

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Centre Universitaire Salhi Ahmed – NAAMA**

**Institut des Sciences et de Technologie**



En vue de l'obtention du diplôme de MASTER Académique

En : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté Par : M<sup>elle</sup> NAMAOUI Mehjdouba et M<sup>elle</sup> SEGHIER Achwaq

Intitulé

**Evaluation de la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* isolées des différents cathéters.**

**Soutenu, devant le jury composé de :**

<b>Président :</b>	Mr SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib	M.C.A	CUN Naâma
<b>Encadreur :</b>	Mme LAGHA Nouria	M.C.A	CUN Naâma
<b>Examinatrice :</b>	Mme YAKOUBI Meryem	M.A.B	CUN Naâma

**Session : (juillet 2021)**

**Promotion : 2020 / 2021**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا

إننا أنت العليم الحكيم

سورة البقرة: الآية 32

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمَ



# *Remerciements*



*Nous tenons à remercier et rendre grâce à **DIEU** le tout puissant de nous avoir donné le courage et la volonté de concrétiser ce modeste travail.*

*Nos reconnaissances, nos profondes gratitudee et nos sincères remerciements vont à notre encadreur Madame **LAGHA NOURIA** pour sa gentillesse, sa contribution à l'élaboration de ce travail et pour les efforts qu'elle a fournis durant notre cursus qui nous ont permis de mener à bien ce mémoire.*

*Nous souhaitons aussi remercier tous les membres du jury présents ce jour.*

*Un grand remerciement à notre cher président, **Mr SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib** d'avoir accepté à présider de notre travail. Et à notre cher Examinatrice **Mme YAKOUBI Meryem** d'avoir accepté d'examiner notre travail, ainsi qu'à tous les enseignants du département des sciences de la nature et de la vie.*

*Un grand merci à nos familles respectives et nos amis qui nous ont aidées.*

*Nous profitons de l'occasion pour remercier tous ceux qui ont collaboré de Près ou de loin à la réalisation de ce mémoire  
Enfin nous remercions tous nos collègues d'études et particulièrement ceux de notre promotion.*

*Merci*





# *Dédicaces*



*Je dédie ce modeste travail : **A Dieu**, tout puissant, qui m'a donné la force, la santé et le courage de réaliser ce précieux travail.*

*A ma précieuse source de tendresse, qui a veillé sans cesse sur moi avec ses prières, sa patience et son soutien :*

**Ma chère mère.**

*A qui m'a donné la volonté, l'affection et le courage nécessaire pour persévérer dans le bon sens*

**Mon père**

*Je dédie, mon amour et mon profond respect à Vous deux. Puisse Dieu, le tout puissant, vous accorder longue vie, santé et bonheur.*

*A mes chers sœurs et frères (**Hakim, Zeyneb, Fouza, Adel, Wahid, Sidou**) sans qui nos vies n'auraient pas de sens.*

*Mon binôme **Mehdjouba**, je la remercie pour le courage qu'elle m'a donné et tous les moments que nous avons passés ensemble.*

*A tous mes amis (**Naima et Souria**) et mes collègues de promotion*

*A toute ma grande famille surtout mes tantes (**Tata et Karima**).*

**« AchwaQ »**

*Je dédie ce travail :*

*A DIEU, le tout puissant Je dédie ce modeste travail  
A mes précieuses sources de tendresse, qui ont veillé sans cesse  
sur moi avec ses prières, sa patience et son soutien :  
Avec un énorme plaisir, je dédie ce modeste travail à mes très  
chers parents, source de tendresse, de noblesse et d'amour, qui  
ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique  
modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront  
dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.*

*Ames sœurs*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon amour, de  
mon profond attachement et mes souhaits de succès et de  
bonheur pour chacun de vous. Jamais je n'oublierai l'appui que  
vous me prodiguez à chaque fois que j'en ai besoin. Que Dieu  
vous protège.*

*Mon binôme **Achwaq**, je la remercie pour le courage qu'elle m'a  
donné et tous les moments que nous avons passés ensemble.*

*A tous mes amis et mes collègues de promotion*

*A toute ma grande famille.*

*« Mehadjouba »*

## Table des matières

Remerciements :.....	I
Dédicaces :.....	II
Liste des abréviations .....	III
Liste des figures.....	IV
Liste des tableaux.....	VII
Résumé.....	IX
Introduction.....	1

### Première partie : Synthèse bibliographique.

#### Chapitre I : Les infections associées aux cathéters vasculaires :

1- Définition.....	2
2- Les différents types cathéters vasculaires.....	2
3- Physiopathologie.....	3
3-1- Les principales voies de contaminations du cathéter.....	3
4- Epidémiologie.....	4
5- Facteurs de risque des infections associées aux cathéters vasculaires .....	4
6- Prévention .....	5

#### Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa* :

1- Généralité .....	5
2- Classification.....	6
3- Caractère morphologique.....	7
4- Caractère culturaux.....	7
5- Caractère biochimique et métabolique .....	8
6- Pouvoir pathogène .....	8

#### Chapitre III : Formation de biofilm :

1- Définition.....	9
2- Etapes de formation des biofilms .....	9

2-1- L'adhérence réversible.....	10
2-2- L'adhérence irréversible.....	10
2-3- Le développement précoce du biofilm.....	11
2-4- La maturation du biofilm.....	11
2-5- Le détachement des bactéries.....	12
3- Les facteurs influençant la formation du biofilm.....	13
4- Régulation de la formation des biofilms : le quorum sensing.....	14
4-1- Définition et mécanismes.....	14
5- L'intervention des biofilm dans le domaine médical.....	14
5-1- Les biofilms sur les dispositifs médicaux.....	15
6- Formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15

#### **Chapitre IV : Les antibiotiques :**

1- Définition.....	15
2- Classification des antibiotiques.....	16
3- Mode d'action.....	17
4- Mécanisme de la résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques.....	18
4-1-La résistance naturelle.....	18
4-2-La résistance acquise.....	19

#### **Deuxième Partie : Matériel et Méthodes :**

1- Prélèvements.....	21
2- Inoculations.....	21
3- Isolement et purification.....	21
4- Identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
4-1- Examen macroscopique des cultures.....	22
4-2- Examen microscopique.....	22
4-2-1- Coloration de Gram.....	22
4-3- Les tests biochimiques.....	23
4-3-1- La recherche de l'oxydase.....	23
4-3-2- La recherche de catalase.....	23
4-3-3- La galerie API 20 NE.....	24
5- Conservation des souches.....	25

6- Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	25
7- Détection de la formation de biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27
7-1- La méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	27
7-2- La méthode en tube(TM).....	28
7-3- La méthode de Rouge Congo agar (RCA).....	29

### **Troisième Partie : Résultats et Discussion**

Résultats.....	31
Discussion.....	41
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>46</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>47</b>

