

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTEDES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES
SCIENCES DE LA TERRE DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Réf : .../UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2022

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

Domaine : SNV **Filière : Sciences Biologiques**

Spécialité : Microbiologie appliquée.

Présenté par :

CHETTAH Tarik & AZRI Yazid

Thème

**Exploration de l'adaptation de *Pseudomonas aeruginosa* en biofilm :
Rôle dans l'échec des traitements antibiotiques**

Soutenu le : 07/07/2022

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Mr KADRIN</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>Mme MEDBOUA C</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme BENBARA T</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

*Notre vif remerciement pour les membres du jury **M. Kadri N** qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements avec reconnaissance à Madame **MEDBOUA C**, enseignante à l'université de Bouira de nous avoir accordée sa confiance et de nous avoir permis de réaliser cette étude. A travers ses qualités professionnelles en tant qu'encadreuse, elle nous a transmis de précieuses connaissances et informations ainsi qu'une rigueur scientifique qui nous seront très utiles dans notre vie professionnelle.*

*Nos plus sincères remerciements vont aussi à Madame **BENBARA T** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner notre travail.*

Toutes nos sincères remerciements pour les techniciennes de laboratoire de microbiologie pour leur service.

Nous tenons à remercier nos camarades de Master Microbiologie et toutes les personnes qui ont de près ou de loin contribué à accomplir ce travail.

Dédicace

*Du profond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui
me sont chers :*

*A mes parents, pour m'avoir donné, par leur amour et leur
éducation, les clés pour réussir et comprendre ce monde.
Pour m'avoir enrichi de leurs cultures complémentaires et
de leurs valeurs communes.*

*A Mes chère frères **Lounis, Lotfi***

*A ma belle sœur **Tina***

*A mes adorables nièces **Alicia et Meyar***

*A tous mes amies et sans oublies mon binôme **Yazid** pour son
soutien moral, sa patience et sa compréhension tout ou long
de ce projet de fin d'étude.*

Tarik

Dédicace

À mes chers parents

Que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leur grand sacrifice.

À mon meilleur ami d'enfance et frère Riad

Qui s'est tenu à mes côtés et m'a aidé dans les moments les plus difficiles et pour ses encouragements continus et sa foi en moi et en mes capacités, que Dieu vous protège et prenne soin de vous.

À mon binôme Chettah Tarik

Qui avec lui j'ai partagé les bon et les mauvaise jours de mon parcours universitaire. J'ai aussi partagé avec lui l'accomplissement de ce modeste travail.

À mes amis proches

Nour et Ibrahim Al Khalil, Sofiane ,Sami ,Mustapha,Sif eddine et toutes ceux dont je n'ai pas cité ces noms, Merci d'être dans ma vie. Vous êtes toujours dans mon cœur.

À mes professeurs de primaire, CEM, lycée et université

Que j'ai connus tout au long de mon parcours universitaire. Je n'oublierai jamais leur gentillesse envers moi.

À Toute personne

Qui, pendant le long parcours de mes études, m'a aidé de près ou de loin pour arriver à ce moment où j'obtiens mon diplôme.

YAZID

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction	01
---------------------------	-----------

Partie I :Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur *Pseudomonas aeruginosa*

1. Classification... ..	03
2. Habitat... ..	04
3. Caractéristiques générales sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	05
3.1. Caractères morphologiques.....	05
3.2. Caractères cultureux.....	05
3.3. Caractères biochimiques... ..	06
3.4. Caractères antigéniques... ..	06
3.5. Caractères génomiques... ..	06
4. Les facteurs de virulence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	07
4.1. Les facteurs de virulence associés à la bactérie.....	08
4.1.1. Le flagelle.....	08
4.1.2. Le pili... ..	08
4.1.3. Les lipopolysaccharides... ..	09
4.1.4. L'alginat... ..	09
4.2. Les facteurs sécrétés par la bactérie.....	09
4.3. Le biofilm... ..	11
4.3.1. La composition d'un biofilm.....	12
4.3.2. La formation.....	12
a) Adhésion réversible.....	13
b) Adhésion irréversible.....	13
c) La maturation... ..	13
d) La dispersion d'un biofilm.....	13

4.3.3. Régulation de biofilm.....	14
5. Résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques.....	15
5.1. Généralité sur la résistance bactérienne.....	15
5.1.1. Définition de la résistance.....	15
5.1.2. Résistance naturelle.....	15
5.1.3. Résistance acquise.....	15
5.2. Résistance aux β -lactamines.....	16
5.2.1. Résistance enzymatique... ..	16
➤ La production de Céphalosporinase	16
➤ β -lactamase à spectre élargi.....	16
➤ Les carbapénémase.....	17
5.2.2. Résistance non enzymatique... ..	17
➤ Imperméabilité aux carbapénèmes	17
➤ Systèmes d'efflux actif.....	17
5.3. Résistance aux aminosides.....	18
5.4. Résistance aux quinolones... ..	18
5.5. Résistance à la colistine.....	18

Chapitre II : les infections à *Pseudomonas aeruginosa*

1. Les infections pulmonaires	19
1.1. La mucoviscidose... ..	19
2. Les infections cutanées.....	20
3. Les infections oculaires.....	21
4. Autres infections.....	22

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et Méthodes

I. Matériels utilisés.....	22
II. Méthodes.....	22
1. Origines des souches.....	22
2. Isolement et purification.....	22
3. Identification.....	22
3.1. Etude macroscopique.....	23
3.2. Etude microscopique.....	23
3.3. Croissance à 4°C et 42°C.....	23
3.4. Recherche d'oxydase.....	23
3.5. Recherche de catalase.....	23
4. Antibiogramme.....	23
4.1. Techniques standardisées selon les recommandations du CA-SFM, 202.....	23
➤ La préparation d'une suspension bactérienne (Inoculum).....	23
➤ La technique d'ensemencement.....	24
➤ L'application des disques d'antibiotiques.....	24
5. L'évaluation de l'effet des antibiotiques sur la formation des biofilms.....	24
5.1. Préparation de suspension bactérienne initiale.....	25
5.2. Préparation de différentes concentrations d'antibiotiques.....	26
6. Détection de la formation de biofilm par marquage au cristal violet.....	27
6.1. Principe.....	27
6.2. Protocole.....	28

Chapitre II : Résultats et Discussion

1. Isolement et purification	29
2. Identification.....	29
2.1. Etude macroscopique.....	29
2.2. Etude microscopique.....	29
3. Croissance à 4°C et 42°C	30
4. Test de catalase.....	31
5. Test d'oxydase.....	31
6. Antibiogramme.....	31
7. Marquage au cristal violet	33
8. Quantification des biofilms formés par spectrophotométrie	34
8.1. Effet des antibiotiques sur la formation des biofilms.....	34
8.2. L'effet de l'agitation.....	35
9. Discussion générale général.....	35
Conclusion.....	39
Références bibliographie	
Annexe	
Résumé	

Liste des abréviations

ABC : ATP-Binding-Cassette

ADH : Arginine-déshydrogénase

ADN : L'acide désoxyribonucléique

ADP : Adenosine diphosphate.

AHL : N-acyl homosérines lactones

AK : Amikacine

AQ : Alkyle quinolones

BEL : Belgium

BLSE : β -lactamase à spectre élargi

CAZ: Ceftazidime

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CIP : Ciprofloxacine

CMI : Concentration minimal d'inhibition

CS : Colistine

CTX-M : Cefotaxime M

EPS : exopolymères

GES : Guiana Extended Spectrum

GEN : Gentamycine

H. influenzae: *Haemophilus influenzae*

K : Kanamycine

KB : Les kératites bactériennes

LDC : Lysine-décarboxylase

LPS : lipopolysaccharides

Las B : Elastase B

ODC : Ornithine-décarboxylase

OMP : Outer Membrane Protein

ONPG: ortho nitro phényl-galactose

ORL: Oto-rhino-laryngologiste

PA: *pseudomonas aeruginosa*

PER-1: *Pseudomonas* Extended Resistance

PH : potentiel hydrogène

PQS : *Pseudomonas* Quinolone Signal

PSE : *Pseudomonas* Specific Enzyme

Psl : polysaccharide synthesis locus

QS : Quorum Sensing

Rif : Rifampicine

Rmt : Ribosomal méthyltransférase

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

Tat : Twin-arginine-translocation

TCC : Ticarcilline+ Acide clavulanique

TDA : Tryptophane désaminase.

TEM : virus de l'immunodéficience humaine

VEB : Vietnamese Extended spectrum β -lactamase

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Liste des tableaux

Tableau I : Caractères biochimiques de <i>P. aeruginosa</i>	05
Tableau II : Matériels et différents milieu utilisées	22
Tableau III : Liste d'antibiotiques utilisés : recommandations du CA-SFM, 2021	24
Tableau IV : Résultats de l'antibiogramme de la souche 01	32
Tableau V : Résultats de l'antibiogramme de la souche 02	32

Liste des figures

Figure 01 : Morphologie de <i>P. aeruginosa</i>	4
Figure 02 : Représentation circulaire du génome de 12 souches de <i>P. aeruginosa</i>	6
Figure 03 : Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	6
Figure 04 : Structure et assemblage du flagelle bactérien	7
Figure 05 : Représentation d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> au microscope électronique à Balayage	1
Figure 06 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	11
Figure 07 : La régulation par le QS chez <i>P. aeruginosa</i>	14
Figure 08 : Infection à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Figure 09 : Aspect clinique d'un ulcère infecté par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figure 10 : Kératite bactérienne à <i>P. aeruginosa</i>	21
Figure 11 : Protocole expérimental de l'effet de la Ceftazidime sur la formation des biofilms	26
Figure 12 : Protocole expérimental de l'effet de l'agitation mécanique sur la formation des biofilms	27
Figure 13 : Détection de la formation de biofilm par marquage au cristal violet.	28
Figure 14 : Figure représente les résultats de repiquage sur milieu Hektoen et King A.	29
Figure 15 : Observation microscopique de <i>P. aeruginosa</i> après coloration de Gram (G100).	30
Figure 16 : La croissance à 4°C et 42°C	30
Figure 17 : Test de catalase positif	3
Figure 18 : Test d'oxydase positif	31
Figure 19 : Résultats d'antibiogramme pour les souches 01 et 02	33
Figure 20 : Visualisation des biofilms par marquage au cristal violet	33
Figure 21 : Evolution de la densité optique en fonction d'antibiotique et temps chez la souche 01 (origine animale) ; A : effet de la Céfotazidime, B : effet de Ciprofloxacine, C : effet de l'Amikacine.	34
Figure 22 : Evolution de la densité optique en fonction d'antibiotique et temps chez la souche 02 (origine humaine) ; A : effet de la Céfotazidime, B : effet de Ciprofloxacine, C : effet de l'Amikacine.	35
Figure 23 : Evolution de la densité optique en fonction de l'agitation chez les souches 01 et 02.	36

Introduction

Pseudomonas aeruginosa été découverte en 1882 par Carle Gessard, un pharmacien des armées et bactériologiste français. Une expérience sur les colorations bleues et vertes du pus laissé sur les bandages recouvrant les plaies des soldats lui a fait identifier un pigment soluble dans l'eau et fluorescent lorsqu'il est exposé à la lumière ultraviolette. Son étude l'amène isoler la bactérie à conclure sur la nature pathogène de *Pseudomonas aeruginosa* et à classifier la souche (Gessard *et al.*, 1984).

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif que l'on trouve dans de nombreux environnements comme le sol, l'eau ou la végétation. C'est également un pathogène opportuniste capable d'infecter une multitude d'hôtes comme les nématodes, les insectes, l'homme et même les plantes (Ralme *et al.*, 2000). Chez l'homme, *P. aeruginosa* est la cause majeure d'infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés. Parmi les affections les plus courantes, on peut citer les pneumonies, les infections du tractus urinaire, des brûlures, des plaies ou bien encore les septicémies. De plus, *P. aeruginosa* est directement responsable du taux de mortalité élevé et précoce chez les patients atteints de mucoviscidose (Costerton *et al.*, 1999).

Cette bactérie possède une arme clé, un biofilm. La formation des biofilms est un mécanisme très important permettant à *P. aeruginosa* de rivaliser, de survivre et de dominer dans l'environnement polymicrobien pulmonaire de la mucoviscidose (Oluyombo *et al.*, 2019). *P. aeruginosa* colonise également efficacement diverses surfaces, notamment le matériel médical (cathéters urinaires, implants, lentilles de contact, etc.) (Ghafor *et al.*, 2011), et les équipements de l'industrie alimentaire (cuves de mélange, cuves et tubulures) (Coughlan *et al.*, 2016).

Le biofilm est un agrégat complexe de bactéries enfermées dans une matrice auto-générée de substances polymères extracellulaires (EPS) et est l'une des stratégies clés pour la survie des espèces lors de changements inattendus des conditions de vie tels que les fluctuations de température et la disponibilité des nutriments (Rollet *et al.*, 2009). Les bactéries dans un biofilm peuvent échapper aux réponses immunitaires de l'hôte et résister aux traitements antimicrobiens jusqu'à 1000 fois plus que leurs homologues planctoniques (Lounis *et al.*, 2001).

Pseudomonas aeruginosa est capable de développer de multiples résistances en activant ses mécanismes intrinsèques (naturels), soit en acquérant du matériel génétique étranger délivré par des éléments mobiles (plasmides, transposons). Cette espèce bactérienne fait désormais partie d'une liste de bactéries dont la résistance aux antibiotiques est devenue un enjeu majeur de santé

publique. En fait, certaines souches ne sont aujourd'hui sensibles qu'à un nombre limité d'antibiotiques, ce qui limite les options de traitement et compromet l'efficacité des traitements. La multirésistance à des origines complexes et multifactorielles. Elle dépend en partie des habitudes de prescription des préconisations, de la nature de l'activité clinique et du respect plus ou moins fort des consignes d'hygiène hospitalière par l'équipe médicale (Imane *et al.*, 2015).

Dans le cadre de notre travail, nous nous intéressons à l'étude de l'effet des antibiotiques à différentes concentrations ainsi que l'agitation mécanique sur la formation des biofilms chez cette souche.

Notre travail se repartie en deux parties

- La première partie est une synthèse bibliographique où nous apportons Généralité sur *Pseudomonas aeruginosa*, la résistance aux antibiotiques ainsi que les infections causées par *Pseudomonas aeruginosa*.
- La deuxième partie est la partie expérimentale qui est consacrée aux méthodes d'étude de l'effet des antibiotiques à différentes concentrations ainsi que l'agitation mécanique sur la formation des biofilms par la méthode au cristal violet.
- Enfin, une conclusion et quelques perspectives.

Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Généralité sur *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas est le genre le plus important dans l'ordre des *Pseudomonadales*, famille des *Pseudomonadaceae*, et un taxon exceptionnellement hétérogène actuellement composé d'environ 60 espèces. Les espèces d'intérêt clinique peuvent survivre, voire se multiplier, dans les sols et les milieux hydriques sous forme libre ou en association avec d'autres organismes. Il existe néanmoins peu de bilans de la répartition spatiale des *Pseudomonades* et il est donc difficile de préciser l'habitat naturel de la majorité de ces espèces. La littérature scientifique donne toutefois quelques indications sur la répartition de certaines espèces (Leclerc et Moreau, 2002).

1. Classification

Domaine : *Bactéria*.

Phylum : *Proteobacteria*.

Classe : *Gammaproteobacteria*.

Ordre : *Pseudomonadales*.

Famille : *Pseudomonadaceae*.

Genre : *Pseudomonas*.

Espèce : *Pseudomonas aeruginosa*

2. Habitat

Pseudomonas aeruginosa est largement répandu dans l'environnement. Il peut survivre à l'état saprophyte dans l'eau, le sol, les plantes et les solutions agents de conservation et surfaces inorganiques (Green *et al.*, 1974 ; Little Flower, 2009). Les bactéries également présentes dans le tube digestif et la peau des mammifères. *Pseudomonas aeruginosa* est très fréquente dans les hôpitaux et cause de nombreuses infections nosocomiales. Dans son milieu naturel, *P. aeruginosa* vit sous forme planctonique, se déplaçant dans des biofilms ou à l'état sessile, se fixant sur surface inerte ou source de substrat (Freney *et al.*, 2001).

3. Caractéristiques générales de *Pseudomonas aeruginosa*

3.1. Caractère morphologique

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram négative, les bactéries se présentent sous la forme de bacilles droits ou légèrement incurvés de 0.5 à 1.0 Um sur 1.5 à 5.0 Um

de long. Il est mobile grâce à un flagelle polaire (ciliature monotriche), parfois entouré d'une pseudo capsule appelée slim (Eyquem *et al.*, 2013).

