

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE UNIVERSITE AKLIMOHANDOUHADJ-BOUIRA FACULTE DES
SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA
TERRE DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2024

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

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté par :

BELGACEM Lilia & NAILI DOUAOUA Abir Zineb

Thème

**Effet de quelques substances chimiques sur la production
de biofilm chez les souches de *Pseudomonas aeruginosa***

Soutenu le : 27/06/2024

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade		
<i>Mme MELOUK S</i>	<i>MAA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme MEDBOUA C</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme BACHIRI T</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciement

Nous tenons à remercier vivement le bon dieu le tout puissant de nous avoir donné la patience, la volonté et le courage pour l'accomplissement de ce travail.

*Notre grande gratitude et remerciement chaleureux pour notre promotrice Madame **MEDBOUA.C** enseignante à l'université de Bouira pour l'encadrement, les précieux conseils et le suivi très rigoureux durant toutes les étapes de réalisation de notre mémoire de fin d'étude.*

*Merci infiniment aux membres du jury, en particulier Madame **MELOUK.S** qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.*

*Nous exprimons également notre sincère gratitude envers Madame **BACHIRI.T** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner notre travail.*

Notre sincère remerciement à tous les enseignants de la faculté des sciences de la vie et la nature et des sciences de la terre ainsi que les techniciens et ingénieurs du laboratoire de microbiologie.

*A tous ceux qui nous ont aidés de loin ou de prêt.
Sans oublier nos chers camarades de master microbiologie appliquée.*

Dédicace

Après tant d'effort, et de travail, nous avons enfin arrivé à la fin...

C'est avec gratitude et sincères mots que je dédie ma remise de diplôme et ma joie

A ma chère maman Nouara,

Ma confidente, ma force, Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifices. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie, vous êtes pour moi la lumière qui me guide vers le chemin de la réussite. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices. Que Dieu te protéger, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon cher père Arezki,

De tous les pères, tu es le meilleur. Aucune dédicace ne saurait exprimer ma reconnaissance et mon profond amour. Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur. Vous êtes et vous restez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin. Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme père.

A mes chers frère Moumouh, Yazid et Ahcene et ma chère sœur Karima

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour vos soutiens et encouragements tout au long de mes études, votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous garde pour moi.

À mes chers amis

Kamilia, Tinhinane, Rania, Sondous, Ryma, Hadjer, Ferial, Wissam, Hayat, Asma, Moussa, Wassim, Nabil, je vous remercie pour vos amitiés, chaque moment passé avec vous est un trésor, Merci d'être dans ma vie. Vous êtes toujours dans mon cœur.

À mon binôme : Zineb

Pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de notre parcours universitaire. Merci pour tous les souvenirs et les moments que nous avons passés ensemble, tu es une amie formidable, je te souhaite plein d'autres réussites et beaucoup de bonheur.

A toute ma famille paternelle et maternelle pour leur amour et leur tendresse

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont soutenus et tous ceux qui m'ont connu sans exception.

LILIA

Dédicace

Au plus profond de mon cœur, je dédie ce travail :

Aux deux êtres qui me sont très chère, et qui ont illuminé ma vie.

*À ma raison de vie à celle qui m'a en fanté dans la douleur, mon symbole d'affection et d'amour ma très chère mère **Fatiha**. A celui que j'adore et qui j'apprécie très fort son soutien morale et financier tout au long de mes études **Papati Rabah** que dieux le tout puissant me les gardes comme une couronne sur ma tête.*

*A ma petite sœur **Amani** que j'aime énormément et qui suivras inchallah le chemin du savoir.*

*A mon chère regretté grand père **Saad** (rabi yarahemou)*

*A mes grands-mères **Khira** et **Aicha***

*A toute ma famille **NAILI DOUAOUDA** et **BAGHDALI**.*

*A tous mes amis **Hadjer**, **Rima**, **Moussa**, **Ouassim** et **Nabil** pour le climat convivial et fraternelle et un regard particulier pour **Asma**.*

*A mon binôme **Lilia** pour la bonne collaboration et les moments agréables que nous avons passé durant tout de cursus et je considère que c'est la découverte d'un être émotif et modeste.*

Sans oublié tous les personnes que je n'ai pas citées et qui ont certainement une place étoffée d'amour et de considérations dans mon cœur.

ZINEB

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Premier partie : Revue bibliographique

Chapitre I: Généralité sur *Pseudomonas aeruginosa*

1. Historique	3
2. Taxonomie et nomenclature	3
3. Habitat	3
4. Etude bactériologique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
4.1. Caractères phénotypiques	4
4.1.1. Caractères morphologiques	4
4.1.2. Caractères cultureux	4
4.1.3. Caractères biochimiques.....	5
a) Métabolisme.....	5
b) Production des pigments	6
4.1.4. Caractères antigéniques	6
4.2. Caractères génotypique	6
5. Les facteurs de virulences	6
5.1. Les facteurs de virulence associés à la bactérie	7
5.1.1. Le flagelle	7
5.1.2. Les pilis de type IV	7
5.1.3. Lipopolysaccharide	8
5.1.4. L'alginate	8
5.2. Les facteurs sécrètent par la bactérie	8

Chapitre II: effets des substances chimiques sur la formation de biofilm

1. Définition de biofilm.....	10
2. La composition de biofilm.....	10
3. Formation de biofilm.....	12

4. Le rôle de biofilm.....	13
5. Les effets des détergents et les antiseptiques sur la production de biofilm.....	14

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et Méthodes

1. Lieu et durée du stage.....	16
2. Prélèvement et enrichissement	16
3. Isolement et identification des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.1. Isolement et purification	17
3.2. L'identification.....	17
3.2.1. Etude macroscopique	17
3.2.2. Etude microscopique	17
3.2.3. Croissance à 4°C et 42°C	17
3.2.4. Recherche de l'oxydase.....	17
3.2.5. Recherche de la catalase	18
4. Evaluation de la formation de biofilm	18
4.1. Méthode de Rouge Congo Agar (RCA)	18
4.2. Méthodes directes : Méthode des tubes (TM)	18
5. Etude de l'efficacité des désinfectants et antiseptiques à usage hospitalier sur la production de biofilm.....	19
5.1. Préparation des dilutions des substances chimiques.....	19
5.2. Méthode directe (RCA).....	19
5.3. Détection de la formation de biofilm par méthode en tube et marquage au cristal violet.....	19

Chapitre II : Résultats et Discussion

1. Prélèvement	23
2. Identification.....	24
2.1. Etude macroscopique	24
2.2. Etude microscopique	25
2.3. Croissances 4°C et 42°C	25
2.4. Recherche de l'oxydase	26
2.5. Recherche de catalase	26
3. Evaluation de la formation de biofilm par les souches étudiées.....	26

3.1. Méthode de RCA	26
3.2. Méthode en tube (TM)	27
4. Etude de l'efficacité des détergents et antiseptiques à usage hospitalier sur la production de biofilm	28
5. Discussion	30
Conclusion	34
Références bibliographique	36
Les annexes	47
Résumé	50

Liste des abréviations

ADH : Arginine d'hydrolase

ADN : L'acide désoxyribonucléique

ARN : L'acide ribonucléique

ATB: Antibiotique

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

CV : Cristal violet

DO : Densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

EPS : Exopolysaccharides

EXO : Exotoxine

GN : Gélose nutritive

LDC : Lysines-décarboxylase

LPS : Lipopolysaccharides

MO : Microorganismes

ODC : Ornithine- décarboxylase

PIA : Polysaccharide intercellulaire adhésion

PGA : Polyglucosamine

RGA : Rouge Congo Agar

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

TM : Méthode de tube

Liste des tableaux

Tableau I : Classification systématique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	03
Tableau II : Principaux facteurs de virulence secrètes de <i>P. aeruginosa</i> .	09
Tableau III : Composition d'un biofilm bactérien.	11
Tableau IV : Les différents échantillons collectés.	16
Tableau V : Liste des détergents et les antiseptiques utilisés.	19
Tableau VI : Répartition des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en fonction du prélèvement.	23
Tableau VII : Détermination de la formation de biofilm par des différentes souches vis-à-vis des détergents et antiseptiques utilisés.	28

Liste des tableaux de l'annexe

Tableau 01 : Les matériels et le matériel biologique utilisés.
Tableau 02 : Les milieux de culture et les produits utilisés.

Liste des figures

Figure 01 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en microscopie électronique grossissement (X400).	04
Figure 02 :(01) Aspect des colonies « Large » sur Hektoen (02) Aspect des colonies « Small » sur gélose au sang (03) Aspect des colonies «Muqueuses » sur Mac Conkey.	05
Figure 03 : Schéma présente les facteurs clés de virulence de <i>P. aeruginosa</i> .	07
Figure 04 : Image en microscopie d'un biofilm bactérien mixte.	10
Figure 05 : Composition du biofilm.	11
Figure 06 : Figure représentative des différentes étapes de création d'un biofilm de <i>P.aeruginosa</i> .	12
Figure 07 : Protocole expérimental de l'effet des substances chimiques sur la formation des biofilm.	20
Figure 08 : Détection de la formation de biofilm par marquage au cristal violet.	21
Figure 09 : Répartition des prélèvements dans différentes niche écologique.	24
Figure 10 : (01) Aspect des colonies de <i>P.aeruginosa</i> sur Hektoen (02) Aspect des colonies <i>P.aeruginosa</i> sur King A (C03) Aspect des colonies de <i>P.aeruginosa</i> sur Gélose nutritif.	24
Figure 11 : Observation microscopique de <i>P. aeruginosa</i> après coloration de Gram (G100).	25
Figure 12 : Résultats d'incubation à 04°C et 42°C sur Mac Conkey.	25
Figure 13 : Résultat positif d'un teste oxydase.	26
Figure 14 : Résultat positif d'un test catalase.	26
Figure 15 : Phénotype de production et non production de slime.	27
Figure 16 : Evaluation de la production du biofilm par la méthode TM : (A) Souche formatrice du biofilm ; (B) Souche modérément formatrice du biofilm ; (C) Souche non formatrice du biofilm ; (TM) Témoin.	28
Figure 17 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode en tube (TM).	29
Figure 18 : Evaluation de la production du biofilm en présence de différentes substances chimiques.	29

Introduction

Les bactéries du genre *Pseudomonas* se distinguent par leur présence partout. Grâce à leur faible besoin en nutriments, ils peuvent survivre et se développer sur des surfaces humides. Par conséquent, elles se rencontrent souvent dans les établissements hospitaliers (**Camiade, 2019**).

Pseudomonas aeruginosa est un bacille Gram négatif, non sporulé, non capsulé caractérisée par leur ubiquité. Il peut être observé poussant à une température de 37-42 °C que l'on trouve dans de nombreux environnements comme le sol, l'eau ou la végétation (**Rahme et al., 2000**). Le bacille pyocyanine utilise une "stratégie de survie" pour s'installer et coloniser dans un environnement. Une fois ces bactéries sont attachées, vont se développer et créer une communauté organisée à laquelle William Costerton a appelée « biofilm ». (**Moltz et al., 2005 ; Filloux et al., 2003 ; Shi et al., 2009**).

La croissance, l'adhérence progressive, la mobilité et la production de polysaccharides extracellulaires est une conséquence de la dynamique du processus de formation du biofilm sur les surfaces (**Aparna et al., 2008**). L'impact sur la fixation des bactéries sur les surfaces sont dû aux paramètres physico-chimiques de l'environnement tel que la température et le pH, de la surface (hydrophobicité), du milieu (substrat) et du microorganisme comme hydrophobicité, flagellation et motilité (**Aparna et al., 2008**).

L'action bactériostatique et bactéricide des substances chimiques est moins efficace contre les bactéries à Gram négatif telles que *P.aeruginosa*. Cette espèce est peu sensible en raison de la structure de sa membrane externe et du LPS, Cela bloque le déplacement des molécules biocides. L'existence de biofilm et l'affinité d'acquérir une résistance à travers des processus non enzymatiques étant donné la perméabilité réduite de la membrane des produits utilisés dans le domaine hospitalier et l'environnement (**Olivares, 2017**).

