



/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2023

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par :

*M<sup>elle</sup> YAZID Hafsa & M<sup>elle</sup> LAMRI Khawla*

*Thème*

**Isolement et caractérisation des souches de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant à partir de différentes niches écologiques.**

Soutenu le : 03/07/2023

Devant le jury composé de :

**Nom et Prénom**

**Grade**

*Mme METIDJI H*

*MCB*

*Univ. de Bouira*

*Président*

*Mme MEDBOUA C*

*MAA*

*Univ. de Bouira*

*Promotrice*

*Mme BENBARA T*

*MCB*

*Univ. de Bouira*

*Examineur*

**Année Universitaire : 2022/2023**

## ***Remerciement***

El hamdoulillah, nous remercierons Dieu, le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience de mener à terme ce travail.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude et remercier chaleureusement à madame **MEDBOUA Chafiaa** notre encadreur, pour avoir accepté d'encadrer notre travail, pour ses conseils, et son aide ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité, son assistance et son soutien indéfectible.

Mes remerciements s'adressent également à Madame **METIDJI** qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury. A Madame **Ben Bara** qui nous a fait l'honneur de participer à ce jury et d'examiner notre travail nous la remercions profondément.

Nous remercions particulièrement à tous les ingénieurs de laboratoire de la faculté

A tous les enseignants de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie de l'université de BOUIRA, qui ont fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui ; nous vous remercions du fond du cœur pour vos conseils lors de la conception de ce travail et le fait de nous avoir mis en contact avec notre superviseur

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

## ***Dédicaces***

Je remercie tout d'abord, **Allah**, le tout puissant et clément de m'avoir aidé à réaliser ce travail.

Je dédie ensuite ce fameux travail aux plus exceptionnels qui existent dans le monde Mes parents, **Djaloul** et **Nasira**

Toute ma gratitude pour leur soutien tout au long de mes études Qu'Allah Je les garde

Je dédie également à tous ceux qui m'aiment et spécialement

A mes sœurs **Mira** et **Fatma**

Je ne trouve pas les mots justes et sincères pour vous exprimer mes sentiments. Je vous remerciée pour tous les encouragements et le soutien moral tout au long de mes études

A toute ma famille **SAADI** et **YAZID** sans exception.

Pour Ma meilleure amie: **Feriel**

À Mon binôme **Khawla**

Enfin, je dédie ce travail à toute personne qui m'a aidé de le réaliser de près ou de loin Sans exception.

***Hafsa***

## **Dédicace**

*Après tant d'effort, et de travail, nous avons enfin arrivé à la fin...mais ceci grâce aux proches.*

*Pour cela je tiens à dédier ce travail en premier lieu :*

*Mon père **MOUSSA** et ma chère maman, ma reine **SABAH**, que mille dédicaces ne puissent exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices.*

*A mon unique sœur **HIBA**, je te remercie pour ton soutien, pour ta compréhension, tu m'as encouragé surtout dans les moments les plus difficiles.*

*A mes frères : mon chère **Ahmed**, mon bras droit et le petit **Djoude**, la nouvelle joie de notre maison.*

*Pour ses soutiens moraux et leurs conseils précieux tout au long de mes études.*

*A ma grande la famille **LAMRI** et **SAADI**.*

*A ma belle amie et ma binôme **Hafsa** et sa famille.*

*En fin je dédie aussi mon travail à mes professeurs qui nous ont donné le savoir et la volonté pour en être ce qu'on sera aux futures*

**KHAWLA**

Remerciements

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

## Première partie : Synthèse bibliographique

### Chapitre 01 : Généralité sur *Pseudomonas aeruginosa*

I. Historique .....	3
II. Habitat .....	3
III. Taxonomie et nomenclature.....	3
IV. Caractère bactériologique .....	4
1. Caractère phénotypique .....	4
1.1. Caractère morphologique .....	4
1.2. Caractères culturels .....	4
1.3. Caractère biochimique .....	5
1.4. Caractère antigénique .....	5
2. Caractère génotypique.....	6

### Chapitre 02 : Facteur de virulence et Pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa*

I. Facteurs de virulence .....	7
1. Les facteurs de virulence membranaire.....	7
1.1. Flagelle.....	7
1.2. Les pili de type IV et fimbriae .....	7
1.3. Lipopolysaccharide (LPS).....	8
2. Les facteurs de virulence extracellulaire .....	8
2.1. Les toxines sécrétées par le système de sécrétion de type I.....	8
2.2. Les protéines sécrétées par le système de sécrétion de type II.....	8
2.3. Les exotoxines sécrétées par le système de sécrétion de type III.....	9
2.4. Les exotoxines sécrétées par le système de sécrétion de type V .....	9
II. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et biofilm .....	10

### Chapitre 03 : La résistance du *pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

I. Mécanismes de résistance aux antibiotiques .....	12
1. Résistance naturelle .....	12

2. Résistance acquise .....	12
2.1. Mécanismes enzymatiques .....	12
2.2. Résistance aux aminosides .....	14
2.3. Résistance aux fluoroquinolones .....	14

## Deuxième partie : partie expérimentale

### Chapitre 01 : Matériels et méthodes

I. Lieu et durée du stage.....	16
II. Prélèvement et enrichissement.....	16
III. Isolement et identification des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	18
1. Isolement et purification .....	18
2. L'identification .....	18
2.1. Etude macroscopique et microscopique .....	18
2.2. Croissance à 4°C et 42°C .....	18
2.3. Recherche de l'oxydase .....	18
2.4. Recherche de catalase .....	18
3. Etude de la sensibilité de <i>p. aeruginosa</i> aux antibiotiques .....	18

### Chapitre II : Résultats et discussions

I. Prélèvement .....	21
I. Identification .....	22
1. Observation macroscopique et microscopique .....	22
2. Croissance à 4°C et 42°C .....	22
3. Recherche de l'oxydase.....	23
4. Recherche de catalase .....	23
II. Résultat de la sensibilité des souches de <i>P.aeruginosa</i> vis-à-vis des antibiotiques.....	24

Conclusion.....	28
-----------------	----

### Références bibliographiques

### Annexes

### Résumé

**ADH:** arginined'hydrolase

**AK:** Amikacine

**ATM:** Aztreonam

**BLSE :**  $\beta$ -lactamasea spectre élargi

**CA-SFM :** Le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**CAZ :** Ceftazidime

**CFM :** Cefixime

**CIP :** Ciprofloxacin

**CN :** Gentamicine

**CT :** Colistine sulphate

**EPS :** Exopolysaccharides

**EXOA :** Exotoxine A

**EXOT :** Exotoxine T

**EXOU:** Exotoxine U

**FEP :** Céfépime

**GTPase :** Guanosine triphosphate phosphatase

**IL-8 :** Interleukine8

**Las A:** ElastaseA

**Las B:** Elastase B

**LDC :** Lysines décarboxylase

**LPS :** Lipopolysaccharide

**NET :**Nétilmicine

**ODC :** Ornithine décarboxylase

**ONPG :** l'O-nitrophényl- $\beta$ -D-galactopyranoside

**PLP :** Protéines de liaison pénicillines

**PRL :** Piperacillin

**S. aureus :** Staphylococcus aureus

**TOB:** Tobramycine

**TP IV:** Type IV

**TR :** Récepteur Toll

**TTC :** Ticarcilline+Acide clavulanique

**T3SS :** Système de sécrétion type

<b>Figure 01 :</b> (A) Aspect des colonies « Large » sur Hektoen (B) Aspect des colonies « Small » sur gélose au sang (C) Aspect des colonies «Muqueuses » sur Mac Conkey .....	5
<b>Figure 02:</b> Facteurs de virulence chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	7
<b>Figure 03:</b> (A) Aspect des colonies de <i>P. aeruginosa</i> sur Hektoen (B) Aspect des colonies de <i>P. aeruginosa</i> sur King A (C) Aspect des colonies de <i>P. aeruginosa</i> sur Mac Conkey....	22
<b>Figure 04 :</b> Observation microscopique de <i>P.aeruginosa</i> après coloration de Gram (Grossissent 100).....	22
<b>Figure 05:</b> Résultats d'incubation à 42°C et 4°C sur King A .....	23
<b>Figure 06:</b> Résultat positif de l'oxydas.....	23
<b>Figure 07:</b> Résultat positif de catalase.....	23
<b>Figure 08:</b> La résistance des 20 souches isolées vis-à-vis des antibiotiques testés.....	24
<b>Figure 09 :</b> Une comparaissant des taux de résistance aux antibiotiques des souches d'origine envirommentale avec des souches d'origine hospitalière.....	25
<b>Figure 10:</b> Résultat d'antibiogramme d'une S06 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	25



<b>Tableau I:</b> Classification systématique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	4
<b>Tableau II:</b> Les différents échantillons collectés. ....	17
<b>Tableau III:</b> Listes des antibiotiques utilisés .....	20
<b>Tableau IV:</b> Répartition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en fonction du prélèvement .....	21

#### LISTES DES TABLEAUX DES ANNEXES

**Tableau I :** Les matériels et les matériels biologique utilisés.

**Tableau II :** les codes des souches isolées.

**Tableau III:** Les diamètres de résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines.

**Tableau VI :** Les diamètres de résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux autres familles d'antibiotique.

# ***Introduction***

*Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie à coloration de Gram négative, se distingue par son omniprésence au sein de multiples environnements. Elle est reconnue comme l'un des principaux agents pathogènes opportunistes impliqués dans des infections nosocomiales graves. De plus, en tant que micro-organisme polyvalent, elle démontre une remarquable capacité à tolérer des conditions défavorables. Ces diverses propriétés lui confèrent la faculté de s'adhérer et de subsister sur de multiples surfaces biotiques et abiotiques, favorisant ainsi l'établissement d'infections, notamment chez les patients immunodéprimés (Engel et al., 2009). Cette bactérie est associée à un taux de mortalité élevé et occupe la sixième position parmi les agents pathogènes les plus fréquemment liés aux infections nosocomiales (Weiner et al., 2016).

La pathogénie de *P. aeruginosa* est attribuée à la production de nombreux facteurs de virulence membranaires et extracellulaires. Ces facteurs de virulence sont impliqués dans les différentes étapes du processus d'infection et permettent ainsi à ce germe de coloniser son hôte (Pier et al., 1991; Van Delden et al., 1998).

Un vaste ensemble de souches de *P. aeruginosa* se caractérise par leur résistance à diverses catégories d'antibiotiques et d'agents antibactériens, ce qui pose un défi majeur dans le contrôle des infections, étant donné le nombre limité de molécules généralement efficaces contre cette bactérie (Mohanty et al., 2020). *P. aeruginosa* présente une résistance intrinsèque à la plupart des antibiotiques en raison de la présence de céphalosporinase chromosomiques AmpC, de la faible perméabilité de sa membrane externe aux agents antimicrobiens et de l'expression de pompes à efflux (Belodu et al., 2012). Outre cette résistance intrinsèque, *P. aeruginosa* possède une extraordinaire capacité à développer des résistances acquises parfois simultanément à plusieurs classes d'antibiotiques (Rice, 2008).

Il convient également de mentionner la capacité de *P. aeruginosa* à former des biofilm, qui représente un autre facteur majeur impliqué dans les infections chroniques et constitue un déterminant essentiel de sa virulence, étant étroitement lié à la résistance aux antibiotiques. Les biofilm offrent un environnement protecteur aux bactéries, rendant extrêmement ardu et onéreux leur traitement par des agents antimicrobiens. Cette caractéristique explique la persistance des infections prolongées causées par ce pathogène (Baker et al., 2016).

C'est dans ce but que notre travail a été réalisé dans le cadre de la préparation de mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master, et qui consiste à isoler des

souches de *P.aeruginosa* à partir de différentes niches écologiques et à étudier leurs sensibilités aux antibiotiques.

Notre travail contient deux parties: la première partie théorique porte principalement un rappel sur *P. aeruginosa* leurs facteurs de virulences et les mécanismes de résistances aux antibiotiques. La deuxième partie qui consiste à présenter la partie expérimentale qui représente le matériel et les méthodes ainsi que les principaux résultats.

*Première partie*

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

# **Chapitre 01**

## **Généralité sur *Pseudomonas aeruginosa***

## I. Historique

*Pseudomonas aeruginosa*, également connu sous le nom de bacille pyocyanique, a été découvert par Carle Gessard (1850-1925) en 1882 lors de la Première Guerre mondiale, où il était responsable de surinfections des plaies chez les soldats. En tant que pharmacien militaire, Gessard a réalisé les premières descriptions et isolations de *P. aeruginosa*. Il a consacré de nombreuses recherches à l'étude de la production de pigments caractéristiques par cette bactérie infectieuse, ce qui colorait les pansements des plaies des soldats infectés. Ces pigments, appelés pyocyanine, ont facilité l'identification de la bactérie en culture, d'où le terme encore utilisé de bacille pyocyanique (**Gessard, 1984**).

