°8: Résultat de galerieAPI20E chez le *Pseudomonas aeruginosa*.**

**FigureN°9: Photo représentant le résultat du test du milieu RCA pour les souches P1,P2.**

**Figure N°10: Photo montrant l'effet des acide organiques sur la formation des biofilm dans les puits des microplaques.**

## Liste Des Tableaux

---

### **LISTE DES TABLEAUX:**

**TABLEAU N°1:** Taxonomie de *Pseudomonas aeruginos* (Binabid, 2009).

**TABLEAU N°2:** l'origine de souche.

**TABLEAU N°3:** Antibiotiques tester sur les souches *Pseudomonas aeruginosa*.

**TABLEAU N°4:** Préparation des solutions de l'acide acétique.

**TABLEAU N°5:** Préparation des solutions de l'acide lactique.

**TABLEAU N°6:** Le résultat de mannitol mobilité chez le *Pseudomonsa aeruginosa*.

**TABLEAU N°7:** la lecture de galerie d'API 20E chez Le *Peudomonas aeruginosa*.

**TABLEAU N°8:** la lecture pour la sensibilité / résistance aux antibiotique pour les  
souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

**TABLEAU N°9:** Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

**TABLEAU N°10:** Test de formation de biofilm par les souches P1 et P2 sur  
microplaque.

**TABLEAU N°11:** L'effet des acides organiques sur la formation de biofilms de bofilm  
par *Pseudomonas aeruginosa*.

## Liste des Abreviations

---

### **LISTE DES ABREVIATIONS:**

**ATB: Antibiotique.**

**API: Appareillage et procédé d'identification.**

**AHL: N-Acyl Homosérines Lactones.**

**QS: Quorum Sensing.**

**QQ: Quorum Quenching**

**GN: Gélose Nutritive.**

**BN: Bouillon Nutritif.**

**MH: Mueller Hinton.**

**G+C: Guanine +cytosine.**

**LPS: Lipopolysaccharidie.**

**MEB: Microscopie électronique à balayage.**

**C3G: Céphalosporine de 3ème generation.**

**VP: Voges-Proskauer.**

**TDA: Tryptophane désaminase.**

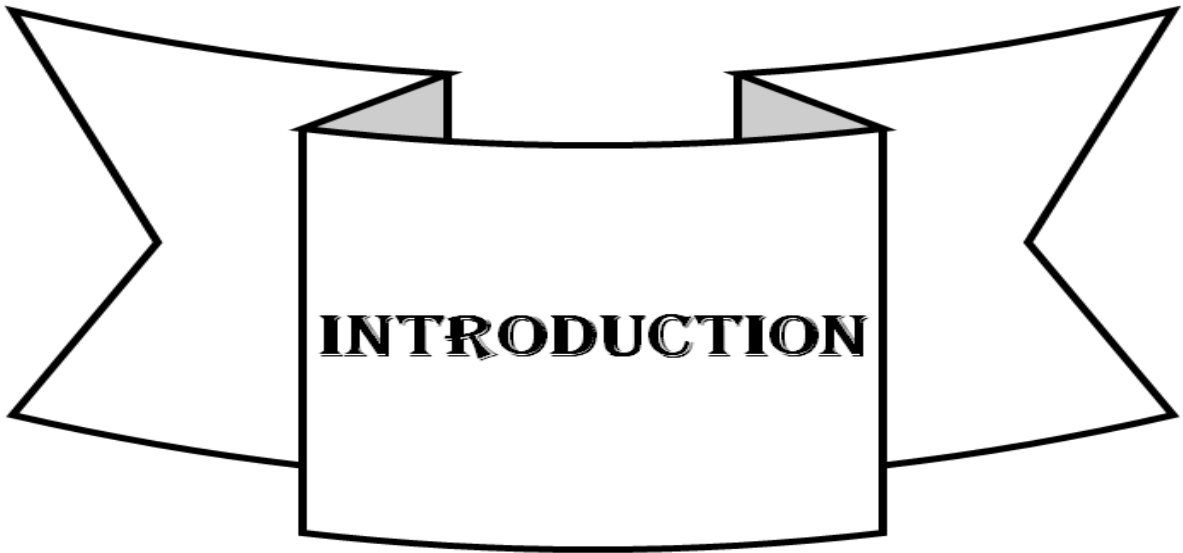
**IND: Indole.**

**CV: Cristal Violet.**

**RCA: Rouge Congo Agar (Red Congo Agar).**

**EDS: Eau distillé sterile.**

**AI: autoinducteur.**



# Introduction

---

## Introduction:

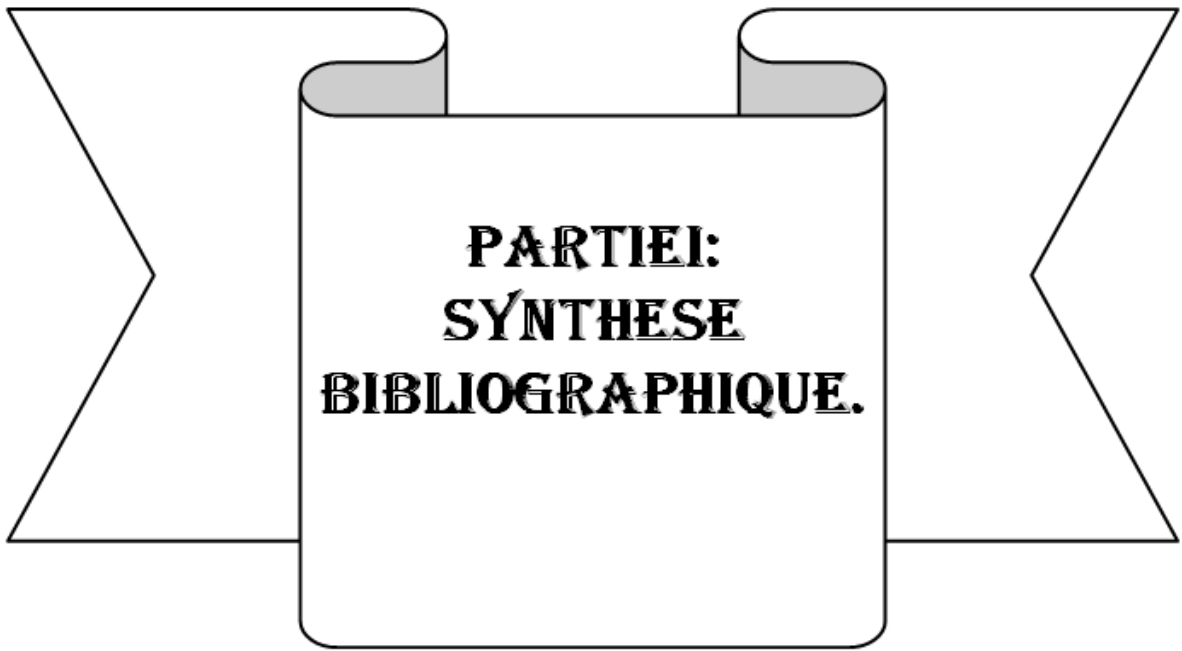
Actuellement, *Pseudomonas aeruginosa* occupe une place importante dans les établissements de santé (Alyajouri, 2012). Elle est responsable d'infections nosocomiales graves, d'infections potentiellement mortelles chez les personnes immunodéprimées et d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose (Ben Haj Khalifa et al.,2011).

*P. aeruginosa*, comme d'autres bactéries à Gram négatif, produit des agrégats structurés ou biofilms maintenus par une matrice protectrice (formation de biofilm) (khalilzadeh, 2009). De plus elle est associée à une incidence élevée de résistance aux antibiotiques. 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, 2008), de la résistance aux antibiotiques (Høiby et al., 2010) et d'autres fonctions pathogènes, notamment l'expression de facteurs de virulence (Schuster, Greenberg, 2006). Les inhibiteurs du quorum sensing (QSI) diminuent la pathogénèse de *P. aeruginosa* 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, Givskov, 2003).

Notre travail s'inscrit dans ce cadre et porté sur l'étude de la sensibilité de biofilm de *pseudomonas aeruginosa* aux acide organique ce présente en deux parties, une partie bibliographique qui porte sur des généralités concernant *Pseudomonas aeruginosa*, l'antibiorésistance, biofilms et le quorum sensing, ainsi qu'une partie expérimentale dont les objectifs:

- 1) Isoler et identifier *Pseudomonas aeruginosa*.
- 2) Détermination de l'antibiogramme des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolés
- 3) Etude la capacité de formation de biofilms.



Activer Window

### Partie I: Synthese Bibliographique.

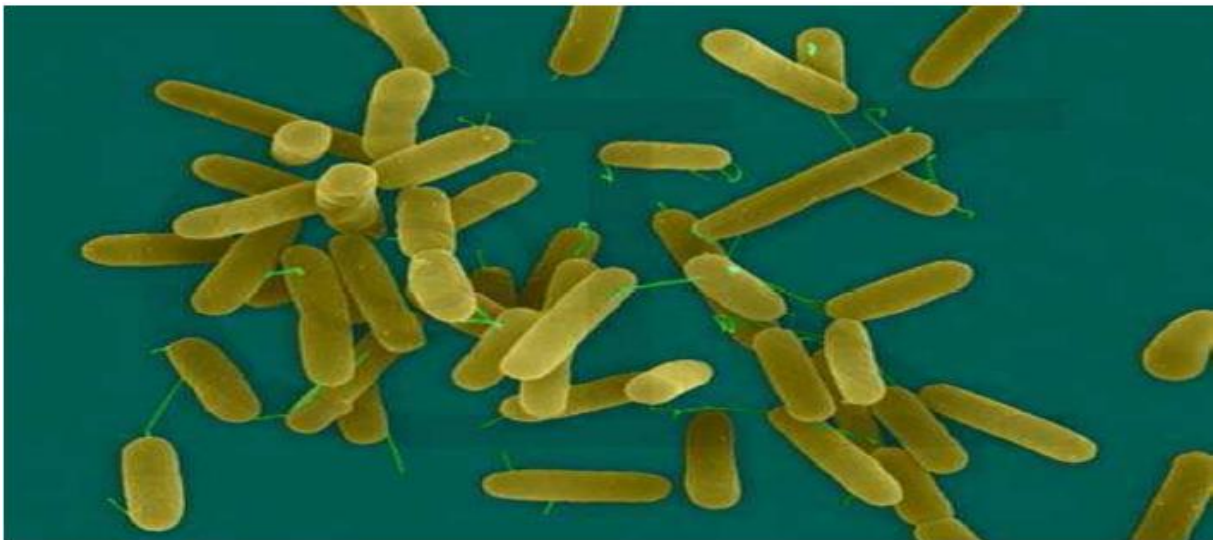
#### 1. Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*.