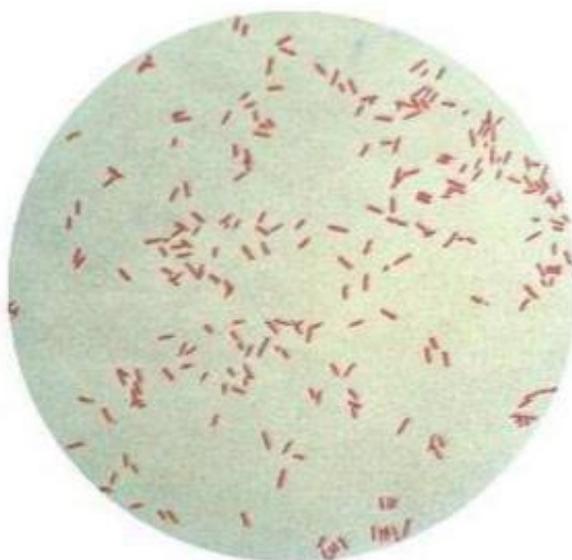


Figure 1: Coloration de Gram (GX100) (Eyquem *et al.*, 2013).

3.2. Caractères cultureux

Le genre de *Pseudomonas* sont des germes qui n'exigent aucun facteur de croissance et capable d'utiliser des simples substrats comme source de carbone et d'énergie. Cette bactérie est mésophile, capable de se développer dans des températures de 4 à 45 °C avec une température optimale de 30 °C, et d'un pH optimal de 7,2. *P. aeruginosa* est une bactérie aérobique stricte, mais en absence de l'oxygène elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons (Rahman *et al.*, 2005).

L'isolement de *P. aeruginosa* est réalisé sur des milieux ordinaires (Mueller Hinton, Gélosenutritif), milieux sélectifs comme la cétrimide qui possède des inhibiteurs de bactéries Gram positif (sels biliaires et acide nalidixique), également utilisé des milieux qui favorisant la production des deux pigments, la pyocyanine sur le milieu King A et la pyoverdine sur le milieu King B, ainsi que le Mac Conkey et Drigalski. *P. aeruginosa* peut avoir des colonies large (grande colonies bombé à contour irrégulier), des colonies Small et des colonies muqueuse (Palleroni, 1984).

3.3. Caractères biochimiques

P. aeruginosa est une bactérie chimio organotrophe, parmi ces caractéristiques biochimiques, la production d'un cytochrome C oxydase, d'autres caractères sont utiles pour

le diagnostic d'espèce : Indole (-), urée (-), TDA (tryptophane désaminase) (-), H₂S (-), gélatine (+), ONPG (-) (ortho nitro phényl-galactose), Nitrate réductase(+), LDC (-), (Lysine-décarboxylase), ODC (Ornithine-décarboxylase) (-), ADH (Arginine déshydrogénase) (+) (Lie, 2002).

Tableau I: Caractères biochimiques de *P. aeruginosa* (Oulymata., 2007).

TESTS	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H ₂ S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
RESULTATS	(+)	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	+/-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	-

3.4. Caractères antigéniques

Les souches de *P. aeruginosa* produisent deux types distincts de antigènes : un antigène polysaccharidique commun composé d'un homopolymère de D-rhamnose et un antigène O spécifique composé d'un hétéropolymère de trois à cinq sucres distincts (Lie, 2002).

3.5. Caractères génomiques

Le premier génome de *P. aeruginosa* séquencé est celui de la souche PAO1 en 2000 (Stover et al., 2000). Il est composé de 6,3 Mb et renferme 5570 gènes prédits. C'est l'un des génomes connus les plus larges parmi les bactéries Gram négatives. De plus, il contiendrait le plus grand pourcentage de gènes régulateurs prédits de tous les génomes bactériens (8,4% soit plus de 500 gènes dévolus à sa seule régulation (Stover *et al.*, 2000; Reva et Tummeler, 2004). A ce jour, de nombreux génomes de souches de *P. aeruginosa* ont été séquencés. Treize génomes (dont 9 séquencés entièrement) sont accessibles en ligne sur le site du *Pseudomonas Genome Database* et leur taille varie de 5,5 à 7 Mb, (www.pseudomonas.com).

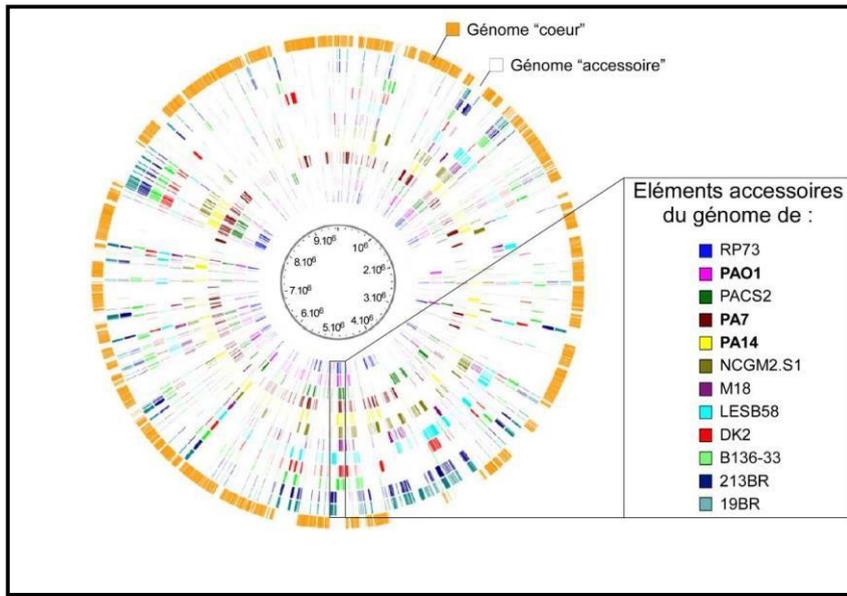


Figure 2 : Représentation circulaire du génome de 12 souches de *P. aeruginosa* (Ozer *et al.*, 2014).

4. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

La pathogénicité de *P. aeruginosa* dépend de la production de plusieurs facteurs de virulence, soit intrinsèque de la surface cellulaire, soit des produits extracellulaires (Le minor *et al.*, 2008). Ces facteurs impliqués dans la protection de bactérie, colonisation de l'hôte et aussi dans les infections aigues et chroniques (Hauser et Ozer, 2011).

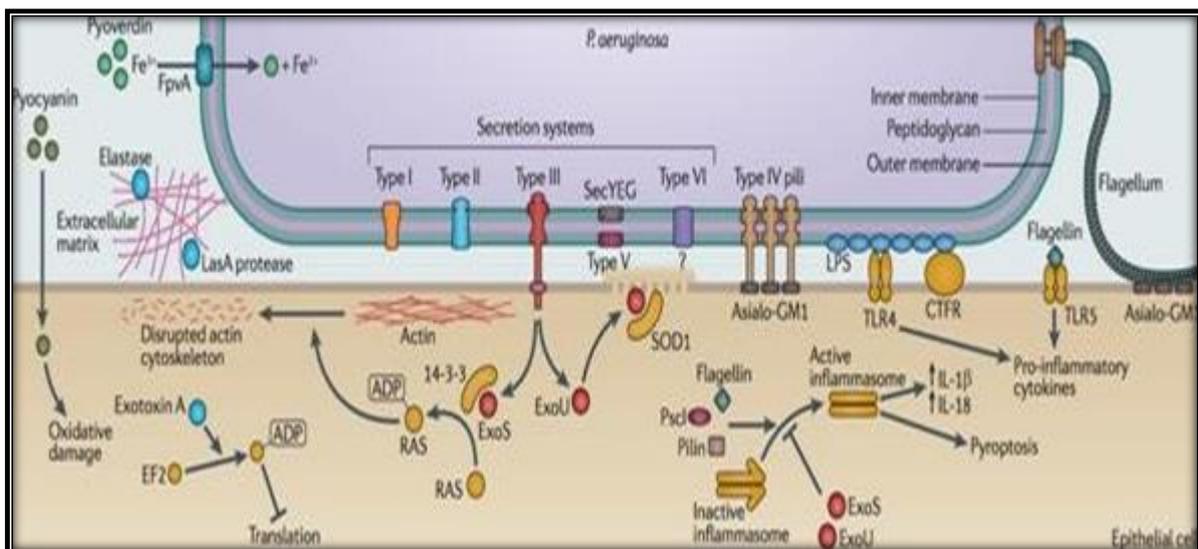


Figure 2: Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (Hauser et Ozer., 2011).

4.1. Les facteurs de virulence associés à la bactérie

4.1.1. Le flagelle

Le flagelle est un appendice locomoteur qui existe à l'extérieur de la membrane cytoplasmique et de la paroi cellulaire. *P. aeruginosa* possède un flagelle monotriche polaire, constitué essentiellement par la sous-unité FliC, qui entraîne deux types de motilité, une motilité « swimming » dans un environnement liquide et une motilité « swarming » dans des surfaces semi solides (Kohler *et al.*, 2000 ; Toutain *et al.*, 2005 ; McCarter, 2006; Kaiser, 2007). Le flagelle est impliqué dans la virulence de la bactérie. Des études antérieures démontré que les mutants dépourvus de flagelle ont une virulence faible (Drake et Montie, 1988; Feldman *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 1996). Il intervient dans la formation de biofilm et participe à la reconnaissance de la bactérie par l'hôte (O'Toole et Kolter, 1998; Sauer *et al.*, 2002).

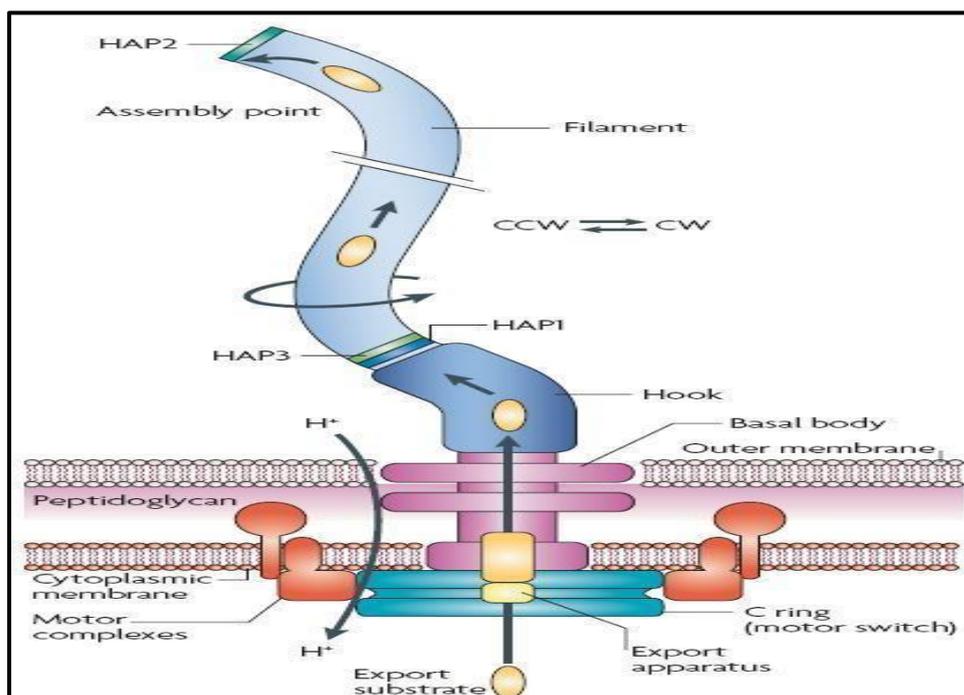


Figure 4 : Structure et assemblage du flagelle bactérien (Jare et Mc Bride., 2008)

4.1.2. Le pili

Les pilis sont des appendices situant à la surface de la paroi de nombreuses bactéries d'un diamètre de 6 nm et peuvent atteindre plusieurs micromètre de longueur, constituées d'empilements de monomères protéiques appelés piline. les pili de type IV sont responsables

d'un mécanisme d'extension-rétraction (twitching) permettant un déplacement sur des surfaces plus ou moins solides (Paranchych *et al.*, 1990).

4.1.3. Les lipopolysaccharides

Situé sur la membrane externe des bactéries Gram-négatives, le LPS est connu d'une part pour son effet protecteur contre la lyse induite par le sérum et d'autre part pour son activité d'endotoxine. Il est également impliqué dans la stimulation des réponses inflammatoires et des interactions avec les tissus de l'hôte. La molécule de LPS peut être divisée en trois parties : un lipide A, une région hydrophobe permettant l'ancrage de la structure dans la membrane externe, d'un cœur oligosaccharidique et de l'antigène-O, le cœur oligosaccharidique, également l'antigène O qui permet le sérotypage et l'identification antigénique de *P. aeruginosa* (Rocchetta *et al.*, 1999).

4.1.4. L'alginate

L'alginate est un polysaccharide visqueux produit par *P. aeruginosa* composé de D-mannuronate et de son épimère en C5, le L-glucuronate, lié en 1-4, produit dans les poumons des patients lors de l'infection chronique (mucoviscidose) (Narbad *et al.*, 1990), c'est la première barrière contre les traitements antibiotique et les systèmes de défenses immunitaires (Narbad *et al.*, 1990).

4.2. Les facteurs sécrétés par la bactérie

- L'exotoxine A est la protéine la plus toxique de *P. aeruginosa* secrété dans l'espace extracellulaire sous forme d'une pro toxine inactive de 71kDa, possède deux domaines : le domaine A possède l'activité mono ADP ribosyltransferase et le domaine B qui interagit spécifiquement avec le récepteur présent à la surface de la cellule hôte et entraîne l'arrêt de la synthèse protéique et la mort des cellules par nécrose ou par apoptose pour les mastocytes (Michalska et Wolf, 2015).
- L'élastase composé de deux enzymes protéolytiques, LasA et LasB. LasB une métalloprotéase à zinc sécrétée par le système de sécrétion de type II, joue un rôle important dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*, L'élastase Las A (Staphylolysine) est une protéase à sérine qui agit en synergie avec Las B, elle possède la capacité de moduler les défenses de l'hôte (Kessler et Ohman, 2013).

- La pyocyanine est une phénazine de couleur bleu-vert, avec une activité oxydoréductrice très importante (Wang *et al.*, 2010). Ce pigment a été observé dans la plupart des isolats cliniques de *P. aeruginosa* en phase stationnaire de croissance chez les patients atteints de mucoviscidose (Wilson *et al.*, 1988). Il a été démontré récemment que ce pigment conduisait à une hyperplasie des cellules à gobelet et à une surproduction de mucus chez la souris, rappelant ainsi un phénotype ressemblant à celui de la mucoviscidose (Hao *et al.*, 2012).
- Les phospholipases C sont des enzymes extracellulaires thermolabile hydrolysent les liaisons phosphodiester des glycérophospholipides, interviennent dans la virulence de *P. aeruginosa*. Elles déstabilisent la membrane de la cellule hôte et provoquent la mort cellulaire (Ostroff *et al.*, 1990)
- Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires amphiphile, ils ont un effet détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire, et capables d'inhiber la phagocytose (Déziel *et al.*, 2003).
- *P. aeruginosa* sécrète un nombre important de glycolipides composé de deux lectines Solubles : PA-IL et PA-IIL. Les deux protéines sont principalement présentes dans le cytoplasme de la bactérie et la présence de calcium est essentielle pour qu'elles soient actives. La sécrétion des facteurs de virulence dans le milieu extracellulaire dépend de plusieurs mécanismes de sécrétion.
- Le système de sécrétion de type I appelé aussi transporteur ABC (ATP-Binding-Cassette), est composé d'une protéine appelée OMP (Outer Membrane Protein) inséré dans la membrane interne qui fournit l'énergie nécessaire pour le transport (Mackman *et al.*, 1985).
- Le système de sécrétion de type II ou sécrétion sec-dépendante s'effectue en deux étapes. Les protéines traversent d'abord la membrane interne soit par un système sec-dépendant qui nécessite de l'ATP soit par le système de sécrétion à double arginine Tat (Twin-arginine-translocation). Les protéines traversent ensuite la membrane externe par deux machineries, qui sont le système Xcp et le système Hxc chez *P. aeruginosa* (Voulhoux *et al.*, 2001; Ball *et al.*, 2002).
- Le système de sécrétion de type III (« type three secretion system », T3SS) est un facteur de virulence majeur de la bactérie. En effet, les souches exprimant le T3SS provoquent les infections les plus graves chez les patients hospitalisés. Le T3SS n'est pas nécessaire à l'infection de l'hôte par *P. aeruginosa*, mais son expression augmente la morbidité et la mortalité liées à la maladie, notamment chez les patients sous ventilation assistée (Cordes *et al.*, 2003).