Depuis ces premières descriptions, *P. aeruginosa* a acquis une place prépondérante dans la pathologie humaine. Bien qu'il soit un saprophyte dans l'environnement aquatique, il occupe désormais une position majeure dans les établissements de santé, étant responsable d'une grande partie des infections nosocomiales (**Yétérien, 2010**).

## II. Habitat

*Pseudomonas aeruginosa*, en tant que microorganisme omniprésent, fait preuve d'une flexibilité métabolique considérable et présente des exigences nutritionnelles minimales. Cela lui permet de coloniser avec succès diverses niches écologiques, caractérisées par des conditions de vie variées (**Spiers et al., 2000**). On le retrouve fréquemment dans des environnements humides tels que les piscines, les jacuzzis, les douches, les réservoirs de toilettes, les siphons d'évier, les robinets, ainsi que dans le sol (**Mérens et al., 2013**).

Chez l'être humain, *P. aeruginosa* peut se trouver à l'état commensal, manifestant une préférence pour les zones corporelles humides telles que le tube digestif, l'oropharynx, le nez, les oreilles, le tractus génital et les plis axillaires (**Davies et al., 1998**).

L'hôpital représente une niche écologique propice au développement de *P. aeruginosa* où cette bactérie peut être isolée à partir de dispositifs et d'équipements médicaux et chirurgicaux tels que des matelas, des endoscopes, des cathéters, des nébuliseurs, des humidificateurs et des respirateurs. Elle peut également être présente dans les siphons, les douches, les toilettes (**Silby et al., 2011**).

## III. Taxonomie et nomenclature

Son appellation provient de la combinaison des termes grecs "pseudo" (signifiant similaire ou imitation) et "monas" (désignant une unité), tandis que le mot latin "aeruginosus"

(couvert de rouille) fait référence à la coloration verdâtre observée sur les ulcères infectés par cette bactérie.

Le genre *Pseudomonas* comprend un ensemble de 332 espèces, parmi lesquelles *P. aeruginosa* est l'espèce de référence (Eyquem et al., 2000).

**Tableau I:** Classification systématique de *Pseudomonas aeruginosa* (Eyquem et al., 2000)

<b>Domain</b>	Bacteria
<b>Phylum</b>	Proteobacteria
<b>Classe</b>	Gammaproteobacteria
<b>Ordre</b>	Pseudomonadales
<b>Famille</b>	Pseudomonadaceae
<b>Genre</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Espèce</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

#### IV. Caractère bactériologique

##### 1. Caractère phénotypique

###### 1.1. Caractère morphologique

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à coloration de Gram négative, qui ne forme pas de spores et a un besoin strict d'oxygène, non capsulée. Elle se présente sous la forme de bacilles, mesurant de 1 à 5 µm de longueur et de 0,5 à 1 µm de largeur. Ils sont dotés d'un flagelle unique situé à une extrémité, ce qui leur confère une grande mobilité (Vander et al., 1984).

###### 1.2. Caractères cultureux

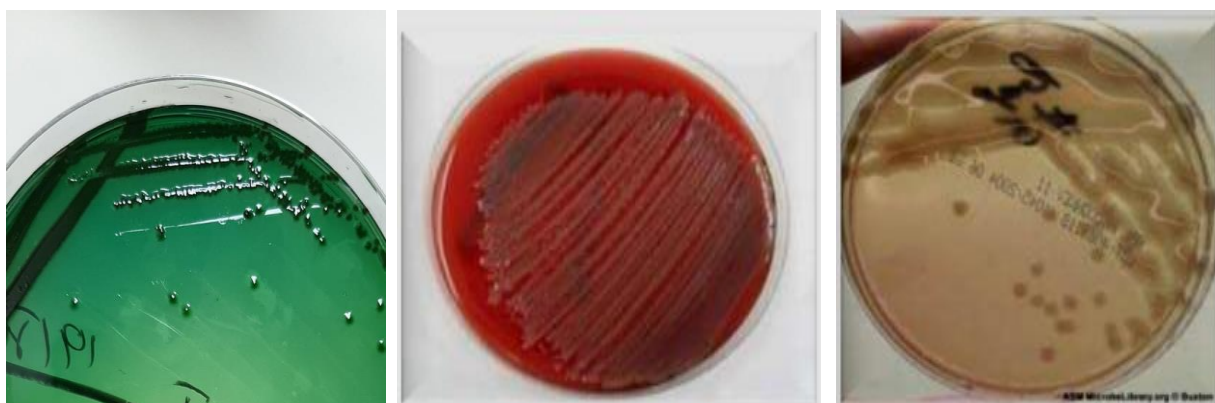
Le bacille pyocyanique est une bactérie aux exigences nutritionnelles restreintes. Elle se développe aisément sur des milieux synthétiques simples et affiche une croissance rapide en 24 heures à une température de 37°C. Sa plage de croissance s'étend de 4 à 42°C, avec un pH optimal de 7,2. *P. aeruginosa* est une bactérie strictement aérobie, mais elle est capable d'utiliser les nitrates en conditions d'anaérobiose. Une de ses caractéristiques distinctives est son odeur florale, rappelant celle de la fleur de seringia (orthoaminoacétophénone). L'isolement de cette bactérie est réalisé sur des milieux ordinaires ou gélose au sang, milieux sélectifs comme le cétrimide qui possède des inhibiteurs des bactéries Gram positif, Les milieux King A et King B sont également employés pour favoriser la production des pigments



spécifiques de cette bactérie, tels que la pyocyanine sur le milieu King A et la pyoverdine sur le milieu King B (Olivier, 2000).

Trois types de colonies peuvent être observées simultanément ou de manière isolée :

- **Colonies *la* (larges) :** de taille moyenne, d'aspect irrégulier et rugueux métallisé, (Meybeck et al., 2003 ; Veron et al., 2016). Elles caractérisent la morphotype sauvage, en opposition aux variant morphologiques identifiés au cours d'infections chroniques (Malhotra et al., 2019).
- **Colonies *sm* (small) :** petites, régulières et lisses (Veron et al., 2016) largement décrites durant les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* (Malone, 2015).
- **Colonies *M* (muqueuses) :** aspect muqueux, lisse et bombé, présentent des caractéristiques proches de celles des colonies Small (Malhotra et al., 2019).



(A)

(B)

(C)

**Figure 01 :** (A) Aspect des colonies « Large » sur Hektoen (B) Aspect des colonies « Small » sur gélose au sang (C) Aspect des colonies «Muqueuses » sur Mac Conkey

### 1.3. Caractère biochimique

*Pseudomonas aeruginosa* se distingue par son métabolisme oxydatif, lui conférant la capacité de dégrader des composés complexes tels que les protéines et les polysaccharides (Palleroni, 1984 ; Mezaache, 2012 ; Boudouda, 2015). Il est capable de réduire les nitrates en nitrites, et il présente des caractéristiques telles qu'une arginine-dihydrolase et une lécithine. De plus, il est capable de produire de l'ammoniac par la dégradation de l'acétamide (Memdouh et al., 2018).

Cette bactérie présente un résultat positif au test de catalase, tandis que les tests de décarboxylase de la lysine (LDC), de la décarboxylase de l'ornithine (ODC), de l'indole et de la bêta-galactosidase donnent des réponses négatives (Boussouf et al., 2020).

#### 1.4. Caractère antigénique

*Pseudomonas aeruginosa* présente deux types d'antigènes, à savoir un antigène somatique O qui est un lipopolysaccharide associé à une protéine constituant la paroi cellulaire. Cet antigène joue un rôle crucial dans la virulence de la bactérie ainsi que dans la réponse immunitaire (Chaibdraa et al., 2008), et un antigène flagellaire H protéique, Thermolabile, permettant un typage qui en combinaison avec le typage O, permet de reconnaître au moins 25 sérovars (Zidoune et al., 2020).

#### 2. Caractère génotypique

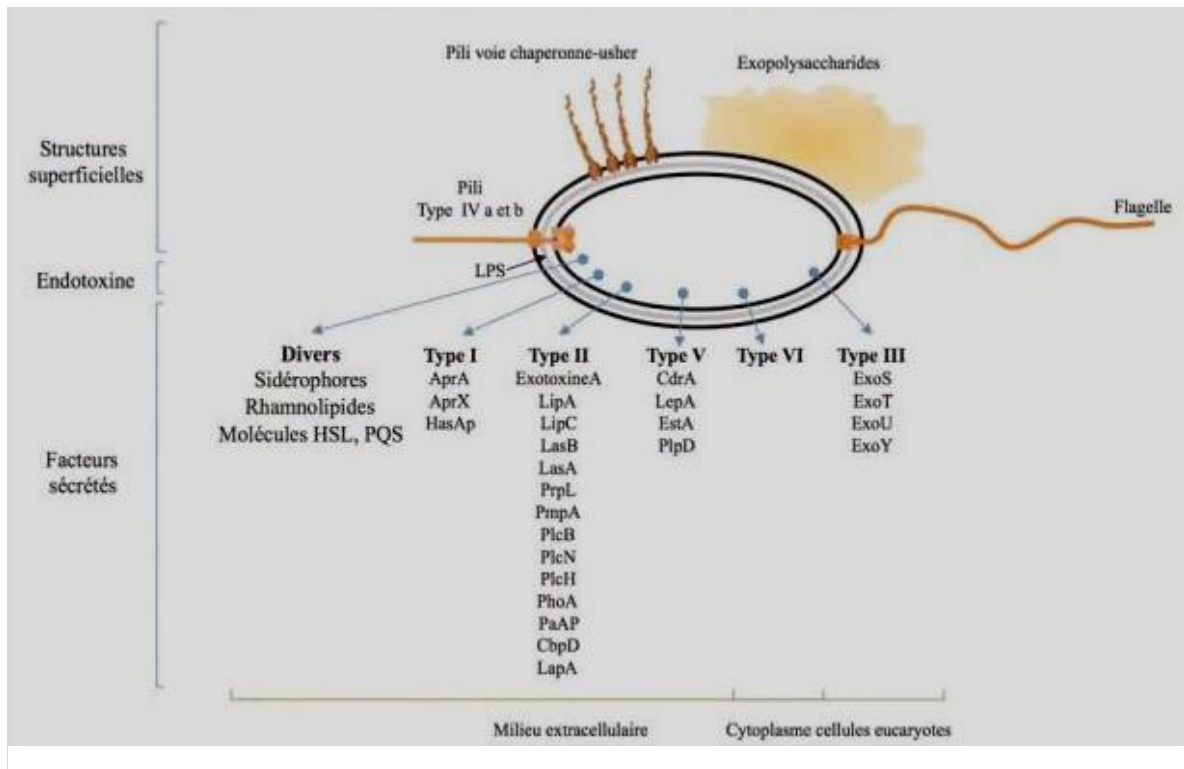
Le séquençage complet du génome de la souche de référence PAO1 de *P. aeruginosa* a été réalisé par Stover et al. En 2000 cette étude a révélé qu'il s'agit du génome bactérien le plus volumineux à ce jour, avec une taille de 6,3 millions de paires de bases. Le génome de PAO1 contient 5 570 cadres de lecture ouverts, dont la plupart sont riches en Guanine et Cytosine (GC) avec un taux de 66,6% (Stover et al., 2000). Lorsque les autres souches de *P. aeruginosa* ont été séquencées, une comparaison a montré que le génome de cette bactérie comprend un ensemble commun d'environ 5000 gènes, qui est ensuite modulé dans chaque souche par une combinaison de gènes accessoires conférant un répertoire génétique spécifique à chaque souche (Mathee et al., 2008 ; Qiu et al., 2009).

# Chapitre02

## Facteurs de virulence de *Pseudomonas* *aeruginosa*

## I. Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* revêtent une importance cruciale dans les processus de colonisation, de survie bactérienne et d'invasion tissulaire. Ces facteurs peuvent être classés en deux catégories principales : d'une part, les facteurs de virulence cellulaires ou liés à la membrane et d'autre part, les facteurs de virulence sécrétés (Ben Hadj et al., 2011).



**Figure 02:** Facteurs de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa* (Ben Hadj et al., 2011).

### 1. Les facteurs de virulence membranaire

*Pseudomonas aeruginosa* exhibe à sa périphérie des structures qui présentent des similitudes avec celles constatées chez d'autres bactéries de type Gram négatif (Giraud et al., 2010).