##### 1.1. Définition:

*Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique est une bactérie saprophyte de l'air, l'eau et du sol, commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, elle possède un pouvoir pathogène étendu, isolé pour la première fois en 1882 par Gessard (**BedouiH et al .,2006**)

*Pseudomonas aeruginosa* présente fréquemment dans le milieu hospitalier elle atteint essentiellement les sujets débilisés: cancéreux brûlés, insuffisant respiratoires (**Ben messaoud K, 2005**)

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**).



**Figure 1: Photo au microscop électronique de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Dubois, 2013).**

## Synthese bibliographique

---

### 1.2. Taxonomie:

Le bacille pyocyanique, du grec puon = pus et du grec kuanos = bleu foncé, est désigné sous le nom d'espèce *Pseudomonas aeruginosa* du latin *aeruginosus* = couvert de rouille (Chakerh, 2012). C'est l'espèce la plus connue et la plus répandue du genre *Pseudomonas*. La plus pathogène, elle constitue l'espèce-type du genre (Lessner, 2000).

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

la composition en G+C % de cet espace est égale à 67% (Aissa, 2012).

**Tableau 1 : Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa*. (Binabid, 2009)**

<b>Règne</b>	<b>Bacteria.</b>
<b>Division</b>	<i>Proteobacteria.</i>
<b>Classe</b>	<i>Gammaproteobacteria.</i>
<b>Ordre</b>	<i>Pseudomonadales.</i>
<b>Famille</b>	<i>Pseudomonadaceae.</i>
<b>Genre</b>	<i>Pseudomonas.</i>
<b>Espèce</b>	<i>aeruginosa.</i>

### 1.3. Habitat:

C'est une bactérie qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et de divers animaux. Le Bacille pyocyanique peut survivre et se multiplier dans une infinie variété de liquides et de milieux, sur des supports et des matériels surtout s'ils sont humides. Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales (Delarras, 2007).

### 1.4. Caractères généraux de *Pseudomonas aeruginosa*:

#### 1.4.1. Caractères morphologique:

Ce sont des bacilles fins à Gram- non capsulés, mobiles grâce à une ciliature mono triche avec 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1,5 à 3,0 de longueur. Au contraste de phase le déplacement des bacilles s'effectue plutôt en ligne droite. (Khalilzadeh, 2009 ; Touati, 2013)

#### 1.4.2. Caractères culturaux:

*P.aeruginosa* peut être isolée en culture sur milieu ordinaire ou sur milieu rendus sélectifs par addition d'inhibiteurs tel que le cétrimide grâce à sa grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique, elle n'a pas d'exigences nutritives particulières (Essoh, 2013).elle pousse facilement en 24 heures à 37°C. Elle peut croître entre 5 et 42°C avec un optimum de 30°C *P.aeruginosa* est une aérobie stricte mais capable d'utiliser les nitrates en condition anaérobies (Souley, 2002). La grande majorité des souches de *P. aeruginosa* synthétisent de la pyocyanine (bleu-vert), de la pyoverdine (jaune-verts) et plus rarement de la pyomélanine (brun-noire ou acajou) ou de la pyorubine (brun-rouge) (Khalilzadeh, 2009 ; Aissa, 2012 ; Saussereau, 2013). Elle est caractérisée par une odeur florale (Flandrios, 1997). Il existe trois types de colonies de *P. aeruginosa*:

- Les colonies larges: isolées, grandes, avec une partie centrale bombée et un contour irrégulier.
- 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).



Figure 2: les différents aspects de colonies de *Pseudomonas aeruginosa* (Touati, 2013).

## Synthese bibliographique

---

### 1.4.3. Caractères biochimiques et antigéniques:

L'aspect irisé des colonies et le pigment vert orienteront très vite le diagnostic. La confirmation pourra être apportée de façon minimum par:

- Le caractère mobile et gram- des bacilles.
- Le caractère aérobic strict.
- Une oxydase positive violente (sauf pour les colonies muqueuses).
- La pousse à 41°C.
- La résistance à la kanamycine.

Pour les souches atypiques quant à leurs caractères culturels, la réalisation d'une identification biochimique pourra être lancée à l'aide de galeries: les caractères principaux sont la production d'une arginine dihydrolase, gélatinase, nitrate réductase et l'assimilation de certains hydrates de carbone comme le glucose. (**leptospira, 2009**).

### 1.4.4. Caractéristiques de métabolisme:

Sont décrits importants les caractères métaboliques qui suivent:

- La réduction des nitrates allant souvent jusqu'au stade azote gazeux.
- La présence d'une oxydase.
- Le métabolisme oxydatif des sucres, appréciable en milieu MVAG ou de Hugh et Leifson (milieu très pauvre en peptone recouvertes ou non de vaseline), retenir essentiellement l'action sur le glucose et sur le D-arabinose.
- Le pouvoir protéolytique: liquéfaction de la gélatine en entonnoir puis coupe renversé.
- La présence d'une lécithinase, qui souvent ne peut être révélée qu'en milieu liquide: sur milieux gélosés les « réactions restreintes » (technique bactériologiques de la présente collection) sont fréquents (**Lilet et al., 1983**).

### 1.6. Les facteurs de virulence:

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste essentiellement responsable d'infections nosocomiales. L'opportunisme de ce germe est à l'origine des états pathologiques graves sur les terrains fragilisés: les infections cutanées secondaires à des brûlures, immunodéprimés, malades de réanimation, ventilation assistée invasive,

## Synthese bibliographique

---

dispositifs invasifs (sonde, cathéters périphériques et centraux) (**Chaibdraa et al., 2008 ; Fuentefria et al., 2011**).

Les facteurs de virulence sont Protéine située dans l'espace périphrastique et qui est libérée après la phase de croissance exponentielle. Elles sont responsables de la formation de pores dans les membranes cellulaires, notamment dans la membrane des leucocytes ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité et une libération d'enzymes lysosomiales. Elles sont ainsi responsables d'une inflammation sévère et d'une nécrose tissulaire. La phospholipase C est une hémolysine thermolabile dont la synthèse est induite par une carence en phosphate. Elle libère des phosphorylcholines à partir de la phosphatidylcholine ou de la sphingomyéline. Son substrat principal est le constituant majeur du surfactant pulmonaire. (**Narcy, 1993**). *Pseudomonas aeruginosa* produit au moins quatre protéases qui provoquent des hémorragies et des nécroses tissulaires. La plus importante est une élastase qui agit sur l'élastine (composant structural majeur des tissus pulmonaires), la laminine, les collagènes de type III et IV et sur protéoglycane. Une protéase alcaline joue un rôle important dans la dégradation directe des protéines des tissus cornéens, mais aussi un rôle indirect en activant des protéases endogènes de la trachée ; la protéase alcaline dégrade également l'interféron gamma et les protéines du système compensatoire. L'exotoxine A agit d'une manière comparable à la toxine diphtérique. Elle inhibe la synthèse protéique des cellules eucaryotes par ADP-ribosylation du facteur d'élongation EF2. Sa synthèse est stimulée par la carence en fer.

L'exoenzyme possède également une activité ADP-ribosyltransférase. Elle s'agit sur la vimentine (un composant du cytosquelette), les immunoglobulines A et G et elle entraîne une dépolymérisation des filaments d'actine et contribue à la résistance aux macrophages. L'antigène somatique « O » thermostable est un lipopolysaccharide (LPS)

lié à une protéine. Constituant de la paroi, il joue un rôle important dans le pouvoir pathogène et dans l'immunité; les anticorps correspondants sont agglutinants et opsonins, ce qui explique la particulière fréquence des infections à *Pseudomonas* chez les sujets immunodéprimés. L'antigène flagellaire H protéique, hermopolitain, permet la détermination de nombreux sérotypes. (**Lilet et al., 1983**).

### **2. Antibiorésistance de *Pseudomonas aeruginosa*.**

#### **2.1. Différents types de résistance bactérienne:**

Les antibiotiques sont des médicaments qui servent à soigner les infections dues à des bactéries (Eurekasanté Vidal, 2019). Les bactéries peuvent devenir insensibles à ces drogues, la résistance aux antibiotiques se présente sous deux types de mécanismes (Faure et al., 2009) (Figure 3).