### **Annexes**

## Liste des abréviations

***P. aeruginosa*** : *Pseudomonas aeruginosa*.

**TCP** : Plaque de culture de tissus.

**RAC** : Culture sur milieu au rouge congo.

**ILC** : Infection liée aux cathéters.

**ATB** : Antibiotique.

**CV** : Cristal violet.

**Sm**: Small.

**ADH**: Arginine Di Hydrolase.

**LDC** : **Lysine** Décarboxylase.

**ODC** : Décarboxylase.Oxygèn.

**QS**: Quorum Sensing.

**TM** : Méthode En Tube.

**LB** : Luria Bertanni.

**DO** : Densité Optique.

**BCC** : Bouillon coeur cervelle.

**MU**: Mueller Hinton.

**PBS**: Phosphate Buffered Saline.

## Liste des figures

**Figure 1 :** Différents types de cathéters vasculaires.

**Figure 2 :** Cathéter vasculaire : principales voies d'acquisition des microorganismes.

**Figure 3 :** Cinq principales composantes des risques infectieux liés aux cathéters.

**Figure 4 :** *Pseudomonas aeruginosa*.

**Figure 5 :** Différents aspect de colonies de *Pseudomonas aeruginosa*.

**Figure 6 :** Principales étapes de la formation des biofilms.

**Figure 7 :** Attachement des cellules.

**Figure 8 :** Expression des gènes pour la synthèse des polymères de la matrice.

**Figure 9 :** Coordination entre cellule grâce aux molécules de signalisation.

**Figure 10 :** Protection contre les agents antimicrobiens.

**Figure 11 :** Destruction du biofilm et relargage des cellules.

**Figure 12 :** Formation du biofilm sur un cathéter.

**Figure 13 :** Cible des principaux antibiotiques.

**Figure 14 :** Différents étapes d'identification de bactérienne.

**Figure 15 :** Les bacilles Gram négatif de *Pseudomonas aeruginosa* à objectif 100X.

**Figure 16 :** La recherche l'oxydase chez *Pseudomonas aeruginosa*.

**Figure 17 :** La Recherche de catalase.

**Figure18 :** Galerie API 20 NE.

**Figure19 :** Emplacement des disques d'antibiotiques.

**Figure 20 :** Les étapes de formation du biofilm par la technique TCP.

**Figure 21 :** Evaluation de la production de biofilm par la méthode de TM.

**Figure 22 :** Culture sur la gélose Rouge Congo.

**Figure 23 :** Répartition des souches selon différents études.

**Figure 24 :** Antibiogramme des souches de *P. aeruginosa* multirésistantes.

**Figure 25 :** Répartition de la Sensibilité aux antibiotiques des souches de *P. aeruginosa*.

**Figure 26 :** Evaluation de la production de biofilm par la méthode de CV.

**Figure 25 :** Capacité des souches de *P. aeruginosa* à former un biofilm.

**Figure 26 :** Production de slime chez les souches isolées sur milieu rouge congo.

**Figure 27 :** Capacité des souches de *P. aeruginosa* à former un biofilm.

**Figure 28 :** Production de slime chez les souches isolées sur milieu rouge congo.

**Figure 29 :** Formation de biofilm par *P. aeruginosa* par la technique TCP.

**Figure 30 :** Résultats de la quantification de la formation de biofilm in vitro par les souches isolées à partir des sondes urinaires.

**Figure 31 :** Culture de *P. aeruginosa* sur gélose Rouge Congo.

**Figure 32 :** Croissance de *P. aeruginosa* en bouillon LB sur polystyrène.

**Figure 33 :** Formation de biofilm de *P. aeruginosa* sur polystyrène.

**Figure 34 :** Croissance de *P. aeruginosa* en bouillon LB sur polystyrène.

## Liste des tableaux

**Tableau 1 :** Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa*.

**Tableau 2 :** Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm.

**Tableau 3 :** Principales familles d'antibiotiques.

**Tableau 4 :** Représente les résultats de la sensibilité aux ATB des souches : *P. aeruginosa*.

**Tableau 5 :** Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

**Résumé :**

Au cours des dernières décennies, *Pseudomonas aeruginosa* s'est imposé comme un pathogène hospitalier majeur, responsable d'un nombre important d'infections remarquables par leur sévérité.

Le biofilm formé par *P. aeruginosa* est souvent responsable des infections associées aux soins à cause de sa capacité de coloniser les surfaces des dispositifs médicaux tels que : les cathéters et les sondes urinaires.

L'objectif de notre mémoire est de faire une synthèse des résultats des différentes études réalisées en Algérie pour montrer la capacité des souches *Pseudomonas aeruginosa* à produire de biofilm à partir de différentes méthodes *in vitro*.

Cette bactérie opportuniste, montre une capacité de résistance à la plupart des antibiotiques utilisés et elle est capable d'infecter un large spectre d'hôtes, sa pathogénicité repose sur un arsenal complexe constitué de facteurs solubles et d'attributs cellulaires.

**Mots clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, cathéters, sondes urinaires.

## ملخص:

في العقود الأخيرة، أثبتت *Pseudomonas aeruginosa* نفسها كممرض رئيسي في المستشفيات، وهي مسؤولة عن عدد كبير من الإصابات الملحوظة لشدها.

غالبًا ما تكون الأغشية الحيوية المكونة من *P. aeruginosa* مسؤولة عن العدوى المرتبطة بالرعاية الصحية نظرًا لقدرتها على استعمار أسطح الأجهزة الطبية مثل: القسطرة والقسطرة البولية.

الهدف من أطروحتنا هو تلخيص نتائج الدراسات المختلفة التي أجريت في الجزائر لإظهار قدرة سلالات *Pseudomonas aeruginosa* على إنتاج غشاء حيوي باستخدام طرق مختلفة في المختبر.

هذه البكتيريا الانتهازية تظهر قدرة كبيرة على التكيف تجاه المضادات الحيوية مما يؤدي إلى مشاكل علاجية حادة في كثير من الأحيان، قدرتها الامراضية ناتجة عن عدة عوامل تتكون أساسا من عدة سموم يتم إنتاجها في الوسط الخارجي بالإضافة إلى عوامل مرتبطة أساسا بالخلية البكتيرية.

**الكلمات المفتاحية:** الغشاء الحيوي، القسطرة، القسطرة البولية، *Pseudomonas aeruginosa*

**Summary:**

Biofilms are structured communities of microorganisms attached to a surface; appear to be the key element of many infections. The latter can form on living tissue as it forms on medical devices.

The biofilm formed by *P. aeruginosa* is often responsible for infections associated with care because of its ability to colonize the surfaces of medical devices, which in our case study are catheters.

The objective of our thesis is to summarize the results of the various studies carried out in Algeria to show the ability of *Pseudomonas aeruginosa* strains to produce biofilm using different in vitro methods.

This opportunistic bacteria, shows a capacity for resistance to most antibiotics and is cabal of infecting a broad host range, its pathogenicity based on a complex arsenal consisting of soluble factors and cell attributes.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, catheters, urinary catheter.



# *Introduction*



*Pseudomonas aeruginosa* occupe une place majeure et considérable dans les établissements de santé (Alyajouri, 2012). Elle est responsable d'infections nosocomiales graves, d'infections potentiellement mortelles chez les personnes immunodéprimées et d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011). La fréquence des infections à bacille pyocyanique s'accroît toujours et régulièrement en milieu hospitalier (Diarra, 2009).

*P. aeruginosa*, comme d'autres bactéries à Gram négatif, produit des agrégats structurés ou biofilms maintenus par une matrice protectrice (khalilzadeh, 2009). Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'Homme. En effet, 65 % des infections bactériennes sont dues à des biofilms et plus de 80 % des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Chalvet, 2009).

Le biofilm est important dans la pathogénie de *P. aeruginosa* car il lui permet de persister sur les dispositifs médicaux implantables et de constituer un réservoir, notamment dans les hôpitaux et de résister aux antibiotiques et aux désinfectants. Il est directement impliqué dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*, dans la mucoviscidose et les infections sur matériels médicales (Méar, 2014).

Un certain nombre de méthodes sont disponibles pour détecter la production de biofilm *in vitro* parmi lesquels la méthode de la détection par plaque de culture de tissus (TCP) et la méthode de culture sur milieu au rouge congo (RCA) (Djelloul Daouadji, 2010).

Le présent travail a pour l'objectif de réaliser une synthèse des résultats des différentes études réalisées en Algérie pour détecter la formation de biofilms *in vitro* chez divers isolats cliniques de *P. aeruginosa*, l'une des bactéries les plus étudiées dans le contexte de biofilms, en appliquant différents méthodes couramment décrites dans de nombreux travaux sur les biofilms. Par ailleurs, l'étude des profils d'antibiorésistance des souches isolées a été effectuée en testant une gamme d'antibiotiques, les plus fréquemment prescrits lors des infections à *P. aeruginosa*.

**PREMIERE PARTIE**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## Chapitre I : les infections associées aux cathéters vasculaires.