4.3. Le biofilm

Le terme « biofilm » est proposé pour la première fois en 1978 par John William Costerton et ses collaborateurs. Un biofilm est une communauté plus ou moins complexe et symbiotique de micro-organismes (bactéries, champignons, algues ou protozoaires), adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice. Sa structure est hétérogène, souvent sous forme d'une matrice extracellulaire, et composée de substances polymères qui sont généralement attachés à la surface de toutes sortes de matériaux, tels que les métaux, les plastiques, les particules des sols, surtout sur les surfaces des milieux hospitalier (*P. aeruginosa*) (Flemming et Wingender, 2010).

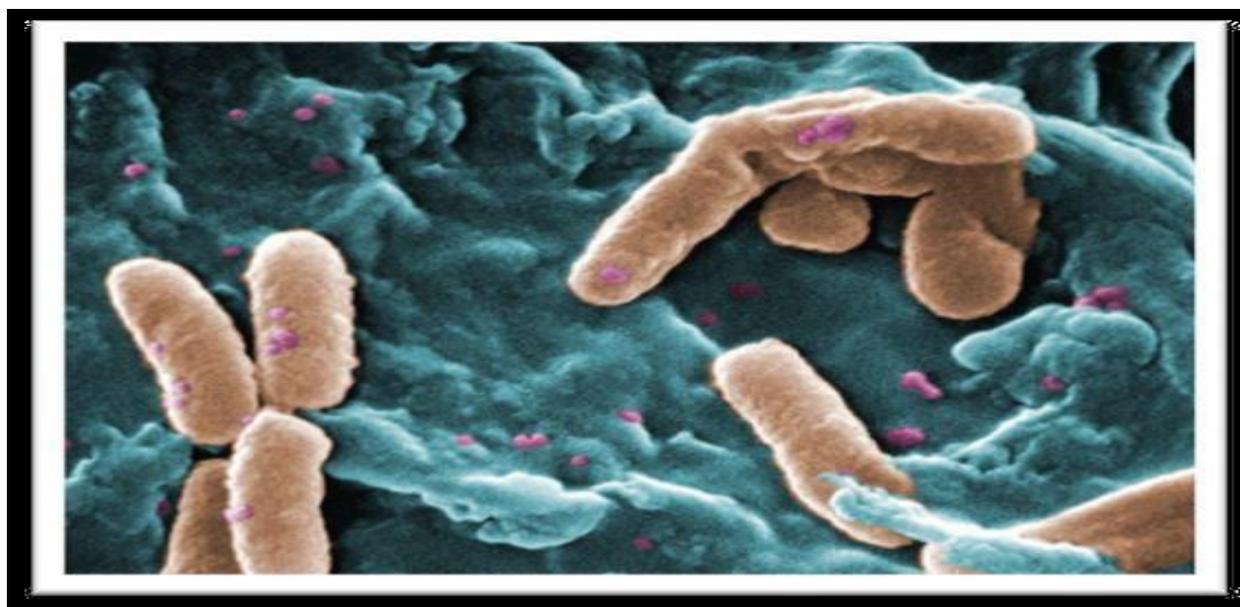


Figure 05 : Représentation d'un biofilm de *P. aeruginosa* au microscope électronique à Balayage (Stoodley *et al.*, 2002).

4.3.1. La composition d'un biofilm

Trois composants essentiels entrent dans la composition d'un biofilm de *P. aeruginosa*, Les exopolysaccharides (EPS) sont des composants importants de la matrice extracellulaire du biofilm microbien, car ils contribuent à l'architecture globale du biofilm et au phénotype de résistance des bactéries dans les biofilms. Le groupe de gènes *psl* contient 15 gènes transcrits (*pslA* à *pslO*) codant pour des protéines censées synthétiser l'EPS Psl, qui est constitué de motifs répétés de mannose, glucose et rhamnose et ce qui est important pour initier et maintenir la structure du biofilm en fournissant des interactions cellule-cellule et cellule-surface. Pel, qui

est constitué de N-acétylgalactosamine et N-acétylglucosamine, reliés entre eux par des liaisons β -1,4. L'alginate est un copolymère de D-mannuronate de son épimère en C5, le L-guluronate, lié par des liaisons β -1,4, lors d'une infection pulmonaire (mucoviscidose), l'alginate est le composant essentiel produit par *P. aeruginosa* (Billings *et al.*, 2013).

4.3.2. Formation

Le passage d'un mode de vie planctonique (bactéries libre) à un mode de vie en biofilm, requiert plusieurs modifications physiologiques, métaboliques, et dépend de signaux environnementaux et bactériens dont ceux de quorum sensing (Davies *et al.*, 1998).

La formation de biofilm se déroule en plusieurs étapes successives : une étape d'adhésion réversible des bactéries planctoniques sur un support puis une adhésion irréversible, une étape de développement et la formation de microcolonies, une étape de maturation de biofilm, à la fin une étape de dispersion (Filloux et Vallet, 2003).

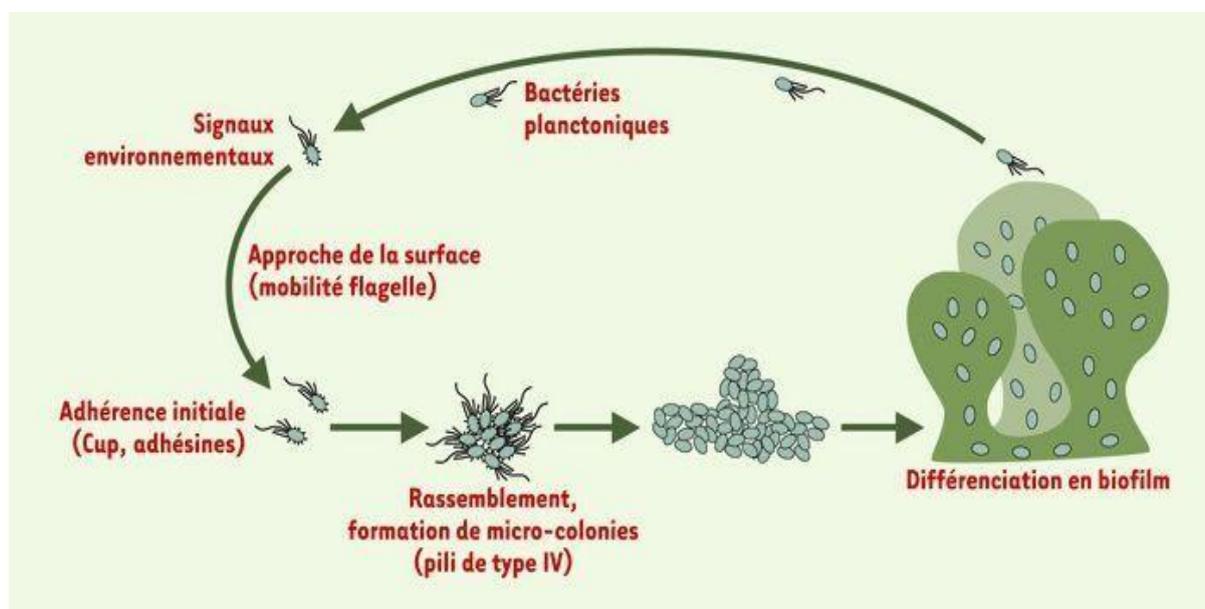


Figure 06 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm de *P. aeruginosa* (Stoodley *et al.*, 2002).

a) Adhésion réversible

L'étape initiale d'attachement des bactéries libres à une surface naturelle ou artificiel. Les bactéries arrivent à la surface par l'intermédiaire des flagelles, pili, également intervenir

des adhésines dont les facteurs d'attachement de type fimbriae et aussi les interactions de Van der Waals, acide-base et les charges électrostatiques. A ce stade les bactéries sont faciles à éliminer avec hydrothérapie, nettoyage Na Cl sous pression (Kaplan *et al.*, 2010).

b) Adhésion irréversible

Une deuxième phase qui permet aux bactéries de se développer, par l'intermédiaire de pili de type IV, ce dernier permet l'adhérence bactérienne aux récepteurs cellulaires. Les bactéries s'attachent fermement et de manière irréversible à la surface. Cette étape nécessite l'intervention de structures bactériennes spécialisées, telles que les exopolymères (EPS) produits par les bactéries ainsi que les appendices cellulaires qui interagissent avec ces EPS. Des liaisons covalentes sont établies aussi entre le glycocalix bactérien et le film de macromolécules recouvrant la surface (Wahl, 1989). Des liaisons cellule-cellule interviennent également car la présence d'une espèce de micro-organisme sur la surface peut promouvoir l'adhésion d'une autre (Savage et Fletcher, 1985).

c) La maturation

Après la formation des microcolonies, s'ensuit une étape de maturation du biofilm où les exopolysaccharides s'accumulent en périphérie et contribuent au maintien de la structure du biofilm qui devient plus résistant aux stress environnementaux. Le biofilm pourra acquérir une forme caractéristique de champignon constituée par un socle de cellules immobiles et une partie supérieure dans laquelle circulent des bactéries mobiles, le tout englobé dans la matrice extracellulaire (Renner et Weibel, 2011).

d) La dispersion du biofilm

Enfin, la dernière étape pour compléter le cycle est la dispersion du biofilm. Elle résulte de modifications des apports en nutriments, des concentrations en oxygène ou encore de variations du pH. Par exemple, des conditions d'anaérobiose en favorisant la production de monoxyde d'azote pourraient induire une diminution des concentrations intracellulaires d'une molécule signal, le di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP), et un retour vers un mode de vie planctonique. Les bactéries de surface ainsi relarguées retrouvent alors un état planctonique, pouvant dès lors coloniser une nouvelle surface puis générer un nouveau biofilm (Kaplur *et al.*, 2010).

4.3.3. Régulation de biofilm

La formation du biofilm est un phénomène régulé par des mécanismes complexes tels que le Quorum Sensing (QS), qui est un système de communication entre les bactéries, reposant sur la diffusion des petites molécules de signalisation dans le milieu appelées auto-inducteurs. Trois types de QS contrôlent l'adaptation et la virulence *P. aeruginosa* : les systèmes las et rhl basés sur des N-acyl homosérines lactones (AHL) et le système PQS libérant des alkyle quinolones (AQ) (Stevens *et al.*, 2012).

Le premier système de QS découvert est le système las, nommé las parce qu'il régule l'élastase LasB, dans ce système l'enzyme auto-inductrice LasI contribue à la synthèse de N-3 oxododecanoyle homosérine lactone (3-oxo-C12-AHL) synthase, ces AI possèdent la capacité de traverser les membranes bactériennes. Le deuxième système Rhl fonctionne selon le même schéma que Las. L'enzyme auto-inductrice RhlI induit la synthèse d'un second type d'AI, la N-butyryl homosérine lactone (C4-HSL, ce auto-inductrice contrôle le gène nécessaire à la production de rhamnolipides, également contrôle l'expression de lasB, lasA (Ruimy et Andremont, 2004).

Un troisième système de QS a été identifié chez *P. aeruginosa* avec comme auto-inducteurs des 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone nommées PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal). Il présente des analogies de structure avec les antibiotiques de la famille des quinolones. La synthèse et la bioactivité du PQS sont respectivement dépendant des systèmes las et rhl. La transcription des gènes nécessaire à la synthèse du PQS est régulée positivement par LasR et négativement par le système rhl. Ce signal ne dépendrait donc pas de la densité bactérienne (Pesci *et al.*, 1999).

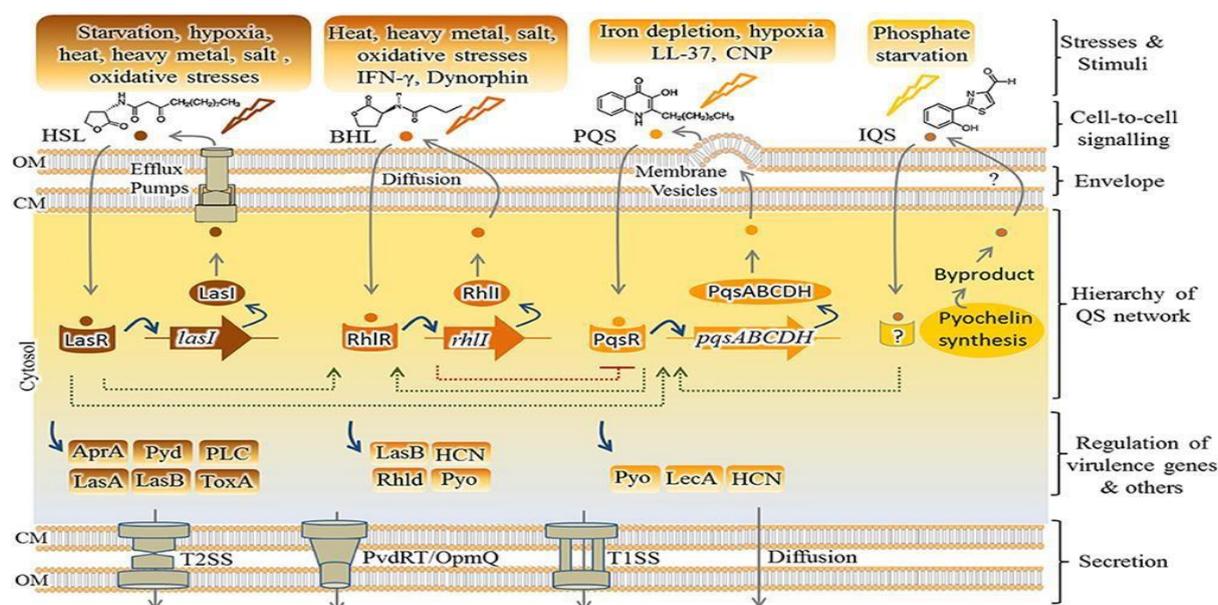


Figure 07: La régulation par le Quorum Sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* (Pesci *et al.*, 1999).

5. Résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

5.1. Généralité sur la résistance bactérienne

5.1.1. Définition de la résistance

La résistance aux antibiotiques ou antibiorésistance est définie par l'inefficacité du traitement antibiotique sur l'infection bactérienne ciblée. Cette résistance peut résulter soit des mutations soit d'acquisition de gène de résistance. *P. aeruginosa* présente une particularité de multirésistance aux antibiotiques, ce qui cause des menaces sérieuses pour la santé publique. Ce terme s'emploie habituellement pour une bactérie qui pose un problème de ressource thérapeutique (Muylaert *et al.*, 2015).

5.1.2. Résistance naturelle

Pseudomonas aeruginosa est intrinsèquement résistant à un grand nombre d'antibiotiques, par une faible perméabilité membranaire, deux systèmes d'efflux actifs (MexAB-OprM et MexXY-OprM), également une production d'une céphalosporine chromosomique AmpC, capable d'hydrolyser l'amoxicilline et l'ampicilline, les céphalosporines de première (C1G) et de deuxième (C2G) génération, voire de neutraliser certaines céphalosporines de troisième (C3G) génération dont la céfotaxime, ceftriaxone (Medboua, 2011).

5.1.3 Résistance acquise

Tous les antibiotiques anti-*Pseudomonas* sont touchés par la résistance et les mécanismes des résistances sont divers et peuvent être associés, donnant des multirésistances voir des toto résistances. Les résistances acquises sont de deux types : non enzymatiques qui sont dues à une imperméabilité accrue de la membrane externe par modification des porines où enzymatique par une production d'enzymes inactivant les antibiotiques (Edward *et al.*, 2011).

5.2. Résistance aux β -lactamines

5.2.1. Résistance enzymatique

P. aeruginosa est probablement l'espèce bactérienne pathogène présentant la diversité la plus large en termes de β -lactamases acquises. Ces enzymes sont quasi exclusivement codées par des plasmides. Les β -lactamases de classe A d'Amber (serine- β -lactamases, sensibles aux inhibiteurs) les plus fréquentes chez *P. aeruginosa* sont celles du groupe PSE. Il s'agit le plus souvent de pénicillinases à spectre étroit n'hydrolysant que les carboxy- et les ureido-pénicillines, l'activité des inhibiteurs (clavulanate, tazobactam), des céphalosporines, de l'aztréonam et des carbapénèmes étant conservée (Medboua, 2011).