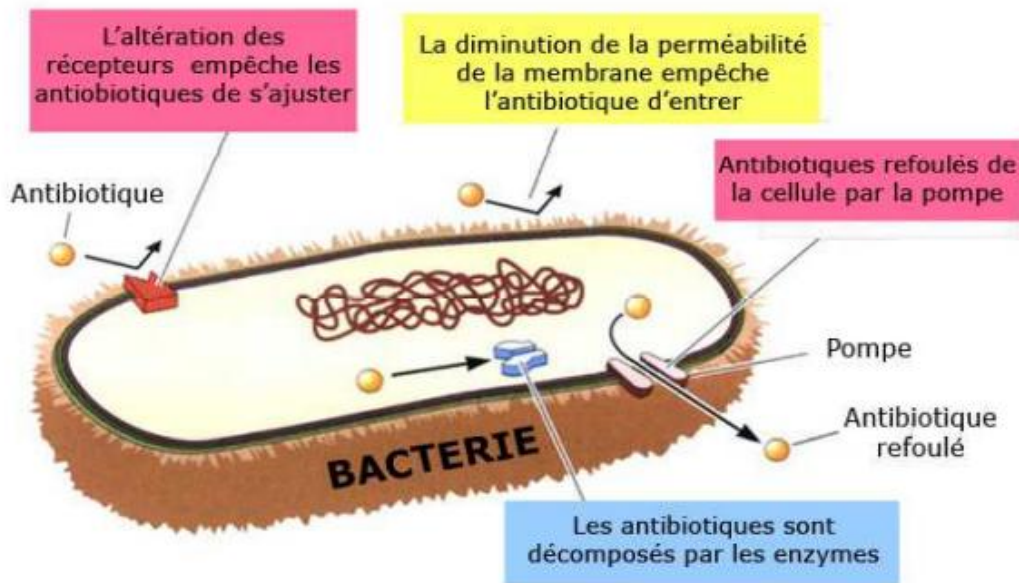
##### **2.1.1. La résistance naturelle:**

*Pseudomonas aeruginosa* est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques comme amoxicilline, les pénicillines du groupe A, les céphalosporines de première et de seconde génération, ainsi qu'une grande partie de céphalosporines de troisième génération "céfotaxime". La résistance naturelle de *P. aeruginosa* relève d'une faible perméabilité de la membrane externe, de la production constante d'une  $\beta$ -lactamase inductible (AmpC) et de systèmes de pompes à efflux actif.

##### **2.1.2. La résistance acquise:**

La résistance acquise se caractérise par l'apparition subite d'une résistance à un ou plusieurs antibiotiques.

Elle est résulte de mécanismes qui sont liés à l'ADN de la bactérie et sont donc caractérisés par des mutations ou des transferts de gènes résistant d'une bactérie résistante vers une bactérie sensible, via un plasmide par exemple (ral, 2017). Les résistances acquises sont dues à une imperméabilité accrue de la membrane externe, une modification des porines, une altération des récepteurs aux antibiotiques et à la production d'enzymes inactivantes et la présence de pompes à efflux dans le biofilm créé par la bactérie, permet l'expulsion active des antibiotiques, La présence de la matrice d'exopolysaccharides ralentit la pénétration des traitements. Ainsi, l'alginate peut capturer le peroxyde d'oxygène, les radicaux libres relargués par les macrophages ou encore certains antibiotiques (Mérens et al., 2011).



**Figure 3: Les différents mécanismes de la résistance bactérienne aux Antibiotiques.**  
(Faure et al., 2009).

## 2. Les différents mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux Béta lactamines:

### 2.1. Mécanisme enzymatique:

*Pseudomonas aeruginosa* est capable de produire des  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent le cycle  $\beta$ lactame nécessaire à l'activité bactérienne des  $\beta$ -lactamines.

Après mutation, certaines souches vont dé-réprimer la céphalosporinase chromosomique (AmpC) qui est naturellement faiblement exprimée par la bactérie, afin d'hydrolyser les  $\beta$ -lactamines. C'est le principal mécanisme impliqué dans la résistance à la ceftazidime. Les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi sont des enzymes dont le spectre inclut les C3G et les C4G (céfépime). Le nombre de souches de *P. aeruginosa* les exprimant a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. Elles sont principalement codées par des plasmides. Les carbapénémases sont des  $\beta$ -lactamases acquises par le contact avec d'autres bactéries, et qui permettent d'élargir le spectre de résistance de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes. Les plus répandues sont les métallo- $\beta$ -lactamases qui possèdent une activité hydrolytique sur les  $\beta$ -lactamines (Bagge et al., 2002).

### 2.2. Mécanismes non enzymatiques:

Les pompes d'efflux sont responsables de la résistance naturelle des bactéries aux antibiotiques, mais lorsqu'elles sont surproduites elles contribuent à l'augmentation des résistances à des antibiotiques auxquelles la bactérie est naturellement sensible. Cette surproduction est due à des mutations spontanées dans les gènes régulateurs des pompes d'efflux MexAB-OprM et MexXY/OprM. Le système associe une pompe (mexB/Y), une lipoprotéine de liaison à la membrane (mexA/X) et une porine (OprM) par laquelle l'antibiotique est expulsé de la cellule. Les souches surproduisant le système MexAB-OprM sont de 4 à 8 fois plus résistantes aux  $\beta$ -lactamines. Celles surproduisant le système MexXY/OprM sont 2 à 8 fois plus résistantes aux céphalosporines, aux aminosides et aux fluoroquinolones (**Barbier et al., 2010; Mérens et al., 2011**).

### 3. La formation du bio film par la *Pseudomonas*

#### *aeruginosa* et Quorum Sensing.

#### **3.1. Description du biofilm bactérienne:**

##### **3.1.1. Historique:**

Les biofilms microbiens est découvert date de 1683 quand Antoni Van Leeuwenhoek observa des communautés microbiennes adhérees à la surface des dents (**Roux et Chigo, 2006**). En 1978 la proposition des premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes par Costerton et al, pour la première fois la théorie de "biofilms". (**Branger et al., 2007; Chalvet de Rochemonteix, 2009; Kara Terki, 2014**). Dernièrement, les études sur les biofilms étaient développées dans plusieurs domaines "médicale, industriel et environnementale. ont compté sur les outils comme la microscopie électronique à balayage (MEB) ou les techniques de cultures microbiologiques standards pour la caractérisation des biofilms (**Donlan, 2002**).

##### **3.1.2. Definition:**

Les biofilms sont des communautés microbiennes complexes contenant des bactéries et des champignons. Ces micro-organismes synthétisent et secrètent une matrice protectrice qui lie fortement le biofilm à une surface biotiques ou abiotiques (**Branger et al., 2007**).

##### **3.1.3. Formation de biofilm:**

La formation d'un biofilm est constituée de plusieurs étapes (Figure 4). Le biofilm peut se former très rapidement, en quelques heures (**Haras, 2005**).

###### **3.1.3.1. Adhésion reversible:**

Les bactéries doivent dans un premier temps, adhérer à une surface biotique ou abiotique. Cette étape requiert généralement la présence de molécules ou de structures particulières à la surface de la bactérie. (**Branger et al., 2007; Pecastaings, 2010; Muller et Guaguere, 2014**).

### **3.1. 3.2. Adhésion irréversible:**

L'adhésion devient irréversible ou permanente avec des molécules dites « ligands » et des structures de type « pili ». L'ancrage devient plus fort et plus difficile à éliminer. 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).

### **3.1.3.3. Formation de micro-colonies:**

Les cellules bactériennes vont s'agglutiner, se multiplier et former des microcolonies (Bellifa, 2014).

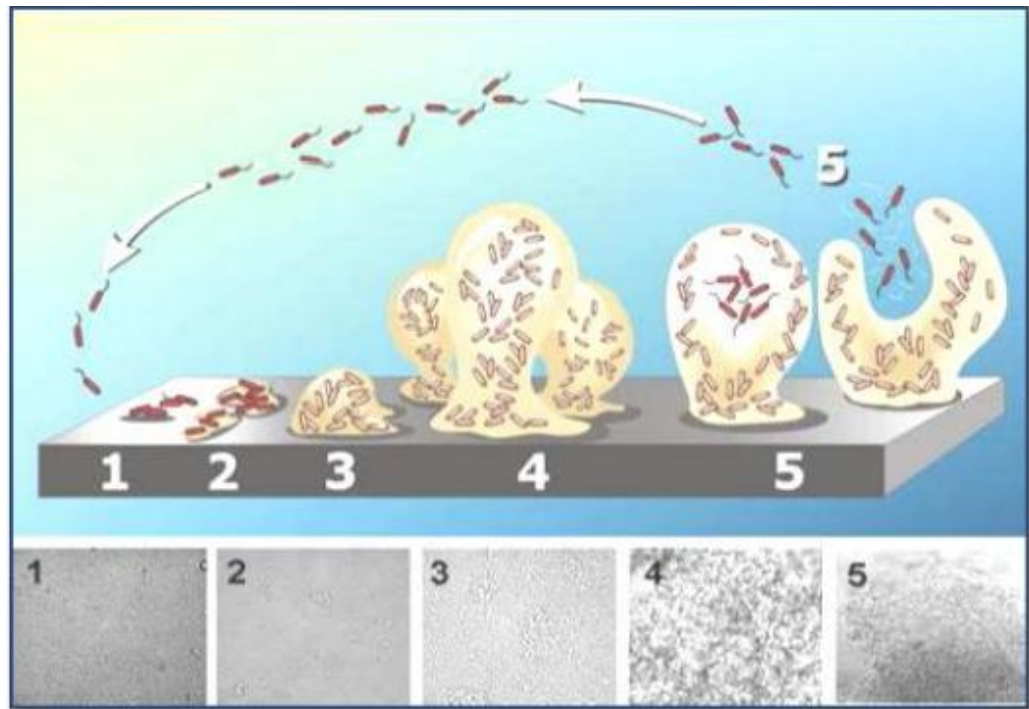
### **3.1.3.4. Maturation de biofilm:**

Le biofilm grandit et devient mature et complexe. Sa matrice grossit et forme des canaux aqueux qui font circuler les nutriments et les déchets donc c'est l'étape clé de la formation de biofilms (Branger et al., 2007; Alnnasouri, 2010).