### 1- Définition :

Le cathéter (vient du grec kathiēnaī, plonger) est un tube de longueur variable, de calibre millimétrique, flexible ou rigide, en métal, verre, gomme, caoutchouc ou matière plastique, destiné à être introduit dans un canal, un conduit, un vaisseau ou un organe creux pour l'explorer, injecter un liquide ou vider une cavité (**Garnier et al., 2004**).

Présence de micro-organismes à la surface interne et/ou externe du cathéter responsable d'une infection locale et/ou générale (**Bleichner et al., 1994**).

### 2- Les différents types cathéters vasculaires :

On distingue deux grandes catégories de cathéters (**Figure1**) :

- ❖ Les cathéters courts : qui se divisent en canules et en épicroâniennes. Ils sont utilisés pour réaliser la pose d'un abord veineux périphérique.
- ❖ Les cathéters longs : avec les cathéters standards, cathéters multi-lumières, cathéters à manchon, cathéters de Swan-Ganz, cathéters d'hémodialyse et cathéters à chambre implantable. Ils sont utilisés pour réaliser la pose d'un abord veineux central (**Rahandi, 2013**).



**Figure 1** : Différents types de cathéters vasculaires (**Frank et al., 2017**).

### 3- Physiopathologie :

#### 3-1-Les principales voies de contamination des cathéters :

Trois méthodes de contamination des cathéters ont été identifiées :

- Contamination de la face externe du cathéter :

Elle peut survenir au moment de la pose du cathéter. Toutefois, le plus souvent, on observe une colonisation sous-cutanée secondaire du cathéter. Dans les deux cas, la contamination se fait à partir de germes provenant du point d'entrée cutané du cathéter. Cette flore peut être la propre flore cutanée du patient ou une flore ayant colonisé son revêtement cutané (mains du personnel soignant).

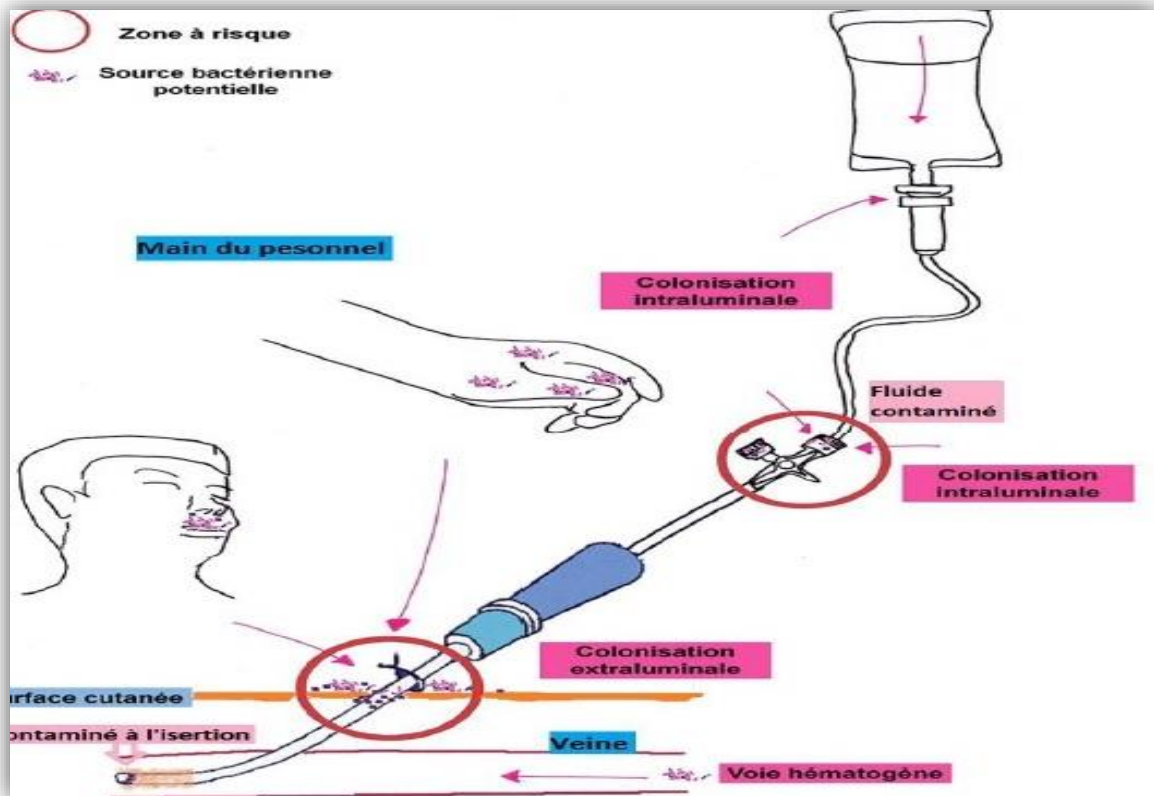
Cette voie de contamination dite extra-luminale serait la plus fréquemment rencontrée. **(Florence et al., 2010).**

- Contamination de la lumière interne du cathéter :

Elle survient lors des manipulations des raccords à l'occasion des divers branchements, ceux-ci étant colonisés soit par la flore cutanée du patient par contiguïté, soit par le personnel soignant. Cette voie de contamination dite endo-luminale serait surtout en cause avec les cathéters centraux de longue durée et, en particulier, ceux pour nutrition parentérale, chimiothérapie et hémodialyse **(Florence et al., 2010).**

- Colonisation de la portion intra-vasculaire du cathéter :

La contamination du cathéter se fait à distance du cathéter, à partir d'un foyer infectieux profond. Ce mode de contamination est le plus rare des trois **(Pourreau, 2008)**. La figure 02 Représente schématiquement l'ensemble des voies de contamination des cathéters.



**Figure 2 :** Cathéter vasculaire : principales voies d'acquisition des microorganismes (Espinasse *et al.*, 2010).

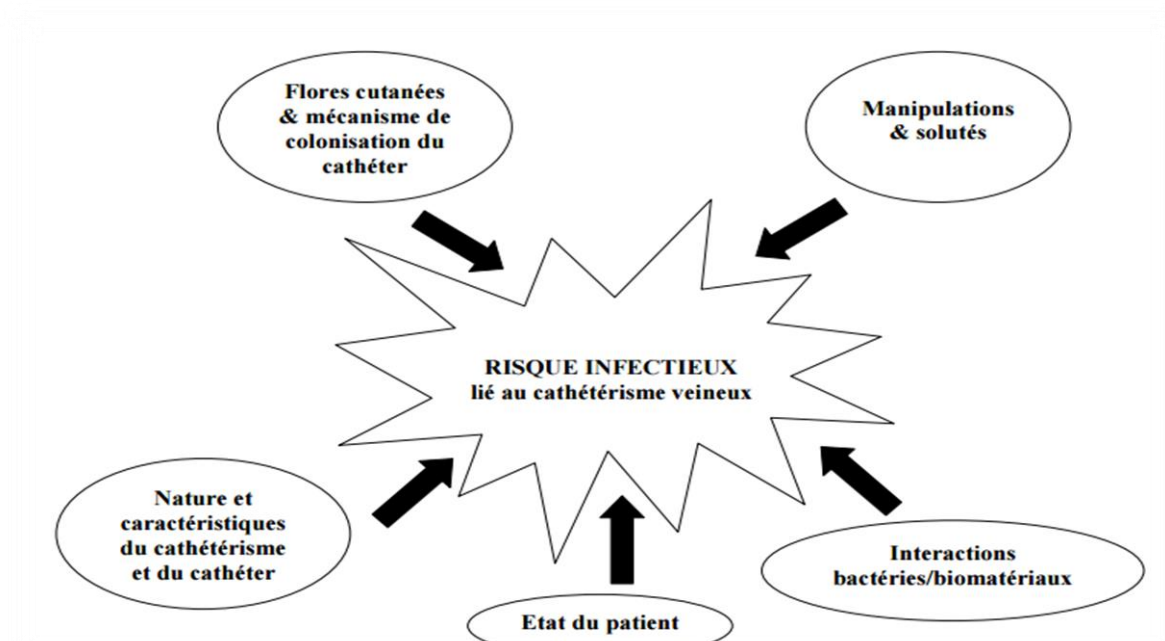
#### 4- Epidémiologie :

Quel que soit l'abord veineux considéré, périphérique ou central, le problème est préoccupant en pratique quotidienne de par sa prévalence et la morbidité qui lui est associée. Les infections sur cathéter représentent 18 à 25 % des infections nosocomiales (selon Dr Eric LOPARD, médecin-anesthésiste-conseil). Par ailleurs, 80 % des infections nosocomiales systémiques surviennent chez des patients cathétérisés. La mortalité dans ce contexte est en moyenne de 6 %, jusqu'à 20 % dans les services de réanimation. L'incidence d'infections par "journée cathéters" est supérieure pour les voies veineuses centrales (3,3 %) par rapport aux voies veineuses périphériques (1,3 %) (Lopard, 2018).