Notre étude a été axée sur l'isolation des souches de *P.aeruginosa* d'après diverses zones écologiques, ainsi la recherche l'effet de quelques substances chimiques sur la formation de biofilm.

Le document rédigé est subdivisé en deux parties, les caractéristiques de *P.aeruginosa* et leurs facteurs de virulence, ainsi que l'effet des détergents et des antiseptiques sur la production de biofilms sont contenues dans la première partie théorique. En outre dans la deuxième partie, nous avons exposé la partie expérimentale, comprenant le matériel et les méthodes, ainsi que les résultats obtenus.

Premier partie :
Revue bibliographique

1. Historique

En 1862, Lucke a découvert *Pseudomonas aeruginosa* dans des infections humaines. Ensuite, en 1882 Carl Gessard a isolé *Pseudomonas* est la nommée bacille pyocyanique grâce de sa capacité de produire des pigments de couleur bleu-vert. qui facilite la distinction de la bactérie en culture (**Chaker, 2012; Lyczak et al., 2000**).

2. Taxonomie et nomenclature

Etymologiquement, le mot issu du grec "pseudo" (signifie imitation) et "monas" (désignait une unité) (**Yeterian, 2010**).

Le genre *Pseudomonas* regroupe plusieurs espèces parmi lesquelles *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce type, sa taxonomie se trouve dans le tableau ci-dessous : (**Eyquem et al., 2000**).

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

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

3. Habitat

Dans l'environnement, *Pseudomonas aeruginosa* qui est une bactérie hydrotellurique, saprophyte, ubiquitaire est largement répandu surtout dans les milieux humides tels que le sol, les piscines, les réservoirs de toilettes et les rivières, aussi dans les poussières et les aliments crus (**Floret, 2009; Kerr et al., 2009**).

les parties corporelles humides de l'homme telles que le tube digestif, le tractus génital, les oreilles... sont les parties de préférence qui peut se trouver à l'état commensal (**Davies et al., 1998**), L'hôpital est un environnement favorable au développement de *Pseudomonas* cette bactérie peut être isolée à partir des appareils et d'équipements

chirurgicaux et médicaux tel que les endoscopes, les matelas, des nébuliseurs et elle peut se retrouver dans les douches, les toilettes et les siphons (Ruimy et al., 2004).

4. Etude bactériologique de *Pseudomonas aeruginosa*

4.1. Caractères phénotypiques

4.1.1. Caractères morphologiques

Le bacille *P. aeruginosa* est un bâtonnet de 1 à 5µm de longueur et de 0,5 à 1µm de largeur. Cette bactérie de couleur de Gram négatif, elle n'a pas de spores, elle est strictement aérobie, généralement non capsulée, mais parfois entourée d'une pseudo-capsule appelée slime. Elle est mobile grâce à la flagelle (ciliature monotriche) (Chaker, 2012 ; Silby et al., 2011).



Figure 01 : *Pseudomonas aeruginosa* en microscopie électronique grossissement (X400) (Aissa, 2012).

4.1.2. Caractères cultureux

Le bacille pyocyanine est une bactérie aux besoins nutritionnels limités. Grâce à la synthèse d'ortho amino-acétophénone, il dégage une odeur aromatique spécifique de seringat, l'intervalle du métabolisme du tryptophane et non associé à la production de pigments (Eyquem et al., 2000 ; Avril et al., 2000). Le pH varie entre de 6.5 et 7.5 avec un pH optimal de 7.2 (Pier, 2007). *P. aeruginosa* est un bacille mésophile, se développe à une température entre 4°C et 42°C et il se développe également entre 30°C et 37°C en 24 heures (Nadjet s. d.). Elle peut être cultivée sur tous les milieux en aérobie, mais elle peut utiliser les nitrates en anaérobiose (Vallet et al., 2001). L'isolement de cette bactérie est réalisé sur des milieux sélectifs comme Mac Conkey, Hektoen et Cétrimide. Les milieux ordinaires comme gélose nutritive et les milieux King A et King B sont aussi employés pour favoriser la formation des pigments caractéristiques de cette bactérie (Sayah et Rekkab 2022).

Trois types de colonies peuvent être observées en même temps ou de manière isolée : Les colonies de taille large « L », variant de 2 à 3 mm de diamètre, présentent un contour irrégulier et une surface rugueuse, avec une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques. En contraste, les colonies lisses « S », de taille plus réduite, sont arrondies avec des contours réguliers. Les colonies muqueuses « M », également bombées, sont caractérisées par un aspect filant et la production d'un slime composé d'un polymère d'alginate (Soukaina, 2013).

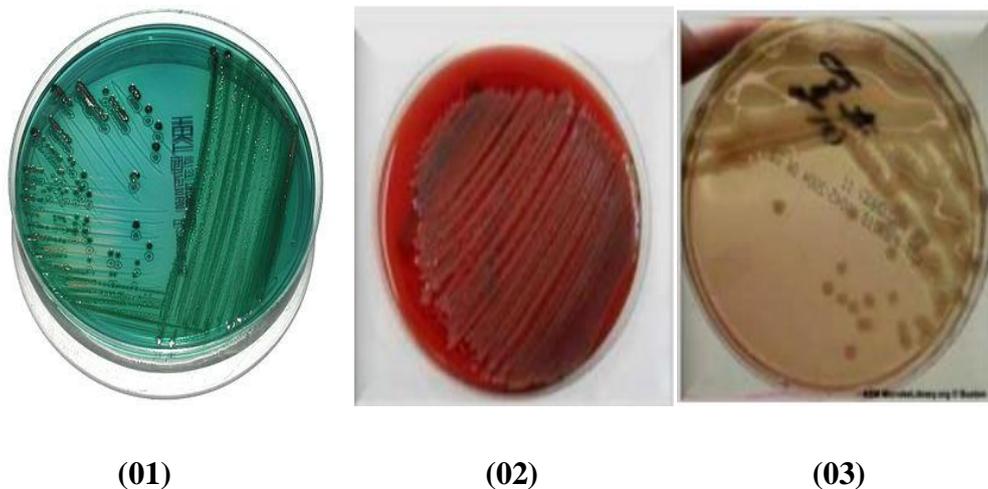


Figure 02 : (01) Aspect des colonies « Large » sur Hektoen (02) Aspect des colonies «Small» sur gélose au sang (03) Aspect des colonies «Muqueuses » sur Mac Conkey (Eyquem et al., 2000).

4.1.3. Caractères biochimiques

a) Métabolisme

Le métabolisme de *P.aeruginosa* est assez diversifié, il est spécifié par une activité oxydatif. Cette capacité qu'elle possède de dégrader des substances complexes, comme les protéines et les polysaccharides. Egalement à une compétence de transformer les nitrates en nitrites (Dahah, 2018).

Cette bactérie produit des enzymes telles qu'une arginine-dihydrolase et une lécithine qui lui permettent de convertir l'acétamide en ammoniac (Mezaache, 2014).

les tests catalase, arginine d'hydrolase (ADH), citrate de Simmons, gélatinase sont positif, alors que les tests de Lysines décarboxylase (LDC), Ornithinedécarboxylase (ODC), indole, bêta-galactosidase, donnent des résultats négatif (Bentaleb, 2017).

b) Production de pigments

On peut identifier cette espèce grâce à la formation de pigments, notamment la pyocyanine, un pigment bleu-vert. Il est soluble dans l'eau et le chloroforme, ce qui en fait une caractéristique distinctive de *P. aeruginosa*. Qui est la seule espèce à le produire (assemblé fortement polaire, de nature phénazinique). Le pigment fluorescent de couleur jaune-vert c'est la pyoverdine, soluble dans l'eau mais insoluble dans le chloroforme. Parfois, il y a d'autres pigments hydrosolubles peuvent être fabriqués de manière temporaire : Pyomélanine brune, Pyorubine rouge (**Khellaf et Amrouni, 2023**).

4.1.4. Caractères antigéniques

Pseudomonas aeruginosa contient deux d'antigènes : un antigène somatique et un antigène flagellaire H protéique.

L'antigène somatique (lipopolysaccharide) est lié à une protéine qui forme la paroi cellulaire. la virulence de la bactérie et la réponse immunitaire c'est le rôle fondamental de cet antigène, ainsi que l'antigène flagellaire H protéique, Thermolabile, joue un rôle clé dans le typage qui en combinaison avec le typage O et reconnaître au moins 25 sérovars (**Chaibdraa et al., 2008**).

4.2. Caractères génotypique

Contient 6,3 millions de paires de bases, codant pour 5570 gènes dans le génome de cette espèce, dont le rôle est soit connu avec certitude, soit supposée par comparaison des séquences avec des génomes d'autres espèces bactériennes, soit inconnue. 70 à 90 % des gènes sont propres à l'espèce, tandis que 10 à 30 % sont propres au clone bactérien. La majorité des caractéristiques de virulence de *P. aeruginosa* sont encodées dans son génome chromosomique. En outre, de nombreuses protéines codées, confèrent la résistance aux divers antibiotiques. En plus du chromosome bactérien, aussi possède plusieurs plasmides qui peuvent être transférés par conjugaison (**Bert et al., 1998**).

5. Les factures de virulences

P. aeruginosa possède plusieurs systèmes de virulence, comme des exotoxines, des protéases, des hémolysines et autres systèmes de sécrétion. Ainsi les pilis de type IV renferme divers facteurs d'adhésion sur la surface de cette bactérie.

La bactérie a une capacité de s'attacher à des surfaces biotiques et abiotiques en formant un biofilm (Kipnis et al., 2006).

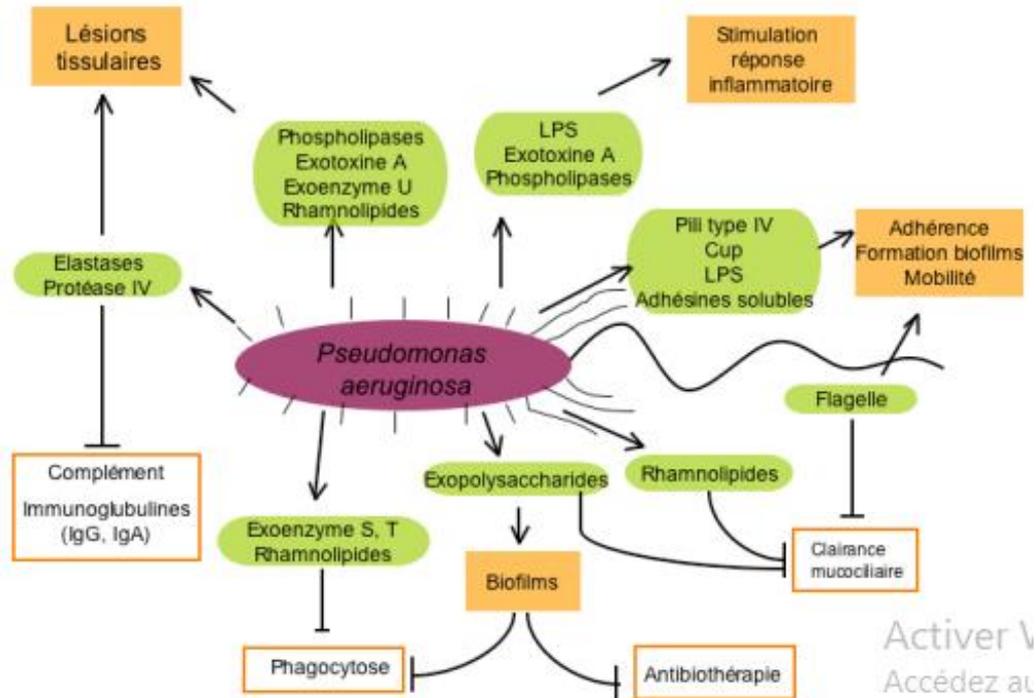


Figure 03 : Schéma présente les facteurs clés de virulence de *P. aeruginosa* (Kipnis et al., 2006).