### **3.1.3.5. Dispersion du biofilm:**

Certains microbes se séparent activement du biofilm et retournent au mode de vie planctonique, ce qui leur permet d'aller s'adhérer sur de nouvelles surfaces vivantes ou non.

Dans un cycle de vie, le mode planctonique représente environ 1 % des microbes. Ce mode planctonique est considéré comme une phase de dispersion, de dissémination (Kaplan JB et al., 2010).



**Figure 4: Représentation des différentes étapes de développement d'un biofilms**

(Haras, 2005).

### 3.2. Le Quorum Sensing:

Le Quorum Sensing (QS) est un ensemble de mécanismes de régulation utilisé par certaines bactéries. Il repose sur leur capacité à communiquer entre elles. Au sein d'une population, les bactéries synchronisent l'expression ou la répression de certains gènes en fonction de la densité de cette population. Ce mécanisme leur permet de coordonner leur comportement et de fonctionner comme un organisme multicellulaire. Il existe trois principaux types de QS chez les bactéries, *P. aeruginosa* possède un QS de type I. La communication bactérienne repose sur la production d'hormones auto-inductrices diffusibles à travers la membrane bactérienne, les N-acyl-homosérine lactones (AHL). Ces protéines donnent une indication de la densité cellulaire dans l'environnement donné. Elles sont synthétisées par une AHL-synthase qui est codée par un gène inducteur. Lorsque la concentration de ces molécules diffusibles atteint un certain seuil, elles se lient au régulateur transcriptionnel situé dans la membrane interne ou le cytoplasme bactérien. Le complexe ainsi formé va activer la transcription de gènes cibles mais également du gène inducteur. Quatre systèmes du Quorum Sensing ont été caractérisés chez *P. aeruginosa*: Le système las: le gène lasR code pour la protéine régulatrice LasR, et le gène lasI code pour une protéine inductrice LasI qui est nécessaire à la synthèse des AHL de type N-(3-oxodecanoyl)-L-homosérine lactone. Lorsque

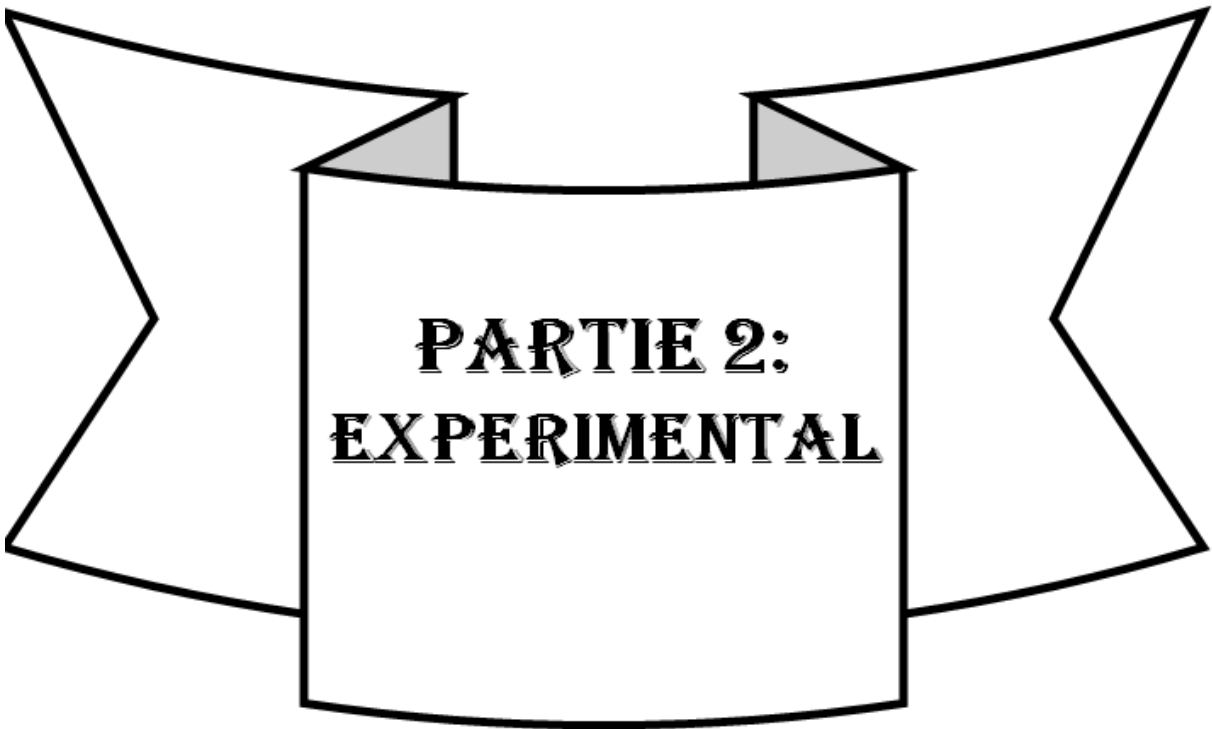
## Synthese bibliographique

---

la concentration atteint un seuil critique, une molécule d'AHL se lie à deux protéines LasR, formant ainsi un complexe activateur de la transcription génique. Le système rhl: sur le même modèle, le gène rhlR code pour la protéine régulatrice RhlR et le gène rhlI code pour une protéine inductrice RhlI qui est nécessaire à la synthèse des AHL de type N-butyryl-L-homosérine lactone. Le système *Pseudomonas* quinolone (PQS): l'auto-inducteur est le 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone. PqsA est une anthranilate coenzyme A ligase qui active la première étape de la synthèse du PQS à partir de l'anthranilate. PqsR est le récepteur du PQS ainsi que son régulateur transcriptionnel. Le système IQS: l'auto-inducteur est le 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde. Ce système est particulièrement actif en condition de faible quantité de phosphate. Ces quatre systèmes interagissent entre eux, le système las gouvernant l'expression des autres QS. 6 à 10 % des gènes de *P. aeruginosa* qui codent pour des protéines impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux ou dans la virulence sont régulés par le QS. Parmi ces gènes, on retrouve lasA (codant pour l'élastase A), lasB (codant pour l'élastase B), aprA codant pour la protéase alcaline), toxA (codant pour l'exotoxine A), xcpR et xcpP (codant pour le T2SS), rhlAB (codant pour les rhamnolipides) et lasI/rhlI (augmentation de la synthèse des AHL et amplification du signal par auto-induction). Le QS joue un rôle primordial dans le développement de l'infection chronique chez les patients atteints de mucoviscidose. Il n'a pas encore été démontré de rôle du QS dans les infections à *P. aeruginosa* autres que les infections broncho-pulmonaires. Certains AHL présentent une activité immuno-modulatrice en inhibant la prolifération lymphocytaire, en diminuant la production de TNFalpha et en stimulant la vasodilatation. Le QS interagit également avec la structuration du biofilm bactérien (Lee et Zhang 2015).

**Le Quorum Quenching:** c'est un mécanisme pour inhiber la communication entre bactéries et limiter leurs effets nocifs. Des inhibiteurs chimiques, des anticorps ou encore des enzymes capables d'interférer avec les autoinducteurs ont été développés et se sont montrés efficaces pour diminuer la virulence des bactéries à la fois in vitro et in vivo.

Cette stratégie a également montré des effets synergiques avec des traitements antibactériens classiques. Il permettrait notamment d'augmenter la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Ceci constitue une piste thérapeutique prometteuse pour lutter contre les infections bactériennes et limiter les conséquences de l'antibiorésistance (Hraiech S et al., 2014).



**PARTIE 2:**  
**EXPERIMENTAL**



**1. MATÉRIEL  
ET  
MÉTHODES.**

## Matériel et méthodes

---

### 1. Matériel et méthodes.

#### 1.1. Lieux de travail:

Ce travail à été réalisé au niveau du laboratoire central de bactériologie à l'hôpital Ahmed ben ajila - Laghouat et au niveau de laboratoire de microbiologie du department biologie de l'université Ammar thelidji- Laghouat.

#### 1.2. Objectifs de l'étude:

- Isoler et identifier des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Etudier la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.
- Etudier la capacité des souches isolées a former des biofilms
- Etudier l'effet de l'acide acétique et l'acide lactique sur la formation de bofilm par les souches isolées.
- Détermination de l'activité antimicrobinne des acides lactique et acétique sur les souches isolées.

#### 1.3. Matériel biologique (l'origine de souche):

Nous avons utilisé 2 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isoler à partir de différent prélèvements cliniques (différent échantillon) de patients de deux sexes et des différents services.

**Tableau 2: L'origine des Souches.**

N°de prélèvement	Sexe	Nature de prélèvement
1	Homme	Pus
2	Femme	Pus

### 1.4. L'isolement et identification des souches de *Pseudomonas aeruginosa*:

#### 1.4.1. L'isolement:

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

#### 1.4.2. L'identification:

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

##### 1.4.2.1. Examen de coloration de gram:

- Préparation un frottis ou étalement: prend une lame propre mette dans la lame un goutte d'eau physiologie stérile, ensuit par pipette pasteur boutonnée stérileprélève 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.
- Recouvre la lame par le violet de gention pendant 1min Après lave par l'eau de robinet.
- Puis recouvre la lame totalement par lygole pendant 2 minute après lave par l'eau de robinet.
- Ensuit on ajoute alcool jusqu'à disparition de la couleur violette pendant 30 second et rince avec l'eau de robinet.
- Enfin on colore la lame par la solution de fushine pendant 45 second et lave par l'eau de robinet.
- Observation microscopique avec objectif  $\times 100$  à d'immersion.