#### 1.1. Flagelle

*Pseudomonas aeruginosa* est pourvu d'un unique flagelle polaire, lequel revêt une importance capitale pour garantir sa mobilité. Le flagelle assume diverses fonctions au sein de *P. aeruginosa*, notamment en lui conférant un chimiotactisme spécifique et en jouant un rôle prépondérant dans l'adhérence cellulaire et facilite également l'acquisition de nutriments. La mobilité conférée par le flagelle chez *P. aeruginosa* se manifeste principalement sous la forme d'un mouvement de type « swimming » (Belas, 2014). Le flagelle contribue à la virulence en déclenchant une réponse inflammatoire par le biais de

l'interaction avec les récepteurs Toll, TR5 et TR2. Cela conduit à la production d'interleukine 8, d'interleukine 6 et de mucine. De plus, il joue un rôle crucial dans les premières étapes du développement du biofilm bactérien (**Ben Hadj et al., 2011**).

### 1.2. Les pili de type IV et fimbriae

Les fimbriae, également connus sous le nom de pili de type IV, revêtent une importance majeure en tant qu'adhésines principales chez *P. aeruginosa*. Ils sont également présents chez de nombreuses autres espèces bactériennes Gram négatif. Les pili de type IV confèrent à *P. aeruginosa* la capacité d'adhérer aux surfaces et favorisent l'agrégation bactérienne. En collaboration avec le flagelle les pili exercent une fonction capitale dans la dispersion des bactéries, assumant un rôle prédominant dans la mobilité de type "twitching". Cette mobilité découle de l'enchaînement systématique des phases d'extension, d'attachement et de rétraction des pili (**Burrows , 2012**).

Au sein de *P. aeruginosa*, ces éléments d'adhérence revêtent une importance cruciale pour la fixation aux surfaces inanimées telles que le verre et le plastique, ainsi que pour la formation du biofilm (**Giraud et al., 2012**).

### 1.3. Lipopolysaccharide

Les lipopolysaccharide sont considérés comme l'un des principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. Ils confèrent à cette bactérie une protection contre la lyse induite par le sérum de l'hôte. Le LPS est une endotoxine qui peut provoquer une activation excessive du système immunitaire, conduisant potentiellement à un choc septique et dans les cas les plus graves au décès. Les LPS sont également impliqués dans la modulation de la réponse inflammatoire et dans l'interaction de la bactérie avec les tissus de l'hôte. La structure du LPS se compose de trois composants distincts : le lipide A, le cœur oligosaccharidique et l'antigène O (**Pier , 2007 ; Lam et al., 2011**).

## 2. Les facteurs de virulence extracellulaire

### 2.1. Les toxines sécrétées par le système de sécrétion de type I

#### 2.1.1. Protéase alcaline

La protéase alcaline est une métalloprotéase de 50 kDa, est responsable de la dégradation de la fibrine. Son action entraîne une forte inhibition de la réponse du système immunitaire inné contre *P. aeruginosa*. Par ailleurs, la bactérie produit également un inhibiteur spécifique de la protéase alcaline, appelé AprI, qui est sécrété dans le périplasme. Au sein de cette région, AprI assure la protection des protéines périplasmiques contre

l'activité de la protéase alcaline avant qu'elle ne soit sécrétée à l'extérieur de la bactérie (Laarman, 2012).

## 2.2. Les protéines sécrétées par le système de sécrétion de type II

### 2.2.1. L'exotoxine A

L'exotoxine A constitue la protéine toxique la plus virulente produite par *P. aeruginosa*. Sa synthèse est induite à la fois par l'interaction entre cette dernière et son hôte, ainsi que par un environnement faible en calcium. Une fois à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte, l'ExoA inhibe la synthèse des protéines. Par conséquent, cette protéine joue un rôle déterminant dans la lésion des tissus présents au niveau du site inflammatoire, tout en exhibant des propriétés immunosuppressives (Michalska et al., 2015).

### 2.2.2. L'élastase

L'élastase composée de deux enzymes protéolytiques, à savoir LasA et LasB, est un élément crucial. L'enzyme LasB une métalloprotéase à zinc est sécrétée par le système de sécrétion de type II et joue un rôle significatif dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*. LasA est une protéase à sérine qui agit en collaboration avec LasB. Elle présente la capacité de moduler les défenses de l'hôte (Kessler et al., 2013).

### 2.2.3. Les phospholipases C

Les phospholipases sont des enzymes extracellulaires de grande taille, d'environ 80 kDa, qui requièrent la présence d'ions zinc pour leur activité enzymatique. Elles présentent différentes spécificités de substrats, avec une cible privilégiée sur la partie lipidique de la membrane des cellules eucaryotes. Ces enzymes ont la capacité de déstabiliser la membrane des cellules hôtes entraînant ainsi leur mort cellulaire (Solbi, 2013 ; Memdough et al., 2018).

### 2.2.2. La protéase IV

La protéase IV une endoprotéase de type sérine pesant 26 kDa présente la capacité de dégrader diverses protéines de l'organisme hôte telles que le fibrinogène, le plasminogène et les immunoglobulines G, les composants du système du complément ainsi que l'épithélium cornéen. Cette activité protéolytique peut entraîner des hémorragies (Hoge et al., 2010).

## 2.3. Les exotoxines sécrétées par le système de sécrétion de type III

Il confère à la bactérie la capacité d'introduire directement ses toxines dans le cytoplasme des cellules cibles:

- **L'exoenzyme S** : Le caractère pathogène de l'exoenzyme S est principalement attribué à l'activité de son ADP ribosyltransférase, qui perturbe l'organisation normale du cytosquelette. Cette enzyme présente une double fonctionnalité à savoir une activité GTPase et une activité ADP ribosyltransférase. Elle contribue à l'inflammation pulmonaire en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires et la prolifération des lymphocytes (Ariane, 2017 ; Gougeon, 2017).
- **L'exoenzyme T** : sa structure présente une bifonctionnalité similaire à celle de l'exoenzyme S, avec des similitudes homologiques. Cependant, son activité ADP ribosyltransférase est considérablement plus faible que celle de l'exoenzyme S, ce qui la catégorise comme une cytotoxine de moindre importance (Ariane, 2017 ; Gougeon, 2017).
- **L'exoenzyme U** : son potentiel cytotoxique dépasse celui de l'exoenzyme S. Elle démontre une aptitude à hydrolyser les acides gras membranaires et est étroitement associée à la dégradation du tissu pulmonaire, engendrant ainsi des pathologies pulmonaires sévères (Ariane, 2017 ; Gougeon, 2017).
- **L'exoenzyme Y** : ce cytotoxine induit la formation de trous intercellulaires et altère l'intégrité de l'endothélium pulmonaire (Ariane, 2017 ; Gougeon, 2017).

## 2.4. Les exotoxines sécrétées par le système de sécrétion de type V

### 2.4.1. Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des composés lipidiques extracellulaires qui possèdent une résistance à la chaleur. Ils sont amphiphiles et dotés de propriétés détergentes envers les phospholipides présents dans le surfactant pulmonaire. Ils jouent un rôle crucial dans la formation et la préservation des biofilm (Nickzad et al., 2014).

### 2.4.2. Les Chromophores

- **La pyocyanine**

La pyocyanine est un pigment de couleur bleu-vert (Lau et al., 2004) exerce une action inhibitrice sur la réponse immunitaire des cellules hôtes (Allen et al., 2005 ; Kipnis et al., 2006). Elle contribue ainsi à l'induction d'un stress oxydatif et conduit à la nécrose des tissus respiratoires (Nikaido , 1994 ; O'Malley et al., 2004).

- **La pyoverdine**

La pyoverdine est une petite molécule impliquée de manière cruciale dans la captation du fer, qui est un élément essentiel pour le métabolisme de *P. aeruginosa*. De plus elle exerce

une fonction régulatrice dans la libération de certains facteurs de virulence (**Takase et al., 2000 ; Lamont et al., 2002 ; Kipnis et al., 2006**).

## **II. *Pseudomonas aeruginosa* et biofilm**

La majorité des micro-organismes adoptent un mode de vie favorisant l'ancrage de la population bactérienne à une surface (état sessile), plutôt que d'exister librement et isolée dans l'environnement (état planctonique). Ce processus d'attachement à une surface représente une stratégie vitale permettant à la bactérie de s'établir et de coloniser un environnement particulier. L'état planctonique, quant à lui peut être considéré comme une phase de transition durant laquelle la bactérie se déplace d'une surface à une autre. Après leur adhérence à une surface, les bactéries entament la mise en place et le développement d'une structure communautaire organisée communément appelée "biofilm". Ce terme a été introduit par William Costerton (**Costerton et al., 1999**).



# **Chapitre 03**

## **La Résistance du *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques**

## I. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques joue un rôle crucial dans la progression de la maladie causée par *P. aeruginosa* quel que soit le type d'infection. Néanmoins, des niveaux de résistance plus élevés ont été constatés chez les bactéries lorsqu'il s'agit d'une infection chronique (Balasubramanian et al., 2013).

La prise en charge de *P. aeruginosa* est complexe en raison de sa diversité de mécanismes de résistance (Lister et al., 2009). Cette bactérie présente à la fois une résistance intrinsèque codée par son chromosome et une résistance acquise génétiquement, ce qui la rend moins sensible aux principales classes d'antibiotiques telles que les  $\beta$ -lactamines, les aminosides, les quinolones et les polymyxines (Llanes et al., 2013).

### 1. Résistance naturelle

Le bacille pyocyanique se caractérise principalement par sa résistance naturelle à de nombreux antibiotiques et sa capacité exceptionnelle à acquérir de nouvelles résistances (Mérens , 2011). La résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* découle de la conjonction de divers mécanismes : une perméabilité limitée de la membrane externe, la présence de multiples pompes d'efflux activables, la production de biofilm ainsi que la production constante d'une céphalosporinase et d'une pénicillinase induite. Ces mécanismes ont pour effet d'inactiver les antibiotiques ou de les empêcher d'atteindre leur cible intracellulaire (Chastre, 2002).

### 2. Résistance acquise

Les résistances acquises résultent d'une augmentation de l'imperméabilité de la membrane externe, de modifications des porines, d'altérations des récepteurs aux antibiotiques et de la production d'enzymes inactivantes (Elmeskini, 2011). La survenue de nouvelles résistances chez *P.aeruginosa* est souvent associée à l'acquisition de matériel génétique étranger tel que des plasmides, des transposons et des intégrons (Mérens et al., 2012).

#### 2.1.Mécanismes enzymatiques

##### 2.1.1. Résistance aux bêta-lactamines

###### a) Résistance par hyperproduction de la céphalosporine AmpC

Les céphalosporinase font partie de la catégorie C de la classification d'Ambler, et sont considérées comme des enzymes à base de sérine. Le mécanisme prédominant implique une augmentation continue de la production de l'enzyme AmpC. Cette surproduction constitutive

de l'enzyme AmpC a un impact significatif sur l'activité de plusieurs antibiotiques notamment la ticarcilline, l'association pipéracilline/tazobactam, la ceftazidime, l'aztréonam, et dans une moindre mesure, le céfépime (Bagge et al., 2002).

#### b) Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE)

Les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi sont des enzymes qui hydrolysent la majorité des  $\beta$ -lactamines (Ruppé, 2011). Elles sont de nature plasmidique et théoriquement neutralisées par les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Elmeskini, 2011). Jusqu'à présent la production de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi par la souche reste limitée. Parmi celles-ci cinq types d'enzymes de classe A (TEM, SHV, PER, VEB et GES) ont été identifiés chez *P. aeruginosa* (Ramoul, 2014).

Les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont classifiées selon les catégories A ou D d'après la classification d'Ambler. Elles sont spécifiquement définies comme des  $\beta$ -lactamases capables d'hydrolyser les carboxypénicillines, les uréidopénicillines, ainsi que les céphalosporines à spectre étendu telles que la ceftazidime, la céfépime. De plus, elles peuvent également hydrolyser l'aztréonam. Toutefois, ces enzymes peuvent être inhibées par l'acide clavulanique, un inhibiteur des  $\beta$ -lactamases (Sefraoui, 2015).

#### c) Les carbapénémases

Les carbapénémases, des protéines métallo-enzymatiques, se trouvent à la fois dans le chromosome et les plasmides, ce qui leur permet de conférer une résistance aux carboxypénicillines, aux céphalosporines et à l'aztréonam, ainsi qu'à un degré modéré de résistance à l'imipénème. Les carbapénémases sont particulièrement redoutables en raison de leur capacité à engendrer une résistance significative et étendue à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines (Elmeskini, 2011).