5.1. Les facteurs de virulence associés à la bactérie

5.1.1. Le flagelle

La mobilité de la bactérie assurée par la présence de flagelle, facilite l'intégration des nutriments et être actif, sans doute une influence indirecte sur l'adhérence cellulaire. Son rôle dans la pathogénèse est évident, car la virulence des souches non flagellées est considérablement réduite. En absence du flagelle, les bactéries mutantes ont montré une invasion moins importante que la souche mobile. Le flagelle est essentiel lors des premières étapes du développement du biofilm bactérien. Il participe également à l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires (Feldman et al., 1998 ; O'Toole et Kolter, 1998).

5.1.2. Les pilis de type IV

L'adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales est due au pili du type IV, et dans les aspects mobilités comme le "twitching" et le "swarming". De plus, ces structures

interagissent in vitro avec la zone glycosylée des glycosphingolipides asialo GM1 et asialo GM2, qui située à la surface des cellules épithéliales pulmonaires. Son expression est contrôlée grâce à un système de régulation de la transcription qui constitué de deux composants, pilS et pilR (Hahn 1997 Hobbs et al., 1993 ; Vallet et al., 2001 ; Wall et Kaiser 1999).

5.1.3. Lipopolysaccharide

On considère que les lipopolysaccharides (LPS) jouent un rôle fondamental dans la virulence de *P. aeruginosa*. Il protège cette bactérie contre la lyse provoquée par le sérum de l'hôte. Le LPS, une endotoxine, a la possibilité de stimuler le système immunitaire, cela peut causer un choc septique et dans les cas les plus graves, la mortalité. La régulation de la réponse inflammatoire et l'interaction entre la bactérie et les tissus de l'hôte. Le LPS est constitué de trois composants: le lipide A, le cœur oligosaccharidique et l'antigène O (Lam et al., 2011 ; Pier 2007).

5.1.4. L'alginate

Les polymères de l'acide mannuronique et de l'acide glucuronique constituent l'alginate, un exopolysaccharidemucoïde. L'alginate est produit afin de s'adapter à des environnements inadaptés au développement bactérien. Les souches génèrent de l'alginate au cours des infections pulmonaires chroniques, notamment chez les patients souffrant de mucoviscidose, ce qui permet l'adhérence aux cellules épithéliales et la protection de la bactérie contre la phagocytose, les antibiotiques (Nadjet s. d. ; Soukaina, 2013 ; Ruimy et Andremont 2004).

5.2. Les facteurs sécrétés par la bactérie

Les mécanismes d'attachement jouent un rôle crucial dans l'adhérence aux surfaces abiotiques ainsi que dans la formation du biofilm (Wall et Kaiser 1999). Les différents facteurs sécrétés sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau II : les facteurs de virulence sécrétés par *P. aeruginosa* (Khalifa et al., 2011).

Exotoxine A	Inhibition de la production de protéines dans les cellules ciblées.
Exoenzyme S	Effectue cytotoxique ; La propagation des LT.
Exoenzyme U	Rôle anti phagocytaire.
Rhamnolipide	Effet détergent.
Elastases (LasA+LasB)	L'élastine, la fibrine, l'interféron, le complément et le collagène sont dégradés.
Protéase alcaline	Protéolyse.
Pyocyanine + Pyoverdine	La libération d'élastase augmente. L'arrêt des mouvements des cils. Capture de fer. Encouragent la formation de radicaux libres.
Lectines solubles	Inhibition des battements ciliaires des cellules Pulmonaires.
Phospholipase C	Effet cytolytique local.

1. Définition du biofilm

La première utilisation de l'appellation « biofilm » remonte à 1978, avec John William Costerton et ses collaborateurs.

Le biofilm est une société bactérienne qui s'accroche à une surface et est recouverte d'une matrice d'exopolysaccharide. Initialement l'adhésion, des appendices provocateurs de mouvement sont appliqués afin de s'approcher de la surface à coloniser (O'Toole et Kolter 1998).

On reconnaît désormais que la capacité de créer un biofilm est une caractéristique spécifique à d'autres microorganismes. Le biofilm représente Environ 80 % de la biomasse microbienne de notre planète (Walsh *et al.*, 2019).

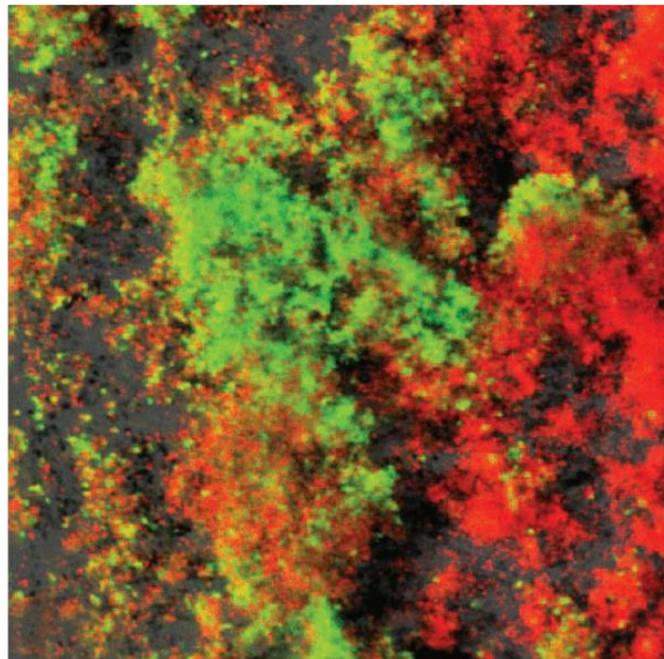


Figure 04 : Image en microscopie d'un biofilm bactérien mixte
(Filloux et Vallet, 2003).

2. La composition de biofilm

Il y a lieu de dire que la constitution du biofilm se présente avec une grande hydratation et peut contenir jusqu'à 97 % d'eau. Les polysaccharides, les protéines, les acides nucléiques, les agents tensioactifs, les lipides, les glycolipides et les cations peuvent être présents dans sa composition (Karatan *et al.*, 2009 ; Flemming *et al.*, 2010).

Chapitre II : Effets des substances chimiques sur la production de biofilm

L'espèce bactérienne et les conditions de croissance sont influencées par la composition de la matrice (**Tremblay et al., 2014**).

Les exopolysaccharides (EPS) jouent un rôle essentiel dans la structure extracellulaire du biofilm microbien, qui est constitué d'un polymère de β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine (polyglucosamine PGA ou PNAG) (**Flemming et al., 2010**).

On observe souvent la présence de la cellulose, un polymère linéaire de glucose, chez différentes espèces et genres de bactéries, tels que *Salmonella*, *E.coli*, *Enterobacter* et *Pseudomonas*. Plusieurs polysaccharides sont également présents, tels que le glucane présent chez *Streptococcus mutans* et l'alginate trouvé chez *Pseudomonas* (**Khelifa et Ait Meddour, 2020**).

Tableau III: Composition d'un biofilm bactérien (**Muhsin et al., 2015**).

Composés	Pourcentage dans la matrice
Cellules microbiennes	2-5%
Protéines	1-2%
Polysaccharides	<1-2
ADN/ARN	<1-2%
Eau	Supérieur à 97%

La figure ci-dessous montre les différents composants du biofilm.

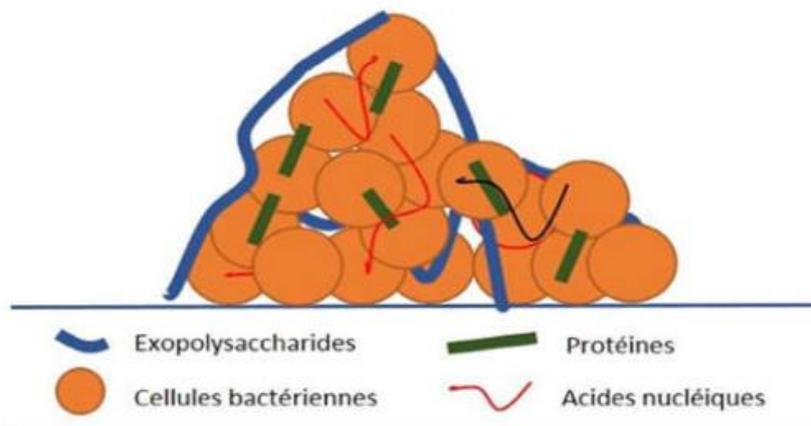


Figure 05: Composition du biofilm (**Lister et al., 2014**).

3. Formation de biofilm

En 1999, Bos et al, ont utilisé *P. aeruginosa* comme modèle pour analyser les biofilms à Gram négatif (Bos et al., 1999). La production du biofilm débute par l'attachement, afin de développer des microcolonies, en outre la maturation pour créer des structures en forme de champignon, à se développer et à se disperser (Manfredi et al., 2000).

Après l'installation des cellules à la surface, les microcolonies commencent à se distinguer en une structure complexe avec des canaux d'eau intermédiaires. La détection du quorum chez *P. aeruginosa* est responsable de l'expression génétique qui est influencée par la densité cellulaire. Signal de repérage du quorum (Lebeaux et Ghigo, 2012). Les étapes sont présentées sur la figure 06.

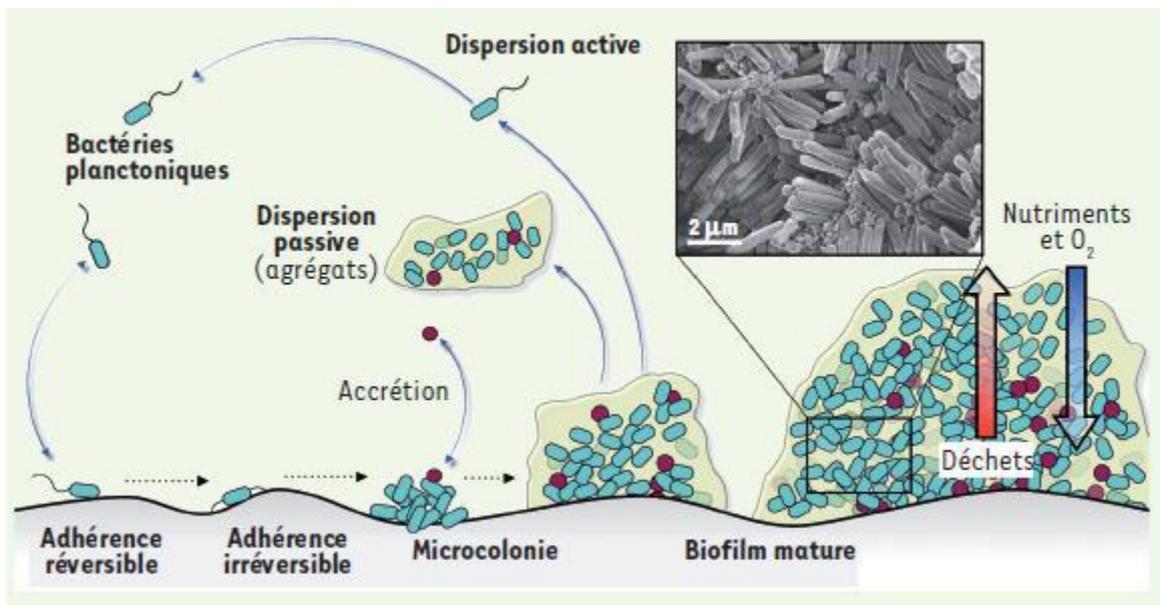


Figure 06 : Figure représentative des différentes étapes de création d'un biofilm de *P.aeruginosa* (Lebeaux et Ghigo 2012).

Étape 01 : La formation du biofilm débute par l'adsorption des bactéries ou l'adhésion réversible sur le support. Les bactéries ont accès à la surface en fonction de différents facteurs tels que le couplage chimiotaxie/motilité, la sédimentation, le mouvement brownien et le transport convectif (Bos et al., 1999).

Étape 02 : L'adhésion irréversible se produit ensuite par la création de molécules protéiques connues sous le nom d'adhénines et de structures comme les pilis. En accroissant et en modifiant les surfaces d'ancrage (Kaplan, 2010).

Étape 03 : Les micro-organismes commencent à se séparer, formant des microcolonies. Dès qu'une concentration d'individus est suffisamment dense, les microcolonies commencent à produire le biofilm lui-même (**Kaplan, 2010**).