➤ La production de Céphalosporinase

Une mutation chromosomique de la Céphalosporinase naturelle aboutissant à la résistance aux toutes les β -lactamines même les quatrièmes générations, les carbapénèmes restent actifs et les inhibiteurs de β -lactamases sont peu ou pas efficaces (Lister *et al.*, 2009).

➤ β -lactamase à spectre élargi (BLSE)

Les BLSEs sont des enzymes dont le spectre, plus ou moins large, inclut les C3G et les C4G(céfépime). Leur nombre a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. Elles appartiennent aux classes A ou D de Amber. Depuis la description inaugurale en 1991 de l'enzyme PER-1 (*Pseudomonas* Extended Resistance), 6 autres familles de BLSEs de classe A ont été identifiées chez *P. aeruginosa*, à savoir TEM, SHV, CTX-M, VEB (Vietnamese Extended spectrum β -lactamase), GES (Guiana Extended Spectrum) et BEL (Belgium). Différents variants ont été rapportés dans différentes parties du monde. Toutefois, toutes ces BLSEs ont la particularité d'être inhibées in vitro par l'acide clavulanique. Cette propriété est mise à profit en routine pour la réalisation de tests de synergie entre un disque de ceftazidime (ou de céfépime) et un disque contenant de l'acide clavulanique (habituellement en association avec de l'amoxicilline) (Cavallo *et al.*, 2000).

Les BLSE de classe D sont également appelées « oxacillinases à spectre élargi » (ES-OXA) par opposition aux « oxacillinases à spectre restreint » et aux oxacillinases à activité carbapénémase. Pour la plupart, ces BLSEs dérivent d'oxacillinases à spectre restreint par des mutations ponctuelles (OXA-14, OXA-19, OXA-28, OXA- 32, OXA-45...). Leur activité enzymatique, variable sur les uréidopénicillines, les carboxypénicillines, l'aztréonam et les C3G, est peu inhibée par l'acide clavulanique sauf en ce qui concerne OXA-18 et OXA-45. Il n'existe pas de méthode simple permettant la détection de ces β -lactamases en routine. Il s'agit le plus souvent d'un diagnostic par élimination. Toutefois, chez la plupart des souches productrices d'ES-OXA, on peut observer une faible image de synergie entre un disque de C3G (ceftazidime, céfépime) et un disque d'acide clavulanique (en association avec l'amoxicilline) ou d'imipénème placé à proximité (Hocquet *et al.*, 2011).

➤ **Les carbapénémases**

Les carbapénémases les plus répandues et les plus significatives chez *P. aeruginosa* sont des métallob- β -Lactamines. La biosynthèse de ces enzymes peut conduire à une résistance à l'imipénème, au doripénème mais également aux autres β -Lactamines dont cefépime, uréidopénicillines (Jovicic *et al.*, 2008).

5.2.2. Résistance non enzymatiques

➤ **Imperméabilité aux carbapénèmes**

Le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa* reste l'imperméabilité par mutation inactivatrice d'*oprD*, gène codant la protéine D2. La perte de cette porine de la membrane externe confère une résistance de haut niveau à l'imipénème et une diminution variable de la sensibilité au méropénème et au doripénème, mais n'affecte pas l'activité des autres β -lactamines. Le risque de sélection d'un mutant résistant par perte de D2 au cours du traitement d'une infection à *P. aeruginosa* par imipénème est de l'ordre de 20 à 30 % et ne semble pas significativement réduit par l'association avec un aminoside (Juan *et al.*, 2005).

➤ **Systèmes d'efflux actif**

L'hyper expression acquise des systèmes naturels d'efflux transmembranaire est un mécanisme majeur de multirésistance chez *P. aeruginosa*. Ces systèmes, multiples, déterminent certaines résistances naturelles de l'espèce. Les mutations activatrices portant sur

l'opéron *MexAB-oprM* (expression constitutive faible) sont les plus fréquemment impliqués dans l'émergence de résistances aux β -lactamines. Ce système associe une pompe (MexB), une lipoprotéine de liaison à la membrane (MexA), et la porine (*oprM*) par laquelle l'antibiotique est expulsé de la cellule. L'hyper expression de *MexAB-oprM* confère une diminution de la sensibilité, voire une résistance, à la ticarcilline, à l'aztréonam et au méropénème, l'imipénème n'étant pas un substrat de la pompe MexB. L'hyper expression du système *MexCD-oprJ*, plus rare, peut réduire la sensibilité au céfépime (Lister *et al.*, 2009).

5.3. Résistance aux aminosides

La résistance aux aminosides est liée le plus souvent à l'acquisition d'enzymes inactivatrices (notamment AAC (6')-I et APH(3')-II) et/ou d'un efflux actif (*MexXYoprM*). L'acquisition de plusieurs enzymes peut conférer une résistance croisée à l'ensemble des aminosides. Plus rares sont les résistances de haut niveau dues à l'acquisition de méthylases (*ribosomal méthyltransférase* ou *Rmt*) de l'ARNr 16S, cible de cette classe d'antibiotiques (Bonomo *et al.*, 2006).

5.4. Résistance aux quinolones

Les différences d'activité sont nettement marquées pour cette espèce en fonction des molécules de fluoroquinolones : la ciprofloxacine étant la molécule la plus active. Trois mécanismes de résistance peuvent rendre compte de la résistance à cette famille d'antibiotiques : modification d'affinité de la cible par mutations successives au niveau des gènes codant pour les topoisomérases (ADN gyrase et topoisomérase IV), imperméabilité et efflux actif. Plusieurs mécanismes peuvent coexister chez de nombreuses souches. La diminution de la sensibilité à la ciprofloxacine est une évolution notable de ces dernières années. Il est conseillé de tester à l'antibiogramme au moins deux fluoroquinolones : ofloxacine et ciprofloxacine. Les résistances étant croisées entre les différentes molécules, il est important de vérifier la CMI de la ciprofloxacine, lorsque les souches sont ofloxacine R (Reffuveille *et al.*, 2014).

5.5. Résistance à la colistine

La colistine représente actuellement la principale option pour le traitement des infections à *P. aeruginosa* multi et panrésistants. Ce polypeptide cyclique bactéricide reste en effet actif sur la quasi-totalité de ces souches (Falagas, 2007).

Chapitre II : les infections à *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes: humain, animaux, insectes, plantes, elle n'est pas virulente chez l'individu sains, mais est à l'origine d'un grand nombre d'infection notamment chez les personnes ayant des problèmes médicaux grave (immunodépression, hospitalisation, co_morbidité), et chez les patients en soins intensifs ou atteints de la mucoviscidose (Rahme *et al.*, 1995 ; D'Argenio *et al.*, 2001 ; Pukatzki *et al.*, 2002). Elle provoque des infections urinaires, intestinales, également capable de causer des infections au niveau de système nerveux central (Carek *et al.*, 2001).

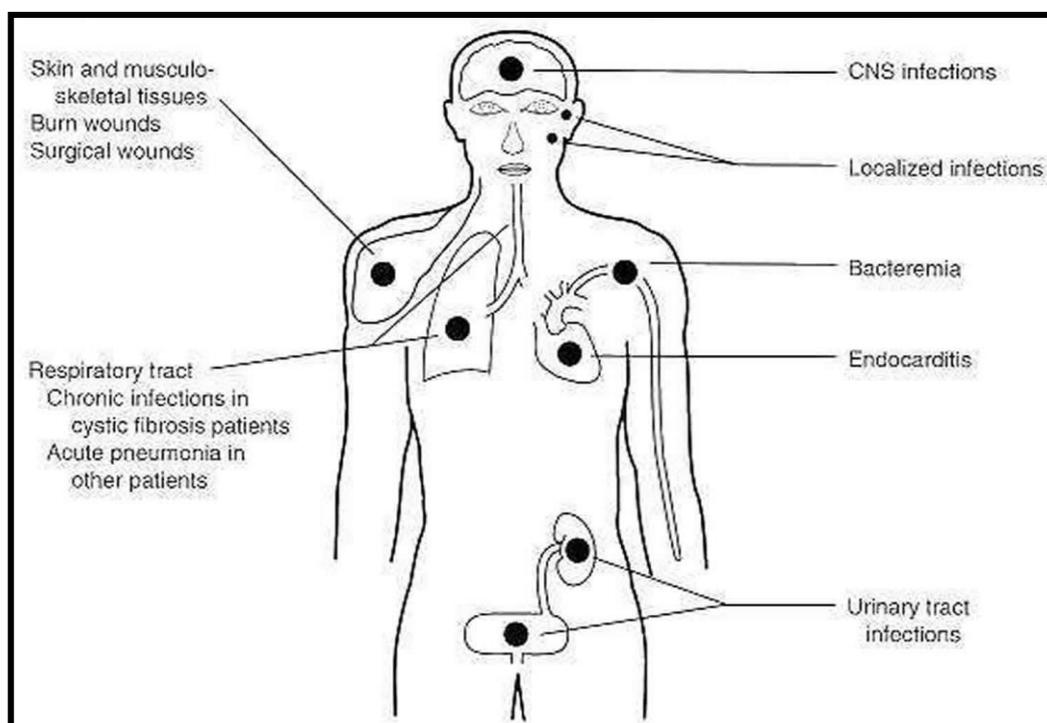


Figure 08 : Infection à *Pseudomonas aeruginosa* (Carek *et al.*, 2001).

1. Les infections pulmonaires

1.1. La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive liée à une mutation dans un gène nécessaire à la production d'une protéine appelée CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Les dysfonctionnements de cette protéine se traduisent par une augmentation de la viscosité des sécrétions corporelles et par une

inflammation au niveau des tissus recouvrant la surface du corps ou ses cavités internes et qui secrètent des substances au profit de l'organisme. Tous les organes sont affectés, mais plus particulièrement les systèmes respiratoires et digestifs (Lyczak *et al.* 2002). Les patients atteints de mucoviscidose sont les plus exposés à l'infection par *P. aeruginosa* du fait de l'altération de leur épithélium respiratoire. Les cellules immunitaires présentes dans le système pulmonaire perdent leur capacité de phagocytose à cause des quantités anormales d'ions de chlore, due à la dysfonction du canal CFTR, ce qui rend *P. aeruginosa* capable de coloniser facilement les poumons (Pier et Ramphal, 2005).

En France, 2 millions de personnes sont porteuses saines du gène de la mucoviscidose et tous les 3 jours, un enfant naît atteint de la maladie. Bien que multifactorielles, les atteintes de la maladie sont principalement respiratoires et digestives (Girodon-Boulandet et Costa, 2005). L'infection broncho-pulmonaire conditionne même le pronostic vital des patients. En effet, l'obstruction bronchique et les lésions pulmonaires associées à une infection bactérienne et à une inflammation représentent la cause majeure de mortalité (Boucher, 2004).

L'atteinte pulmonaire, qui se développe rapidement après la naissance, est liée à la production d'un mucus épais et abondant dans les voies respiratoires. Ce dernier, riche en nutriments et ralentissant la clairance mucociliaire, devient un environnement propice à la colonisation microbienne. Les principaux pathogènes impliqués dans les infections pulmonaires mucoviscidosiques sont généralement *S. aureus* et *H. influenzae* dans la petite enfance. La primo-colonisation à *P. aeruginosa* intervient en moyenne entre 8 et 10 ans et perdurera jusqu'à la fin de vie des malades. En effet, une fois présent dans les voies aériennes, le bacille pyocyanique est pratiquement impossible à éradiquer en raison de sa remarquable plasticité génomique, qui lui permet de s'adapter constamment à l'environnement pulmonaire particulier lié à la mucoviscidose. Après une première colonisation par le pathogène, les patients seront sujets à des épisodes successifs de recolonisation jusqu'à l'établissement d'une infection chronique et persistante (Ciofu *et al.*, 2015).

2. Les infections cutanées

L'infection cutanée à *P. aeruginosa* est une affection rare, qui survient surtout chez les patients immunodéprimés. Elle peut proliférer lors d'une perturbation de barrières cutanée comme une plaie chronique surinfectée : ulcère, brûlure ouverte, pied du diabétique, également lors de la disparition de la flore cutanée Cocci Gram positif (Tzika *et al.* 2015).



Figure 09: Aspect clinique d'un ulcère infecté par *Pseudomonas aeruginosa* (Tzika *et al.* 2015)

Le traitement des infections cutanées à *P. aeruginosa* passe en premier lieu par une antiseptie locale (par exemple de l'acide acétique 1%, une solution de sodium hypochlorite à 2 % dans le cas des ongles verts ...) et une suppression des conditions favorisant le développement de la bactérie (piscine, macération ...). Dans certains cas, comme la folliculite, l'infection par d'elle-même. Le traitement médicamenteux consiste en l'application d'un antibiotique topique (associé à un antifongique si besoin), ou bien selon la sévérité de l'infection, la prise d'un traitement oral antibiotique de type aminoside ou fluoroquinolone (Tancredi-Bohin 2002 ; Wu *et al.* 2011).

3. Infections oculaires

Les kératites bactériennes (KB) sont définies par la survenue d'un infiltrat cornéen sous-jacent à un ulcère épithélial d'origine infectieuse avec une atteinte tissulaire résultant de l'inflammation secondaire. Constituant de véritables urgences infectieuses, leur prise en charge rapide est nécessaire afin d'éviter la survenue de complications graves et de séquelles cornéennes parfois synonymes de baisse d'acuité visuelle définitive. L'utilisation très largement répandue des lentilles de contact explique la grande fréquence des KB (Sharma *et al.*, 2008).

Le principal facteur de risque de la kératite à *P. aeruginosa* est le port de lentilles de Contact. Cela est dû à l'hypoxie relative de l'oeil, aux microtraumatismes de l'épithélium cornéen et à l'effet pansement de la lentille. Mais la kératite peut également être liée à des antécédents de traumatisme ou de chirurgie (fils de suture cornéenne), une sécheresse oculaire, l'utilisation de collyres au long cours (corticoïdes, antibiotiques), une immunodépression

(diabète, alcoolisme, dénutrition...), une dystrophie cornéenne ou bien une pathologie palpébrale ou de la marge ciliaire (Gabison, 2013 ; Bourcier *et al.*, 2015).

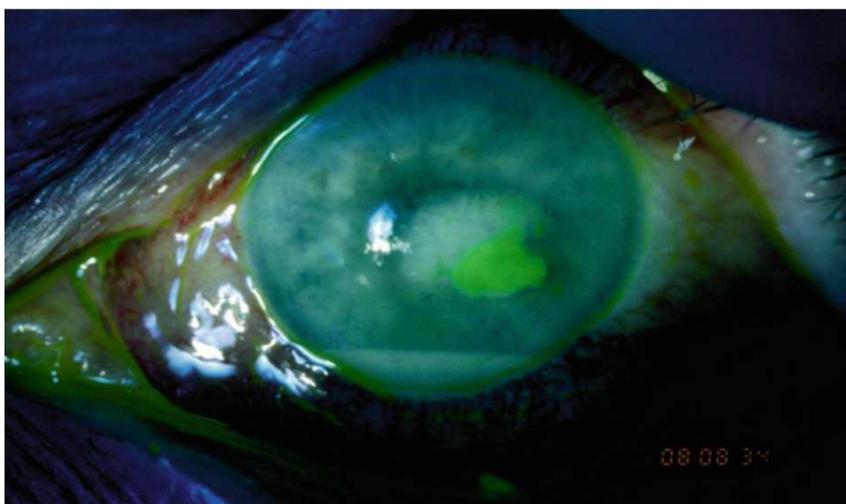


Figure 10 : Kératite bactérienne à *P. aeruginosa* (Bourcier *et al.*, 2015)

4. Autres infections

Les méningites sont rares, environ 2% dans leurs totalités, surviennent chez les patients fragilisés : néoplasiques, neutropénie, brûlés infectés par le VIH. Infections ORL sont présentées par 45 à 65% d'otite externe banale. Concernant les endocardites ; Environ 1% peuvent être dus à *P. aeruginosa*, elles peuvent être secondaire à un geste chirurgical cardio-vasculaire (Kramer *et al.*, 2006).

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre I :

Matériels et Méthodes

I. Matériels utilisés

Durant les différentes étapes de cette étude, plusieurs matériels, appareils, milieux de culture et réactif sont utilisés dans le but d'étudier les effets de quelques antibiotiques sur les biofilms de *P. aeruginosa*.