De manière plus récente, une nouvelle  $\beta$ -lactamase de Classe D présentant une activité carbapénémase, connue sous le nom d'OXA-198 a été identifiée en Belgique chez des souches de *P. aeruginosa* (El Garch et al., 2011).

### 2.2.Mécanismes non enzymatiques

#### a) Pompe à efflux

Il s'agit de systèmes complexes composés de trois éléments qui facilitent l'expulsion de molécules de l'espace périplasmique vers l'environnement extérieur (Sefraoui, 2015). Les bactéries utilisent ces pompes à efflux comme mécanismes de défense et de détoxification

contre les substances toxiques présentes dans leur environnement. En outre, il est reconnu que les pompes à efflux jouent un rôle dans l'élimination des métabolites endogènes ou dans la sécrétion de produits cellulaires (Aires, 2011).

#### **b) Imperméabilité membranaire**

Au sein des bactéries à Gram négatif, les porines bactériennes jouent un rôle essentiel en tant que voies principales de pénétration pour les antibiotiques couramment utilisés tels que les  $\beta$ -lactamines et les fluoroquinolones. Ces protéines canaux localisées dans la membrane externe, sont dotées d'un site de liaison spécifique aux carbapénèmes, connu sous le nom d'OprD, qui permet la pénétration sélective de l'imipénème. Toute modification quantitative ou fonctionnelle de ces porines conduit à une réduction de la diffusion des antibiotiques qui empruntent cette voie d'entrée (Bouguenoun, 2017).

#### **c) Modification de la cible**

La capacité des  $\beta$ -lactamines à se lier de manière efficace à leurs cibles, les protéines de liaison aux pénicillines (PLP), peut être altérée par des mutations génétiques qui surviennent au niveau des gènes chromosomiques responsables de la production de nouvelles PLP. Ces mutations ont la capacité d'entraîner des modifications à la fois quantitatives et qualitatives des PLP, ce qui se traduit par une réduction de leur affinité envers les  $\beta$ -lactamines (Strateva et al., 2009).

### **2.3.Résistance aux aminosides**

Les aminosides sont des agents qui inhibent la synthèse protéique des microorganismes en se liant à la sous-unité ribosomale bactérienne 30S, ce qui entraîne une perturbation de l'initiation du processus de synthèse protéique (Pachori et al., 2019). Le principal mécanisme de résistance observé dans les souches cliniques vis-à-vis des aminoglycosides est la présence d'enzymes modifiant ces antibiotiques. Ces enzymes, généralement codées par des plasmides, sont capables d'ajouter un radical phosphate, adényle ou acétyle à la molécule de l'aminoglycoside, réduisant ainsi son affinité de liaison avec la sous-unité ribosomale 30S de la cellule bactérienne (Llano et al., 2002). Un autre mécanisme de résistance aux aminosides repose sur la capacité de modifier la structure ribosomale de la cellule bactérienne sur lequel il se fixe, l'ARN 16S. Cette modification spécifique implique la méthylation de la sous-unité 16S par des enzymes connues sous le nom de méthylases (Trigueros, 2015).

#### 2.4. Résistance aux fluoroquinolones

Les quinolones agissent en inhibant la synthèse de l'ADN bactérien en ciblant deux enzymes essentielles : l'ADN topoisomérase de type II également connue sous le nom d'ADN gyrase, et l'ADN topoisomérase de type IV (**Montalegre, 2016**). Cependant, des mutations par substitution d'acides aminés peuvent survenir dans les régions de fixation des antibiotiques au sein de ces deux enzymes rendant ces dernières insensibles à l'action des quinolones. La résistance aux fluoroquinolones, principalement due à des mutations représente un facteur prédominant chez les souches cliniquement importantes de *P. aeruginosa* (**Lee et al., 2005**).

# **Partie expérimentale**

# *Chapitre 01*

## **Matériel et méthode**

**I. Lieu et durée du stage**

Notre recherche a été menée au sein du département de biologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre de l'Université de Bouira, sur une période allant du 1 mars au 30 mai 2023.

Les matériels utilisés et les compositions des milieux de cultures sont présentés dans l'annexe N°1.

**II. Prélèvement et enrichissement**

Les prélèvements ont été fait à partir des différentes niches écologiques à savoir le sol, l'eau et le milieu hospitalier tel que l'environnement hospitalier et les prélèvements biologiques. Pour les prélèvements du sol, une quantité de 10g ont été prélevé à l'intérieur d'un cercle de 15 cm de profondeur. Ainsi que pour les prélèvements des eaux un volume de 10ml a été prélevé dans des flacons en verres. de plus les prélèvements dans le milieu hospitalier ont été fait par écouvillonnage et par la récupération des prélèvements biologiques. Le détail sur les sites des prélèvements a été présenté dans le tableau(II).



**Tableau II:** Les différents échantillons collectés.

Niche écologique		Les échantillons
<b>Environnement</b>	<b>Sol</b>	-Sol des légumineuses(Haricot, pois, Géranium) Sol de Blé, flacons d'avoine ,Sol de laurier Sol des Fruits (raisins, poivre) Sol des légumes (poivron, ail, oignon, salade, olive,) -Les graines : graines de lin, fenugrec, romarin, cannelle, cumin, Coriandre, carvi, cresson, cardamome, pin d'Alep, nigelle, oignon grains, aneth....
	<b>Eau</b>	Piscine (Grande/petite), Citerne, l'eau de maison ancien, Barrage Sed lakhal, Lac de Bir Ghbalou, lac de foret riche, , Fontaines (SNV/Sociaux\ fac centrale), Aquarium ,
<b>Milieu hospitalier</b>	<b>Environnement hospitalier</b>	-L'eau de l'hôpital -Service réanimation : blouses, palliasses, murs, les appareils, matériels médicaux. -Service pédiatrie : murs, matériels médicaux, lits, couverture , couveuse -Service médecine femme : chariot, chauffage, murs, lits, matériels. -Service des urgences : paillasse, masque, lit , lavabo, toilette , plateaux , ciseaux , la blouse -Service maternité : les murs , sanitaire
	<b>Prélèvement biologique</b>	Prélèvement de sang, urine, pus

L'enrichissement a été réalisée sur milieu liquide, à savoir 1g de sol ou 1ml de l'eau ont étéensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif.

Pour les prélèvements de surface, l'écouvillon a été introduit directement dans le bouillon nutritif incubé à 37°C pendant 24h.

### III. Isolement et identification des souches de *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1. Isolement et purification

A partir des tubes positifs de bouillon nutritif, une goutte a étéensemencée sur différents milieux à savoir King A et Hektoen par des stries serrées, puis l'incubation se fait à 37°C pendant 24h-48h.

La purification a été réalisée sur le milieu Mac Conkey par des repiquages successifs jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes et homogènes.

#### 2. L'identification

Pour identifier les souches de *P. aeruginosa* des tests microbiologiques et biochimiques ont été réalisés.

##### 2.1. Etude macroscopique et microscopique

Il met en évidence la forme, la taille, la couleur, l'aspect, l'odeur et la pigmentation des colonies. Cela nous permet de sélectionner les seules colonies qui présentent les caractéristiques culturelles de *P.aeruginosa*.

L'étude microscopique a été réalisée par une coloration de Gram, qui est une coloration différentielle qui permet de classer les bactéries en deux groupes en fonction de la structure de leurs parois.

##### 2.2. Croissance à 4°C et 42°C

Les souches pures sontensemencées sur le milieu King A puis incubés à 42°C et à 4°C.

##### 2.3. Recherche de l'oxydase

L'activité oxydase de *P. aeruginosa* peut être attribuée à l'aide de la méthode des disques en suivant le protocole suivant : une colonie de la bactérie est déposée sur un disque oxydase doit être déposée sur un milieu solide à l'aide d'une pipette pasteur.

##### 2.4. Recherche de catalase

La catalase est une enzyme qui favorise la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en libérant de l'oxygène. Le test consiste à déposer une colonie provenant d'une

culture récente sur une lame préalablement humidifiée avec une goutte d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### 3. Etude de la sensibilité de *P. aeruginosa* aux antibiotiques

La sensibilité des souches de *P.aeruginosa* a été testée par la technique de l'antibiogramme par diffusion sur gélose Muller Hinton en suivant les recommandations du CA-SFM.2018.

#### 3.1. La technique

##### ➤ Préparation de la suspension bactérienne

En utilisant une pipette Pasteur stérile, une colonie soigneusement isolée est prélevée à partir d'une culture de 18 à 24 heures. Elle est ensuite transférée dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. La suspension est homogénéisée de manière à obtenir une densité équivalente à 0,5 sur l'échelle de Mac Farland, correspondant à une densité optique de 0,08 à 0,13 à une longueur d'onde de 625 nm.

##### ➤ La technique d'ensemencement

Dans les 15 minutes suivant l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum, tremper un écouvillon de coton dans la suspension. Presser fermement contre la paroi intérieure du tube juste au-dessus du niveau du liquide, tourner l'écouvillon pour enlever les liquides excédentaires. Étaler à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte à environ 60°C après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum. Enfin, écouvillonner partout autour du bord de la surface de la gélose.

Les disques choisis sont posés à l'aide d'une pince stérile en appliquant une pression pour assurer un contact complet du disque avec la gélose Muller Hinton.

Dans notre expérience nous avons utilisés 11 antibiotiques de différentes familles (présenter dans le tableau III).

L'interprétation eu sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie 2018

**Tableau III:** Listes des antibiotiques utilisés

Abréviation	Antibiotique	Famille	Charge
PRL	Piperacillin	$\beta$ – lactamines	30 $\mu$ g
ATM	Aztréonam		30 $\mu$ g
TTC	Ticarcilline+Acide clavulanique		30 $\mu$ g
CAZ	Ceftazidime		30 $\mu$ g
FEP	Céfépime		30 $\mu$ g
CN	Gentamicine	Aminosides	120 $\mu$ g
AK	Amikacine		30 $\mu$ g
TOB	Tobramycine		10 $\mu$ g
NET	Nétilmicine		30 $\mu$ g
CIP	Ciprofloxacine	Quinolones	5 $\mu$ g
CT	Colistine sulphate	Polymyxines	10 $\mu$ g

## *Chapitre 02*

# **Résultat et Discussion**

### I. Prélèvement

Les souches de *P. aeruginosa* ont été isolées parmi les 100 prélèvements effectués dans trois niches écologiques distinctes, à savoir l'eau, le sol et le milieu hospitalier. Ces souches présentent une production notable de pyocyanine, un pigment vert, présenté sur les milieux King A et Hektoen. De plus, elles émettent une caractéristique rappelant la fleur de seringas, attribuable à la synthèse d'orthoaminoacétophénone. Le nombre des souches isolées et le pourcentage de chaque niche écologique ont été présentés dans le tableau (IV).