##### 1.4.2.2. Test d'oxydase:

Ce teste détermine l'activité oxydase à été détermine par la méthode de disque d'oxydase. à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée en prend une colonie et en dépose la colonie sur le disque. La réaction positive est révèlle par l'apparition d'une tache violette.

### 1.4.2.3 .Test mannitol mobilité:

A l'aide de pipette pasteur stérile on prélève une colonie à culture de 24 heures de culture et on réalise une pique centrale à travers le milieu, ensuite on n'incube le tube à essai à 37°C durant 24 heures.



**Figure 5: Le milieu du mannitol mobilité.**

### 1.4.2.4. Galerie ApI20E:

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

**Préparation de galerie:** Nous mettons dans le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation environ à 5ml 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 de mettre dans une boîte de incubation pour que l'on mette dans chaque micro tube la suspension bactérienne après mettre la galerie dans l'étuve à 37°C pendant à 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 à essai contenant une eau physiologique et homogène la suspension.
- Réaliser une suspension égale 0,5 de McFarland.

## Matériel et Méthodes

### Méthode d'inoculation de la galerie:

- Remplir les tubes des tests NO<sub>3</sub> 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 incuber à 37 °C pendant 24 heures.

### 1.4.2.5. Antibiogramme:

C'est une technique qui étudie la sensibilité et la résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

Le tableau suivant montre la liste d'ATB qui ont été testés sur les souches de *P.aeruginosa* isolées.

**Tableau 3: Antibiotiques testés sur les souches *Pseudomonas aeruginosa*.**

N°	Antibiotique	Abréviation	Famille
1	Ticarcilline-Acide clavulanique	TCC	Béta-Lactamine
2	Tobramycine	TOB	Aminosides
3	Colistine	CL	Polypeptides
4	Imipenème	IPM	Béta-Lactamine
5	Gentamicine	GEN	Aminosides
6	Céfazoline	GN	Béta-lactamine
7	Céfazidime	CZ	Béta-Lactamine
8	Ofloxacin	OF	Quinolones
9	Lévofloxacin	LE	Béta-Lactamine
10	Amikacine	AK	Béta-Lactamine
11	Céftazidime	CAZ	Béta-Lactamine

## Matériel et Méthodes

---

### 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.

### 1.5. Détection de la formation de biofilm par les souches isolées *P.aeruginosa*:

#### 1.5.1. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA):

Le Rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime et donnant des colonies noires sur milieu RCA contrairement aux colonies non productrices qui restent rouges (**Rewatkar et Wadher, 2013; Kara Terki, 2014**).

Ce milieu est préalablement préparé en additionnant 0,8 g de Rouge Congo et 37 g de saccharose à 1 L de BCC et 10 g d'agar.

Le milieu est ensuiteensemencé par des stries serrées à l'aide d'une anse de platine, à partir des cultures de 24 heures sur gélose nutritive, puis incubé à 37° pendant 24 heures à 48 heures.

Les souches de *P. aeruginosa* productrices de slime donnent des colonies noires (résultat positif), contrairement aux souches non productrices qui donnent des colonies rouges (résultat négatif).

## Matériel et Méthodes

---

### 1.5.2. 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 a 24 heures.

- La biofilm forme sur supports en polystyrènes en utilisant de microplaque à 96 puits.

### La préparation d'inoculum:

Prendre une colonie bien isolée à partir d'une culture de 24 heures et ensemercer 5ml de bouillon nutritive qu'on incube à 37°C pendant 18heures -faire des dilutions pour obtenir une concentration de  $10^8$  ufc/ml (DO=0.1 à 620 nm).

### 1.5.3. Coloration des biofilms au Cristal violet:

Après le temps d'incubation, les biofiims forméesur la surface des puits subissent les traitements suivants:

- Les plaques sont d'abords vidés avec la micropipette.
- Rinçage à l'EDS trois fois pour éliminer les cellules non adhérees.
- Laisser sécher 10 à 15 min.
- Remplir les puits avec 200 ul de cristal violet à 0.5% qui joue un rôle dans la révélation et la fixation de biofilm.
- Le temps de coloration est 20 min.
- Rinçage a L'EDS 3 fois.
- Séchage des plaques en positions renversé.

## 1.6. Etude l'effet des acides organiques sur la formation de biofilms de bofilm par *p.aeruginosa* invitro:

### 1.6.1. Détermination de l'activité antimicrobienne des acides lactique et acétique:

L'objectif de cette partie est l'étude de l'activité antimicrobienne des acides organiques (acide lactique, acide acétique aux concentration suivantes: L'acide lactique à 10%, 5%, 3% et l'acide acétique à 5%, 3%, 1%.

## Matériel et Méthodes

---

### Préparation des solutions des acides organiques:

Les acides organiques (acide lactique, acide acétique) ont été dissocies dans l'eau distillée stérile (EDS) pour préparer des dilutions successives qui permis aboutir aux différentes concentrations étudiées (tableau 4 et 5).

### Les solutions mères:

La solution mere de l'acide lactique: 10 % et 20%; la solution mere de l'acide acétique: 10%

**Tableau 4: Préparation des solutions de l'acide acétique.**

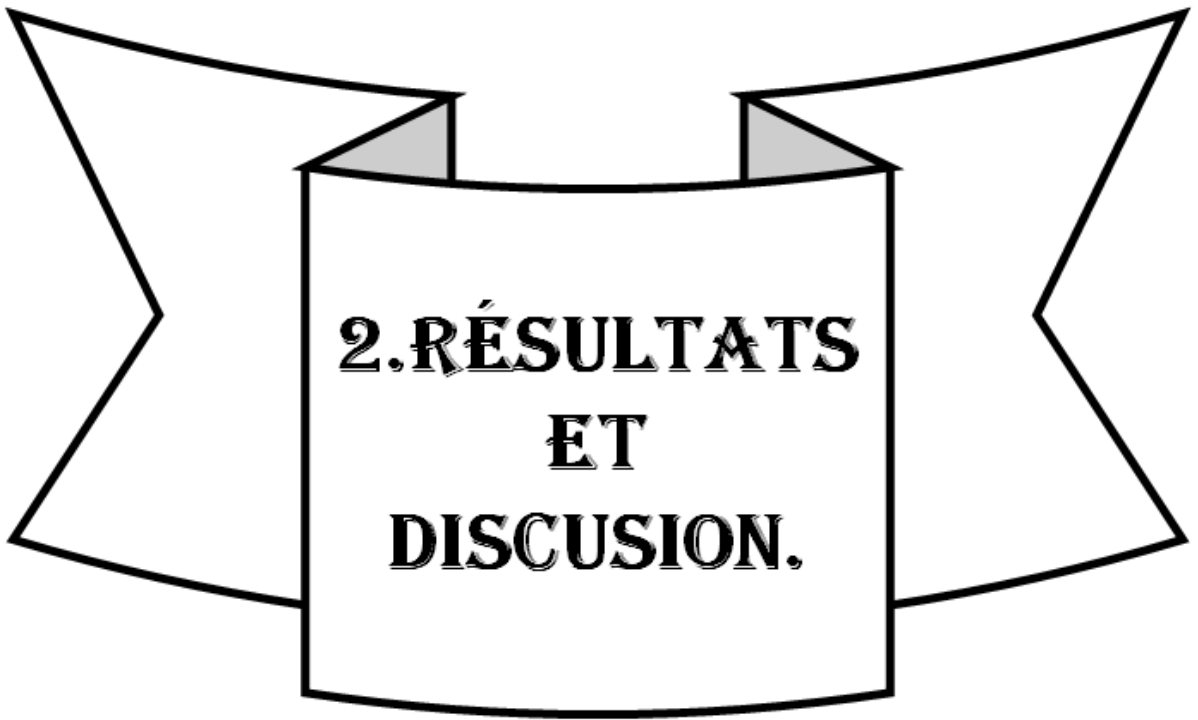
C%	Vs (ml)	Vd (ml)	Vt (ml)
5%	150	150	300
3%	100	200	300
1%	30	270	300

**C:** concentration final (%), **VS:** volume de la solution mère à 10%, **Vd:** volume de milieu de culture, **Vt:** volume total.

**Tableau 5: Préparation des solutions de l'acide lactique.**

C%	Vs (ml)	Vd (ml)	Vt (ml)
3 %	100	200	300
5 %	150	150	300
10%	150	150	300

**C:** concentration final (%), **VS:** volume de la solution mère à 10%, **Vd:** volume de milieu de culture, **Vt:** volume total; la concentration de 10% de l'acide lactique a été préparé à partir de la solution mère de 20%.