Étape 04 : Ensuite, les MO se multiplient sur la surface, forment des macrocolonies tout en produisant une substance polymérique extracellulaire. Donc, le biofilm se développe, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique, et devient un biofilm mature (**Costerton et al., 1999**).

Étape 05 : La phase de dispersion est causée par le vieillissement du biofilm. Les micro-organismes ont la capacité de se séparer activement du biofilm, parfois en consommant la matrice qui lui sert d'énergie, Ces MO reviennent à leur état libre de la circulation appelé "planctonique" et peuvent également coloniser de nouvelles zones, complétant ainsi le cycle de planctonisation. Ce modèle du mode de vie du biofilm permet de voir dans la phase « planctonique » une phase de dispersion, comme dans le décollement "autogène" de plaques ou débris de biofilms, qui semble être fortement influencé par la T°, en eaux douces tempérées (**Stoodley et al., 1999**).

4. Le rôle de biofilm

Les biofilms peuvent être classés en trois grandes catégories : les biofilms positifs, négatifs et neutres, en fonction de leurs impacts sur l'homme, tels que l'environnement, la sécurité alimentaire, la production végétale et animale, ainsi que les domaines médicaux (**Yin et al., 2021**).

Dans divers processus, tels que le traitement des eaux usées, la biodégradation et la biorestauration, le type initial de biofilm se forme dans le bioréacteur et joue un rôle essentiel dans le traitement des eaux usées, en éliminant les substances organiques, en adsorbant les matières en suspension et en purifiant les eaux usées brutes. De plus, les biofilms génèrent des communautés microbiennes spécifiques qui dégradent les herbicides et les antibiotiques. Le deuxième genre Il joue un rôle dans diverses infections chez l'homme, telles que les infections liées aux dispositifs médicaux, les caries dentaires, la cystite, les infections pulmonaires liées à la mucoviscidose et à l'endocardite. Finalement, il y a un biofilm neutre dans la vie quotidienne des êtres humains, qui peuvent parfois se transformer en biofilm utiles dans des conditions bien défini (**Yin et al., 2021**).

5. Les effets des détergents et les antiseptiques sur la production de biofilm

Les bactéries peuvent former des biofilms sur diverses surfaces, y compris des équipements médicaux et environnementaux. La diminution des risques environnementaux dû à la présence des substances qui élimine les cellules, telle que les ATB, les détergents et les antiseptiques, ces produits nettoyants fragilisent, découpent et éliminent les biofilms des surfaces (**Costerton et al., 1985**).

Les détergents sont des substances qui ont été spécialement conçues pour le nettoyage en utilisant un processus qui utilise les mécanismes de détergence. Ils comprennent des éléments essentiels (agents de surface) et habituellement des éléments supplémentaires (adjuvants, etc.). Ils possèdent un large spectre d'activités contre les microbes et ne laissent pas de traces sur les surfaces (**Atbib et al., 2022**).

Pour être efficace, le détergent doit satisfaire à divers critères tels que sa solubilité rapide, sa capacité à mouiller les surfaces, son effet dispersant, sa toxicité minimale, son caractère non corrosif, etc. Le détergent est sélectionné en fonction de la nature des dépôts à éliminer. Il y a peu de recherches qui parlent sur le rôle des détergents sur les biofilms. La majorité des recherches réalisées par les divers auteurs se sont concentrées sur l'effet des désinfectants et l'utilisation de la détergence enzymatique pour éliminer les biofilms (**Cetre, 2006**).

La plupart des détergents sont principalement actifs au niveau de la membrane cytoplasmique et doivent donc passer par la face interne. Les bactéries Gram négatives présentent donc une plus grande résistance par rapport aux bactéries Gram positifs (**Chouh et al., 2019**).

La majorité des antiseptiques sont antimicrobiens, cela signifie qu'ils empêchent la formation du biofilm par leur action bactériostatique et bactéricide. Une qualité majeure recherchée chez un antiseptique est la rémanence, c'est-à-dire la persistance de son anti gingivite. Enfin, il n'a pas d'effets indésirables à long terme (**Rosling et al., 1997**).

Les antiseptiques sont utilisés sur les tissus vivantes afin d'inhiber ou de détruire les microorganismes pathogènes. La stratégie thérapeutique doit opter à choisir un antiseptique combinant : un effet à large spectre (bactéries, spores, virus et champignons), rapide et efficace, qui n'a pas de m'effet sur la peau péri-ulcéreuse une faible inhibition par les matières organiques et un conditionnement adapté à la pratique (**Daeschlein, 2013**).

Partie II : Partie expérimentale

Chapitre I : Matériel et Méthodes

1. Lieu et durée du stage

Notre recherche a été établit au sein du laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre de l'Université de Bouira, étalée sur une période allant du 25février au 21 mai 2024.

Le matériel employés et la composition des milieux de cultures sont détaillés en annexe 01.

2. Prélèvement et enrichissement

La collecte des échantillons ont été menée à partir des diverses niches écologiques, telles que le sol, l'eau et les surfaces, au niveau de l'hôpital, cité universitaires et le restau de l'université. Les prélèvements du sol ont été effectués à l'intérieur d'un cercle de 15 cm de profondeur pour une quantité de 10g. En ce qui concerne les prélèvements des eaux, on a prélevé un volume de 10 ml dans des flacons en verres. La méthode d'écouvillonnage a été utilisée pour effectuer les prélèvements de surface.

Tableau IV : Les différents échantillons collectés.

Niche écologique		Les échantillons
Sol		-Sol des Fruits (citron, fraise, abricot). des légumes (haricot vert, ail, oignon, tomate)
Eau		Citerne, l'eau de maison, Puits, l'hôpital, Lac el riche, Fontaines universitaires
surfaces	Hôpital	-Service réanimation et pédiatrie: blouses, palliasses, murs, les appareils, matériels médicaux, lits, couverture, couveuse, chariot. -Service des urgences : paillasse, masque, lit, lavabo, toilette, plateaux, ciseaux, la blouse. -Service maternité : les murs, les escaliers, matelas bébé, sanitaire, chauffage.
	Cité universitaire	Les sanitaires, foyer, portes, murs, escaliers, lits.
	Restau de l'université	Four, tables, placarde, les plats, lavabo, murs.

On a effectué l'enrichissement sur un milieu liquide, dans 10ml de bouillon nutritif nous avonsensemencé 1g du sol ou 1ml d'eau.

Les prélèvements de surface, ont été effectués à l'aide d'un écouvillon qui est placé directement dans le bouillon nutritif, incubé à 37°C pendant 24h.

3. Isolement et identification des souches de *P. aeruginosa*

3.1. Isolement et purification

A partir d'un bouillon positif, une goutte a étéensemencée sur différents milieux tel que Mac Conkey et Hektoen, puis l'incubation est faite à 37°C pendant 24h-48h.

La purification a été effectuée sur le milieu King A pour observer la production de pyocyanine.

3.2. L'identification

Les tests microbiologiques et biochimiques, permettent d'identifier les souches de *P. aeruginosa*.

3.2.1. Etude macroscopique

Pour sélectionner uniquement les colonies qui possèdent les caractéristiques culturales de *P.aeruginosa* en doit soumettre les colonies à une étude macroscopique afin d'observer la forme, la taille, la couleur, l'aspect, l'odeur et la pigmentation des colonies.

3.2.2. Etude microscopique

L'étude microscopique doit être soumise à la coloration de Gram, cette technique différentielle nous permet de séparer les bactéries en deux groupes en fonction de la structure de leurs parois.

3.2.3. Croissance à 4°C et 42°C

L'ensemencement des souches pures sur le milieu Mac Conkey, ensuite incubés à 42°C et à 4°C.

3.2.4. Recherche de l'oxydase

Le test oxydase de *P. aeruginosa* peut être attribué en utilisant la méthode des disques en respectant le protocole suivant : à l'aide d'une pipette pasteur il est nécessaire de placer une colonie de bactéries sur un disque oxydase.

3.2.5. Recherche de la catalase

La catalase, une enzyme à base de fer, est responsable de la transformation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau et en oxygène. Ce test implique de placer une colonie issue d'une culture récente sur une lame avec une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂).

4. Evaluation de la formation de biofilm

Il est nécessaire d'examiner les souches de *P. aeruginosa* qui ont une activité antibactérienne afin de déterminer leur capacité à former des biofilms. Différentes techniques sont employées afin de détecter la capacité de produire un biofilm: la méthode des tubes (TM) et la création d'un "slime" sur un milieu solide tel que le "Rouge Congo Agar" (RCA) (Oliveira et Cunha, 2010).

4.1. Méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

A l'aide d'une pipette pasteur nous avons prélevé des colonies bactériennes et on les aensemencé sur les boîtes de Pétri qui contiennent le milieu (RCA). Ensuite, les boites sont incubées à 37 °C pendant 24 heures.

4.2. Méthode des tubes (TM)

Une série de tubes a été préparée en utilisant une micropipette 1000µl pour ajouter 05 ml de bouillon nutritif. Ensuite, des colonies bactériennes ont été prélevées et ensemencées dans tous les tubes, puis les tubes ont été incubés à 37°C pendant 48h.

Après l'incubation, 2.5ml de cristal violet a été ajouté et laissé agir 30min. Les biofilms ayant adhéré aux parois des tubes sont marqués par le cristal violet. Ensuite, les tubes ont été vidés, rincés deux fois à l'eau distillée puis séchés à l'air libre.

La formation d'un biofilm est considérée positive si le colorant reste fixé aux parois internes des tubes et elle est classée en trois catégories : forte (couleur violet foncé), modérée (couleur violet clair) ou faible (couleur violet très clair) (Ait Meddour *et al.*, 2014).

5. Etude de l'efficacité des désinfectants et antiseptiques à usage hospitalier sur la production de biofilm

5.1. Préparation des dilutions des substances chimiques

On prend 10 ml des détergents (Eau de javel, Cresyl, Isis, Sanibon) et antiseptiques (Iodine et Bétadine) brute et on ajoute 90 ml d'eau distillée pour avoir la dilution (10^{-1}). Dans notre expérience nous avons utilisés 4 détergents et 2 antiseptiques (présentés dans le tableau V).

Tableau V : Liste des détergents et antiseptiques utilisés :

Abréviation	Détergent	Antiseptique	volume
JA	Javel		1ml
CR	Cresyl		1ml
IS	Isis		1ml
SA	Sanibon		1ml
IO		Iodine	1ml
BE		Bétadine	1ml

5.2. Méthode directe (RCA)

A l'aide d'une micropipette nous avons versé 01ml de chaque détergent et antiseptique sur les boîtes de pétri, puis couler le milieu (RCA) et laissé sécher. L'ensemencement doit être effectué après 20 minutes de séchage, avec quelques colonies de la culture bactérienne préparée précédemment. Ensuite, nous avons incubé à 37 °C pendant 24 heures en observant l'apparence des colonies.

5.3. Détection de la formation de biofilm par méthode en tube et marquage au cristal violet

Nous avons utilisé quatre détergents et deux antiseptiques pour évaluer l'effet des substances chimiques sur la formation des biofilms.

On a préparé une série de tubes en utilisant une micropipette de 1000µl afin d'incorporer 05ml de bouillon nutritif. Par la suite, deux à trois colonies bactériennes ont étéensemencées dans tous les tubes. Par la suite, 01ml de chaque détergent et antiseptique a été ajouté dans chaque tube, à l'exception du témoin positif. L'ensemble des tubes ont été incubés à 37°C pendant 48 heures. Voir en dessous le protocole expérimental de l'effet des substances chimiques sur la formation de biofilm (figure 07).