**Tableau IV:** Répartition de *Pseudomonas aeruginosa* en fonction du prélèvement

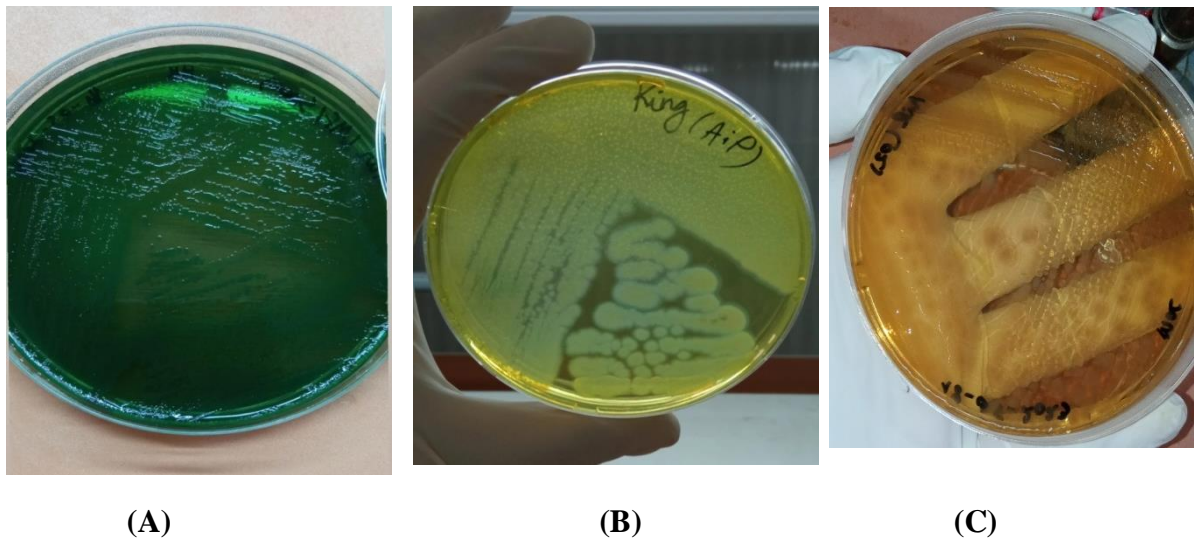
Niches écologiques		Le nombre de prélèvement positive	Le code	Le pourcentage
<b>Environnement</b>       <b>12</b>	Sol	07	S02 S09 S17 S05 S11 S18 S21	35%
	L'eau	05	S01 S10 S12 S13 S14	25%
<b>Milieu hospitalier</b>      <b>08</b>	Environnement hospitalier	05	S04 S08 S15 S16 S20	25%
	Prélèvement biologiques	03	S03 S06 S07	15%
<b>Totale</b>		20		100%

## I. Identification

### 1. Observation macroscopique et microscopique

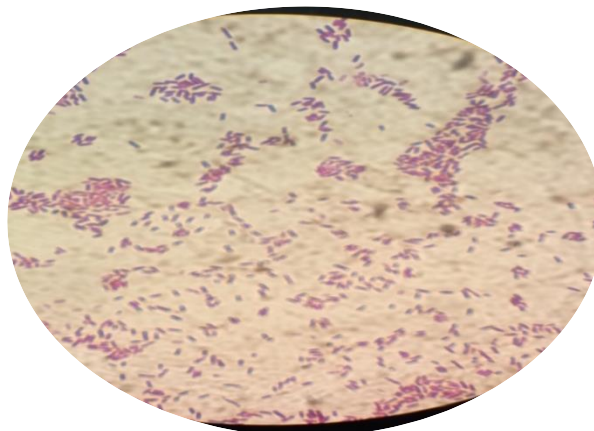
Les résultats obtenus après 24h d'incubation à 37°C sur le milieu Mac Conkey ont montré que les souches de *P. aeruginosa* apparaissent des colonies circulaires lisses et mucoïdes avec une couleur transparente et une odeur caractéristique de sering.

L'examen macroscopique des cultures a montré des colonies large, lisses, bombées au centre a bord irrégulier présentant des reflets métalliques, d'une pigmentation verte sur milieu Hektoen, King A, la couleur de milieu ne change pas (non fermentaire) (Figure 03) .



**Figure 03:** (A) Aspect des colonies de *P. aeruginosa* sur Hektoen (B) Aspect des colonies de *P. aeruginosa* sur King A (C) Aspect des colonies de *P. aeruginosa* sur Mac Conkey

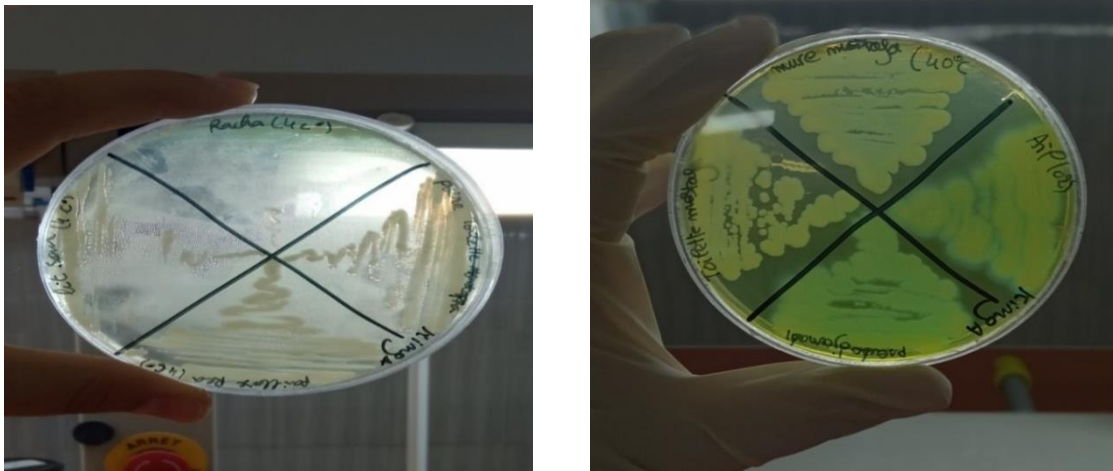
L'examen microscopique des souches après la coloration de Gram a révélé que nos souches sont Gram positif et qui se présentent sous des bacilles colorés en rose (figure 04).



**Figure 04 :** Observation microscopique de *P.aeruginosa* après coloration de Gram (Grossissent 100)

## 2. Croissance à 4°C et 42°C

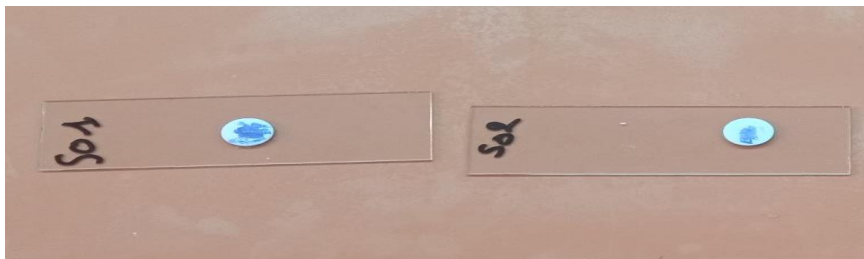
Après 24h d'incubation les colonies de *P.aeruginosa* sont observées sur le milieu King A (figure 08).



**Figure 05:** Résultats d'incubation à 42°C et 4°C sur King A

## 3. Recherche de l'oxydase

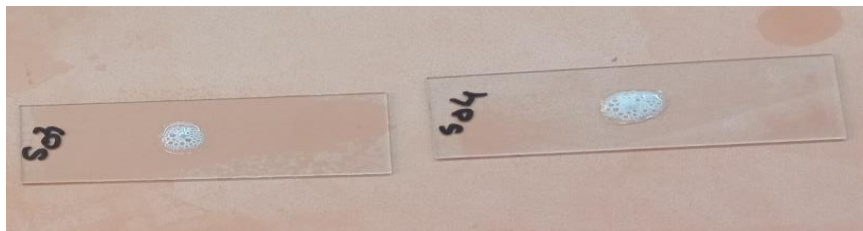
La présence du cytochrome oxydase a été confirmée par la réaction positive à l'oxydase, se manifestant par une coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée.



**Figure 06:** Résultat positif de l'oxydas

## 4. Recherche de catalase

La production de catalase se manifeste par l'émission de bulles de gaz.



**Figure 07:** Résultat positif de catalase

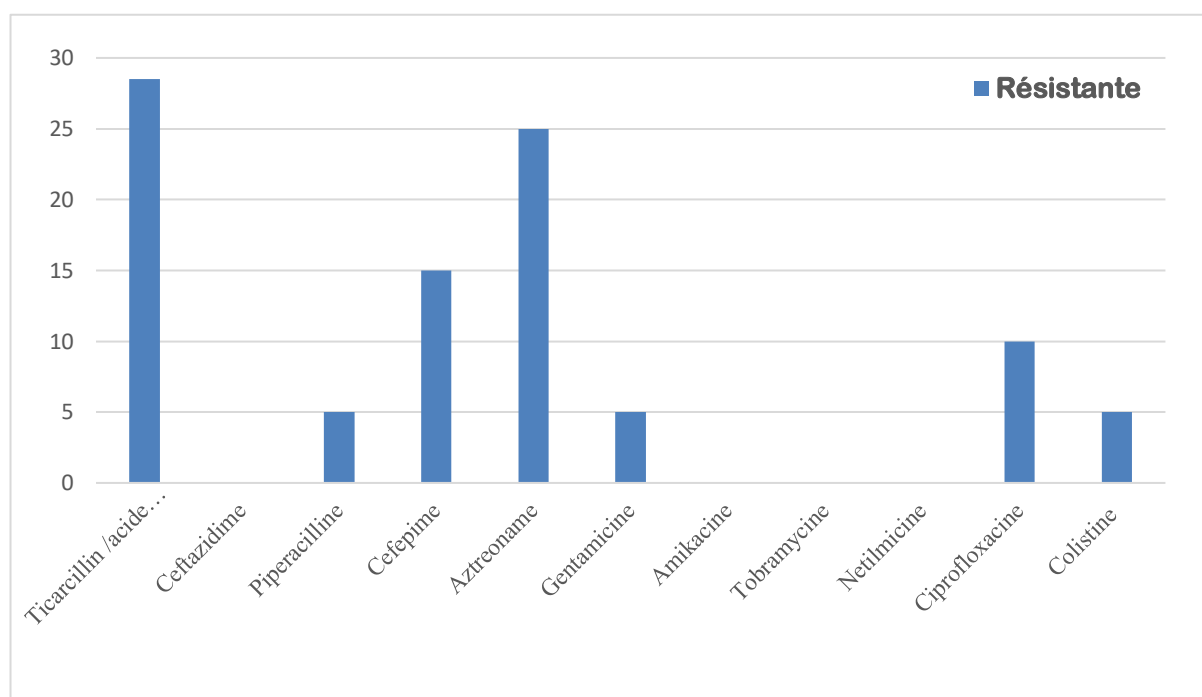


## II. Résultat de la sensibilité des souches de *P.aeruginosa* vis-à-vis des antibiotiques

Après l'incubation, la lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle. Le diamètre mesuré est comparé à des diamètres critiques définis par CA-SFM 2018.

Les résultats d'antibiogramme montrent une variation de taux de résistance des souches de *P.aeruginosa* vis-à-vis des différents antibiotiques.

La figure 08 montre les différents taux de résistance aux  $\beta$ -lactamines et aux autres familles