Tableau II : Matériels et différents milieux de cultures utilisés.

Appareils	Milieux de culture	Réactifs	Divers
Balance	Mac conkey	Méthanol	Aluminium
Plaque chauffante	Hektoen	Eau de javel	Flacon de 200 ml
Agitatrice bain marie	King A	Eau distillée	Boîtes de Petrie
Autoclave	Muller Hinton	Acide acétique	Pipette pasteur
Etuve	Bouillon nutritif	Cristal violet	Barreau magnétique
			Eerlein-Mayer
			Portoir
			Micropipette
			Anse de platine
			Eprouvette
			Bec bunsen
			Tubes à essai

II. Méthodes :

1. Origine des souches

Deux souches ont été utilisées ; une d'origine animale isolée à partir de matière fécale des moutons (souche 01) et l'autre d'origine humaine isolée à partir d'un liquide pleural d'un patient hospitalisé au niveau du service chirurgie générale d'hôpital d'Akbou (souche 02). Ces souches ont été utilisées afin d'étudier le profil de formation des biofilms en présence et en absence d'antibiotique.

2. Isolement et purification

L'isolement des souches a été réalisé sur des milieux sélectifs les bacilles à Gram négatif à savoir le milieu Héктоen et Mac Conkey, ainsi que sur le milieu King A afin de mettre en évidence la production de la pyocyanine. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. La purification des souches est réalisée par des repiquages successifs sur les mêmes milieux sélectifs.

3. Identification

Pour identifier les souches de *P. aeruginosa*, des tests microbiologiques, physiologiques, biochimiques ont été effectués

3.1. Etude macroscopique

Elle permet d'observer la taille, la forme, la couleur, l'aspect et la pigmentation des colonies. Ceci nous permet de prélever et de sélectionner seulement les colonies possédant les caractéristiques culturales des *P. aeruginosa*.

3.2. Etude microscopique

L'étude microscopique a été menée grâce à une coloration de Gram qui est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi : Gram positive et Gram négative ainsi qu'un état frais.

3.3. Croissance à 4°C et 42°C

Les deux souches sont ensemencées sur le milieu Mac Conkey ou Héктоen puis incubés à 42 °C et à 4 °C pendant 18 à 24 h.

3.4. Recherche de l'oxydase

L'activité oxydase du *P. aeruginosa* peut être déterminée par la méthode des disques et selon le protocole suivant : A l'aide de pinces, un disque d'oxydase est placé sur une lame porte objet. Puis, faire Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraîche à tester. Ensuite Prélever la colonie choisie à d'une anse de platine. À la fin, Frotter doucement la colonie sur le disque et observer.

3.5. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène. Synthétisée par la plupart de bactéries aérobies. L'activité catalase du *P. aeruginosa* peut être déterminée selon le protocole expérimental décrit par Prescott et al, en 2003. Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu gélosé à l'aide d'une pipette Pasteur dans de l'eau oxygénée.

4. Antibiogramme

L'antibiogramme est un examen réalisé pour déterminer la sensibilité ou la résistance d'une souche à un ou plusieurs antibiotiques. La méthode de diffusion est la plus utilisée dans le laboratoire, des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés à la surface de milieu Muller Hinton préalablement ensemencé avec une suspension bactérienne standardisé.

4.1. Techniques standardisées selon les recommandations du CA-SFM, 2021

➤ La préparation d'une suspension bactérienne (Inoculum)

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, une colonie bien isolée est prélevée à partir d'une culture de 18h à 24 h, qui est déchargée ensuite dans un tube stérile contenant de l'eau

physiologique. L'antibiogramme par diffusion est réalisé avec une suspension calibrée à 0.5 MF ou à une D.O de 0.08 à 0.13 à 625nm contenant environ 10^8 bactéries par ml.

➤ **La technique d'ensemencement**

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum, il est réalisé par trempage d'un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ensuite l'essorer en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum. Enfin l'ensemencement est réalisé par frottement de l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de la boîte de pétrie. Cette opération se répète trois fois en tournant la boîte 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même.

➤ **L'application des disques d'antibiotiques**

Les disques sont fabriqués à partir de papier absorbant de qualité supérieure imprégnés d'antibiotiques à des concentrations précises. Ils sont clairement identifiés par une abréviation, comportant 1 à 3 lettres, imprimé de chaque côté du disque (tableau III).

Les disques choisis sont déposés 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 utilisé neuf antibiotiques de différentes familles.

Tableau III : Liste d'antibiotique utilisés: recommandations du CA-SFM, 2021

Abréviation	Famille	Antibiotiques	Charge
CS	Polymyxines	Colistine	10µg
RIF	Rifamycines	Rifampicine	5µg
TCC	β-lactamines	Ticarcilline+Acide clavulanique	30µg /85µg
CAZ		Céftazidime	30µg
CIP	Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	5µg
GEN	Aminosides	Gentamycine	10µg
K		Kanamycine	30µg
AK		Amikacine	30µg

5. L'évaluation de l'effet des antibiotiques sur la formation des biofilms

5.1. Préparation de suspension bactérienne initiale

Quelques colonies de la culture bactérienne ensemencée la veille sur milieu Héктоen, sont remises en suspension dans 10ml de bouillon nutritif, après détermination de sa densité optique à longueur d'onde 600nm (DO : 0.08-0.13 environ 10^8 bactéries/ml), ensuite deux dilutions ont été réalisées afin d'avoir une suspension à l'ordre de 10^6 bactéries/ml. Cette dernière a été utilisée comme suspension initiale dans l'étude de la formation des biofilms, sous l'effet d'antibiotique et l'agitation mécanique.

5.2. Préparation de différentes concentrations d'antibiotiques

Pour déterminer l'effet des antibiotiques sur la formation des biofilms, nous avons utilisé trois familles antibiotiques à des concentrations différentes, à savoir une β -lactamine (Céftazidime à deux concentrations finales de 1 μ g/ml et 2 μ g/ml), un aminoside (Amikacine à deux concentrations finales de 1 μ g/ml et 2 μ g/ml) et une fluoroquinolone (Ciprofloxacine à deux concentrations finales de 2 μ g/ml et 4 μ g/ml). Le protocole expérimental de l'effet de la céftazidime sur la formation des biofilms est résumé dans la figure 11. Ainsi que le protocole expérimental de l'effet de l'agitation mécanique sur la formation des biofilms est résumé dans la figure 12.

- **Remarque** : Le même protocole a été réalisé pour l'étude de l'effet de l'amikacine et la ciprofloxacine.

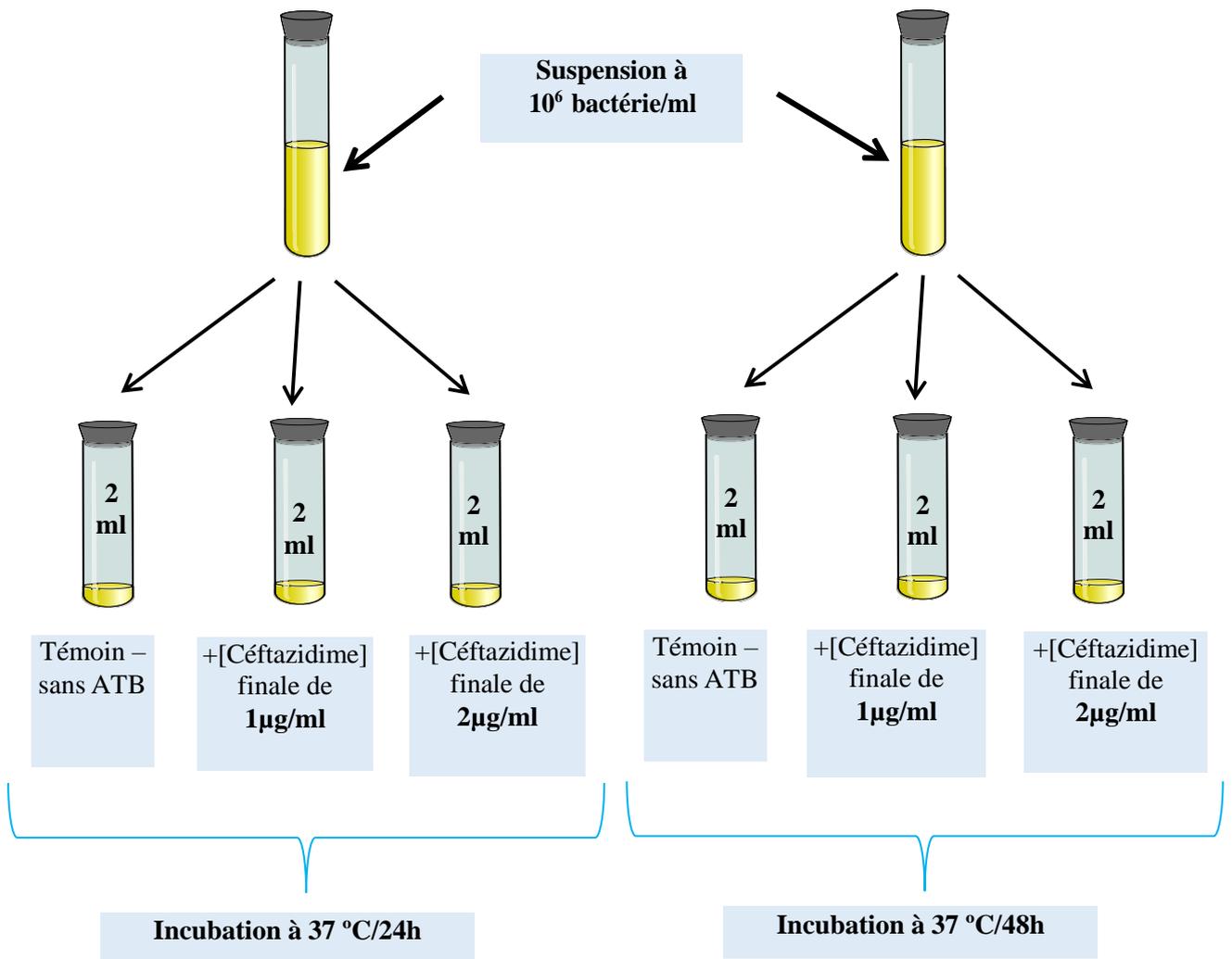


Figure 11 : Protocole expérimental de l'effet de la ceftazidime sur la formation des biofilms.

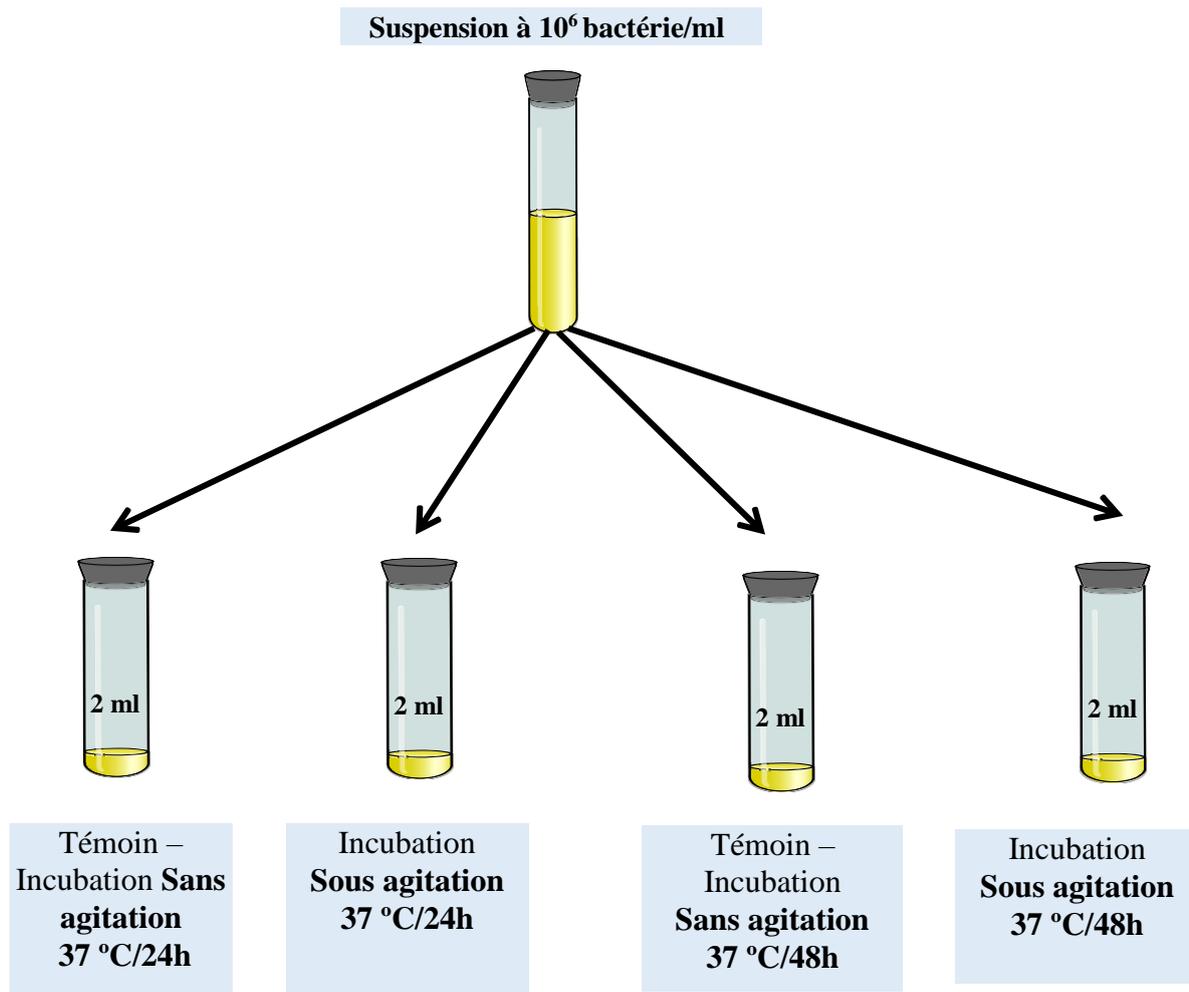


Figure 12 : Protocole expérimental de l'effet de l'agitation mécanique sur la formation des biofilms.

6. Détection de la formation de biofilm par marquage au cristal violet

6.1. Principe

C'est la technique la plus fréquemment utilisée au laboratoire, basée sur la spectrophotométrie le principe de cette méthode, qui quantifie la biomasse totale du biofilm, repose sur le marquage des cellules adhérentes par le cristal violet (O'Toole, 2011 ; Stepanovic et al., 2000). La mesure de l'absorbance de la culture bactérienne analysée reflète ainsi sa capacité à adhérer et donc à former un biofilm au fond d'un tube. L'effet des antibiotiques sur la formation des biofilms peut être évalué par la technique de cristal violet, on les ajoutant à la suspension bactérienne à différentes concentrations d'antibiotiques.

6.2. Protocole

Après l'incubation dans l'étuve pendant 24 h, on prend une micropipette à 1000 μ l et on prélève à chaque fois un volume de 2.5 ml de cristal violet et on l'ajout dans des tubes qui contiennent 2 ml de la culture bactérienne ^{et} qui possèdent aussi des antibiotiques différents à des concentrations différentes. On les laisse après pendant 20 à 25 minutes et les biofilms ayant adhéré aux parois et sur les surfaces des tubes sont marqués par le cristal violet. Les tubes ensuite sont vidés de cristal violet et bien rincés à l'eau distillé.

On prélève après un autre volume de 2.5 ml d'acide acétique et on l'ajout à l'intérieur de ces tubes à l'aide d'une micropipette à 1000 μ l pour solubiliser les biofilms adhérent dans les tubes. Enfin on mesure l'absorbance à 540nm de chaque tube à l'aide de l'appareil de spectrophotomètre (Figure 13). On répète le même protocole pour les tubes incubés à 48h et les tubes sous agitation.