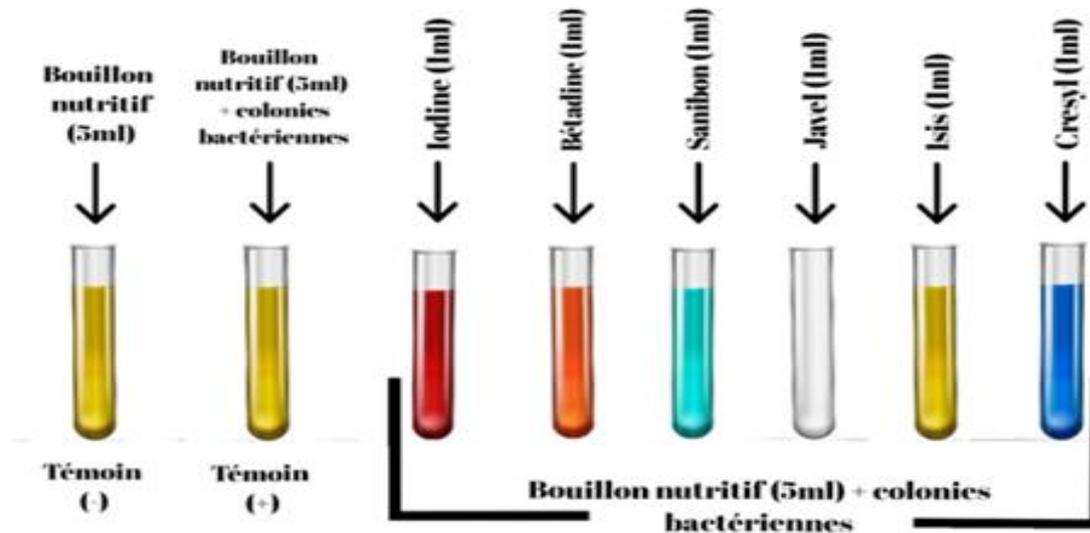


Figure 07 : Le protocole expérimental de l'effet des substances chimiques sur la formation des biofilms.

Après 48h d'incubation, 2.5 ml de cristal violet a été ajouté, laisser agir 30 min à 01 heure. Les biofilms ayant adhéré aux parois et surfaces des tubes sont marqués par le cristal violet. Ensuite, les tubes ont été vidés et rincés deux fois à l'eau distillée. Un volume de 2.5 ml d'acide acétique est ajouté, pour solubiliser le cristal violet fixé sur les biofilms adhérents sur les surfaces de tubes. Finalement, on évalue l'absorbance à 540nm de chaque tube en utilisant un spectrophotomètre. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de biofilm produit.

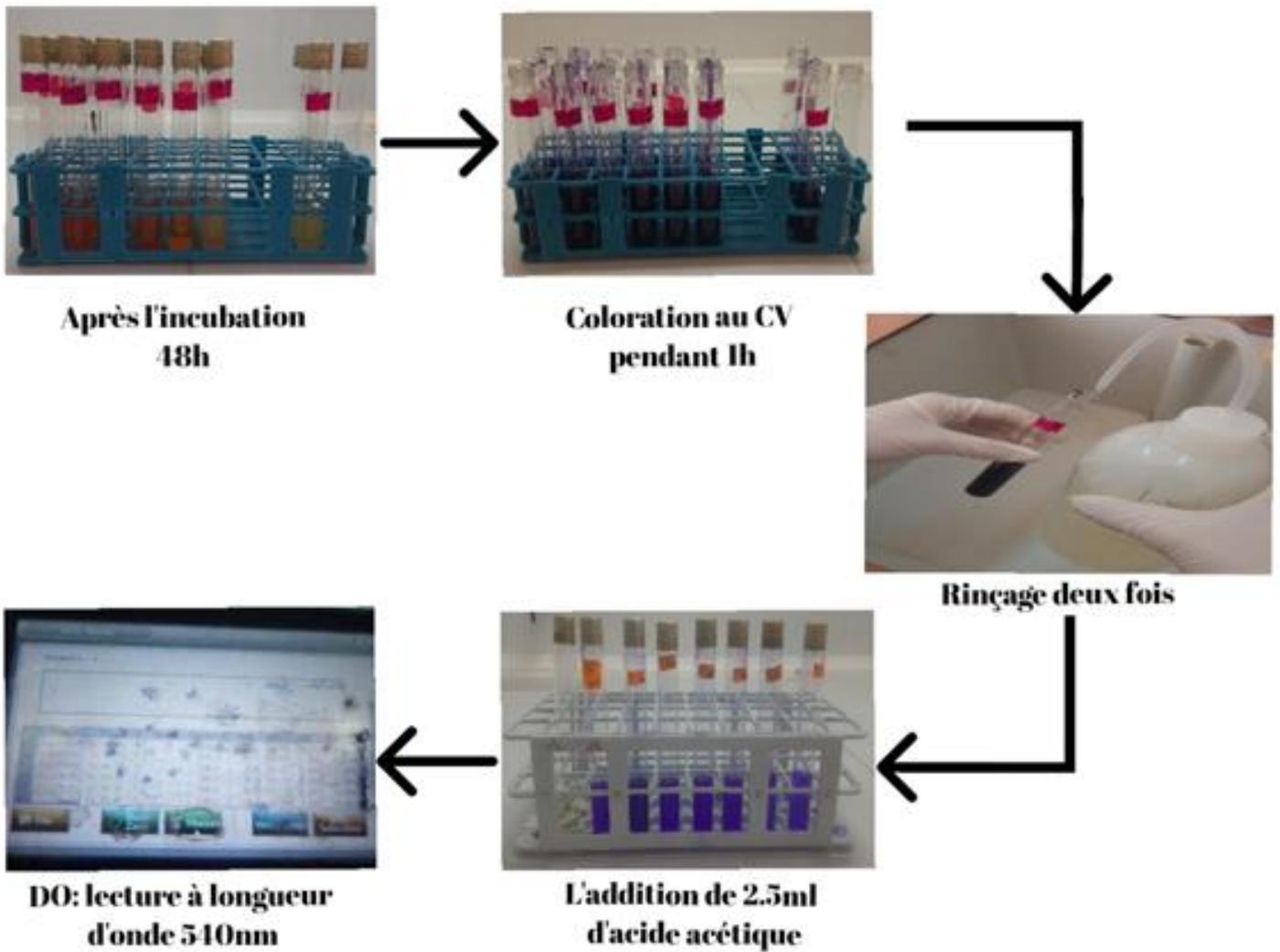


Figure 08 :Détection de la formation de biofilm par marquage au cristal violet.

Chapitre II :

Résultats et Discussion

1. Prélèvement

A travers les 120 prélèvements réalisés nous avons identifié 33 souches de *P. aeruginosa* dans les diverses niches écologiques, à savoir l'eau, le sol et les surfaces des milieux hospitaliers, restau et cité universitaire.

Tableau VI: Répartition des souches de *Pseudomonas aeruginosa* en fonction du prélèvement.

Niche écologique		Nombre totale	Prélèvement positif	Pourcentage
Sol		23	6	18,2%
Eau		10	4	12,1%
Surfaces	Milieu hospitalier	60	17	51,5%
	Cité universitaire	15	3	9,1%
	Restau de l'université	12	3	9,1%
Total		120	33	100%

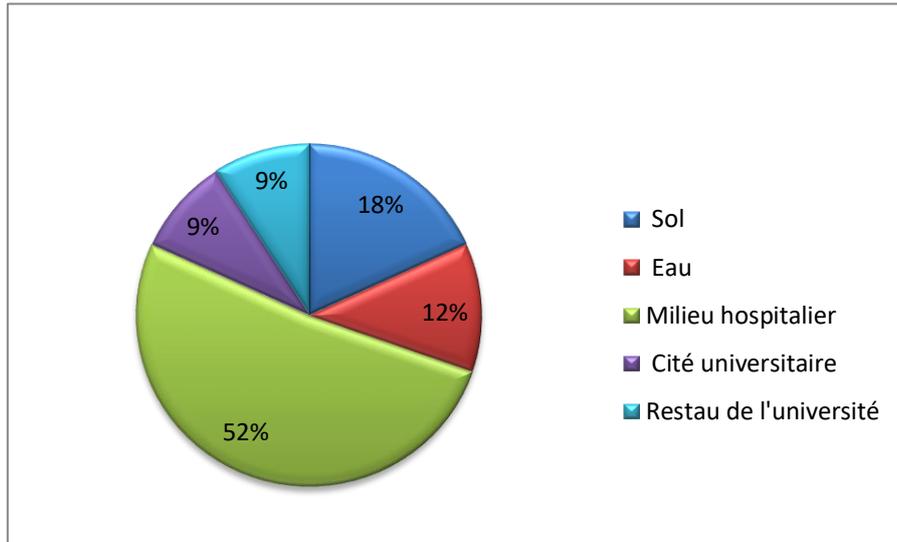


Figure 09 : Répartition des prélèvements dans différentes niches écologiques.

2. Identification

2.1. Etude macroscopique

Après l'incubation à 37°C pendant 24h sur le milieu Mac Conkey, les colonies circulaires lisses, d'une couleur transparente dû à la présence des souches de *P. aeruginosa* et d'une odeur typique de seringat. La formation du pigment pyocyanine est confirmée sur milieu King A.

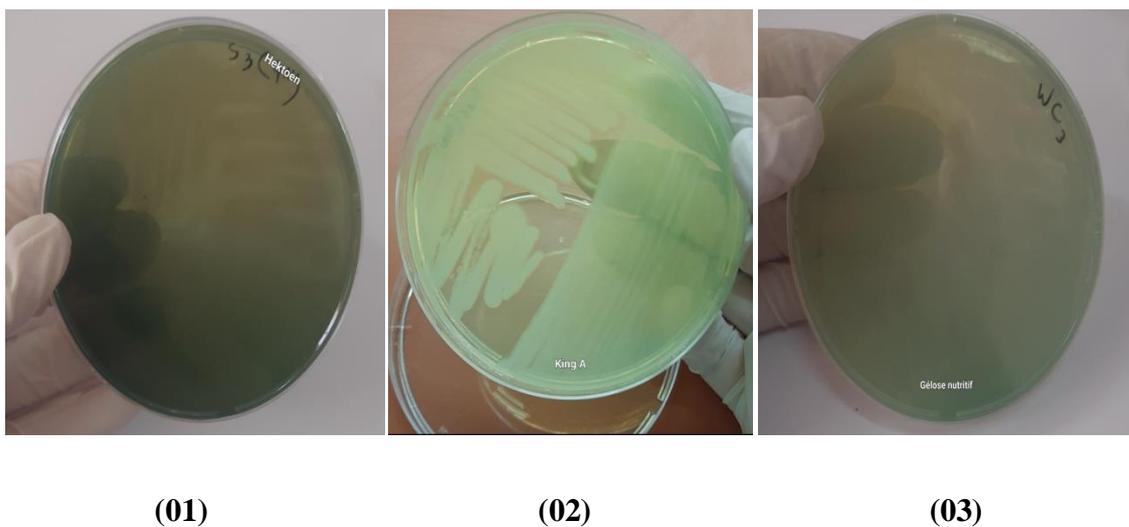


Figure 10: (01) Aspect des colonies de *P. aeruginosa* sur Hektoen (02) Aspect des colonies de *P. aeruginosa* sur King A (03) Aspect des colonies de *P. aeruginosa* sur Gélose nutritif.

2.2. Etude microscopique

Après la coloration de Gram, les bacilles de *Pseudomonas aeruginosa* apparaissent roses. Leur paroi cellulaire est de type Gram négatif, et lorsque l'alcool entre en contact avec les cellules colorées, il solubilise les lipides de leur paroi. Après avoir perdu ces derniers, la paroi devient poreuse, puis la fuchsine remplacera les phospholipides solubilisés et donnera une couleur rose.

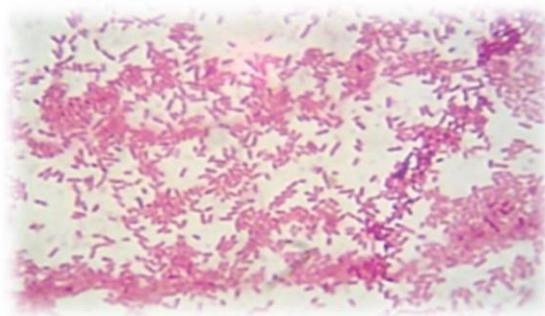


Figure 11 : Observation microscopique de *P. aeruginosa* après coloration de Gram (G100).

2.3. Croissances 4°C et 42°C

La figure 12 montre le résultat positif des souches de *P. aeruginosa* qui ont poussé sur le milieu Mac Conkey à 4°C et 42°C.