#### 5- Facteurs de risque des infections associées aux cathéters vasculaires :

La détermination des facteurs liés à la mise en place de cathéter tels que les conditions de placement et de l'expérience de l'opérateur, site d'insertion choisi, les matériaux de cathéter et

ceux liés à son utilisation : la durée cathéter, la fréquence et les conditions de traitement de la ligne intraveineuse (Maki et al., 2006 ; Safdar et al., 2002).



**Figure 3 :** Cinq principales composantes des risques infectieux liés aux cathéters (C.clin, 2001).

## 6- Prévention :

Les infections sur cathéters sont majoritairement d'origine exogène. C'est donc pour ce type d'infections associées aux soins, considérée comme « évitables », que l'efficacité des programmes de prévention est attendue tels que :

- Restreindre la pose d'un cathéter vasculaire aux indications pertinentes et en limiter la durée par une réévaluation fréquente.
- Former les professionnels qui insèrent et entretiennent ces cathéters vasculaires.
- Respecter les conditions d'asepsie recommandées pour la pose et pour la manipulation et particulièrement la désinfection des mains (Carrière et Marchandin, 2001 ; Florence et al., 2010 ; Lebeaux et al., 2014).

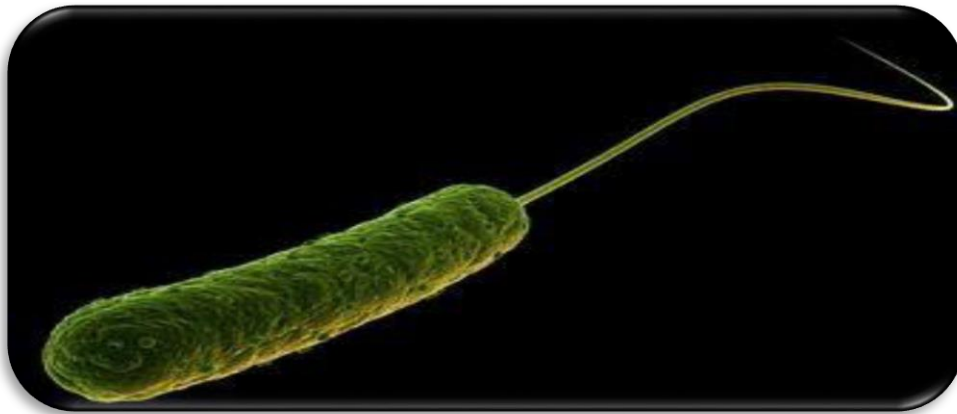
## Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa*.

### 1- Généralité :

*P. aeruginosa* a été découvert en 1882 par Carle Gessard, c'est une bactérie à Gram négatif de la famille des *Pseudomonadaceae*. Elle est aussi appelée bacille pyocyannique (Gessard,

1984). *P. aeruginosa* est responsable d'infections graves communautaires et surtout nosocomiales (**Figure 4**). Cette espèce, se distingue par sa grande adaptation aux différentes conditions environnementales, par sa capacité à acquérir des résistances aux antibiotiques (ATB) et par la diversité de ces facteurs de virulence (**Mérens et al., 2013**).

*P. aeruginosa* est donc considéré comme l'exemple type des bactéries pathogènes opportunistes et pratiquement inoffensives chez l'individu sain (**Stover et al., 2000**) (**Plesiat, 2008**).



**Figure 4** : *Pseudomonas aeruginosa* (**Aissa, 2012**).

## 2- Classification :

Le genre *Pseudomonas* regroupe plus de 140 espèces dont les principales sont :

*Pseudomonas aeruginosa* (espèce type), *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*,

*Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*....

La famille des *Pseudomonadaceae* appartient au vaste groupe des bacilles à Gram négatif non fermentants (**Denis, 2007**).

*P. aeruginosa* est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Sa taxonomie est présentée dans le tableau 1 :

**Tableau 1** : Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* (Chaker, 2012).

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

### 3- Caractères morphologiques :

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille Gram négatif en forme de bâtonnet, de 0.5 à 0.8 µm de diamètre sur 1 à 3µm de long. Mobile grâce à un flagelle polaire généralement unique, dépourvu de spores et de capsules. La paroi du bacille pyocyanique est ; caractéristique de celle des bactéries a gram négatif (Sadolff et Artenstein, 1974). Elle est constituée d'une membrane externe et d'un espace péri plasmique et du peptidoglycane. La membrane externe est une bicouche asymétrique constituée du lipopolysaccharide (LPS) et de phospholipides (PL) ou se trouvent de nombreuses protéines telles que les porines qui assurent la diffusion de divers types de molécules à travers la membrane externe (Pages, 2004).

### 4- Caractères cultureux :

C'est une bactérie hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique, par conséquent, elle peut être isolée en culture sur milieu ordinaire ou sur milieu rendus sélectifs par addition d'inhibiteurs tel que le cétrimide (Essoh, 2013).

Les cultures dégagent une odeur caractéristique de raisin ou seringa in vitro (Khalilzadeh, 2009 ; Essoh, 2013) et il existe trois types de colonies de *P. aeruginosa* :

- ✓ Les colonies larges : sont grandes, rugueuses convexes et lisses.
- ✓ Les colonies muqueuses : sont bombées, opaques visqueuses, filantes ou parfois coulantes. Elles possèdent une pseudo-capsule constituée d'alginate.

✓ Les colonies Sm (Small) : sont rondes petites, convexes et lisses (**Touati, 2013**).

La Figure 5 représente les différents aspects de colonies de *P. aeruginosa*.



**Figure 5** : Les différents aspects de colonies de *P. aeruginosa*.

<https://slideplayer.fr/slide/1297924/>

#### **5- Caractère biochimique et métabolique :**

*P. aeruginosa* présente un métabolisme oxydatif (non fermentant), réduit généralement les nitrates au-delà des nitrites (**Delarras, 2007**) et produit de l'ammoniac à partir de la dégradation de l'acétamide (**Pecastaings, 2010**).

Elle donne des réponses positives pour les tests : catalase, oxydase, ADH, citrate de Simmons, et la gélatinasse et des réponses négatives pour les tests suivants : LDC, ODC, indole,  $\beta$ -galactosidase (**Diarra, 2009 ; Touati, 2013**).

#### **6- Pouvoir pathogène :**

Les *Pseudomonas* se comportent comme des agents opportunistes chez l'homme, comme chez les animaux, l'espèce la plus importante est *P. aeruginosa* ou bacille pyocyanique découvert par (**Gessard, 1882**). Chez des individus immunodépressifs elle peut être la cause de diverses infections cutanées et viscérales voire même de septicémie. Elle comporte un risque particulièrement élevé d'infections nosocomiales (contractées par l'intermédiaire de soins en milieu hospitalier). Elle se retrouve en flore de transit sur la peau et les muqueuses et causes des surinfections de plaies ou brûlures. Les autres espèces sont peu agressives par eux-mêmes mais se comportent en générale comme germes opportunistes profitant de conditions anormales d'implantation chez les individus débilisés, créant des flores de substitution ou des infections grave par introduction accidentelle dans l'organisme (cathétérisme, sondage,...) (**Emmanuelle et El Amari, 2004**).