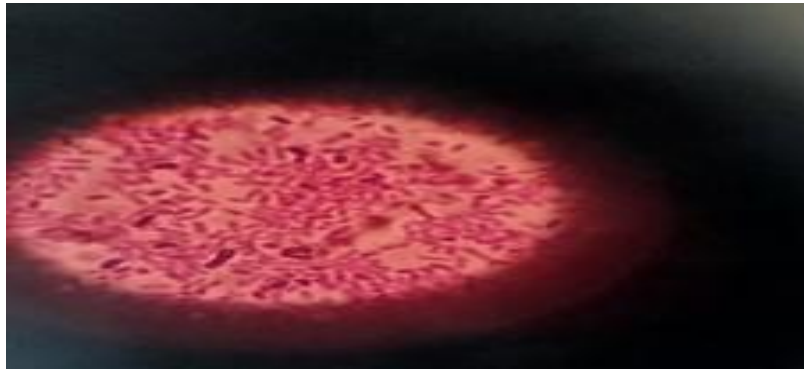
**2. RÉSULTATS  
ET  
DISCUSSION.**

### 2. Résultats et discussion.

#### 2.1. Isolement et identification de 2 souches de *Pseudomonas aeruginosa*:

##### 2.1.1. Le caractère cultural:

##### 2.1.1.1. La Coloration de gramme:

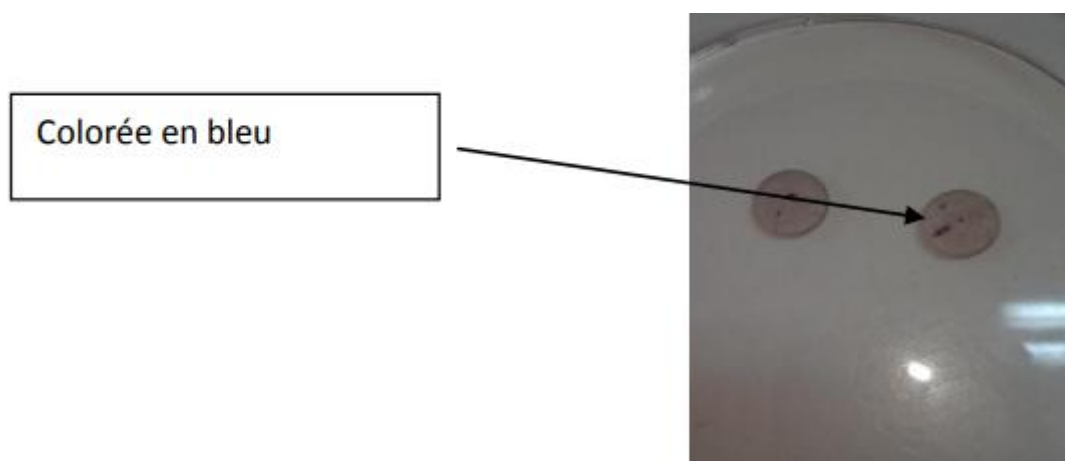


**Figure 6: Les bacilles Gram négatif de *Pseudomonas aeruginosa* à objectif 100X a immersion.**

##### 2.1.2 .Le Caractère biochimique:

##### 2.1.2.1. 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.



**Figure 7: Résultat positif d'oxydase chez le *Pseudomonase aeruginosa*.**

## Résultats et Discussion

### 2.1.2.2 Recherche de mannitol mobilité:

Tableau 6: le résultat de mannitol mobilité chez le *Pseudomonas aeruginosa*

	P1	P2
Mannitol	-	-
Mobilité	+	+

### 2.1.2.3. 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 1 goutte de réactif TDA. 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 10 minutes c'est réaction negative.

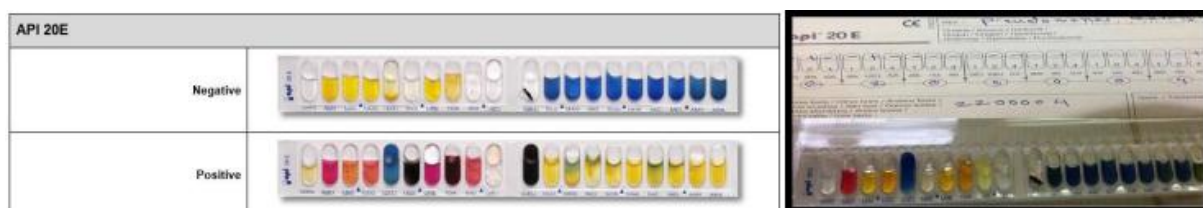


Figure 8: Le résultat de galerie API20E chez le *Pseudomonas aeruginosa*.

## Résultats et Discussion

**Tableau 7: La lecture de galerie d'API 20E chez *Le Pseudomonas aeruginosa*.**

Test /p	Abbreviation	P1	P2
ONPG	l'orthonitrophényl-β-D galactopyrannoside.	-	-
ADH	arginine dihydrolase	+	+
LDC	lysine décarboxylase	-	-
ODH	Oxygen Deficiency Hazard	-	-
CIT	citrate	+	+
H2S	hydrogène sulfuré	-	-
URE	urease	-	-
TDA	Tryptophane désaminase.	-	-
IND	Indole.	-	-
VP	Voges-Proskauer.	-	-
GEL	Gélatinase	-	-
GLU	Glucose	-	-
MAN	Mannose	-	-
INO	l'inositol	-	-
SOR	Sorbitol	-	-
RHA	Rhamnose	-	-
SAC	Saccharose	-	-
MEL	Mélibiose	-	-
AMY	l'amygdaline	-	-
ARA	l'arabinose	-	-

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

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

## Résultats et Discussion

### 2.1.2.4. 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.

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

ATB/souche	P2	P1	Antibiotique
TCC	R	R	Ticarcilline-Acide clavulanique
TOB	S	S	Tobramycine
CL	S	S	Colistine
GEN	S	S	Gentamicune
AK	S	S	Amikacine
CAZ	R	R	Céftazidime
OF	S	R	Ofloxacine

### 2.2. Détection de la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*:

#### 3.2.1. La méthode de culture sur rouge Congo agar (RCA):

La gélose Rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime. Sur ce milieu, les souches exprimant le PIA (polysaccharide intercellular adhesin) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatif (Chaieb et al., 2005).

Les 2 souches de *P. aeruginosa* isolées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à produire de slime sur milieu rouge Congo, Les souches productrices de slime avaient un phénotype variable ou positif (Annexe 3). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau8 suivant:

## Résultats et Discussion

**Tableau 9: Résultats de la production de slime par la méthode RCA.**

Souches	Couleur de colonies	Phénotype (slime)
P1	Noire	Positive (+)
P 2	Blanche	Négatif (-)

Après 48 heures d'incubation, la production de slime est remarquée respectivement chez les souches P1 à l'opposé d' autres souches exprimant un phénotype négatif.

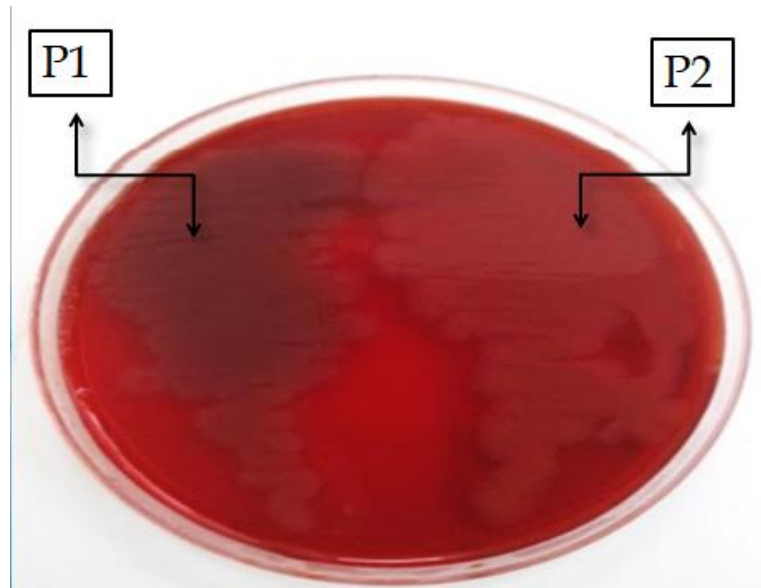
La souche productrice de slime donne des colonies de couleur noire **P1**, par contre la souche non productrice donne des colonies de couleur rouge **P2**.

La méthode de RCA est couramment employée pour détecter la formation de biofilms chez les isolats cliniques. D'après les résultats obtenus, la souche productrice de slime est la même souche qui donne des valeurs d'absorbances CV importantes après 48 heures d'incubation en BN (P1).

L'analyse des résultats montre que la méthode de coloration au CV a permis de mettre évidence une formation de biofilm variable chez l'ensemble de souches étudiées en comparaison avec la méthode de RCA qui a permis de détecter la formation de biofilms chez P1. Ces résultats sont semblables à ceux rapportés par plusieurs travaux traitant les biofilms de *P. aeruginosa* tels que l'étude de (**Filloux et Vallet, 2003**).

De ce fait et à fin de détecter et de quantifier les biofilms formés in vitro, la méthode de RCA semble être moins efficace (**Beliffa, 2014**) par contre la méthode de coloration au CV peut être la plus adaptée et la plus fiable (**Hou et al., 2012**).

Enfin, la détection précoce de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* en pratique peut être l'une des étapes essentielles pour la prévention et la gestion des infections causées par ce pathogène. La lutte efficace contre les biofilms nécessite la connaissance approfondie possible des mécanismes de leur formation rendue abordable par l'utilisation des méthodes fiables.