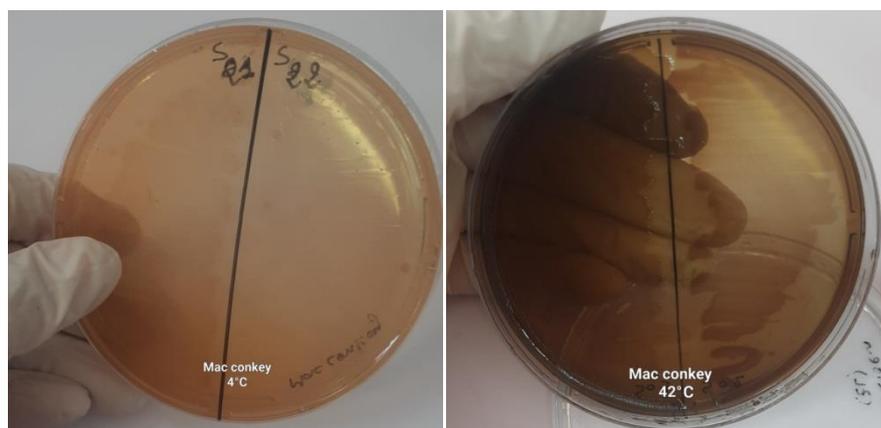


Figure 12 : Résultats d'incubation à 4°C et 42°C sur Mac Conkey.

2.4. Recherche de l'oxydase

La présence de cytochrome oxydase se manifeste par l'apparence d'une coloration violette elle est confirmée par la réaction positive à l'oxydase.



Figure 13 : Résultat positif de l'oxydase.

2.5. Recherche de catalase

La production de la catalase est révélée par l'émission de bulles de gaz.



Figure 14 : Résultat positif d'un test catalase.

3. Evaluation de la formation de biofilm par les souches étudiées

3.1. Méthode de RCA

La gélose contenant du Rouge Congo est un milieu favorable pour la détection des souches productrices du biofilm. L'interaction directe entre le colorant rouge Congo et certains polysaccharides bactériens forment un "slime" qui conduit à la formation de colonies noires sur le milieu, contrairement aux colonies qui ne produisent pas de Polysaccharide intercellulaire adhésion (PIA). Parmi les 33 prélèvements positifs nous avons sélectionné 08 souches productrices de biofilm le résultat négatif et positif sont montrés sur la figure 15.

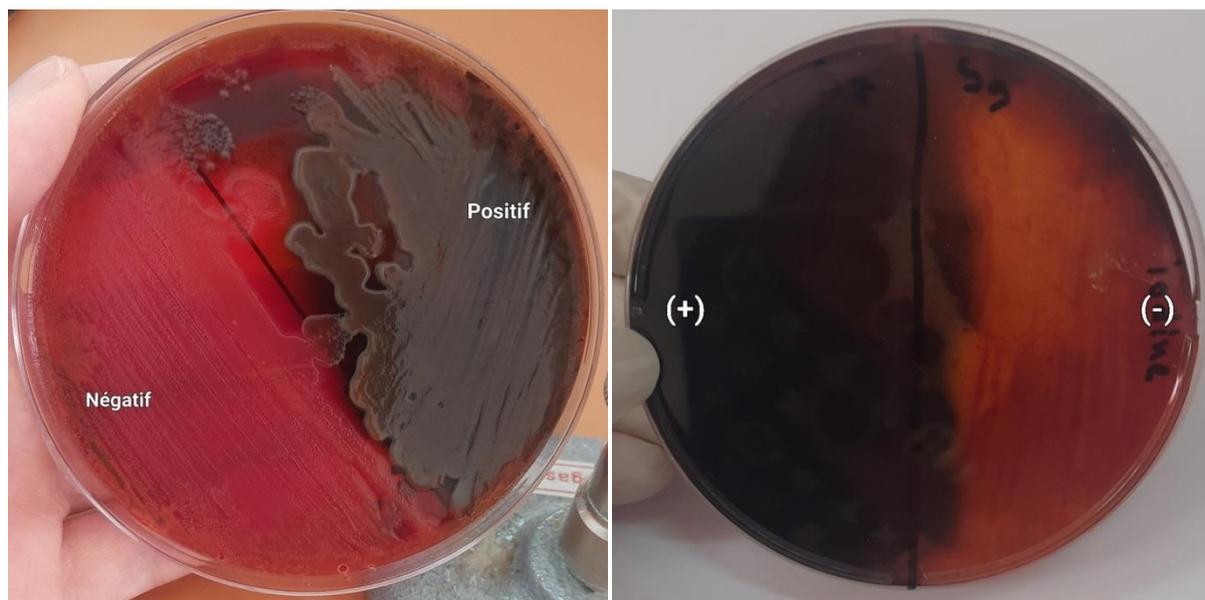


Figure 15 : Phénotype de production et non production de slime.

3.2. Méthode en tube (TM)

On considère que cette méthode permet de détecter la formation d'un biofilm. Cette technique a révélé que toutes les souches de *P. aeruginosa* sélectionnées sur milieu Rouge Congo, ont créé des biofilms, la quantité de ce dernier est révélée par l'intensité de la coloration au cristal violet (Annet et al., 2006).

Selon plusieurs auteurs, divers facteurs influencent l'adhésion des tubes à la paroi interne. Les recherches (d'Annet et al., 2006) sur la formation de biofilm sur une surface de polystyrène ont démontré que l'adhésion agit par l'hydrophobicité, la charge du substrat et les microorganismes présents.

Concernant les résultats obtenus, Il est clairement remarqué l'apparition des anneaux à la surface des tubes, la paroi et le bas du tube sont couverts d'un film visible ce qui explique la formation des biofilms (figure 16).

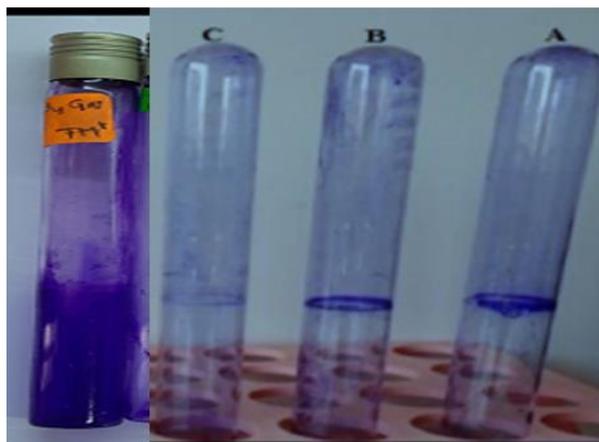


Figure 16 : Evaluation de la production du biofilm par la méthode TM : (A) Souche formatrice du biofilm ; (B) Souche modérément formatrice du biofilm ; (C) Souche non formatrice du biofilm ; (TM) Témoin.

4. Etude de l'efficacité des détergents et antiseptiques à usage hospitalier sur la production de biofilm

Les bactéries peuvent former des biofilms en présence de différentes molécules chimiques, ce qui remet en cause l'efficacité de ses dernières. Le comportement des souches vis-à-vis aux différentes molécules est présenté dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau VII : Détermination de la production de biofilm par des différentes souches vis-à-vis des détergents et antiseptiques utilisés :

Souches	TM ⁺	Iodine	Bétadine	Javel	Sanibon	Isis	Cresyl
S01	++	+	+	-	++	-	+
S03	++	+	+	-	++	++	+
S04	+++	++	+++	-	++	++	+
S07	++	+	+	+++	++	+++	++
S07 (GN)	+	-	+	+++	++	++	+
S09	++	++	++	-	++	-	+
S15	++	+++	++	+	++	++	-
S21	+++	++	++	+	++	+	-

(+ et ++): production moyenne ; (+++): forte production; (-): pas de production.

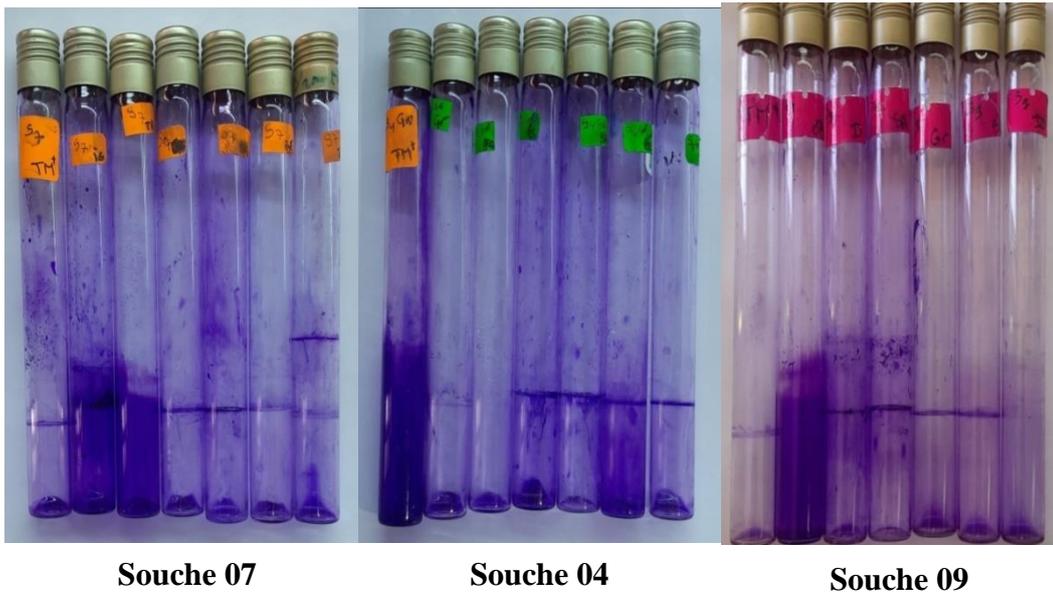


Figure 17: Evaluation de la production du biofilm en présence de différentes substances chimiques.

Un essai de mesure des valeurs de la densité optique (DO) du biofilm produit par la souche 07 en présence de différentes substances a été mesuré et présenté dans la figure 18. On remarque que les détergents utilisés en bio nettoyage ont un effet minime sur l'élimination des souches productrices de biofilm.

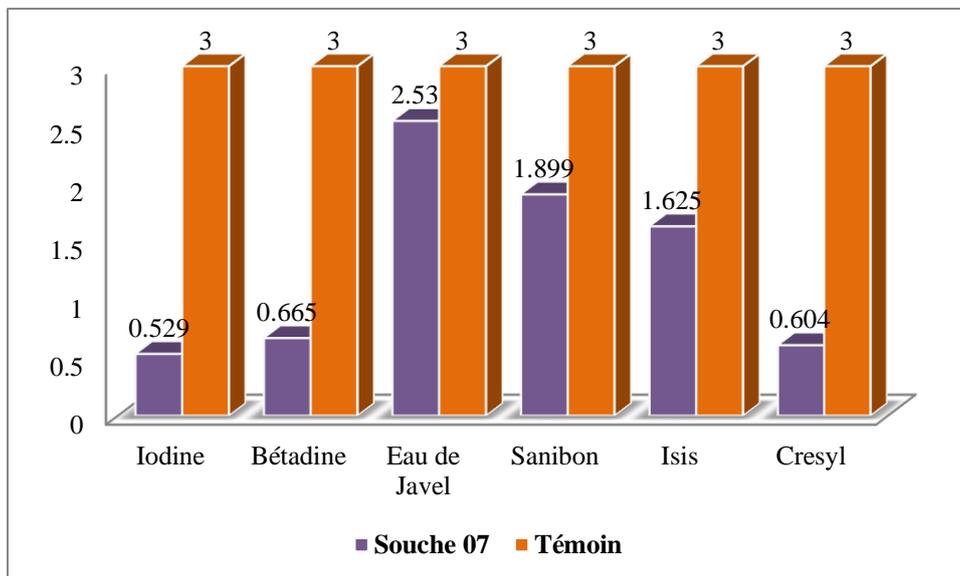


Figure 18 : Effet des substances chimiques sur la production du biofilm chez la souche 07 isolée au niveau de l'hôpital.