## Chapitre III : Formation de biofilm :

### 1-Définition :

Un biofilm est un ensemble de microorganismes, soit de la même espèce, soit d'espèce différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il constitue un ensemble de cellules isolées et de micro colonies de cellules filles, associés entre elles et/ou au surfaces (Alain Branger et *al.*, 2012).

Les biofilms sont des communautés microbiennes complexes capables de synthétiser et de sécréter une matrice protectrice en se liant fortement à un support (ex : un tissu) (Phillips et *al.*, 2010).

### 2-Etapes de formation des biofilms :

Les différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quel que soit l'environnement qu'ils colonisent (John et *al.*, 2006 ; Costerton et *al.*, 1987). La formation du biofilm est composée de cinq étapes (Steven et *al.*, 2000 ; John et *al.*, 2006 ; Characklis et *al.*, 1990 ; Lappin-Scott et Costerton, 1995) qui sont les suivantes (Figure 6) :

- L'adhérence réversible.
- L'adhérence irréversible.
- Le développement précoce du biofilm.
- La maturation du biofilm.
- Le détachement des bactéries.

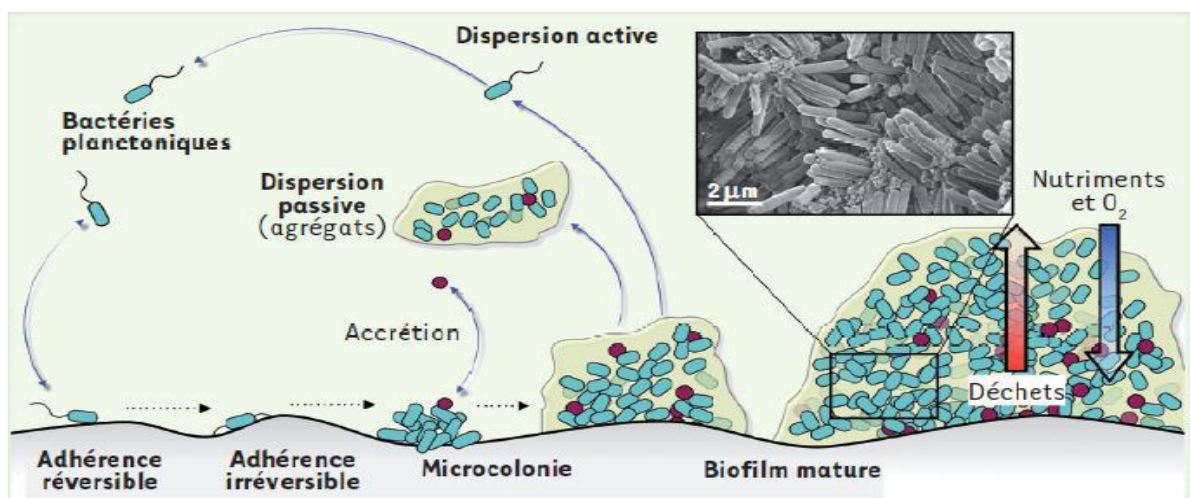
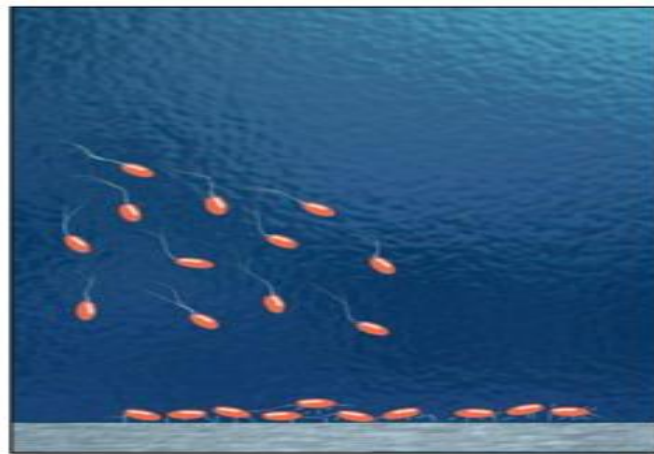


Figure 6 : Principales étapes de la formation des biofilms (Lebeaux et Ghigo, 2012).

### **2-1-L'adhérence réversible :**

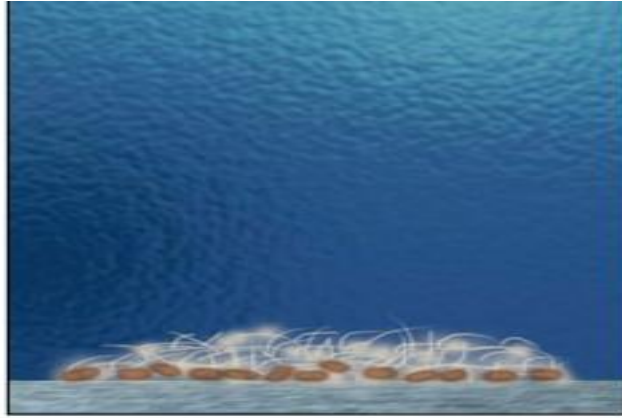
En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles). Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité du milieu, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique du fluide (**Beloin et al., 2008**). L'adhérence des bactéries est également influencée par la nature de la surface, notamment sa rugosité et son hydrophobicité (**Figure7**). Les bactéries adhèrent plus facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire (**Beloin et al., 2008**).



**Figure 7 : Attachement des cellules (Revellin, 2001).**

### **2-2- L'adhérence irréversible :**

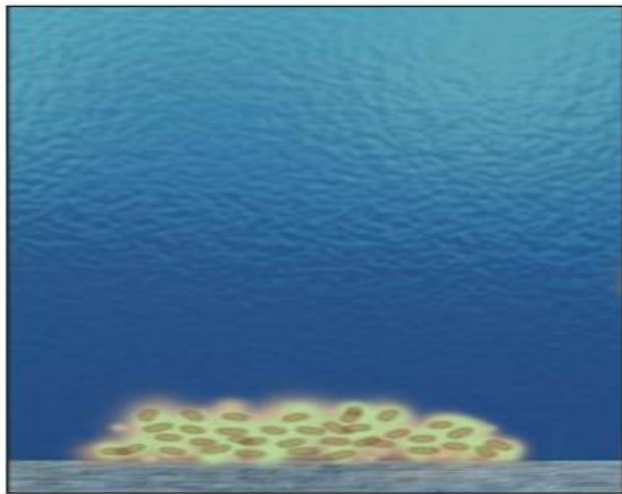
Dans un deuxième temps, l'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exo-polymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support (**Figure8**). Dans ce cas des interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe (**Bellifa, 2014 ; Branger et al., 2007**).



**Figure 8** : Expression des gènes pour la synthèse des polymères de la matrice (**Revellin, 2001**).

### 2-3-Le développement précoce du biofilm :

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides (**Figure 9**). Elles s'agrègent entre elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidique (**Jacolsen et al., 2008**).