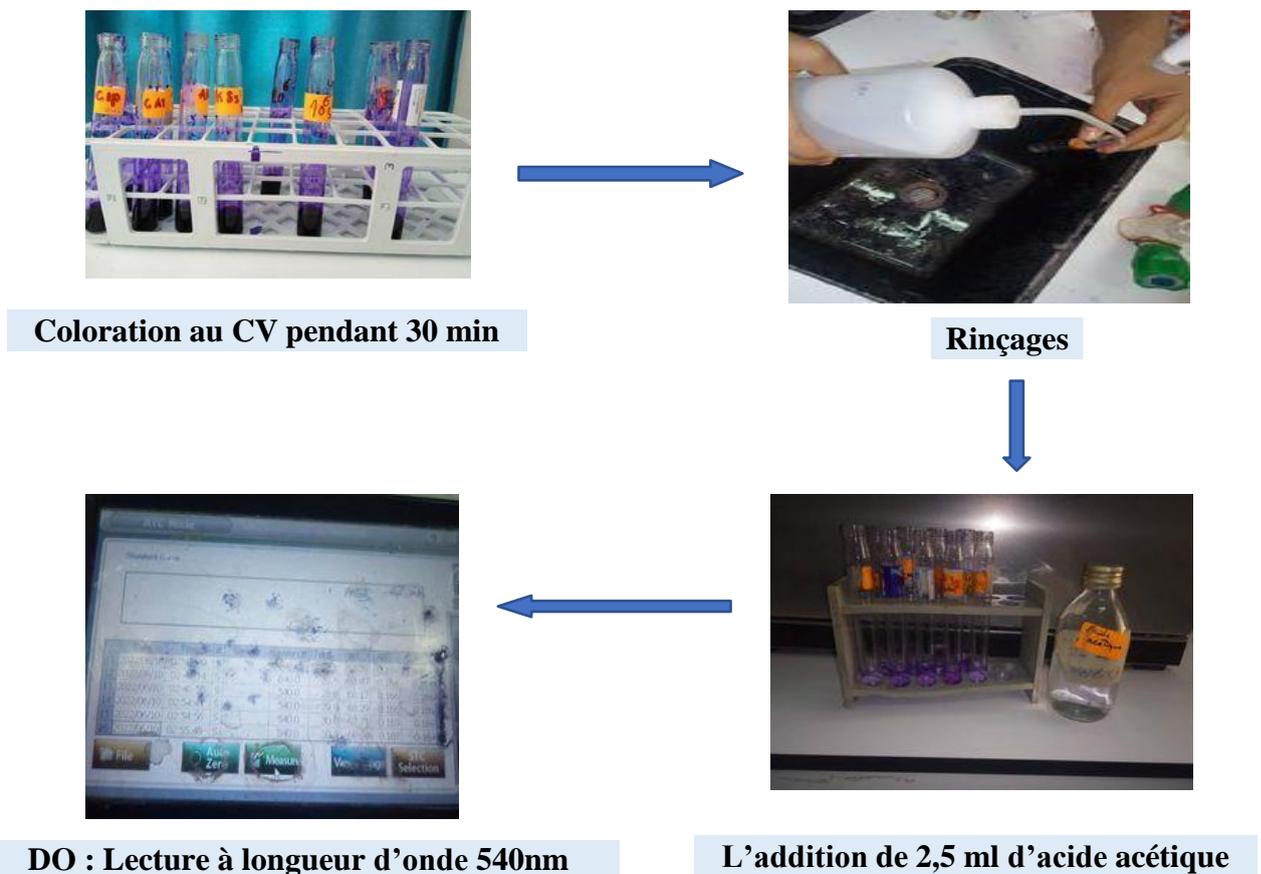


Figure 13 : Détection de la formation de biofilm par marquage au cristal violet.

Chapitre II :

Résultats et Discussion

1. Isolement et purification

L'isolement et la purification de deux souches de *P. aeruginosa* a montré une production de la pyocyanine qui est un pigment vert, sur les deux milieux à savoir King A et Hektoen. De plus, une odeur caractéristique de la fleur de « seringa » due à la production d'orthoamino-acétophénone, provient de ces cultures (figure 14).

2. Identification

2.1. Etude macroscopique

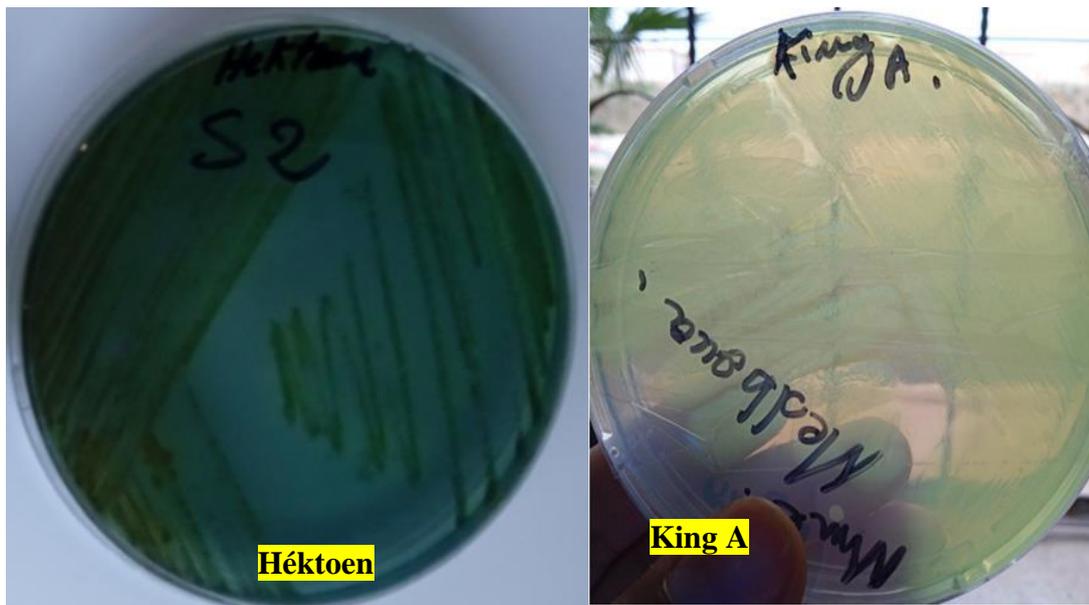


Figure 14 : Les résultats de repiquage sur milieu Hektoen et King A.

2.2. Etude microscopique

Après la coloration de Gram ; *P. aeruginosa* apparaît sous forme de bacilles colorés en rose. Elles possèdent des parois à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram négatif, l'alcool mis au contact de cellules colorées, solubilise les lipides de leur paroi. Ces derniers sont alors perdus et la paroi devenue poreuse, puis la fuchsine va occuper la place des phospholipides solubilisés et donne une couleur rose (figure 15).

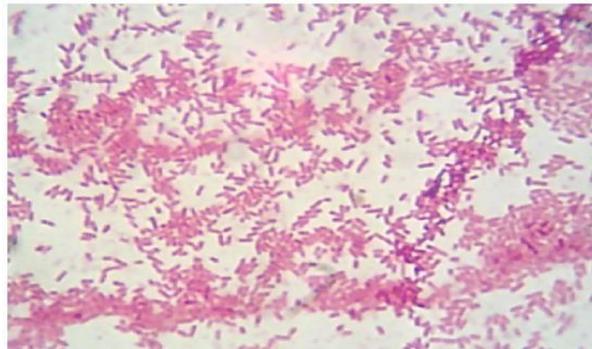


Figure 15 : Observation microscopique de *P. aeruginosa* après coloration de Gram (G100).

3. Croissance à 4°C et 42°C

Après 24 heures d'incubation à 4°C et 42°C, des colonies de *P. aeruginosa* sont observées sur les deux milieux.

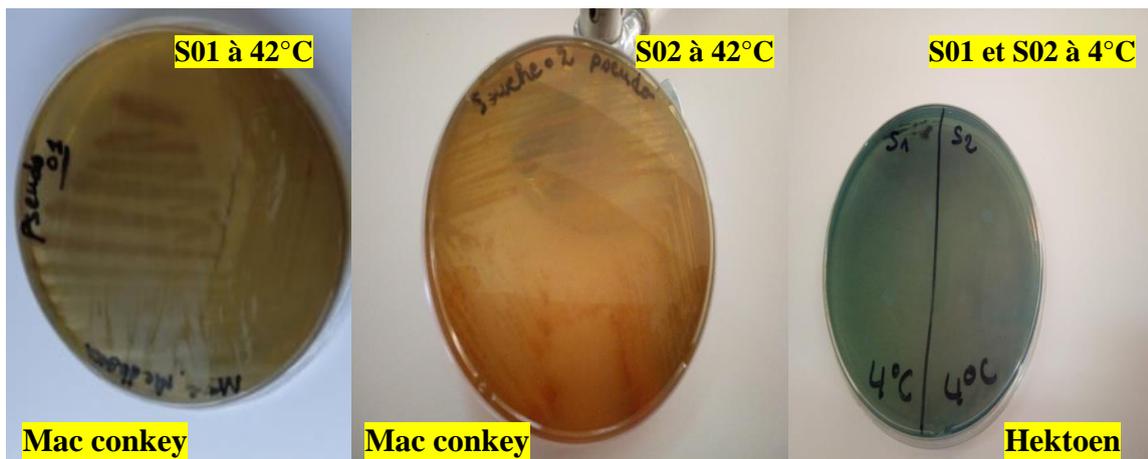


Figure 16 : La croissance à 4°C et 42°C

4. Test de catalase

L'apparition des bulles de gaz après l'addition de H_2O_2 , révèle une réaction positive (figure17).



Figure 17 : Test de catalase positif

5. Test d'oxydase

La zone réactionnelle sur la bandelette d'oxydase est colorée en bleu ou bleu-violet, ce qui confirme la présence du cytochrome oxydase (figure 18).



Figure 18 : Test d'oxydase positif

6. Antibiogramme

Après incubation à la température $37^{\circ}C$ pendant 24h, les diamètres des zones d'inhibition seront mesurés avec précision à l'aide d'une règle. Les mesures seront prises en procédant par transparence à travers le fond de la boîte de Petri fermée. Les diamètres des zones d'inhibition mesurés seront comparés aux diamètres critiques donnés par les instances en vigueur (CASFM, 2021) afin de classer la bactérie dans l'une des catégories Résistant, Intermédiaire, Sensible. Les résultats des diamètres d'inhibition mesurés sont reportés dans les tableaux IV et V . Ces résultats montrent que les deux souches représentent des résistances intermédiaires aux différentes molécules d'antibiotique (figure 19).

Tableau IV : Résultats de l'antibiogramme de la souche 01.

Antibiotique	Concentration	Diamètre	Interprétation
Colistine	10µg	13mm	S
Ticarcilline+ Acide clavulanique	30µg +85µg	24mm	I
Ciprofloxacine	5µg	35mm	S
Gentamycine	10µg	23mm	S
Céftazidime	30µg	25mm	I
Kanamycine	30µg	13mm	I
Rifampicine	5µg	< 6mm	R
Amikacine	30µg	24 mm	S

Tableau V : Résultats de l'antibiogramme de la souche 02.

Antibiotique	Concentration	Diamètre	Interprétation
Colistine	10µg	11mm	S
Tétracycline	30µg	<6mm	R
Ticarcilline+ Acide clavulanique	30µg +85µg	<6mm	R
Ciprofloxacine	5µg	35mm	S
Gentamycine	10µg	13mm	I
Céftazidime	30µg	16mm	R
Kanamycine	30µg	12mm	I
Rifampicine	5µg	< 6mm	R
Amikacine	30µg	25mm	S

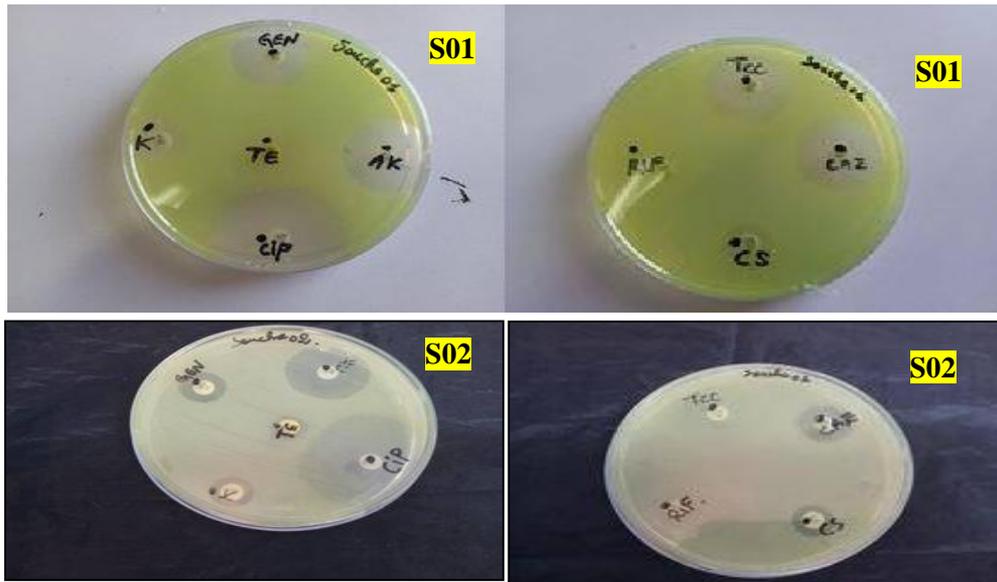


Figure 19 : Résultats d'antibiogramme pour les souches 01 et 02

7. Marquage au cristal violet

D'après les résultats obtenus, Il est clairement remarqué l'apparition des anneaux à la surface des tubes ce qui explique la formation des biofilms (figure 20).

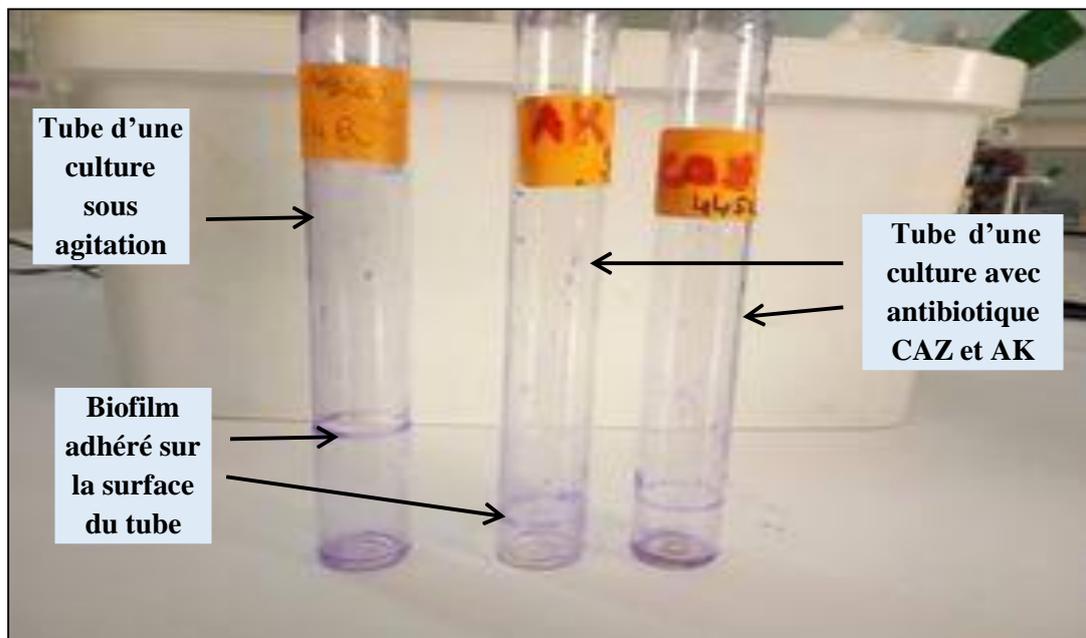


Figure 20 : Visualisation des biofilms par marquage au cristal violet

8. Quantification des biofilms formés par spectrophotométrie

8. 1. Effet des antibiotiques sur la formation des biofilms

Les figures 21 et 22 ci-après montrent les variations de la densité optique chez la souche 01 (origine animale) et la souche 02, respectivement (origine humaine), en fonction des antibiotiques à différentes concentrations à travers le temps, ce qui reflète la quantité de biofilm formé dans ces conditions variables.