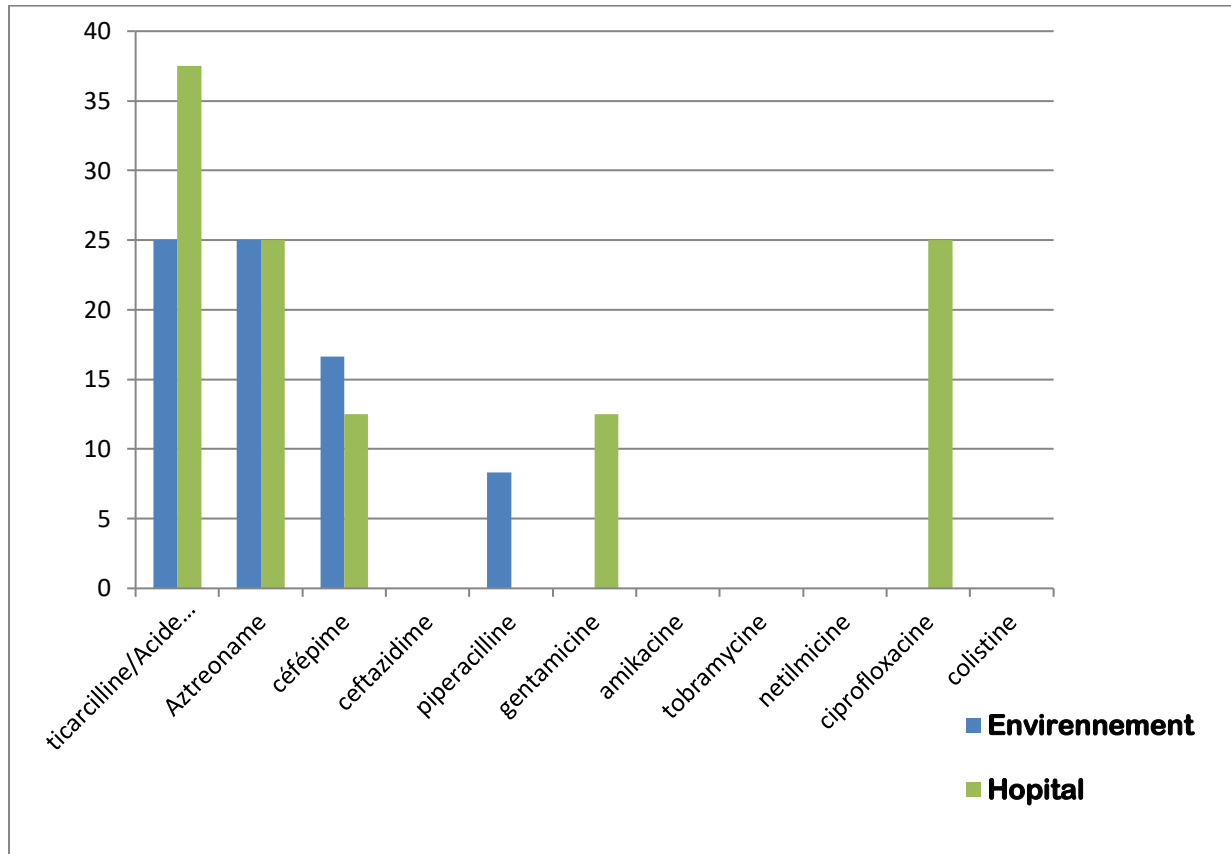


**Figure 08:** La résistance des 20 souches isolées vis-à-vis des antibiotiques testés

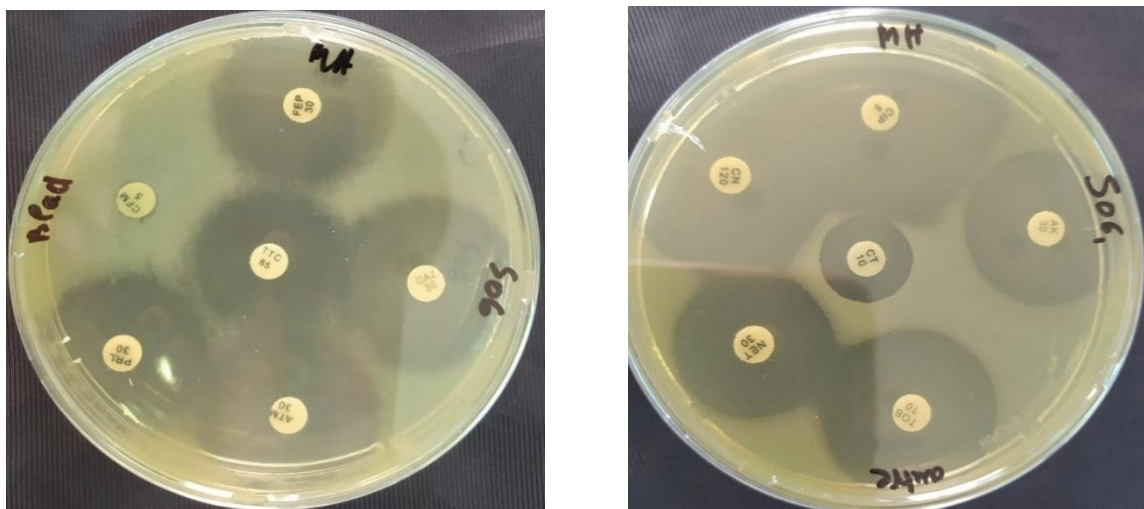
On observe que toutes les souches présentent des niveaux moyens de résistance, affectant toutes les  $\beta$  lactamines sauf la ceftazidime. La résistance la plus élevée a été constatée vers la Ticarcilline-acide clavulanique (28%), suivie de l'aztréonam avec un taux de résistance de 12,37% et de la céfépime avec un pourcentage de 15%. Environ 5% des souches étaient résistantes à la Pipéracilline. De plus, on constate que 10% des souches présentent une résistance aux fluoroquinolones. En outre, une sensibilité totale est observée pour les aminosides, à l'exception de la gentamycine qui présente une faible résistance de 5%.

La figure 09 présente une comparaison des taux de résistance aux antibiotiques entre les souches d'origine environnementale et les souches d'origine hospitalière.

La représentation de diagramme montre une observation globale des souches de *P.aeruginosa* testées, révèle que les isolats provenant d'établissements hospitaliers présentent une résistance plus élevée aux différentes familles des antibiotiques que les isolats provenant de l'environnement.



**Figure 09 :** Une comparaissant des taux de résistance aux antibiotiques des souches d'origine environnementale avec des souches d'origine hospitalière



**Figure 10:** Résultat d'antibiogramme d'une S06 de *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est omniprésente et suscite un intérêt particulier dans les domaines de la microbiologie médicale, alimentaire, aquatique, environnementale et agronomique (Meghdas et al., 2003). Cette bactérie est un pathogène opportuniste associé à une incidence croissante de morbidité et de mortalité, étant impliquée dans de nombreuses infections nosocomiales diverses (Cheong et al., 2008).

Selon le rapport du Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (AARN) en 2019, les souches de *P. aeruginosa* sont les plus fréquemment rencontrées au laboratoire de microbiologie. En effet, cette bactérie représentait 8,23 % des agents pathogènes isolés par rapport aux autres bactéries. Cette constatation souligne l'importance de surveiller l'évolution de la fréquence d'isolement de cette souche ainsi que de surveiller sa résistance aux antibiotiques (AARN, 2019).

La présente étude a permis d'étudier la résistance des souches de *P. aeruginosa* isolées à partir de différentes niches écologiques : l'eau, le sol et le milieu hospitalier.

Notre recherche a mis en évidence un taux de positivité des prélèvements pour *P. aeruginosa* égale à 20% sur 100 prélèvements.

Nous avons rapporté un total de 12 souches de *P. aeruginosa* à partir de l'environnement sur un total de 20 échantillons positifs dont une fréquence de 60%. De plus 8 souches de *P. aeruginosa* ont été isolées dans le milieu hospitalier avec un pourcentage de 40%. Cependant le nombre des souches isolées dans l'environnement naturel est plus que l'environnement hospitalier, ce qui est expliqué par l'implication des procédés de stérilisation et désinfection, pour éviter l'émergence des germes pathogènes et aussi les infections nosocomiales.

Permis les 20 prélèvements positifs, nous avons isolé 5 souches de *P. aeruginosa* à partir de l'eau, ce qui correspond à une fréquence de 25%. Un taux relativement similaire a été trouvé par Adjide et al (Adjide et al., 2009) (26,2 %).

Les résultats de la recherche des *P. aeruginosa* montrent son absence dans les prélèvements de piscine donc ces derniers sont conformes aux normes préconisées par (J.O.R.A.D.P 1993), et aussi par Robert (1999).

Notre travail nous a permis d'isoler 7 souches de *P. aeruginosa* à partir du sol, ce qui correspond à une fréquence de 35%. Par contre, dans une étude menée par Benyoub

Khéira, il a été isolé 20 souches de *P. aeruginosa* à partir de 40 échantillons du sol d'olivier (Benyoub,2011).

Dans nos résultats les souches isolées à partir de l'eau sont montrés une sensibilité totale à la famille des aminosides et aussi les fluoroquinolones. Ainsi pour la famille des  $\beta$ -lactamines, un faible taux de résistance avec la ticarcilline/acide clavulanique (40%) et l'aztréonam (20%).

Concernant les 7 souches isolées du sol ont présenté un taux de résistance de 14,28% pour la ticarcilline/acide clavulanique et la pipéracilline, 28,57% pour l'aztréonam et la Céfépime. Cependant, pour les autres antibiotiques, il convient de noter que toutes les souches isolées du sol se sont révélées sensibles aux aminosides, à l'exception de la gentamicine qui présente un taux de résistance de (14,28%).

Les résultats dérivés des échantillons provenant de milieu hospitalier indiquent que les 8 souches isolées ont manifesté une sensibilité à la majorité des antibiotiques soumis au test. En effet, toutes les souches se sont révélées sensibles aux aminosides. Ces résultats rejoignent les conclusions de l'étude menée par **Boussouf et Yahia**, qui ont également constaté une résistance presque négligeable vis-à-vis de la tobramycine avec un pourcentage de 2,7 % et de l'amikacine avec un pourcentage de 4,42 %. Ainsi que certaines souches présentent une faible résistance avec la ticarcilline\acide clavulanique (37.5%), l'aztréonam (25%), céfépime (12.5%) (**Boussouf et yahia ., 2020**). Nos résultats sont différents à celui trouvé par **Rebeiro (2019)**, et similaire avec l'étude de **Zidoune et ben Belkacem (2020)**.

La majorité des souches sont sensible à la colistine, ce résultat est similaire avec les études qui porte sur la résistance des souches *P. aeruginosa* en milieu hospitalier de **Rabhi (2010)**, **Mesli (2012)**, **Sefraoui (2015)**,

Nous avons rapportés que l'ensemble des souches de *P. aeruginosa* d'origine hospitalière sont plus résistes que les isolats de l'environnement naturel , cette sélection des souches résistantes induit par l'usage intensif des antibiotiques à large spectre pour traités les infections et aussi par la transmission de ces souches résistes entre les patients, alors que les souches d'origine environnementale sont des souches généralement sauvages ,sensibles ,qui n'ont pas encore subit la sélection par les antibiotiques.

# Conclusion

La résistance aux agents antimicrobiens est désormais une problématique mondiale d'envergure, représentant un défi majeur pour la santé publique. Effectivement, une augmentation significative de la résistance aux antibiotiques est observée au sein des bactéries à Gram négatif.

Depuis la reconnaissance de cette bactérie en tant que pathogène opportuniste de première importance, de multiples épidémies nosocomiales a été consignées.

Notre travail nous a permis d'isoler 20 souches de *P.aeruginosa* à partir de divers prélèvements de sol, de l'eau, milieu hospitalier. Cette espèce est isolée avec une fréquence relativement faible. La majorité des souches proviennent des prélèvements à partir de milieu environnement.

La totalité des souches isolés sont sensibles a les aminosides, et cartaiés souches sont résistantes a des antibiotiques: ticarcilline/acide clavulanique, l'aztréonam, piperaciline, céfépime, ciprofloxacine avec des taux respectivement (30%), (25%), (5%), (15%), (10%). Il faut noter que presque la totalité des souches isolées sont sensibles à la colistine.

Les résultats antibiogramme des souches isolés dans le milieu hospitalier, montrent la révèle d'efficacité de la majorité des molécules testés.

La prévention des résistances ne réside pas uniquement dans la recherche des molécules actives sur cette bactérie, mais dans la prévention contre la diffusion de ce pathogène résistant. Cette lutte est basée essentiellement sur les mesures d'hygiène mais aussi sur le bon usage des antibiotiques grâce à une collaboration étroite, entre cliniciens, microbiologistes et pharmaciens.

En perspective notre travail mérite d'être complété par :

- Elargir de champ de prélèvement
- Testé d'autre molécules antibiotiques
- Une étude sur d'autres facteurs de virulence tel que la production de biofilm

# **Les références bibliographiques**

**A**

**Aires J.** (2011). Les systèmes efflux actifs bactériens : caractérisation et modélisation pour quelles perspectives. Bulletin de Académie Vétérinaire de France. **3** : 267.

**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. 119p.

**Alhede M., Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Phipps R.K., Moser C., Christophersen L. et al.** (2009). *Pseudomonas aeruginosa* Recognizes and Responds Aggressively To The Presence Of Polymorphonuclear Leukocytes. Microbiology (Reading, Engl.) **155**:3500–3508.

**Alkawash M.A., Soothill J.S. and Schiller N.L.** (2006). Alginate Lyase Enhances Antibiotic Killing of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* In Biofilms. APMIS **114**: 131–138.

**Allen L., Dockrell D.H., Pattery T., Lee D.G., Cornelis P., Hellewell PG. et al.** (2005). Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. J Immunol ; **174** : 3643-9. 57.

**Ariane B.** (2017). Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* et leurs traitements. Thèse pour obtenir un diplôme d'état de docteur : Pharmacie. Bretagne : Université de Rennes 1. p14, 34, 57.

**B**

**Bagge N., Ciofu O., Hentzer M., Campbell J.I ., Givskov M., Høiby N.** (2002). Constitutive high expression of chromosomal  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. Antimicrobial agents and chemotherapy. **46**(11):3406-11.

**Baker P., Hill P.J., Snarr B.D., Alnabelseya N., Pestrak M.J., Lee M.J et al.,** (2016). Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolase s can be utilized to disrupt to and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Sci. Adv. 2, e1501632.



- Balasubramanian D., Schnepfer L., Kumari H. and Mathee K.** (2013). A Dynamic and Intricate Regulatory Network Determines *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Nucleic Acids Res.* 41, 1–20.
- Belas R.** (2014). Biofilm , flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol. Sep*;22(9):517-27.
- Belodu H.R., Karangate N., Sonth S., Anitha M.R ., Vijayanath V.** (2012) . Antimicrobial susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical sources. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences.* 96(8), 1065–1069.
- Ben abdallah H.B., Noomen S., Khélifa A.B., Sahnoun O., Elargoubi A. et Mastouri, M.** (2008). Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la région de Monastir. *Médecine et maladies infectieuses.*38(10), 554-556.
- Ben Haj khalifa., Didier A., Moissen et Hoag Vu Thien., Mohamed Khedher.** (2011). Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation.
- Boudouda R.** (2015). Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse de *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de master : Génétique Moléculaire. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine. P3-4-14-15.
- Bouguenoun W.** (2017). Etude de résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l’environnement hospitalier de la région de GUELMA. Thèse de doctorat d’état, université Badji Mokhtar, Annaba, 218 p.
- Boussouf O., Yahia C.H.** (2020) . Epidémiologie et profil de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à l’hôpital militaire régional universitaire de Constantine (HMRUC). Mémoire de master : biologie moléculaire des microorganismes. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine.p5-6-7.
- Burrows Lori L.** (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Rev Microbiol.* 66 :493–520.