5. Discussion

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie existe partout tel que dans les domaines de la microbiologie médicale, alimentaire, aquatique, environnementale et agronomique. Cette espèce est considérée comme un pathogène opportuniste, ce qui contribue à une augmentation des cas de maladies graves et de décès (Mérens A *al.*, 2013).

L'environnement hospitalier proche des patients, peut être contaminé par les souches de *P. aeruginosa* tel que les draps, les lits, les couvertures et les équipements médicaux. Ces souches peuvent survivre des mois sur les surfaces avec une capacité de survie (Touati *et al.*, 2007 ; Touati *et al.*, 2010 ; Obeidat *et al.*, 2014 ; Stoesser *et al.*, 2014 ; Zenati *et al.*, 2016).

D'après les résultats positifs des prélèvements ; *P. aeruginosa* est isolée dans l'environnement naturel : le sol 18% et l'eau avec 12% ainsi elle est isolée essentiellement des surfaces : l'hôpital 52 %, cité universitaire 9% et le restau de l'université avec 9%.

L'environnement hospitalier constitue une niche écologique importante pour les microorganismes, qui peuvent servir de réservoir pour développer différentes infections (Zenati *et al.*, 2016). Les prélèvements positifs obtenus montrent que 52% des *Pseudomonas* sont retrouvés dans les hôpitaux, ce qui confirme l'importance de ce milieu comme niche écologique pour la propagation des bactéries surtout *Pseudomonas aeruginosa* (Zenati *et al.*, 2016).

Deux méthodes sont employées pour évaluer la capacité des souches isolées à adhérer et à former des biofilms. On utilise la technique de TM et RCA comme une technique de criblage générale pour détecter les bactéries qui génèrent des biofilms en laboratoire (Oliveira *et Cunha*, 2010). Les résultats révèlent que 08/20 souches sont productrices de slime par culture sur milieu rouge Congo et confirmer par la méthode TM. Ces souches présentent des comportements différents vis-à-vis des substances utilisées. Nous avons observé une variation dans l'élimination et la production de biofilms en utilisant différents détergents et antiseptiques. Selon les chercheurs (Freemanet *et al.*, 1989), la gélose Rouge Congo Agar (RCA) est un milieu idéal pour détecter les souches bactériennes qui produisent du slime. Donc ces méthodes servent à évaluer l'adhésion des bactéries à la surface interne des tubes ainsi que leur aptitude à former des biofilms. Les bactéries sont classées en trois catégories :

celles qui ne sont pas adhérentes (ne formant pas de biofilms), celles qui sont moyennement adhérentes (formant des biofilms de manière modérée), et celles qui sont fortement adhérentes (formation intense de biofilms) (**Lakhal et al., 2016**).

Le bacille pyocyanine possède une capacité de former des biofilms. Pour cela, nous avons testé l'effet de quatre détergents (Sanibon, Javel, Isis, Cresyl) et deux antiseptiques (Iodine, Bétadine) sur les souches.

Le rôle des détergents et des antiseptiques sur la production de biofilm a été mis en évidence. Selon le nombre de sites actifs, la quantité de chlore consommée, la concentration en chlore et sa surface spécifique est par conséquent la réaction avec le biofilm varie (**Parent et al., 1996**). En combinant ces produits, il existe des souches qui éliminent le biofilm par ces produits, tandis que d'autres ne le font pas. Parmi les détergents les plus efficaces, on retrouve l'eau de javel, qui est considéré comme l'un des meilleurs pour éliminer le biofilm. Le chlore est un agent désinfectant extrêmement puissant pour éliminer les bactéries, en particulier les bactéries pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa*. Néanmoins, sa pénétration dans le biofilm est restreinte et il maintient un résiduel de chlore adéquat pour un impact limité sur la croissance bactérienne (**Finch et al., 1994**). Et peut influencer la croissance des biofilms est régulée par le contrôle physique de leur épaisseur. Des processus d'érosion et de détachement peuvent perturber l'organisation structurale du biofilm. Ces polysaccharides peuvent soit être attaché à la paroi par des liaisons covalentes ou des interactions intenses en tant que polysaccharides capsulaires (PSC), soit créer une couche diffuse facilement détachable de la surface et puis se retrouve dans le milieu extracellulaire en tant que polysaccharides de "slime" (**Lakhal et al., 2016**).

Selon l'étude menée par (**Mirani et al., 2018**), *P. aeruginosa* a des caractéristiques de surface hydrophobes qui leur permettent d'adhérer facilement. *Pseudomonas*, une bactérie opportuniste à Gram négatif, produit de nombreux facteurs de virulence et une couche dense d'EPS contenant jusqu'à trois exopolysaccharides différents (alginate, Pel et Psl), ce qui favorise leur adhésion de manière efficace (**Kurmoo et al., 2020**).

En ce qui concerne les antiseptiques, la présence de biofilm autour des bactéries peut freiner la diffusion des antiseptiques en formant une sorte de bouclier, diminuant ainsi leur

efficacité. Lorsque les bactéries adoptent le mode de vie en biofilm, cela provoque des changements importants dans l'activation des gènes, pouvant aussi favoriser l'émergence des mécanismes de résistance aux antiseptiques (**Djebli et Foussa, 2019**). *Pseudomonas aeruginosa* a une préférence pour se localiser et former des biofilms à l'intérieur des canaux afin de se protéger contre l'effet des désinfectants (**Marchetti et Pineau, 2005**). Les bactéries peuvent acquérir une résistance de plus en plus importante aux détergents et antiseptiques en particulier lorsqu'ils ne sont pas alternés (**Bekkari et al., 2016**).

Les recherches menées par (**Bridier et al., 2011**) révèlent que la résistance des bactéries aux désinfectants, détergents et les antiseptiques est influencée, directement ou indirectement, par la structure de leur paroi cellulaire et sa capacité à résister aux antimicrobiens. Les substances chimiques peuvent réduire la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*, mais ne peuvent pas éliminer complètement les bactéries dans le biofilm (**Elgoulli, 2022**).

Conclusion

Cette étude menée sur l'effet des détergents et antiseptiques sur la création de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Sur les 120 prélèvements effectués au niveau des surfaces, sol, eau et milieu hospitalier et après les résultats de l'identification, 33 souches ont été isolées et identifiées, dont les surfaces hospitalières sont les plus touchées.

Les études sur la production du biofilm réalisé par la méthode de Rouge Congo Agar et de tube, ont démontré que certaines souches isolées produisent du biofilm. Nous avons démontré la persistance de ces souches aux différents désinfectants et antiseptiques utilisés. Cependant, la production du biofilm varié d'une souche à une autre, en fonction de la nature de la substance et l'origine de la souche.

Pseudomonas aeruginosa se distingue par son potentiel élevé d'adaptation au milieu environnemental et hospitalier ainsi les biofilms représentent des formes microbiennes qui résistent aux désinfectants et aux antiseptiques, ce qui constitue un véritable défi pour la santé humaine et un défi majeur pour la communauté médicale.

Les biofilms ont un impact écologique et économique considérable. Ils jouent un rôle dans la survie et la sélection des bactéries dans l'environnement, mais ont aussi de nombreux effets indésirables, notamment en santé publique. Pour toutes ces raisons, de nombreuses équipes de recherche s'intéressent au mode de développement des biofilms et aux facteurs d'adhésion impliqués dans les différentes étapes de leur formation.

Afin de limiter la formation du biofilm, qui devient par ailleurs de plus en plus résistant avec le temps, il est impératif de mettre en place un plan de nettoyage et de désinfection des surfaces des locaux. Ce plan doit prévoir un planning régulier des opérations, afin d'éviter l'implantation durable des micro-organismes et leur prolifération.

En perspectives, ce travail mérite d'être élargi sur le côté expérimental et équipements. Ces résultats obtenus, revêtent une importance capitale et ouvrent de nouvelles projections futur de recherche scientifique et innovante, afin d'inhiber l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques.

Références bibliographique

Références bibliographiques

A

Aissa, K. (2012). Profil de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques aux services de réanimation à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de rabat entre 2006 et 2010. Th. doct: Pharmacie: Université Mohammed V de rabat.

Aparna, M. S., and Yadav, S. (2008). Biofilms: microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12, 526-530.

Atbib, Y., Moutaouakkil, Y., Berdi, F., El Cadi, M. A., EL HARTI, J. and BOUSLIMAN, Y. (2022). Retraitement Des Dispositifs Médicaux « Expérience Du Service De Stérilisation » De L'hôpital Ibn Sina. *Jour Med Resh and Health Sci*, 5(5), 1994-2007.

B

Baillif, S., Hartmann, D., Freney, J., Kodjikian, L. (2010). Implant intraoculaire et adhésion bactérienne: influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. *Journal français d'ophtalmologie*, 33(3), 210-221.

Barir, O. ET Ghilani, M. (2011). Le Profil de résistance aux B-lactamines des souches de *Pseudomonas aeruginosa* d'origine Hospitalière. Mémoire de master : Biochimie et biologie moléculaire, Biskra: Université Mohamed khider-Biskra.

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

Bert, F., Maubec, E. (1998). Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contamination tap water in neurosurgery intensive care unit. *JHosp Infect*; 39.

Boudouda, R. (2015). Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse de *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de master : Génétique Moléculaire. Constantine: Université des Frères Mentouri Constantine. p3-4-14-15.

Boussouf, O., Yahia, CH. (2020). Epidémiologie et profil de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine (HMRUC). Mémoire de master: biologie moléculaire des microorganismes. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine.p5-6-7.

Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F. (2011). Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27(9), 1017-1032.

C

Camiade, M. (2019). Persistance de bactéries entériques antibiorésistantes ou pathogènes sur des végétaux de consommation humaine (modèle la laitue) (Doctoral dissertation, Normandie).

Carpentier, J.P., Morillon, M., Petrognani, R. et Cavallo, J.D. (2003). Infections à bacille pyocyanique. Encyclopédie Médico-Chirurgicale. 8 : 25-50.

CETRE, J. C. (2006). Nettoyage des surfaces métalliques vis-à-vis des protéines et du risque prion Etudes des interfaces protéines/métal (Doctoral dissertation, ECOLE CENTRALE DE LYON).

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

Chaker, H. (2012). Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane.

CHOUH, F., CHATER, A. and SIAD, R. (2019). Profil de résistance aux antibiotiques des bacilles Gram négatif isolés à partir des urines au laboratoire de microbiologie au CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou durant l'année 2018.

Costerton, J.W., Marrie, T. J. and Cheng, K. J. (1985). Phenomena of bacterial adhesion. In *Bacterial adhesion: mechanisms and physiological significance* (pp. 3-43). Boston, MA: Springer US

D

Daeschlein, G. (2013). Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. *International wound journal*, 10(s1), 9-14.

DAHAH, H. (2018). *Etude de l'effet antimicrobien et antioxydant des métabolites secondaires, sécrétés par des Pseudomonas originaires des conditions extrêmes* (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis).

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

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

DJEBLI, T. and FOUSSA, A. (2019). *PRINCIPALES MALADIES RENCONTEES EN ELEVAGE CUNICOLE* (Doctoral dissertation, université ibn khaldoun TIARET).

E

Eyquem, A., Alouf, J., Montagnier, L. (2005). *Traité de microbiologie. Clinique:quatrième mise à jour et compléments.* p238.

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

ELGOULLI, M. (2022). Étude des conditions de la formation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Escherichia coli* en conditions dynamiques de l'eau et conception de nouvelles stratégies anti-biofilm.

F

Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Sheffler, L., Brunnet, S., Tang, H. et Prince, A. (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun*; 66 (1): 43-51.

Filloux, A., Vallet, I. (2003). Biofilm: set-up and organization of a bacterial community.

FINCH, G.R., BLACK, E.K. and GYUREK, L.L. (1994). Ozone and Chlorine Inactivation of *Cryptosporidium*, Conference proceedings, Water Quality Technology Conference, Part II. San Francisco, CA.

Floret, D. (2009). Immunization: process of elaborating guidelines and their evolution in France. *Ann Pharm Fr* 67, 219-223.

Fox, G.j., Barthold, S.W., Davisson, M.T., Newcomer, C.E., Quimby, F.W., Smith, A.L. (2006). The mouse in biomedical research. Academic Press, London; 281-282.