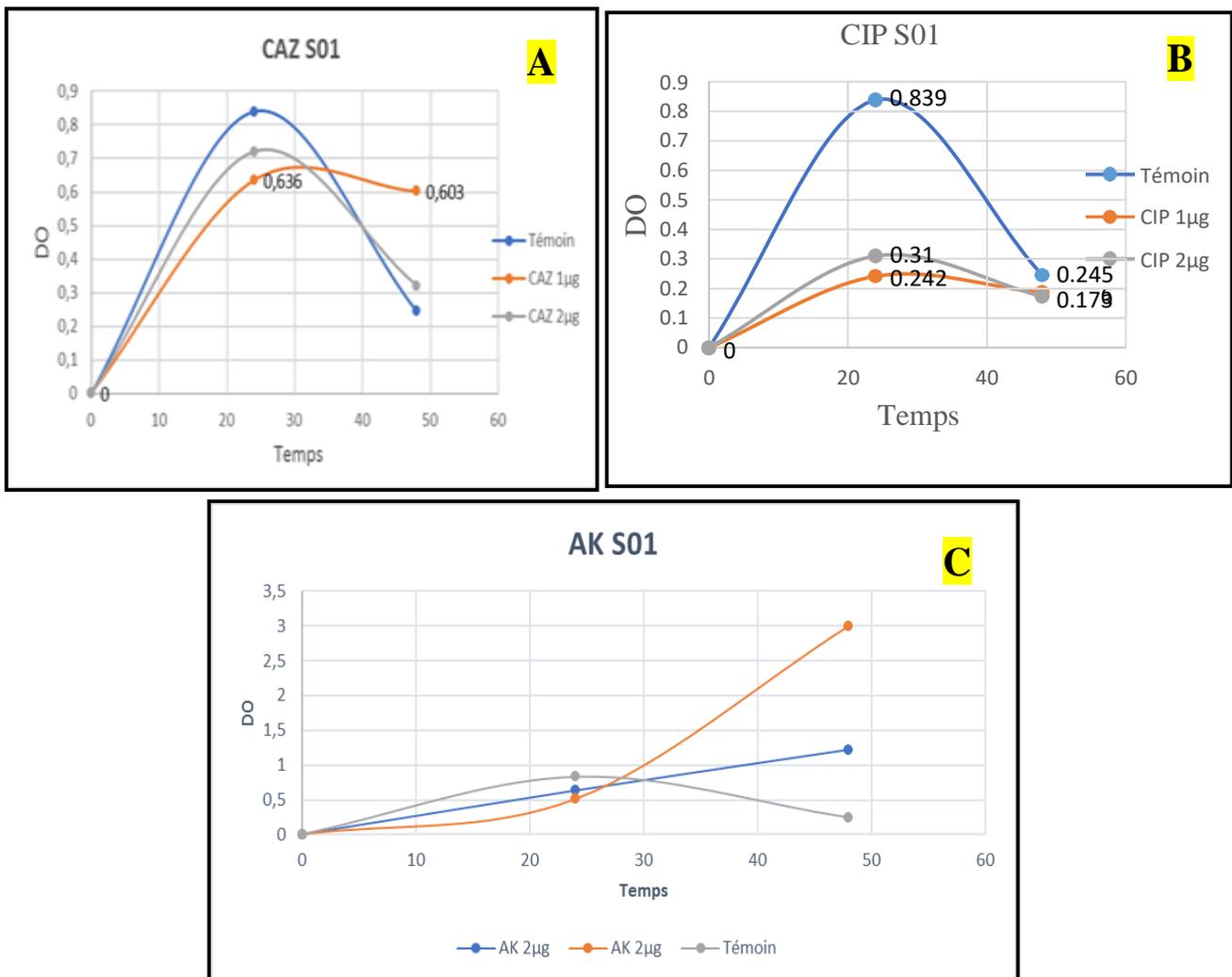


Figure 21 : Evolution de la densité optique en fonction d’antibiotique et temps chez la souche 01 (origine animale) ; **A :** effet de la Céftrizidime, **B :** effet de Ciprofloxacine, **C :** effet de l’Amikacine.

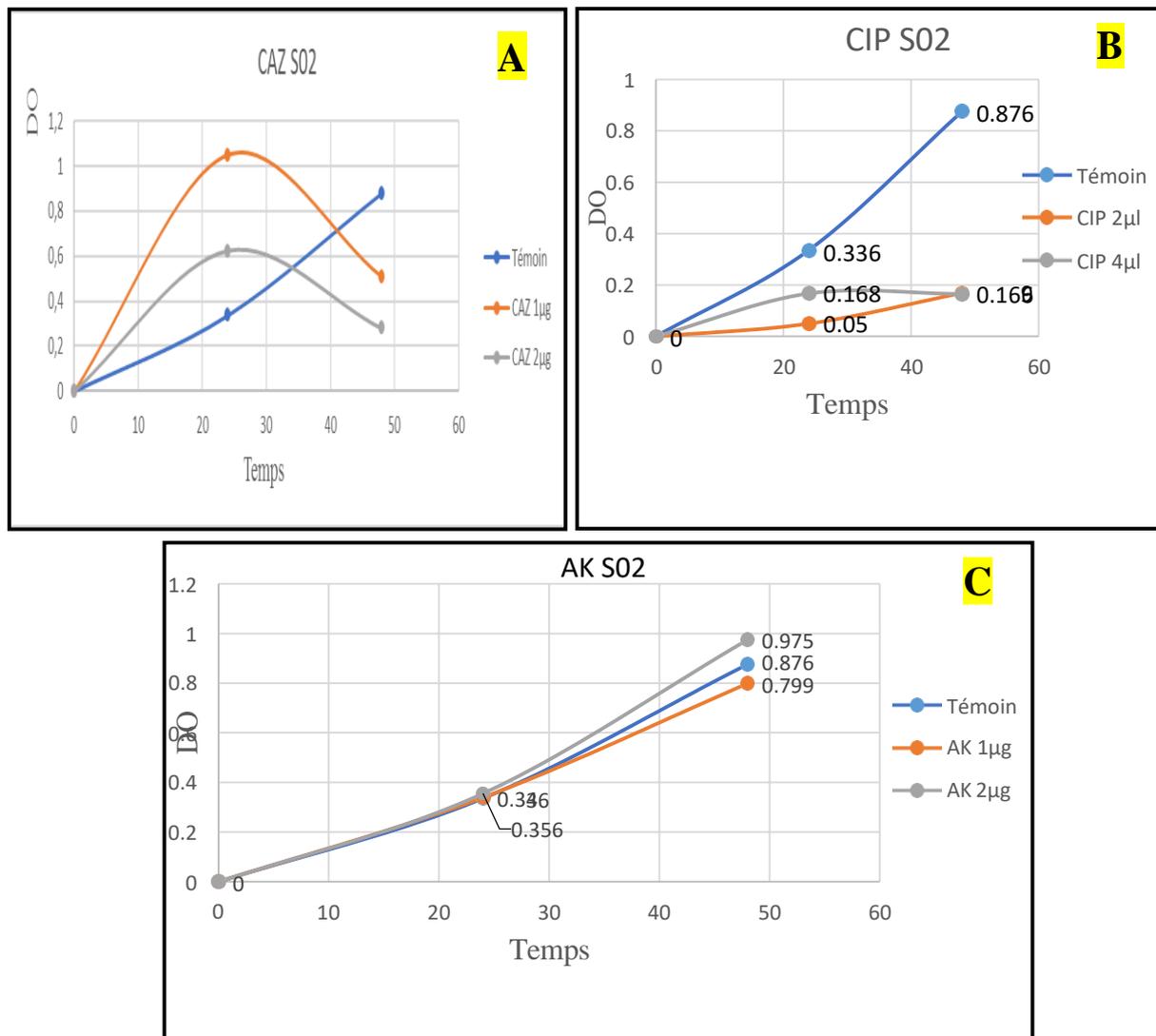


Figure 22 : Evolution de la densité optique en fonction d’antibiotique et temps chez la souche 02 (origine humaine) ; **A** : effet de la Céfotazidime, **B** : effet de Ciprofloxacine, **C** : effet de l’Amikacine.

Selon les figures, on note que la quantité de biofilm produit est moins importante dans les cultures avec antibiotiques comparant aux témoins, ce qui suggère que les antibiotiques réduisent un peu la formation de biofilms mais n’inhibent pas cette production.

. Après 24 h d’incubation on note une augmentation de densité optique dans les cultures contenant les différentes concentrations d’antibiotiques (Céfotazidime, Ciprofloxacine,

Amikacine), on remarque également, que chaque fois on augmente la concentration d'antibiotique chaque fois la densité optique augmente, ce phénomène peut être expliqué par le fait que ces souches produisent plus de biofilms, afin de se protéger.

Par contre, après 48h d'incubation, cette densité diminue dans les cultures avec la céftazidime et la ciprofloxacine contrairement à celle avec l'amikacine qui continue toujours d'augmenter. Cette diminution peut être expliquée par l'augmentation de la concentration bactérienne, ce qui provoque l'inefficacité de l'antibiotique, en revanche, les souches reprennent la forme planctonique (forme libre). Si on compare l'effet des trois antibiotiques sur la formation des biofilms, on peut estimer d'une manière présomptive que l'amikacine est l'antibiotique le plus inducteur de la production de biofilm.

8.2. Effet de l'agitation

Cette figure représente l'évaluation de la formation de biofilm en fonction de l'agitation mécanique, après 24h d'incubation, on note que la souche 02 d'origine humaine produit plus de biofilms par rapport à la souche 01 d'origine animale comparant au témoin sans agitation. Cela peut être expliqué par le fait que les souches cliniques ont la capacité d'exprimer plus leurs facteurs de virulence, afin de s'échapper au système immunitaire et antibiothérapie.

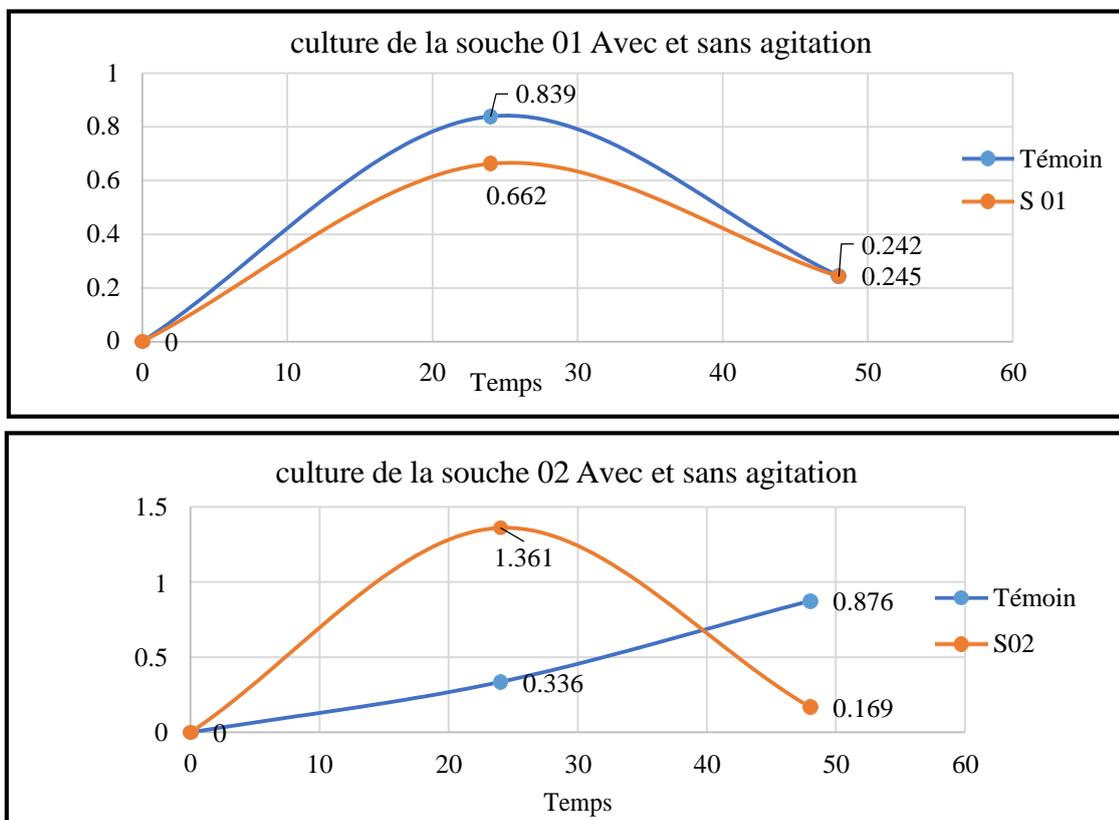


Figure 23 : Evolution de la densité optique en fonction de l'agitation chez la souche 01 et 02.

Discussion générale

Les bacilles à Gram négatif, dont les *Pseudomonas* restent les bactéries les plus isolées dans les infections, particulièrement dans les pays en voie de développement, dont on fait partie.

La souche humaine utilisée dans notre étude est isolée à partir d'un prélèvement broncho-pulmonaire. *P. aeruginosa* infecte préférentiellement les sujets hospitalisés dans les unités de soins intensifs et de chirurgie, services où le risque de colonisation et d'infection est important vu le terrain particulier des patients et la fréquence des manœuvres invasives (Elouennass *et al.*, 2003 ; Ben Abdallah *et al.*, 2008). Selon ces derniers auteurs ; *P. aeruginosa* est isolée dans les services de réanimation avec 33,5% et elle est isolée essentiellement de pus 52,9 % et des prélèvements broncho-pulmonaires avec 30%.

Les deux souches de *P. aeruginosa* ont montré une faible résistance à la ceftazidime, une forte résistance à la ticarcilline+ acide clavulanique et aucune de ces souches résistent à la ciprofloxacine (0% de résistance). Concernant la résistance aux aminosides, les deux souches sont sensibles à l'amikacine et la gentamycine. Selon Ben Abdallah *et al* 2008, les aminosides sont des antibiotiques bactéricides souvent prescrits en association avec les β -lactamines dans le traitement des infections graves à *P. aeruginosa* (Ben Abdallah *et al.*, 2008).

P. aeruginosa est une bactérie opportuniste pathogène, multirésistante à divers antibiotique et agents antimicrobiens, possède une capacité de former des biofilms. Pour cela, nous avons testé l'effet de trois antibiotiques (Céftazidime, Ciprofloxacine, Amikacine) à différentes concentrations sur les deux souches (S01, S02). L'effet des antibiotiques sur la formation de biofilm a été évalué par la méthode colorimétrique du cristal violet. A l'heure d'aujourd'hui, cette technique la plus fréquemment utilisée au laboratoire. Basé sur la spectrophotométrie, le principe de cette méthode, qui quantifie la biomasse totale du biofilm, repose sur le marquage des cellules adhérentes par le CV (Stepanović *et al.*, 2000 ; O'Toole, 2011).

Dans un premier temps, nous avons pu mettre en évidence l'impact des antibiotiques sur la formation de biofilms. L'addition de concentrations d'antibiotiques, jugées comme pertinentes pour leur efficacité *in vivo*, à des cultures de *P. aeruginosa*, a conduit à une formation des biofilms, notamment pour l'amikacine qui est considéré l'antibiotique le plus inducteur de la

production de biofilm par apport à la ceftazidime et la ciprofloxacine. Cette molécule est considérée aussi comme molécules de premier choix, pour l'éradication des infections précoces aux bacilles pyocyaniques. Certains travaux de la littérature décrivant ces antibiotiques comme n'ayant aucun impact sur l'inhibition de l'adhésion précoce des bactéries voire même comme pouvant l'induire à de faibles concentrations (Hoffman, 2005). Elliott *et al.* ont également noté cette capacité des concentrations sub inhibitrices des aminosides à déclencher l'initiation de la formation de biofilm par 81 isolats cliniques de *P. aeruginosa*, prélevés chez des patients mucoviscidosiques de moins de 15 ans (Elliott *et al.*, 2010). Par contre Olivier 2017 a montré que les aminosides inhibent l'adhésion de ces bactéries (Olivier, 2017).

Dans notre étude ; nous avons noté qu'après 48h d'incubation, cette densité diminue dans les cultures avec la ceftazidime et la ciprofloxacine, cette diminution peut être expliquée par l'augmentation de la concentration bactérienne, ce qui provoque l'inefficacité de l'antibiotique, en revanche, les souches reprennent la forme planctonique. Le caractère sessile de *P. aeruginosa* répondant de manière biphasique à l'action des antimicrobiens, ces derniers peuvent alors avoir une action agoniste ou antagoniste sur la capacité des bactéries à former un biofilm, en fonction de leurs concentrations (Kaplan, 2011). Ce constat souligne alors l'importance de mener des investigations à des concentrations variées d'antibiotiques. De plus, l'évaluation des cinétiques d'adhésion des isolats bactériens, ayant acquis un phénotype sessile suite à leur contact avec des concentrations inductrices d'antibiotiques, a révélé le caractère réversible du processus. Selon Kaplan *et al* 2012 les β -lactamines sont capables, de par leur simple présence dans le milieu, d'induire l'expression transitoire de gènes spécifiques à l'adoption du phénotype sessile par les bactéries. Une fois que les antibiotiques sont retirés du milieu, les micro-organismes, pour qui l'établissement d'un biofilm protecteur engendre une dépense énergétique conséquente, ré-adoptent rapidement leur phénotype planctonique spontané (Kaplan *et al.*, 2012).