**C**

**Chaibdraa A., Medjellekh M.S., Saouli A. et Bentakouk M.C.** (2008). *Pseudomonas* : Expérience du Centre des Brûles d'Annaba et Revue de la Littérature. Ann Burns Fire Disasters.

**Chastre J., Fagon J.Y.** (2002). Ventilator-associated pneumonia. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. **165**(7) : 867-903.

**D**

**Darghout S., Metheni A.** (2016). Caractérisation morphologique, biochimique et mutagenèse des souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans la région de Constantine » Mémoire de master : Génétique Moléculaire, Université des Frères Mentouri Constantine.

**Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W. et Greenberg E.P.** (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science **280** : 295-298.

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

**Denis F., Poly M.C., Martin C., Bingen E. et Quentin R.** (2007). Bactériologie médicale, techniques usuelles. Masson, Cedex. 333-335.

**Denis F., Ploy M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R.** (2011). Bactériologie Médicale Techniques Usuelles (2nd ed.). Trento, Italie, Elsevier Masson P372-373.

**E**

**Elmeskini K.** (2011). Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat, Université Mohammed V, Maroc. 117p

**Engel J., Balachandran P.** (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. Current Opinion in Microbiology, **12**(1), 61-66.

**El Solh A.A Alhajhusain A.** (2009). Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. J. Antimicrob Chemother. **64** :229–238.

**Eyquem A., Montagnier L.** (2000). Traité de microbiologie clinique : deuxièmes mises à jour et compléments. Rome : PICCIN édition. p. 238.

### F

**Fleiszig S.M., Wiener-Kronish J.P., Miyazaki H., VallasV., Mostov K.E. et al.**, (1997). *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. Infect.Immun. **65** :579–586.

**Frikh M., Maleb A., Ablavi I.N., Elouennass M., LemouerA.** (2017). *Pseudomonas aeruginosa* : Epidémiologie et état actuel des résistances Etude rétrospective sur trois ans. Journal Marocain des Sciences Médicales, **21**(2), 34-40.

**Finck-Barbançon V., Goranson J., Zhu L., Sawa T., Wiener-Kronish J.P., Fleiszig S.M. et al.** (1997). ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. Mol. Microbiol.**25**: 547-557.

### G

**Garrity-Ryan L., Kazmierczak B., Kowal R., Comolli J., Hauser A., Engel J.N.** (2000). The arginine finger domain of ExoT contributes to actin cytoskeleton disruption and inhibition of internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by epithelial cells and macrophages. Infect. Immun. **68**: 7100–7113.

**Gessard Carle.** (1984). Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages ; Rev Infect Dis 6, S775-776.

**Goehring U.M., Schmidt G., Pederson K.J., Aktories K., Barbieri J.T.** (1999). The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. J. Biol. Chem. **274** : 36369–36372.

**Gougeon A.** (2017). Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa* : analyse de 181 épisodes bactériémiques documentés dans deux établissements hospitaliers du Nord de la France. Mémoire pour le diplôme d'étude spécialisé de biologie médicale. France : Université de Lille2. P23-25-26-28-29-30-31-32.

**Giraud C., Bernard C., Ruer S. et al.** (2010). Biological “glue” and “Velcro”: Molecular tools for adhesion and bioilm formation in the hairy and gluey bug *Pseudomonas aeruginosa*. *Env Microbiol Rep* .**2**:343–358.

**Giraud C., Bentzmann S.** (2012). Inside the complex regulation of *Pseudomonas aeruginosa* chaper-one usher systems. *Envrionmental microbiology*. Aug; **14**(8): 1805-16.

**Guzzo J., Pages J.M., Duong F., Lazdunski A., Murgier M.** (1991). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of mechanism. *J Bacteriol* .**173**: 5290-7.

### H

**HatchR A ., Schiller N.L.** (1998). Alginate Lyase Promotes Diffusion of Aminoglycosides Through The Extracellular Polysaccharide Of Muroid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*. **42**: 974–977 .

**Hauser A.R., Kang P.J., Engel J.N.**(1998). PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol. Microbiol*. **27**: 807–818.

**Hauser A.R.** (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol*. **7**: 654–665.

**Hirsch E.B., Tam V.H.** (2010). Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res*. **10**: 441–451.

**Hoge R., Pelze A., Rosenau F, Wilhelm S.** (2010.) Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 383-95.

### K

**Kaminski A., Gupta K.H., Goldufsky J.W., Lee H.W., Gupta V., Shafikhani S.H.** (2018). *Pseudomonas aeruginosa* ExoS induces intrinsic apoptosis in target host cells in amanner that is dependent on its GAP domain activity. *Sci. Rep*. **8**, 14047.

**Kessler E., Ohman D.E.** (2013). *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Third Edition). 582–592.

**Kipnis E., Wiener-Kronish J.** (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* .**36** : 78-91.

## L

**Laarman A.J., Bardoel B.W., Ruyken M., Fernie J., Milder F.J., van Strijp J.A.** (2012). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *J Immunol*. 2012 Jan 1;**188**(1):386-93

**Lam J.S., Taylor V.L., Islam S.T., Hao Y., Kocincova D.** (2011). Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Frontiers in microbiology*.**2**(18):1-25.

**Lau G.W., Hassett D.J., Ran H., Kong F.** (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*.**10** : 599-606

**Lau G.W., Ran H., Kong F., Hassett D.J., Mavrodi D.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun*.**72**: 4275-8

**Lee J., Lee Y.S., Park Y.K., Kim B.S.** (2005). Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the Par C and Par E subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacinresistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **25**: 290–295.

**Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D.** (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev*. **22**: 582–610.

**Llanes C., Pourcel C., Richardot C., Plésiat P., Fichant G., Cavallo J.D et al.,** (2013). GERPA Study Group, Diversity of  $\beta$ -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *J Antimicrob Chemother*. **68**(8),1763-1771.

**Llano-Sotelo B., Azucena E.F., Kotra L.P., Mobashery S., Chow C.S.** (2002). Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem. Biol*. **9**: 455– 463.

## M

- Malhotra S., Hayes D. and Wozniak D.J.** (2019). Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. Clin. Microbiol. Rev. 32.
- Malone J.G.** (2015). Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. Infect. Drug Resist.
- Mathee K., Narasimhan G., Valdes C., Qiu X., Matewish J.M., Koehrsen M. et al.** (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. Proceedings National of the Academy of Sciences of U S A. **105**(8), 3100-3105.
- Mathlouthi N., Areig Z., Al Bayssari C., Bakour S., Ali El Salabi A., Ben Gwierif S et al** ., (2015). Emergence of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Collected from Some Libyan Hospitals. Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.), **21**(3), 335–341.
- Mazzariol A., Aldegheri M., Ligozzi M., Lo Cascio G., Koncan R., Fontana R.** (2008). Performance of Vitek 2 in antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates with different mechanisms of beta-lactam resistance. J Clin Microbiol. **46**(6) :2095-8.
- Memdough S., Reddof N.** (2018). Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* au CHU de Constantine. Mémoire de master : biologie appliquée. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine. P4-7-9-10-27-28
- Meybeck A and Fantin B.** (2004). De la colonie microbienne à l'infection chez l'homme : le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, importance thérapeutique. Antibiotiques, 241–248
- Mezaache S.** (2012). Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre.
- Mérens A. et al.,** (2011). *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques. Revue Francophone des Laboratoires. **435**: 49-62.
- Mérens A., Janvier F., Vu-Thien H., Cavallo J. D., Jeannot K.** (2012). Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*. Revue Francophone Des Laboratoires. **445**: 68.
- Mérens A., Jault P., Bargues L., Cavallo J.D.** (2013). Infections à *Pseudomonas aeruginosa*. EMC — Maladies infectieuses. **10**:1—18.

**Michalska M., Wolf P.** (2015). *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in Microbiology*.**6**:963.

**Mishra M., Byrd M.S., Sergeant S., Azad A.K., Parsek M.R., Mcphail L et al .,** (2012). *Pseudomonas aeruginosa*, Psl Polysaccharide Reduces Neutrophil Phagocytosis and The Oxidative Response By Limiting Complement-Mediated Opsonization. *Cell. Microbiol.* 14, 95106

**Mohanty S., Baliyarsingh B., Kumar Nayak S.** (2020). Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: A Concise Review. *Antimicrob. Resist. - A One Heal. Perspect.*

**Montalegre R.** (2016). Evaluation du risque d'émergence de résistances de *Pseudomonas aeruginosa* à différents antibiotiques anti pyocyanique en réanimation. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. P94.

**Muhammad M.H., Idris A.L., Fan X., Guo Y., Yu Y., Jin X et al.,** (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Front Microbiol.* **11**: 928.

### N

**Nickzad A., Déziel E.** (2014). The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control. *Lett Appl Microbiol.* May.**58** (5):447-53.

**Nikaido H.** (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* .**264** : 382-8.

**Nyaledome A.I.** (2016). *Pseudomonas aeruginosa* : épidémiologie et état actuel des résistances à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V. Université Mohammed- V– RABAT.

### O

**Lamont L., Beare P.A., Ochsner U., Vasil A.I., Vasil M.L.** (2002). Siderophore mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* .**99** : 7072-7.

**Olivier Dauwalder.** (2000). Sophie Mignard, Cour de *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiologie DCEM1 faculté Lion sude.

**O'Malley Y.Q., Reszka K.J., Spitz D.R., Denning G.M., Britigan B.E.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* .**287** : L94-L103.

## P

**Pachori P., Gothwal R., Gandhi P.** (2019). Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes & Diseases*. **6**(2):109–119.

**Palleroni N.** (1984). *Manual of Systematic Bacteriology*.USA. P141–171.

**Phillips R.M., Six D.A., Dennis E.A., Ghosh P.** (2003). In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J. Biol. Chem.* **278**: 41326–41332.

**Phillips P.L., Wolcott R.D., Fletcher J. et Schultz G.S.** (2010). « Biofilms Made Easy », *Wounds International*, Vol. 1, N° 3, 25 Mai.

**Pier G.B., Grout M., Zaidi T.S., Olsen J.C., Johnson L.G et al.,** (1996 ) . Role of mutant CFTR in hyper susceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections.**271** (5245) : 64-7.

**Pier G.B.** (2007). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol*. 2007 Sep;**297**(5):277-95. E pub 2007 Apr 27. Review. Erratum in: *Int J Med Microbiol*. Nov: **297** (7-8):641.

## Q

**Qiu X., Kulasekara B.R., Lory S.** (2009). Role of Horizontal Gene Transfer in the Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Genome Dynamics*. **6** : (126-139).

## R



**Ramoul A.** (2014). Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries responsables d'infections respiratoires basses. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie, 157.

**Rangel S.M., Logan L.K., Hauser A.R.** (2014). The ADP-ribosyl transferase domain of the effector protein ExoS inhibits phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during pneumonia. *mBio*. **5**:1080-14.

**Rehman A., Patrick W.M., Lamont I.L.** (2019). Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. *J. Med. Microbiol.* **68**: 1– 10.

**Rice L.B.** (2008). Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis* **197** :1079–1081.

**Ruppé E.** (2010). Épidémiologie des bêta-lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. *Antibiotiques*. **12** (1) : 4.

## **S**

**Sato H., Frank D.W., Hillard C.J., Feix J.B., Pankhaniya R.R., Moriyama K et al .,** (2003) .The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J.* **22**: 2959–2969.

**Sawa T., Shimizu M., Moriyama K., Wiener-Kronish J.P.** (2014). Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Crit. Care* **18**: 668.

**Sefraoui I.** (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse de doctorat, université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. 94 p.

**Silby M.W., Winstanley C., Godfrey S.A., Levy S.B., Jackson R.W.** (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev.* **35** : 652–680.

**Solbi S.** (2013). Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux ATB. Thèse pour le diplôme d'État de Docteur en Pharmacie : pharmacie. Rabat : Université Mohammed 5 –souissi- .p6-11-12-13.