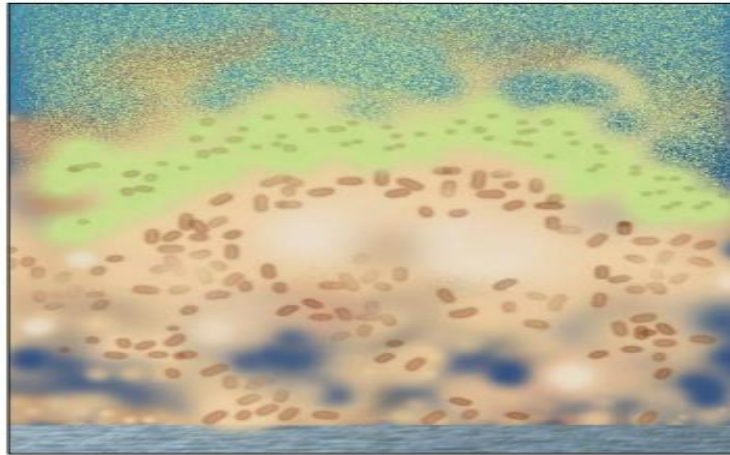


**Figure 9** : Coordination entre cellule grâce aux molécules de signalisation (**Revellin, 2001**).

### 2-4 -La maturation du biofilm :

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation des canaux aqueux et de pores entre les microcolonies, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Filloux et Vallet, 2003 ; Tenke et al., 2006**). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des tissus environnants de l'hôte et permet ainsi la libération de

nutriments (**Jacobsen et al., 2008**). Un biofilm est approximativement constitué de 85 % de matrice extracellulaire et de 15 % de micro-organismes (**Behlau et Gilmore, 2008**). La matrice extracellulaire est principalement constituée d'eau (97 %) et inclue également des polymères d'exopolysaccharides, des protéines, des acides nucléiques (**Figure 10**), des phospholipides, des nutriments et des métabolites (**Beloin et al., 2008**).



**Figure 10** : Protection contre les agents antimicrobiens (**Revellin, 2001**).

## **5-2 -Le détachement des bactéries :**

Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (**Sauer et al., 2002**).

La dispersion du biofilm se fait selon trois étapes (**Kaplan, 2010**) :

- Détachement des cellules de la colonie du biofilm.
- Translocation des cellules vers un nouvel emplacement.
- Fixation des cellules à un substrat dans le nouvel emplacement.

Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques du biofilm, comme l'antibiorésistance (**Chalvet, 2009**).

Les cellules de biofilm détachées peuvent être rattachées à d'autres parties de la surface de la sonde et ensemençer l'urine et la vessie avec des agents pathogènes qui peuvent entrer dans la circulation systémique et provoquer des infections sanguines (**Fisher, 2011**).

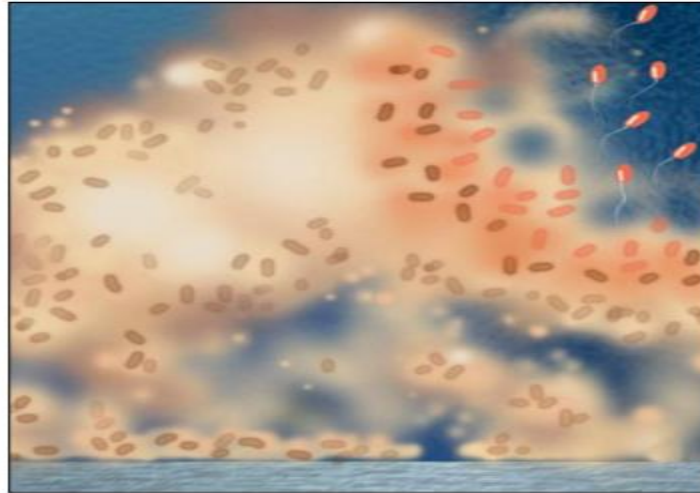


Figure 11 : Destruction du biofilm et relargage des cellules (Revellin, 2001).

### 3- Les facteurs influençant la formation du biofilm :

Il existe plusieurs facteurs influençant la formation de biofilm qui représente dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Facteurs influençant l'attachement de cellules et la formation d'un biofilm (Donlan, 2002).

Propriétés du substrat (support)	Propriétés du milieu aqueux environnant	Propriétés des cellules
-Texture et rugosité : plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante.	-Vitesse, présence d'un flux laminaire ou non.	-Hydrophobicité de la surface des cellules.
	-pH.	-Présence de fimbriae.
-Hydrophobicité.	-Température.	-Présence de flagelles.
	-Cations (Ca <sup>2+</sup> , Na <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> ...) [Fer], [nutriments].	-Rôle des structures Polymériques extracellulaires d'exopolysaccharides.
-Présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface : ceci influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilm.	-Sources de carbone et d'oxygène.	
	-Présence d'agents antimicrobiens	

#### 4- Régulation de la formation des biofilms : le quorum sensing.

##### 4-1- Définition et mécanismes :

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de quorum sensing. Le Quorum Sensing (QS) est un mécanisme régulateur très répandu parmi les bactéries à Gram négatif. Il contrôle la sécrétion de facteurs de pathogénicité, la formation de biofilm, le mécanisme de conjugaison et la bioluminescence (**Miller et Bassler, 2001**).

Il s'agit de mécanismes de contrôle des processus ayant lieu au sein des cellules, matérialisés par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception du quota. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (**Costerton et al., 1999**). Une fois que les signaux atteignent une valeur seuil (valeur critique), des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (**Costerton, 1999**). La nature et la fonction des molécules signalant les échanges de cellule-à-cellule changent à partir d'une concentration donnée des bactéries (**Costerton, 1999**).

##### 5-L'intervention des biofilm dans le domaine médical:

Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'homme. En effet, 65 % des infections sont dues à des biofilms. Plus de 80 % des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (**Chalvet, 2009**).

La formation des communautés sessiles et leurs résistances inhérentes aux agents antimicrobiens sont la base de plusieurs infections bactériennes persistantes et chroniques. Ces infections peuvent être causées par une seule espèce ou d'espèces mixtes de bactéries ou de moisissures (**Costerton et al., 1999**).

##### 5-1 -Les biofilms sur les dispositifs médicaux :

Des biofilms peuvent se former à la surface ou à l'intérieur de dispositifs médicaux implantés :

- ❖ Lentilles de contact.
- ❖ Cathéter veineux central(**Figure12**).
- ❖ Pace-makers.
- ❖ Cathéters de dialyse péritonéale.
- ❖ Sondes urinaires.

82% des infections nosocomiales sont dues à la présence d'implants médicaux contaminés (Archibald et Gaynes, 1997).

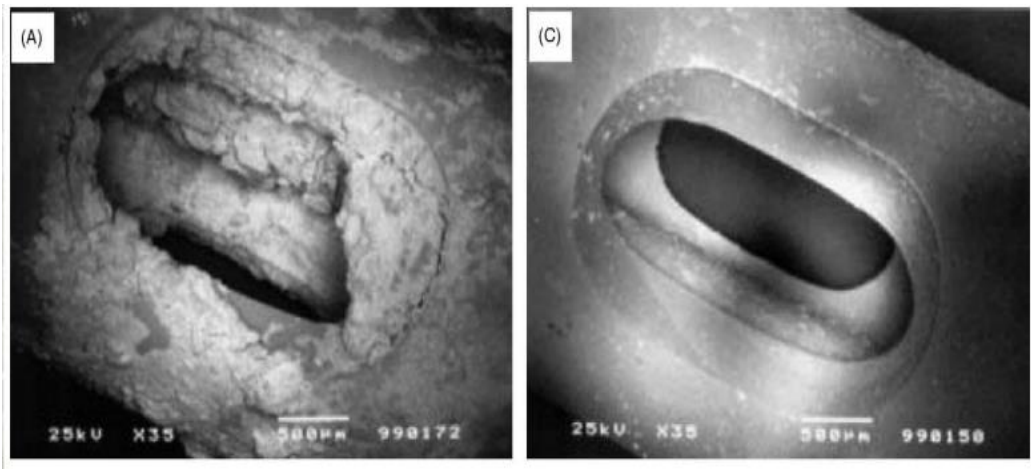


Figure 12 : Formation du biofilm sur un cathéter (Jonesa et al., 2005).

#### 6-Formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* :

Les biofilms formés par *P. aeruginosa* sont caractérisés par un complexe bactérien, très structuré. Ils sont initiés par l'attachement d'une cellule planctonique unique sur une surface (Vallet et al., 2001).