Conclusion

P. aeruginosa est caractérisé par son fort potentiel d'adaptation au milieu environnemental et hospitalier. Ce caractère redoutable est dû en grande partie, au pouvoir toxique de ces agents infectieux, la production des biofilms et à leur grande capacité de résistance aux antibiotiques.

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. La présence de biofilms a un impact considérable, que ce soit dans l'agroalimentaire (altérations de qualités organoleptiques), l'industrie ou le milieu médical (biofilms et infections nosocomiales) tels la formation de biofilms dans les canalisations et les réseaux d'eau, sur les dispositifs médicaux (cathéters, implants...) ou encore les muqueuses du corps humain ce qui en conséquence des problèmes économiques et sanitaires.

Dans ce modeste travail, nous avons constaté que les antibiotiques ne peuvent pas inhiber la formation des biofilms, à certaines concentrations. Donc l'utilisation des concentrations subinhibitrices peut compliquer plus les infections à *P. aeruginosa*, notamment les infections pulmonaires. Donc la précaution reste l'arme la plus importante contre elle, tout en continuant à rechercher pour y remédier et trouver des failles pour la combattre dans un avenir proche.

En perspectives, nous souhaitons d'élargir l'étude, on utilisant un nombre considérable de souches de *P. aeruginosa* ; d'autres antibiotiques à une large gamme de concentration et d'étaler les cultures au-delà de 48h afin de valider les résultats obtenus.

Références Bibliographiques

B

Ball., G., Durand., É., Lazdunski., A., & Filloux, A. (2002). A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 43(2), 475-485.

Ben Abdallah., H., Noomen., S., Ben Elhadj, A., Sahnoun, O., Elargoubi, A. & Mastouri M. (2008). Susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in the Monastir region, Tunisia. *Médecine et maladies infectieuses*. 38 :554-556.

Billings., N., Ramirez , M., Caldara., M., Rusconi., R., Tarasova., Y., Stocker, R., & Ribbeck., K. (2013). The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS pathogens*, 9(8), e1003526.

Bourcier T., Sauer A., Saleh M., Dory A, (2015). Prevost G, Labetoulle M. Kératites Bactériennes.Rapport - Surface oculaire. Société Française dOphtalmologie. 2015.juin ;

Bonomo., R. A., & Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical infectious diseases*, 43(Supplement_2), S49-S56.

C

Carek., P. J., Dickerson, L. M., & Sackier, J. M. (2001). Diagnosis and management of osteomyelitis. *American family physician*, 63(12), 2413.

Cavallo et al., (2000). Evolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* en France de 1994 à 1998. *La Lettre de l'Infectiologue* ;15 :18-23

Cavallo., D. (2000). Emergent design and learning environments: Building on indigenous knowledge. *IBM Systems Journal*, 39(3.4), 768-781.

Ciofu., O., Tolker-Nielsen, T., Jensen, P. Ø., Wang, H., & Høiby, N. (2015). Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Advanced drug delivery reviews*, 85, 7-23.

Costerton JW., Stewart PS, Greenberg EP. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*; 284: 1318–22.

Coughlan L.M., Cotter P.D., Hill C., Alvarez-Ordóñez A. (2016). New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Front. Microbiol* ; 7 :1641.

D

D'Argenio, D. A., Gallagher, L. A., Berg, C. A., & Manoel, C. (2001). *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Journal of bacteriology*, 183(4), 1466-1471.

Déziel, E., Lepine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003). RhIA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149, 2005–2013.

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361), 295-298.

Donaldson, S. H., & Boucher, R. C. (2006). Physiopathologie de la mucoviscidose. *Annales Nestlé (Ed. française)*, 64(3), 101-109.

E

Edouard Nagera S, Haddad V, Calcagno F, Colson P.(2011). Infectiologie conforme au programme du CNCI - Pharma-Memo. Paris: Vernazobres-Gregio.

Elouennass, M., Bajou T., Lemnouer, A. H., Foissaud, V., Hervé V. & Baaj, A.J. (2003). *Acinetobacter baumannii*: susceptibility of strains identified in the military instruction hospital MohammedV, Rabat, Morocco. *Médecine et maladies infectieuses*. 33: 361-364.

F

Falagas, M. E., & Bliziotis, I. A. (2007). Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era?. *International journal of antimicrobial agents*, 29(6), 630-636.

Filloux, A. & Vallet, I. (2003). [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci* 19, 77-83.

Freny, J. R., Randall, P. J., Smith, J. W. B., Hodgkin, J., Harrington, K. J., & Morton, T. C. (2000). Slow release sources of acetylene to inhibit nitrification in soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 56(3), 241-251.

G

Green, S. K., M. N. Schroth, J. J. Cho, S. K. Kominos and V. B. Vitanza-jack (1974).

"Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*." *Appl Microbiol* 28(6): 987-91.

Gabison E. (2013). Kératites bactériennes: conduite à tenir et antibiothérapie. *Réalités Ophtalmologiques* ;200.

Ghafoor A., Hay I.D., Rehm B.H. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl. Environ. Microbiol* ;77:5238–5246.

Girodon-Boulandet E.(2005). Costa C. Génétique de la mucoviscidose. *Mt pédiatrie*. mai-juin ; vol.8, n°3.

Gessard, C. (1984). On the blue and green coloration that appears on bandages. *Reviews of Infectious Diseases*, 6(Supplement_3), S775-S776.

H

Hauser, A. R. & Ozer, E. A. (2011). [*Pseudomonas aeruginosa*]. *Nat Rev Microbiol* 9, 3.

Hao, Y., Kuang, Z., Walling, B. E., Bhatia, S., Sivaguru, M., Chen, Y., & Lau, G. W. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin causes airway goblet cell hyperplasia and metaplasia and mucus hypersecretion by inactivating the transcriptional factor FoxA2. *Cellular microbiology*, 14(3), 401-415.

I

Imane S. (2015). Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Tlemcen : Université Abou BekrBelkaid ; 2015.

J

Juan., C., Maciá, M. D., Gutiérrez, O., Vidal, C., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2005). Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(11), 4733-4738.

K

Kaplan., J. Á. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of dental research*, 89(3), 205-218.

Kessler., E., & Ohman, D. E. (2013). Pseudolysin. *Handbook of Proteolytic Enzymes*.

Kohler., T., Curty, L. K., Barja, F., Van Delden, C., & Pechère, J. C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of bacteriology*, 182(21), 5990-5996.

Kramer., P. A. (2006). *The blood of government: Race, empire, the United States, and the Philippines*. Univ of North Carolina Press.

L

Lewis K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*; 45:999–1007

Lister., P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 582-610.

Lyczak JB., Cannon CL, Pier GB. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* Apr;15(2):194-222.

M

McCarter., L. L. (2006). Regulation of flagella. *Current opinion in microbiology*, 9(2), 180-186.

Medboua, C. (2011). Caractérisation des phénotypes de résistance aux β -lactamines à large spectre des bacilles à Gram négatif isolés au niveau du laboratoire central mère et enfants du CHU Beni-Messous d'Alger. Thèse magister. Univ de Béjaia. 114 P.

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

Muylaert A., Mainil J.G.(2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité » [Internet]. [cited 2015 Mar 16]. Available from: http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/156_2_04.pdf.

N

Narbad., A., Hewlins, M. J. E., Gacesa, P., & Russell, N. J. (1990). The use of ¹³C-nmr spectroscopy to monitor alginate biosynthesis in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical Journal*, 267(3), 579-584.

O

Oluyombo O., Penfold C.N., Diggle S.P. (2019). Competition in Biofilms between Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Is Shaped by R-Pyocins. *mBio* ;10: e01828-18.

Ostroff., R. M., Vasil, A. I., Vasil, M. L. (1990). Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 172(10), 5915-5923.

O'Toole., G. A. Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295-304.

Oulymata, G. (2007). *Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. P : 6, 7, 13).

Ozer, E. A., Allen, J. P., Hauser, A. R. (2014). Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGent. *BMC genomics*, 15(1), 1-17.

P

Paranchych, W., Pasloske, B. L. Sastry, P.A. (1990). Expression, processing, and assembly of *Pseudomonas aeruginosa* N-methylphen-ylalanine pilin. In: Silver, S., Chakrabarty, A.M., Iglewski, B. and Kaplan, S. (Eds.), *Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 343–351.

Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., Iglewski, B. H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(20), 11229-11234.

Pier, G. B., Ramphal, R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa*. *Principles and practice of infectious diseases*, 6(2), 2587-2615.

Pourcel, C., Thien, H. V., Vergnaud, G. (2011). Épidémiologie de *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients mucoviscidosiques. *Revue francophone des laboratoires*, 2011(435), 41-48.

Pukatzki, S., Kessin, R. H., Mekalanos, J. J. (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(5), 3159-3164.

R

Rahme LG., Ausubel FM, Cao H, et al. (2000). Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 97: 8815–21.

Renner, L. D., & Weibel, D. B. (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRSbulletin*, 36(5), 347-355.

Rochetta, H. L., Burrows, L. L., & Lam, J. S. (1999). Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 523-553.

Rollet C., Gal L., Guzzo J. (2009). Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: A comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonasaeruginosa*. *FEMS Microbiol.Lett* ;290 :135–142.

Ruimy, R., & Andremont, A. (2004). Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Réanimation*, 13(3), 176-184.

S

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm.

Stover., C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., & al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406, 959–964.

Stoodley., P., Sauer., K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology*, 56(1), 187-209.

T

Tancréde-Bohin E. Pseudomonas et infections cutanées. Presse therm climat. (2002) ;139 :23-28.

Toutain, C. M., Zegans, M. E., & O'Toole, G. A. (2005). Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 187(2), 771-777.

Tzika E, Ferrara D, Boehncke WH, Toutous Trelu L, Barouti N. (2015). Surinfection de plaie chronique par *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Med Suisse* ; 11 :768-72.

V

Voulhoux, R., Lazdunski, A., & Filloux, A. (2001). Colicin A hybrids: a genetic tool for selection of type II secretion-proficient *Pseudomonas* strains. *EMBO reports*, 2(1), 49-54.

W

Wahl, D. H., & Stein, R. A. (1989). Comparative vulnerability of three esocids to largemouth bass (*Micropterus salmoides*) predation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(12), 2095-2103.

Wang, Y., Li, J., Hou, S., Wang, X., Li, Y., Ren, D., ... & Zhou, J. M. (2010). A *Pseudomonas syringae* ADP-ribosyltransferase inhibits Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant Cell*, 22(6), 2033-2044.

Wingender, J., & Flemming, H. C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International journal of hygiene and environmental health*, 214(6), 417-423.

Annexe

Gélose Mac Conkey :

La gélose Mac Conkey est un milieu d'isolement ordinaire, lactosé et sélectif des bacilles à Gram négatif non exigeants.

Composition de Gélose Mac conkey

Composition de Gélose Mac conkey	
Peptone	20 g
Sels biliaires n°3	1 g
Cristal violet	0.001
Lactose	10.0 g
Rouge neutre	0.05 g
Chlorure de sodium	5.0 g
Agar	15.0 g
Ph	7.1
Eau distillée	Qsp 1 L

Gélose Héктоen :

La gélose Hektoen est un milieu différentiel modérément sélectif servant à l'isolement et à la culture de microorganismes entériques à Gram négatif.

Composition de Gélose hektoen

Composition gélose hektoen	
Protéase -Peptone	12.0 g
Extrait de levure	3.0 g
Désoxycholate de sodium	9.0 g
Lactose	12.0 g
Saccharose	12.0 g
Salicine	2.0 g
Bleu de bromothymol	65 mg
Fuchine acide	100 mg
Thiosulfate de sodium	50 g
Citrate ferrique ammoniacal	1.5 g
Chlorure de sodium	0.5 g
Agar	15 g
pH	7.5
Eau distillé	Qsp 1L

Gélose King A :

Le King A est un milieu de culture utilisé pour mettre en évidence la pyocyanine des *Pseudomonas aeruginosa*.

Composition de milieu King A.

Composition gélose King A	
Peptone dite "A"	20.0 g
Glycérol	10.0 g
Sulfate de potassium	10.0 g
Chlorure de magnésium	1.4 g
Agar purifié	12 g
pH	7.2

Bouillon nutritif

Le Bouillon Nutritif est un milieu largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants. Il est recommandé dans de nombreuses méthodes standardisées d'analyses des aliments, des laitages, de l'eau et d'autres produits.

Composition de bouillon nutritif	
Peptone	10
Extrait de bœuf	1
Extrait de levure	2
Chlorure de sodium	5
pH	6.8 +/- 0.2

Gélose Mueller Hinton

La o Mueller-Hinton est un milieu standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries peu exigeantes.

Composition de Mueller Hinton

Composition gélose Mueller Hinton (MH)	
Hydrolysate acide de caséine (peptone)	17.5 g
Extrait de viande	2.0 g
Amidon	1.5 g
Calcium	20 a 25 mg
Magnésium	10 a 12.5 mg
Agar	15.0 g
Ph	7.4 +/- 0.2
Eau distillée	Qsp 1L

Résumé

P. aeruginosa ; ce pathogène opportuniste responsable de diverses infections nosocomiales a développé ces dernières années des résistances à plusieurs familles d'antibiotiques, compliquant encore la prise en charge thérapeutique. Dans notre expérience on a essayé d'étudier la formation du biofilm de la bactérie de *Pseudomonas aeruginosa* et de connaître sa capacité et sa tolérance dans des conditions défavorables et comment elle est la principale raison de l'échec du traitement antibiotique à l'heure actuelle. Nous avons utilisé trois types différents d'antibiotiques avec des concentrations différentes appartenant à trois familles différentes : les aminosides, bêta-lactamines et les quinolones, ce sont : ceftazidime à 1 µg et 2 µg, amikacine 1 µg et 2 µg et ciprofloxacine à 2 µl et 4 µl. ils ont été testés sur deux souches de bactéries prélevées sur deux origines différentes. Les résultats montrent la différence entre les deux souches malgré l'utilisation de la même concentration au cours de la même période d'étude et comment l'agitation peut affecter également négativement la formation de biofilm.

Mot clés : *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Résistance.

Abstract

P. aeruginosa; this opportunistic pathogen responsible for various nosocomial infections has developed resistance to several families of antibiotics in recent years, further complicating therapeutic management. In our experiment we tried to study the biofilm formation of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* and to know its capacity and tolerance in adverse conditions and how it is the main reason for the failure of antibiotic treatment at present. . we used three different types of antibiotics with different concentrations belonging to three different families: aminoglycosides, beta-lactam the quinolones are: ceftazidime at 1 µg and 2 µg, amikacin 1 µg and 2 µg and ciprofloxacin at 2 µl and 4 µl. they were tested on two strains of bacteria taken from two different origins. The results show the difference between the two strains despite using the same concentration during the same study period and how agitation can also negatively affect biofilm formation.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, Resistance.

ملخص

الزائفة الزنجارية هذه الممرضة الانتهازية المسؤولة عن عدوى المستشفيات المختلفة قد طورت مقاومة للعديد من عائلات المضادات الحيوية في السنوات الأخيرة مما زاد من تعقيد الإدارة العلاجية. حاولنا في تجربتنا دراسة تكوين الأغشية الحيوية لبكتيريا الزائفة الزنجارية ومعرفة قدرتها وتحملها في الظروف المعاكسة وكيف انها السبب الرئيسي لفشل العلاج بالمضادات الحيوية في الوقت الحاضر. استخدمنا ثلاثة أنواع مختلفة من المضادات الحيوية بتركيزات مختلفة تنتمي الى ثلاث عائلات مختلفة امينوزيد بيتا لاكتامين وكينولون هي سيفتازيديم عند 1 ميكروغرام و2 ميكروغرام اميكاسين 1 ميكروغرام و2 ميكروغرام و سيبروفلوكساسين 2 ميكرو لتر و 4 ميكرو لتر. تم اختبارهم على سلالتين من البكتيريا مأخوذة من أصلين مختلفين. أظهرت النتائج الفرق بين السلالتين على الرغم من استخدام نفس التركيز خلال نفس فترة الدراسة وكيف يمكن ان يؤثر التحريض أيضا سلبا على تكوين الأغشية الحيوية.

الكلمات المفتاحية: الزائفة الزنجارية، غشاء حيوية، مقاومة.