**Spiers A.J., Buckling A., Rainey P.B.** (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. Microbiology (Reading, England). **146** (Pt 10): 2345–2350.

**Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J et al .,** (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. **406**: 959-964.

**Strateva T and Yordanov D.** (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol .**58** : 1133-1148.

**Sun J., Barbieri J.T.** (2003). *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10regulator of kinase (Crk) proteins. J. Biol. Chem. **278**: 32794–32800.

### T

**Takase H., Nitnai H., Hoshino K., Otani T.** (2000). Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. Infect Immun .**68** : 1834-9.

**Tamura M., Ajayi T., Allmond L.R., Moriyama K., Wiener-Kronish J.P., Sawa T.** (2004). Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. Biochem. Biophys. Res. Commun. **316**: 323–331.

**Tortora G.J., Berdell B.F., Christine L.C.** (2003). Introduction à la microbiologie. Montreal : ERP édition. p. 945.

**Trigueros N.S.** (2015). Factores de riesgo de adquisición de *Pseudomonas aeruginosa* y comparación de dos estrategias de uso de antibióticos (rotación frente a mezcla) en pacientes críticos: impacto en la adquisición de microorganismos resistentes y desenlaces clínicos. Thèse de doctorat. Université de Barcelona. 209p.

### V

**Van Delden C. et Iglewski B.H.** (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. Emerging Infectious Diseases.**4**: 551-60.

**Vander W.C., Pierard A., Kley-Raymann M. and Haas D.** (1984). *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. Journal of Bacteriology. **160**(3), 928-934.

**Veron M., Berche P.** (1976). Virulence et antigènes de *Pseudomonas aeruginosa*. Bull. Inst. Pasteur. **74**:295-337.

**W**

**Weiner L., Webb M., Limbago A.K., Dudeck B., Patel M.K., Kallen J et al.,** (2016). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare- associated infections: Summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2011-2014. Infect. Control. Hosp.Epidemiol. **37**(11):1288–1301.

**Winsor G.L., Griffiths E.J., Lo R., Dhillon B.K., Shay J.A., Brinkman F.S.** (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. Nucleic Acids Res. **44**: D646–D653.

**Y**

**Yabuuchi E and Ohyama A.** (1972). Characterization of “Pyomelanin”-Producing Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **22**, 53–64.

**Yahr T.L., Vallis A.J., Hancock M.K., Barbieri J.T., Frank D.W.** (1998). ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. Proc. Natl.Acad. Sci. U. S. A. **95**: 13899–13904.

**Yétérian E.,** (2010). Bases moléculaire de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*. Université de Strasbourg. France.178p

**Z**

**Zidoune S., Benbelkacem Y.** (2020). Etude de l’antibiorésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de Master.

# Les annexes

## ANNAXE 01

**Tableau I:** Les matériels et le matériel biologique utilisés.

Matériels	Matériels biologiques
<ul style="list-style-type: none"><li>- Bécher 1L</li><li>- Entonnoir</li><li>- Tubes à essai en verre</li><li>- Flacon stérile</li><li>- Pipette pasteur</li><li>- Portoir</li><li>- Balance</li><li>- Spatule</li><li>- Barreau magnétique</li><li>- Vortex</li><li>- Plaque chauffante agitatrice</li><li>- Boîtes de pétri stériles</li><li>- Ecouvillons</li><li>- Etuve</li><li>- Autoclave</li><li>- Bain marie</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Milieux de cultures : Cétrimide, King A, Hektoen, Bouillon nutritif, Mac Conkey et Mueller Hinton</li><li>- Eau distillée</li><li>- Glycérol</li><li>- Eau physiologie</li></ul>

## ANNAXE02

## ➤ Composition des milieux de culture (pour 1l d'eau distillée)

**Hektoen                      pH= 7.6**

▪ Proteose peptone	12g
▪ Extrait de levure	03g
▪ Chlorure de sodium	05g
▪ Thiosulfate de sodium	5g
▪ Sels biliaires	09g
▪ Citrate de fer ammoniacal	1.5g
▪ Salicine	2g
▪ Lactose	2g
▪ Saccharose	12g
▪ Fuschine acide	0.1g
▪ Bleu de bromothymol	05mg
▪ Gélose	13g

**Milieux King A              pH =7.2**

▪ Bacto-peptone (difco)	20g
▪ Agar	15g
▪ Glycérol cp	10g
▪ SO4K2 anhydre	10g
▪ Eau distillée	1000m

**Milieu Mac Conkey        pH =7.2**

▪ Peptone pancréatique de gélatine	17 g
▪ Peptone pancréatique de caséine	1,5 g
▪ Peptone peptique de viande	1,5 g
▪ Lactose	10 g
▪ Chlorure de sodium	5 g
▪ Sels biliaires	1,5 g
▪ Rouge neutre	30 mg
▪ Violet de gentiane	1 mg

- Agar 13,5 g

➤ **La composition de la solution d'eau oxygénée**

- Eau oxygénée à 110v 0.5ml
- Eau distillée 14.5ml

## ANNAXE 03

Tableau II : les codes des souches isolées

Niche écologique	Prélèvement	Code
<b>Sol</b>	Ail	S02
	Pois	S17
	Oignon	S05
	Laurier	S09
	Haricot	S11
	Poire	S18
	Poivron	S21
<b>Eau</b>	Robinet de maison	S01
	L'eau de fontaine	S10
	L'eau de l'aquarium	S12
	Barrage de forêt de riche	S13
	Barrage oued lekhal	S14
<b>Hôpital</b>	Urine	S03
	Sang	S06
	Pus	S07
	Lit	S04
	Mur 01	S08
	Sanitaire	S15
	Mur 02	S16
	Mur 03	S20



## ANNAXE 04

**Tableau III** : Les diamètres de résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux  $\beta$ -lactamines

Les souches	TTC	ATM	FEP	CAZ	PRL
<b>S01</b>	21mm / S	28mm/ S	29mm/ S	30mm /S	30mm / S
<b>S02</b>	32mm / S	34mm / S	32mm / S	32mm / S	34mm / S
<b>S03</b>	25 mm / S	30mm / S	19mm/ S	28mm / S	30mm / S
<b>S04</b>	23mm / S	27mm / S	26mm / S	26mm/ S	30mm / S
<b>S05</b>	31mm / S	$\leq 6$ / R	10mm / R	35mm / S	13mm / R
<b>S06</b>	25mm / S	30mm / S	30mm / S	30mm / S	26mm / S
<b>S07</b>	29mm / S	25mm / S	32mm / S	34mm / S	31mm / S
<b>S08</b>	20mm / S	20mm / S	32mm / S	36mm / S	36mm / S
<b>S09</b>	15mm / R	20mm / S	26mm / S	25mm / S	25mm / S
<b>S10</b>	30mm / S	31mm / S	30mm / S	34mm / S	35mm / S
<b>S11</b>	26mm / S	29mm / S	30mm / S	30mm / S	32mm / S
<b>S12</b>	$\geq 30$ / S				
<b>S13</b>	10mm / R	17mm / R	27mm / S	25mm / S	24mm / S
<b>S14</b>	17mm / R	23mm / S	28mm / S	29mm / S	27mm / S
<b>S15</b>	$\leq 6$ / R	13 mm /R	19mm / S	30mm / S	25 mm /S
<b>S16</b>	$\leq 6$ / R	15mm / R	15mm / R	26mm / S	20mm / S
<b>S17</b>	38 mm / S	$\leq 6$ / R	15 mm /R	27mm / S	34mm / S
<b>S18</b>	19mm / S	24mm / S	35mm / S	30mm / S	25mm / S
<b>S20</b>	11mm / R	22mm / S	28mm / S	26mm / S	27mm / S
<b>S21</b>	23 mm / S	21mm / S	26mm / S	25mm / S	22mm / S

**Tableau VI :** Les diamètres de résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux autres familles d'antibiotique

Les souches	CN	AK	TOB	NET	CIP	CT
<b>S01.</b>	33mm / S	27mm/ S	28mm/ S	26mm /S	35mm / S	15mm /S
<b>S02.</b>	35mm / S	25mm / S	30mm / S	21mm / S	30mm / S	15mm /S
<b>S03.</b>	27 mm / S	21mm / S	24mm/ S	19mm / S	35mm / S	13mm /S
<b>S04.</b>	29mm / S	24mm / S	25mm / S	20mm/ S	40mm / S	14mm /S
<b>S05.</b>	40mm / S	30mm /S	30mm / S	36mm / S	33mm / S	18mm /S
<b>S06.</b>	25mm / S	28mm / S	29mm / S	24mm / S	40mm / S	15mm/ S
<b>S07.</b>	33mm / S	27mm / S	28mm / S	25mm / S	36mm / S	16mm /S
<b>S08.</b>	44mm / S	37mm / S	36mm / S	40mm / S	35mm / S	18mm /S
<b>S09.</b>	27mm / S	21mm / S	22mm / S	25mm / S	35mm / S	13mm/S
<b>S10.</b>	30mm / S	27mm / S	21mm / S	25mm / S	26mm / S	15mm /S
<b>S11</b>	30mm / S	25mm / S	24mm / S	20mm / S	33mm / S	15mm /S
<b>S12.</b>	30mm / S	26mm / S	26mm / S	30mm / S	27mm / S	14mm/S
<b>S13.</b>	30mm / S	25mm / S	26mm / S	27mm / S	36mm / S	15mm /S
<b>S14.</b>	30mm / S	26mm / S	27mm / S	25mm / S	28mm / S	15mm /S
<b>S15.</b>	30mm / S	27 mm / S	28mm / S	25mm / S	15 mm/R	15mm /S
<b>S16.</b>	26mm / S	24mm / S	20mm / S	21mm / S	13mm /R	14mm/ S
<b>S17.</b>	33 mm / S	28mm / S	25 mm /S	27mm / S	24mm / S	16mm /S
<b>S18.</b>	33mm / S	25mm / S	26mm / S	26mm / S	36mm / S	13mm /S
<b>S20</b>	22mm / S	25mm / S	27mm / S	27mm / S	35mm / S	14mm /S
<b>S21</b>	10 mm /R	23mm / S	24mm / S	25mm / S	33mm / S	12mm /R

## Résumé

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste à Gram négatif responsable essentiellement d'infections nosocomiales. La présente étude concerne d'une part l'isolement de plusieurs souches de *P. aeruginosa* à partir de différentes niches écologiques (sol, eau, et milieu hospitalier), et d'autre part la détermination du profil de résistance de ces souches. Vingt souches de *P. aeruginosa* ont été isolées après l'analyse de 100 prélèvements. Ces souches ont été identifiées en utilisant les techniques conventionnelles de bactériologie. La majorité des souches de *P. aeruginosa* proviennent des prélèvements de l'environnement. La détection des profils de résistance a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu Muller Hinton. Les vingt souches isolées sont sensibles à la majorité des antibiotiques testés.

**Mots clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, Résistance, Gram négatif, Antibiotique.

## Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic Gram-negative pathogenic bacterium primarily responsible for nosocomial infections. The present study concerns on the one hand the isolation of several strains of *P. aeruginosa* from different ecological niches (soil, water, hospital environment), and on the other hand the determination of the resistance profile of these strains. Twenty strains of *P. aeruginosa* were isolated after analysis of 100 samples. These strains were identified using conventional bacteriological techniques. The majority of *P. aeruginosa* strains come from environmental samples. Resistance profiles were detected by the Muller Hinton diffusion method. The 20 isolated strains are sensitive to the majority of antibiotics tested.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, Resistance, Gram negative, antibiotics.

## ملخص

الزائفة الزنجارية هي بكتيريا مسببة للأمراض سالبة الغرام انتهازية مسؤولة بشكل أساسي عن التهابات المنتقلة من المستشفيات. تتعلق هذه الدراسة بعزل العديد من سلالات الزائفة الزنجارية من مختلف المنافذ البيئية (التربة والمياه وبيئة المستشفى)، ومن ناحية أخرى تحديد ملف مقاومة هذه السلالات. تم عزل عشرين سلالة من بكتيريا الزائفة الزنجارية من عينات مختلفة تم تحديد هذه السلالات باستخدام التقنيات البيكتيريولوجية التقليدية حيث أن غالبية سلالات الزائفة الزنجارية تأتي من بيئة المستشفى حيث تم الكشف عن ملامح المقاومة بواسطة طريقة الانتشار على الوسط مولر هينتون فان عشرون 100 سلالة معزولة حساسة لغالبية المضادات الحيوية التي تم اختبارها

**الكلمات المفتاح :** الزائفة الزنجارية، المقاومة، سلبية الجرام، المضادات الحيوية.