La capacité de *P. aeruginosa* à former un biofilm lui confère plusieurs caractéristiques importantes, dont une augmentation importante de la résistance aux antibiotiques (Brooun et al., 2000), ainsi que aux mécanismes de défense de l'hôte et par conséquent sont difficiles à éradiquer. Les biofilms contribuent vers la pathogénicité de *P. aeruginosa* et conduisent souvent à des infections persistantes et récurrentes. La croissance de *P. aeruginosa* commence sous la forme de microcolonies, qui fusionnent ensuite pour former des biofilms (Mittal et al., 2009).

### Chapitre 4 : Les Antibiotiques :

#### 1- Définition :

Les antibiotiques sont des substances élaborées par des micro-organismes, ou des substances synthétiques, qui sont bactériostatiques ou bactéricides à dose faible. Leurs cibles d'activité sont des structures moléculaires spécifiquement bactériennes (Avril et Fauchere, 2002).

**2- Classification des antibiotiques :**

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

- **Origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique).
- **Mode d'action** : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques.
- **Spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large).
- **Nature chimique** : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse.

La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles ( $\beta$ - lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.) (**Auckenthaler, 1995**).

**Tableau 3** : Principales familles d'antibiotiques (**Mendeci et Mihoubi, 2015**) :

/	familles	Sous -familles	Molécule(s)
Inhibiteurs de la synthèse des enveloppes bactériennes	Bêta-lactamines	Pénicillines	Pénicilline G
			Oxacilline et cloxacilline (groupe M)
			Ampicilline et Amoxilline (groupe A)
		Céphalosporines	Céfaloine, Céfalexine (1 <sup>ère</sup> génération)
			Céfalonium (2 <sup>ème</sup> génération)
			Céfopirazone, Cefteofur (3 <sup>ème</sup> génération)
			Cequinome (4 <sup>ème</sup> génération)

	Polypeptides	/	Colistine Bacitracine
Inhibiteurs de la synthèse des protéines	Aminoside	/	Streptomycine, Kanamycine, Apramycine, Gentamicine, Spectinomycine
	Macrolides	/	Erythromycine, Spiramycine, Tylosine, Tilomicosine
Inhibiteurs de la synthèse des protéines	Apparentés aux macrolides	Linecosamides	Linecomycine, Clindamycine
	Tétracyclines	/	Chlortétracycline, Oxytétracycline, Doxycycline
	Phénicol	/	Florfénico, Chloramphenicol Thiamphenicol
Inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique	Sulfamides	/	Sulfaguanidine, Sulfadiméthoxine...sulfadimidine
Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques	Quinolones	/	Acides nalidixique et Oxolinique (1 <sup>ère</sup> génération)
			Fluméquine (2 <sup>ème</sup> génération)
			Enro-, Dano-, Marbo-, difloxacin (3 <sup>ème</sup> génération)

### 3-Mode d'action :

Dans les cellules bactériennes plusieurs types de cibles se sont montrées particulièrement vulnérables à l'action des antibiotiques (la paroi, la membrane plasmique, l'ARN ribosomal...etc) (Nauciel et al, 2005 ; Karp, 2010).

Cependant, chaque famille possède son propre site d'action (**Figure 13**) :

- Action sur la paroi bactérienne.
- Action sur la structure de la membrane.

- Action sur la synthèse protéique.
- Action sur la synthèse de l'ADN (Abdelouahabi et Djeddaoui, 2019).

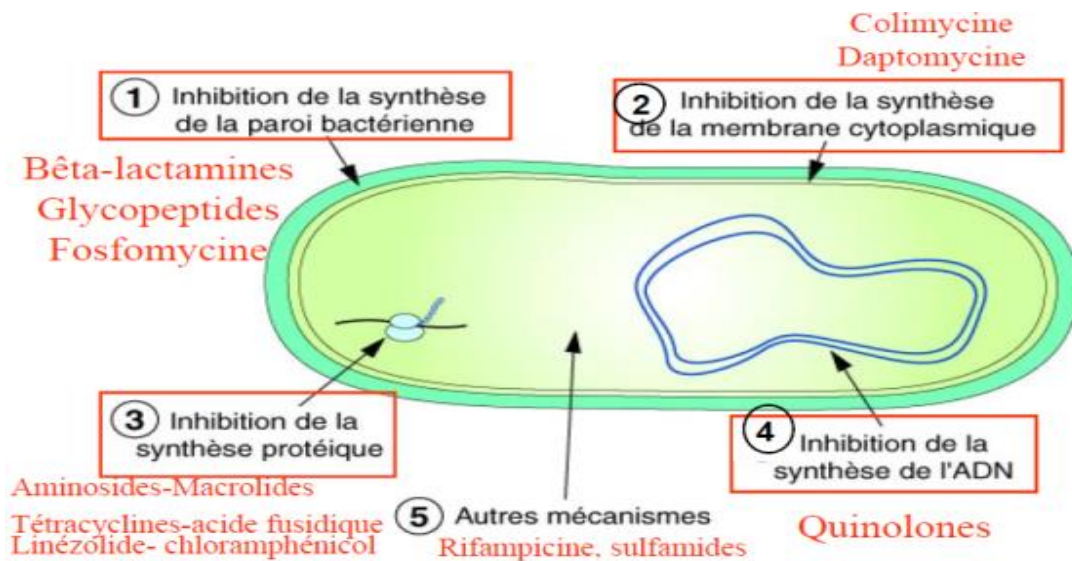


Figure 13 : Cible des principaux antibiotiques (Mainardi, 2015).

#### 4-Mécanisme de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques:

*P. aeruginosa* multi résistant aux antibiotiques possède deux types de résistances (Faure et al., 2009).

##### 4-1-La résistance naturelle :

*P. aeruginosa* présente un niveau très élevé de résistance naturelle aux nombreux ATB comme : pénicilline du groupe A (ampicilline et dérivés), céphalosporines de première et deuxième génération, chloramphénicol et triméthoprime (Diarra, 2009) par différents mécanismes :

- Médiocre perméabilité de la membrane externe.
- Production d'une  $\beta$ -lactamase à large spectre.
- Systèmes d'efflux (Cattoen, 2009 ; Elyajouri, 2012 ; Dubois, 2013).

##### 4-2-La résistance acquise :

Elle est très fréquente et résultante de l'accumulation de mécanismes de résistances liées à des mutations chromosomique et à l'acquisition des gènes transférables. Ces mécanismes sont :

- **L'imperméabilité accrue de la membrane externe** (sélective ou non sélective par modification des porines) : est due à une mutation qui affecte la structure ou diminue la synthèse des porines par laquelle l'ATB peut pénétrer dans la bactérie (**El abdani, 2016**).
- **L'hydrolyse enzymatique** : ce produit par production des enzymes capables d'hydrolyser ou d'inactiver des ATBs (**Saadaoui, 2008**).
- **La surexpression de l'efflux actif** : Mécanisme d'efflux réside sur l'excrétion de l'ATB par des pompes à protons, il s'agit d'un mode de résistance intrinsèque des bactéries. Il résulte de la surexpression des transporteurs par mutation qui est due à l'exposition aux ATBs (**EL Brahmi, 2013**).
- **La modification de cible** : Modification de la cible engendre des modifications quantitatives ou qualitatives de la cible de l'ATB (**El Bouamri, 2017**). Il en résulte une baisse de l'affinité de l'ATB pour son site d'action (**Konare, 2018 ; Cattoen, 2009 ; Elyajouri, 2012 ; Dubois, 2013**).

**DEUXIEME PARTIE**  
**MATERIEL ET METHODES**

---

Le thème de notre étude c'est « évaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* isolées de différents cathéters », ce qui nécessite a réalisé la pratique au niveau de laboratoire de microbiologie –Centre Universitaire Naâma, et ainsi de réaliser des prélèvements à partir des cathéters de différentes patients hospitalisés, aux différents services de l'hôpital de Naâma.

Mais à cause de dissémination de covid-19 qui balaie le monde et l'accès interdit à l'hôpital pour réaliser les prélèvements à tester pour lancer la pratique, pour cela nous avons décidé de faire une synthèse des résultats des différentes études réalisées en Algérie, qui ont travaillé dans le même thème.