**Figure 9: Photo représentant le résultat du test du milieu RCA pour les souches P1, P2.**

### **2.2. La formation des biofilm par la technique au Cristal violet:**

La technique de coloration de cristal violet a permis l'observation des microplaques à l'œil nu, c'est une méthode indirecte d'estimation de la production de biofilms sur différents types de substrat (Djordjevic et al., 2002). La coloration intense des parois des puits des microplaques traduit une production importante de biofilm, et permet aussi une quantification de celui-ci (Musk et al., 2005). La densité de formation de biofilms a varié considérablement en fonction des souches, ce qui montre des capacités différentes de formation de biofilm chez les souches étudiées. Certains montrent un pouvoir important de formation du biofilm. (figure10)

## Résultats et Discussion

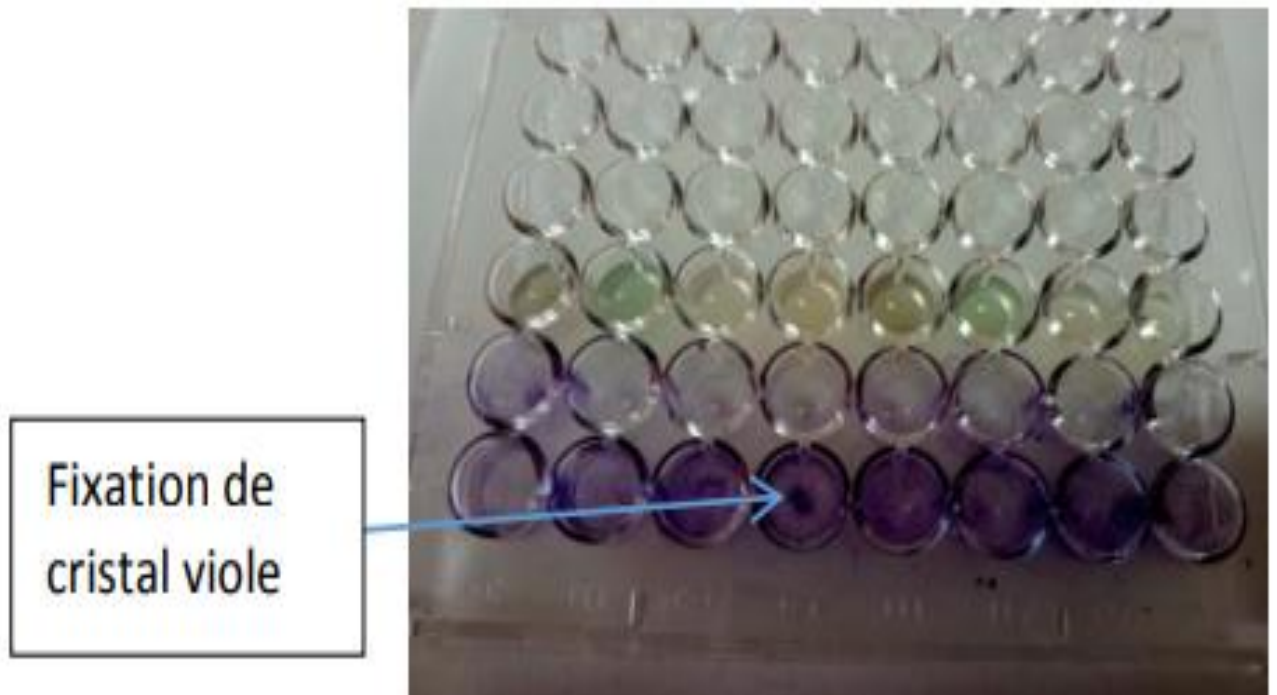


Figure10: le résultat de culture de plaque après 24h d'incubation chez la *Pseudomonas aeruginosa*.

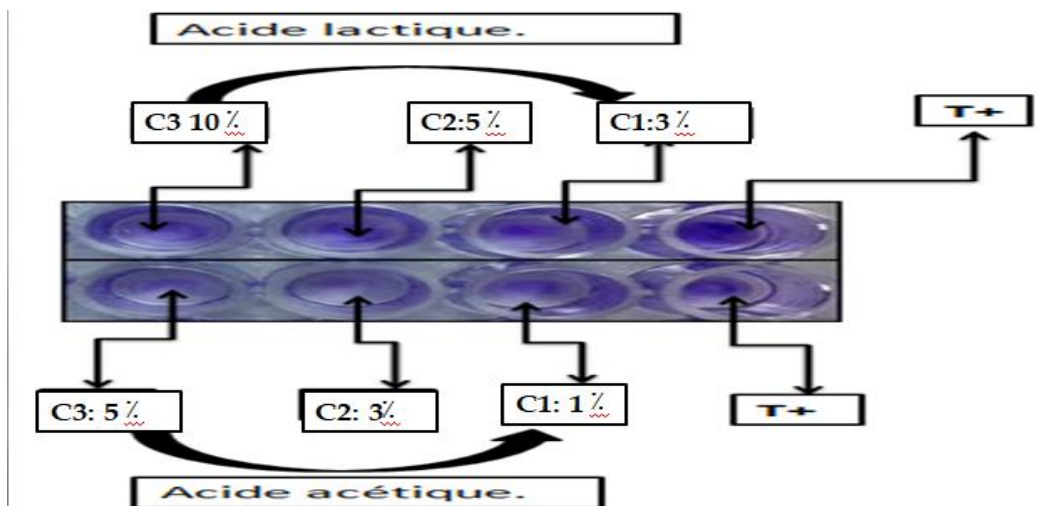


Figure11: Photo montrant l'effet des acide organiques sur la formation des biofilm dans les puits des microplaques.

Le tableau suivant donne la lecture de culture de microplaque.

## Résultats et Discussion

**Tableau 10: Test de formation de biofilm par les souches P1 et P2 sur microplaque.**

Test/souche	P1	P2
Test 1	+++	-
Test 2	+++	-
Test 3	+++	-

- : Pas de formation de biofilm.

+ : Présente de formation de biofilm.

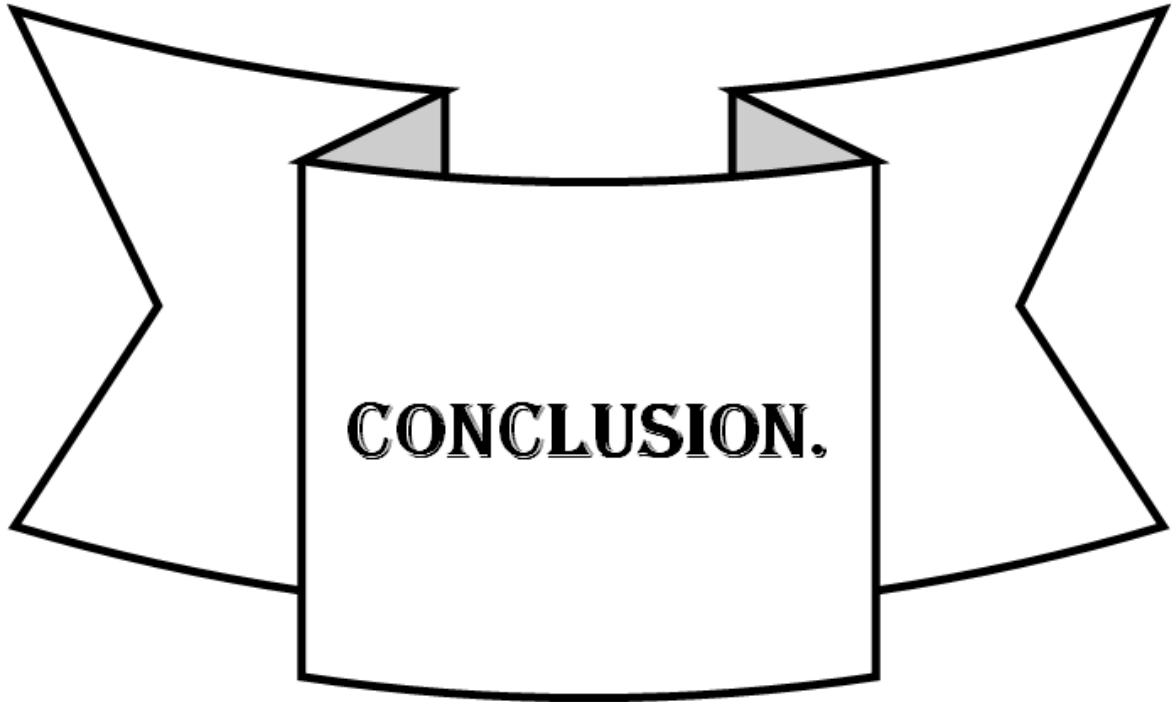
### 2.3. L'effet des acides organiques sur la formation de biofilms de bofilm par

#### *Pseudomonas aeruginosa:*

Tableau 11: L'effet des acides organiques sur la formation de biofilms de bofilm par

#### *Pseudomonas aeruginosa.*

	Concentration des acides organiques / la souche.	P1	Cellule vivante Sur (GN)
Acide acétique.	T+	++	+++
	C1 1%	++	+++
	C2 3%	-	++
	C3 5 %	-	++
Acide lactique.	T+	++	+++
	C1 3%	++	+++
	C2 5 %	-	++
	C3 10 %	-	+



## Conclusion

---

### Conclusion:

*Pseudomonas aeruginosa* a fait l'objet d'assez d'étude sur sa résistance aux antibiotiques ainsi que sur sa capacité à former des biofilms.

Dans notre étude, deux souches de *P. aeruginosa* ont été isolées à partir de prélèvements cliniques. Leur identification a été effectuée selon les méthodes conventionnelles.

La souche isolée P1 c'est montré capable de former un biofilm après une culture de 24h. Par contre la souche P2 n'a pas la capacité à former de biofilm.

Les acides lactique et acétique ont été eux aussi étudié dans ce travail, d'après les résultats on constate que l'acide acétique est plus efficace que l'acide lactique son efficacité est qu'il inhibe la formation de biofilm à 3 % (v/v).

Alors que l'acide lactique c'est montré efficace à une concentration 5% (v/v).

### Perspective:

Comme continuité pour ce travail on propose l'étude du mécanisme d'inhibition de la formation de biofilm par l'acide acétique ont déterminant l'effet de l'acide acétique sur les auto-inducteurs du Quorum Sensing responsable de formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*.



**RÉFÉRANCES  
BIBLIOGRAPHIQUES.**

### Références bibliographiques:

#### A

---

- 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

---

- Barbier F, Wolff M. Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*, vers l'impasse thérapeutique ? Médecine/Sciences. 2010 ;
- Besassier R., Califano J., Carrette M. et Lombardo M. (2005). La lutte antibactérienne. Université Nice Sophia Antipolis.
- 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.
- Bedoui H ; Benhammadi Z et Nacer N (2005-2006) Projet de résistance de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques au secteur sanitaire de Ghardaïa. Diplôme supérieur en Microbiologie université de Kasdi Merbah Ouargla P03.
- Ben messaoud Kawthar Oumel kheir (2004-2005), l'otite moyenne chronique ; Diplôme supérieur en Microbiologie université de Kasdi Merbah Ouargla PP 18-32.
- 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.
- 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.