G

Ghita, B. T. (2020). Etude phénotypique et moléculaire des micro-organismes isolés des aliments et leurs environnements dans une structure de restauration hospitalière et pratiques d'hygiène.

H

Hahn, HP. (1997). The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*; 192: 99-108.

Hobbs, M., Collie, E.S., Free, P.D., Livingston, S.P., Mattick, J.S. pilS and pilR, (1993). A two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1993; 7: 669-82.

K

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

Kerr, K.G., Snelling, A.M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp INF* [7] Lyczak, J. B., Cannon, C. L., et Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*, 2 (9), 1051-60.

Khalifa, A. B. H., Moissenet, D., Thien, H. V. and Khedher, M. (2011). Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. In *Annales de biologie clinique* (Vol. 69, No. 4, pp. 393-403).

Khelifa, Y. and Ait Meddour, A. E. (2020). Types biofilms présents sur le matériel de traite, de collecte et stockage utilisé dans des fermes d'exploitation laitière (Doctoral dissertation, Université de Jijel).

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

Kurmoo, Y., Hook, A. L., Harvey, D., Dubern, J. F., Williams, P., Morgan, S. P., Alexander, M. R. (2020). Real time monitoring of biofilm formation on coated medical devices for the reduction and interception of bacterial infections. *Biomaterials Science*, 8(5). 1464-1477.

L

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

Lakhal, H., Chellat, K., and Ait Meddour, A. E. (2016). *Détection de la biofilms par des souches de Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation, Université de Jijel).

Lebeaux, D. and Ghigo, J. M. (2012). Infections associées aux biofilms-Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale?. *médecine/sciences*, 28(8-9), 727-739.

Lister, J. L. and Horswill, A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 178.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L., et Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*, 2 (9), 1051-60. *Med Sci (Paris)*.19(1):77-83.

M

Manfredi, R. (2000). Pseudomonas spp. complications in patients with HIV disease: an eight-year clinical and microbiological survey Eur J Epidemiol.

Marchetti, B., Pineau, L. (2005). Risque infectieux exogène en endoscopie digestive. Revue Francophone des Laboratoires, (376), 67-73.

Memdouh, S., Reddaf, N. (2018). Les infections a Pseudomonas aeruginosa au CHU de constantine.. Mémoire de master: biologie appliquée. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine. p4-7-9-10-27-28.

Mezaache, S. (2012). Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de pseudomonas isolées de la rhizosphère de la pomme de terre.

Mérens, A., Jault P., Bargues, L., Cavallo, J.D. (2013). Infections à Pseudomonas aeruginosa. EMC — Maladies infectieuses. 10:1—18.

Mirani, Z. A., Fatima, A., Urooj, S., Aziz, M., Khan, M. N., Abbas, T. (2018). Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli. Iranian journal of basic medical sciences, 21(7), 760.

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

Montil, H., Avril, L., Dabernat, H., Denis, F. (1992). Bactériologie clinique 2ème édition.

Moltz, A. G. and Martin, S. E. (2005). Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of food protection*, 68(1), 92-97.

Montil, H., Avril, Daberna, L.H., Denis, T. F. (1992). Bactériologie clinique 2ème édition.

Muhsin, J., Ufaq, T., Tahir, H. et Saadia, A. (2015). Bacterial Biofilm: its composition, formation and role in human infections. *Journal of microbiology and biotechnology*, 4: 1-14.

O

Oliveira, A., Cunha, M.D. (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative *staphylococci*. *BMC Research Notes* 3: 260.

Olivares, E. (2017). *Évaluation de l'impact des antibiotiques sur la formation de biofilms par P. aeruginosa: place de l'Antibiofilmogramme®* (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).

O'Toole, G.A. ET Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*; 30(2): 295-304.

P

Palleroni, N. (1984). Manual of Systematic Bacteriology .USA. P141–171. Pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(12): 6911–6.

PARENT, A., SABY, S., SARDIN, M., BLOCK, J.C. et GATEL, D. (1996). Contribution of biofilms to the chlorine demand of drinking water distribution systems, In Proceedings of the AWWA Water Quality Technology Conference American Water Works Association, Boston, Mass.

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

R

Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B. C., Lau, G. W. and Tompkins, R. G. (2000). Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8815-8821.

Rosling, B., Wannfors, B., Volpe, A. R., Furuichi, Y., Ramberg, P. and Lindhe, J. (1997). The use of a triclosan/copolymer dentifrice may retard the progression of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(12), 873-880.

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

S

Shi, X. and Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407-413.

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

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

Souley, L., Moustafa, F.S. (2002). Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux ATB à l'hôpital du point G. Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. Université de Bamako. p95.

Sultan, A.M. et Nabel, Y. (2019) : Méthode en tube et gélose au Rouge Congo versus méthode sur plaque culture tissulaire pour détection de la production de biofilm par des uropathogènes isolés de courant moyen. 20 (1) :60-66.

T

Thiveaud, D., Grimoud, A. M., Marty, N., Roques, C., Lodter, J. P., & Chabanon, G. (2005). Hygiène: structures, matériels, méthodes. *EMC-Odontologie*, 1(4), 307-339.

Tremblay, Y. D., Hathroubi, S. and Jacques, M. (2014). Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.

V

Vallet, I., Olson, J. W., Lory, S., Lazdunski, A., & Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their

involvement in biofilm formation. *Proceedings of the national academy of sciences*, 98(12), 6911-6916.

W

Wall, D. Kaiser, D. (1999). Type IV pili, cellmotility. *Mol Microbiol*, 32: 1-10.

Wall, D. and Kaiser, D. (1999). Type IV pili and cell motility. *Molecular microbiology*, 32(1), 01-10.

Y

Yeterian, E. (2010). Base moléculaire de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg .p11.

Yin, W., Xu, S., Wang, Y., Zhang, Y., Chou, S. H., Galperin, M. Y., He J. (2020). Ways to control harmful biofilms: prevention, inhibition, and eradication. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(1), 57–78.

Z

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

<https://www.microbiologie-clinique.com/milieucultures.html>

https://www.memobio.fr/html/bact/ba_pae.html

Les annexes

ANNEXE 01

Tableau 01: Les matériels utilisés.

Appareillage	Verrerie	Autre matériel
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Etuve ▪ Balance ▪ Agitateur magnétique ▪ Plaque chauffante agitatrice ▪ Vortex ▪ Autoclave ▪ Bain Marie ▪ Spectrophotomètre ▪ Réfrigérateur ▪ Bec Bunsen ▪ Microscope optique ▪ Micropipette ▪ Distillateur 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bécher ▪ Erlenmeyer ▪ Tubes à essai ▪ Flacons 200 ml ▪ Fiole jaugée ▪ Entonnoir ▪ Eprouvette 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Boites Pétri ▪ Portoirs ▪ Pipettes Pasteur ▪ Anse de platine à fil bouclé ▪ Ecouvillons ▪ Barreau magnétique ▪ Lames, Lamelles ▪ Spatule ▪ Embouts jaunes et bleus ▪ Cuves

Tableau 02 : Les milieux de culture et les produits utilisés.

Milieu de culture	Solvant	Réactifs	Produits
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bouillon BHIB (Brain Heart Infusion Broth) ▪ Gélose Nutritive (GN) ▪ Gélose Rouge Congo Agar ▪ Bouillon nutritif ▪ Hektoen ▪ Mac Conkey ▪ King A 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Eau distillé ▪ Eau physiologique ▪ Ethanol (96) ▪ Acide Acétique ▪ Acide Chlorhydrique HCL 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cristal Violet (CV) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Oxalate d'ammonium ▪ Rouge Congo ▪ Glycérol ▪ Agar ▪ Saccharose

ANNEXE 02

• Composition des milieux de culture (pour 1L d'eau distillée)

Hektoen pH= 7.6

- Proteose peptone 12 g
- Extrait de levure 03 g
- Chlorure de sodium 05 g
- Thiosulfate de sodium 05 g
- Sels biliaires 09 g
- Citrate de fer ammoniacal 1.5 g
- Salicine 02 g
- Lactose 02 g
- Saccharose 12 g
- Fuschine acide 0.1 g
- Bleu de bromothymol 05 mg
- Gélose 13 g

Milieu Mac Conkey pH =7.2

- Peptone pancréatique de gélatine 17 g
- Peptone pancréatique de caséine 1,5 g
- Peptone peptique de viande 1,5 g
- Lactose 10 g
- Chlorure de sodium 05 g
- Sels biliaires 1,5 g
- Rouge neutre 30 mg
- Violet de gentiane 01 mg
- Agar 13,5 g

Milieux King A pH =7.2

- Bacto-peptone (difco) 20 g
- Agar 15 g

- Glycérol 10 g
- SO₄K₂ anhydre 10 g

Bouillon nutritif pH =7,3

- Peptone 10 g
- Extrait de bœuf 01 g
- Extrait de levure 02 g
- Chlorure de sodium 05 g

Rouge Congo Agar pH=7

- bouillon d'infusion cœur-cervelle (BHIB) 37 g
- saccharose 50 g
- Agar 10 g
- Rouge Congo 0.8 g

Gélose Nutritif pH=7

- Extrait de viande 05 g
- Extrait de levure 2,5 g
- Peptone 05 g
- Chlorure de sodium 05 g
- Agar 15 g

Composition de cristal violet

- Cristal 02 g
- Ethanol (95%) 20 ml
- Oxalate d'oxalate d'ammonium (1%) 80 ml

Résumé

Le bacille pyocyanique *Pseudomonas aeruginosa* est considéré comme l'un des pathogènes humains les plus fréquents et omniprésent à cause de leur virulence et de leur attitude à développer une résistance aux substances chimiques via la formation d'un biofilm.

Cette étude vise à isoler les souches de *P. aeruginosa* productrices du biofilms, à partir de différentes niches écologiques, ainsi que évaluer les effets des substances chimiques sur cette formation. Les méthodes RCA et TM sont utilisées pour sélectionner les souches productrices du biofilm.

33 souches ont été isolées à partir de 120 prélèvements, dont plus de la moitié ont été isolées sur les surfaces hospitalières. 08 souches sont productrices du biofilm. L'effet des détergents et antiseptiques a montré un comportement variable chez les différentes souches, ce dernier varié en fonction de la nature de la molécule testée ainsi que l'origine de la souche.

Mots clés : Surface, *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Détergents, Antiseptiques.

Abstract

The pyocyanic bacillus *Pseudomonas aeruginosa* is considered one of the most frequent and ubiquitous human pathogens because of their virulence and their attitude to develop resistance to chemical substances through the formation of a biofilm.

This study aims to isolate biofilm-producing strains of *P. aeruginosa* from different ecological niches, as well as to assess the effects of chemicals of this formation. RCA and TM methods are used to select biofilm-producing strains.

33 strains were isolated from 120 samples, more than half of which were isolated from hospital surfaces. 08 strains produce biofilm. The effect of detergents and antiseptics showed a variable behavior in different strains, the latter varied according to the nature of the molecule tested and the origin of the strain

Keywords: Surface, *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Detergents, Antiseptics.

ملخص

تعتبر عصية الزائفة الزنجارية من أكثر مسببات الأمراض البشرية شيوعًا وانتشارًا بسبب ضرارتها وموقفها من تطوير مقاومة للمواد الكيميائية من خلال تكوين غشاء حيوي. تهدف هذه الدراسة إلى عزل سلالات إنتاج الأغشية الحيوية من عصية الزائفة الزنجارية من مختلف المنافذ البيئية، بالإضافة إلى تقييم تأثيرات المواد الكيميائية على هذا التكوين. نستخدم طريقة الاحمر كونغو اغار و طريقة الانابيب لاختيار سلالات إنتاج الأغشية الحيوية .

تم عزل 33 سلالة من 120 عينة، تم عزل أكثر من نصفها من أسطح المستشفيات. 08 سلالات تنتج أغشية حيوية. أظهر تأثير المنظفات والمطهرات سلوكًا متغيرًا في سلالات مختلفة، وتباينت الأخيرة وفقًا لطبيعة الجزيء المختبر وأصل السلالة.

الكلمات المفتاحية : الاسطح ، الزائفة الزنجارية ، غشاء حيوي ، المنظفات ، المطهرات .