## Références bibliographiques

---

- 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). Les biofilms 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.
- Chaibdraa A., Medjellekh M.S., Saouli A. Et Bentakouk M.C. (2008). Le *Pseudomonas*: Expérience du Centre des Brules D'Annaba et Revue de la Littérature. Ann Burns Fire Disasters. 21(4): 210–218.
- Chaieb K., Mandouani K., Bakhrouf A. (2005). Detection of icaA and icaD loci by Polymerase chain reaction and biofilm formation by Staphylococcus epidermidis isolated from dialysate and needles in a dialysis unit, Journal of Hospital Infection, (61) 225-230.
- C. Lilet; J Bourdon; B Toma; N Marchal et C. Balbastre (1983); Bactériologie médicale et vétérinaire- systématique bactérienne; Edition DOIN. PP 150-190.

## D

---

- 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.
- Donlan R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases; 8, 9: 881– 890.
- Dubois, 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: réservoir, virulence et résistance. Laboratoire de Microbiologie, UMR CNRS 5234 « Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité»

## E

---

## Références bibliographiques

---

- La résistance aux antibiotiques [en ligne]. Consulté le 13 avril 2019. Disponible sur : <https://eurekasante.vidal.fr/medicaments/antibiotiques/resistanceantibiotiques.html>.
- 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

---

- Faure K., Kipnis E., Guery B. (2007). Pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa*. .Mapar. Pathologies infectieuses : 547 - 563.
- F.Bert, E.Maubec et al. Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contamination tap water in neurosurgery intensive care unit. J Hosp Infect 1998 ; 39.
- Filloux A. Et Vallet I., (2003). Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. Médecine / Sciences, 19, 77-83.
- Fuentefria DB, Ferreira AE, Corção G. (2011) Antibiotic - resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water. Are they genetically related? J Environ Manage 2011; 92:250.

## H

---

- Haras D. (2005) .Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. Matériaux & Techniques 93, 27–41 Hors-Série.
- H.Montil, L.Avril, H.Dabernat, F.Denis. Bactériologie clinique 2ème édition, 1992.
- Hraiech S, Hiblot J, Lafleur J, et al. Inhaled Lactonase Reduces *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing and Mortality in Rat Pneumonia. PLoS One 2014 ; 9 :e107125. [CrossRef] [PubMed] [Google Scholar].

## Références bibliographiques

---

- Hou W., Sun X., Wang Z. et al., (2012), Investigative Ophthalmology& Visual Science, the Association for Research in Vision and Ophthalmology. (53): 9. 5624.5631. ISBN: 978- 2 -84444-558 -2. ISBN: 978-27440-7209-3.

## K

---

- Kara Terki, I. (2014). Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Kara Terki, I. (2014). Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- Kaplan JB. Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. J Dent Res. 2010;89:205–218. [[Article](#) [PMC gratuit](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].
- Khalilzadeh P. (2009). Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat d'Université de Paul Sabatier - Toulouse III. Toulouse.
- Khalilzadeh P. (2009). Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat d'Université de Paul Sabatier - Toulouse III. Toulouse.

## L

---

- Lee J, Zhang L. The hierarchy Quorum Sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein & Cell. 2015;6(1):26-41.

## M

---

## Références bibliographiques

---

- Mérens A, Delacour H, Plésiat P, Cavallo JD, Jeannot K. *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. Revue Francophone des Laboratoires. 2011 Sep.
- Mathur T., Singhal S. , Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian Journal of Medical Microbiology, 24 (1):25- 9.
- 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.

## N

---

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

## P

---

- 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.

## R

---

- RAL. Test de résistance aux antibiotiques [en ligne]. Publication 20 décembre 2017. Consulté le 6 mars 2018. Disponible sur : <https://ral-sa.com/2017/12/20/essais-rapid-pararesistances-a-antibiotiques/>.
- Rewatkar A. R., Wadher B. J. (2013). Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa- Biofilm formation Methods. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. Volume 8, Issue 5 (Nov. – Dec. 2013), PP 36-40.

## Références bibliographiques

---

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

---

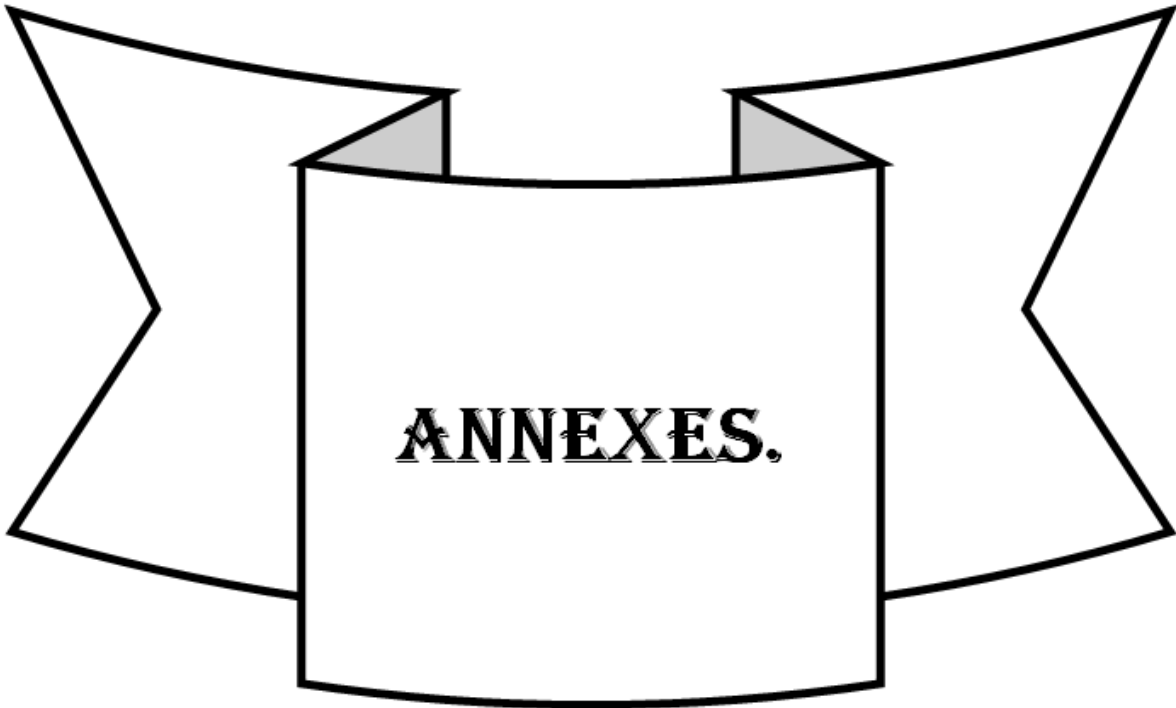
### S

- 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
- Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proc Natl Acad Sci USA. 91(1):197-20.

### 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.



**ANNEXES.**

### Annexes:

#### 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 *Pseudomonase 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 mannitol de mobilité:**

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

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

##### Solutions:

- Cristal violet (1%)
- Cristal viol. 1 g
- Eau distillée 100 ml
- Solution éthanol-acétone (75 : 25)
- Ethanol 75 ml

## Annexes

---

-Acétone 25 ml

Milieux de culture solides

➤ Milieu Rouge Congo Agar (RCA)

BHIB .37 g

Saccharose....50 g

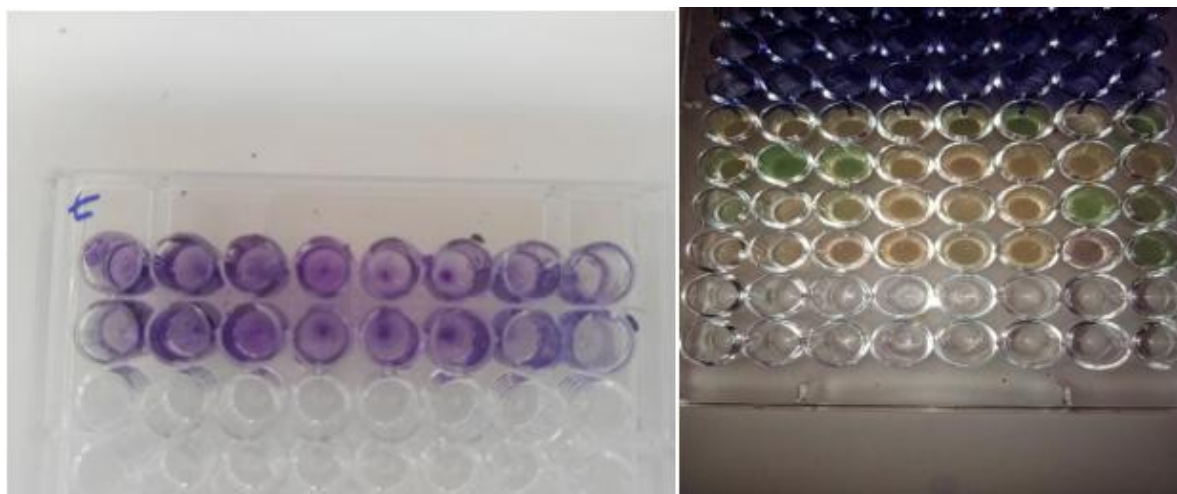
Agar...10 g

Rouge Congo ...0.8 g

Eau distillée ...1000 ml

pH= 7,4 Stérilisation à l'autoclave : 121°C pendant 15 minutes.

### **Annexe 2 :Detection de la formation de biofilm de *P.aeruginosa* après coloration au Cv.**



### **Annexe 3 : Phénotype de production de slime chez *P. aeruginosa* sur milieu RCA.**



**p1 et p2.**