Les quatre études choisies dans notre mémoire sont comme suivant :

- ✚ *Pseudomonas aeruginosa* : Facteurs de virulence et évaluation de la résistance aux bêta-lactamines et aux quinolones. Présenté par : Meradji Samah, 2017.
- ✚ Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen. Présenté par : Chibi Amina, 2015.
- ✚ Formation de biofilm in vitro par des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de sondes urinaires. Présenté par : Madouri Manel, 2017.
- ✚ Recherche de biofilms mixtes sur implants médicaux. Présenté par : Derardja Asma Messaadia Soulaf, 2018.

### **1-Prélèvements :**

Les prélèvements « cathéters, sondes urinaires » sont effectués à partir des patients hospitalisés aux différents services : les blocs opératoires, service de réanimation, les services de pneumologie, d'infectiologie, d'hématologie et le service d'ORL, et au sein du laboratoire de Bactériologie, service de chirurgie d'Établissement Hospitalier Spécialisé mère-enfant (EHS) et service des urgences. Dans différentes périodes.

### **2-Ensemencements :**

Ensemencements des différents prélèvements sont réalisés sur des différents milieux sélectifs :

- Le milieu Mac Conkey : permet d'isoler les bactéries à Gram négatif, grâce à l'action des deux inhibiteurs le cristal violet et les sels biliaires (**Biokar, 2009**).

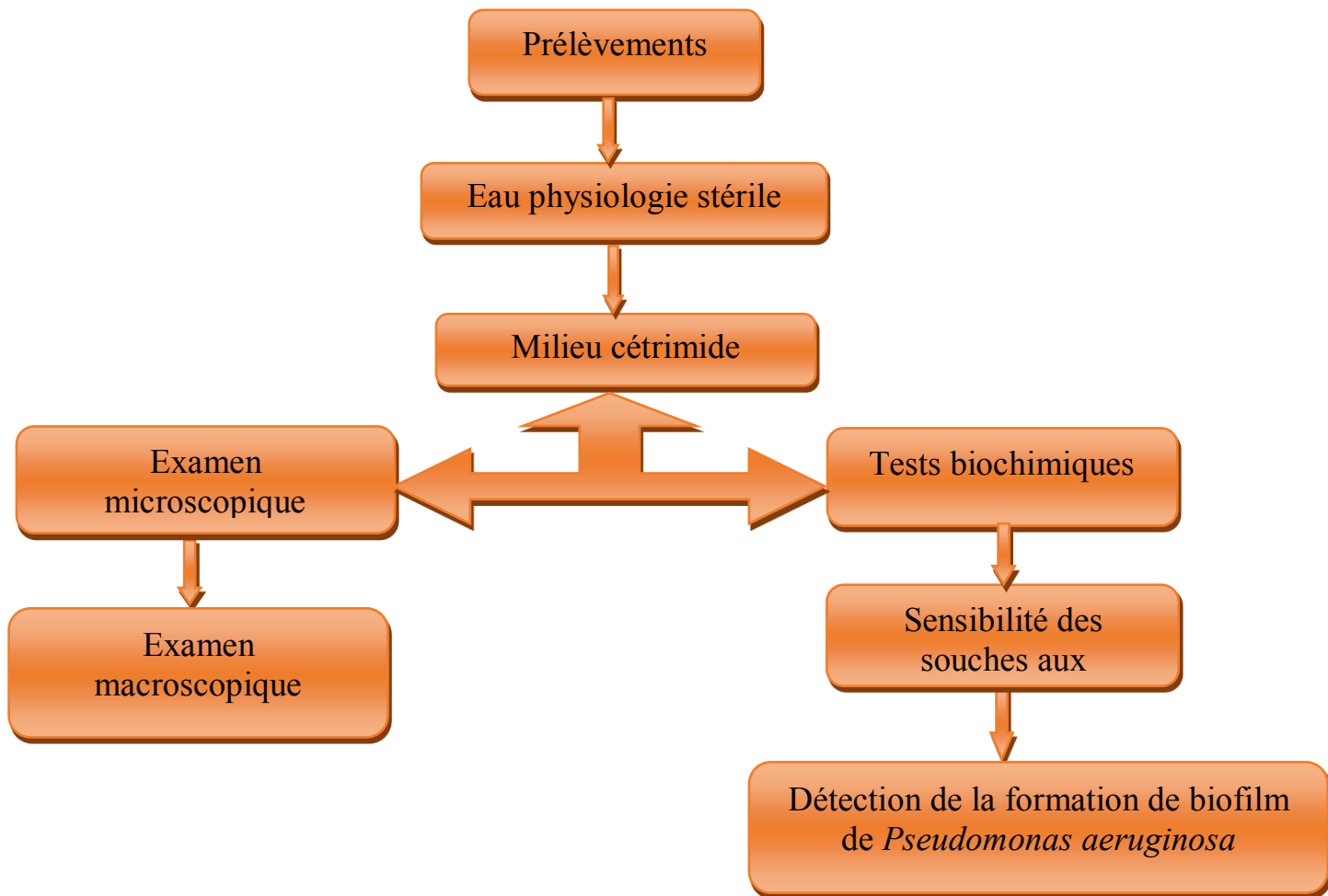
- Le milieu gélose au sang cuit (au chocolat), le milieu Bouillon cœur cerveau (BHIB) et le milieu gélose nutritive. Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 18-24 heures.

### **3-Isolement et purification :**

Après incubation des deux milieux sélectifs ensemencés, il a été procédé à la purification des colonies bactériennes par réisolement sur les mêmes milieux sélectifs afin d'obtenir des souches pures pour entamer l'identification. Les colonies sont repérées selon leurs aspects et leurs morphologies.

### **4-Identification de *Pseudomonas aeruginosa* :**

La figure 14 présente les étapes d'identification de *Pseudomonas aeruginosa* :



**Figure 14 :** Différents étapes d'identification des bactéries.

#### **4-1-Examen macroscopique des cultures :**

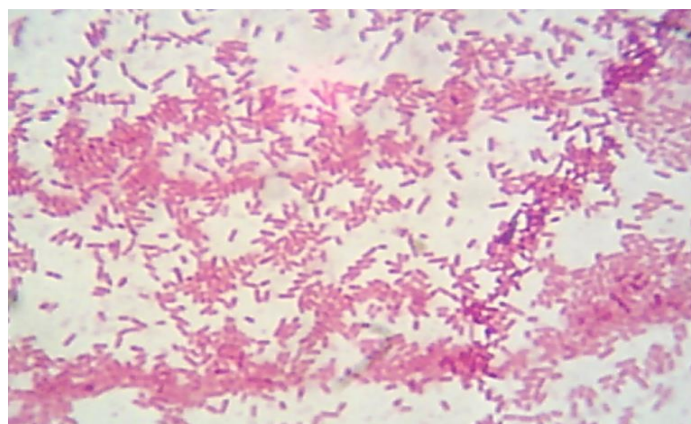
L'observation macroscopique a été réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C.

Elle permet d'observer la taille, la forme, la couleur, l'aspect et la pigmentation des colonies.

#### **4-2- Examen microscopique :**

##### **4-2-1- Coloration de Gram :**

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi en : Bactéries à Gram négatif (**Figure 15**) et à Gram positif (**Dennis, 2007**).



**Figure 15 :** Les bacilles Gram négatif de *Pseudomonas aeruginosa* à objectif 100X  
(Darghout et Metheni, 2016).

#### 4-2-3- Les tests biochimiques :

##### 4-2-3-1- La recherche de l'oxydase :

Ce test est employé couramment pour l'identification des bacilles à Gram négatif. A l'aide d'une pipette pasteur boutonné, une partie de la culture est étalée sur un disque oxydase (**Figure 16**). La réaction est considérée comme étant positive après apparition d'une couleur violette. Les cultures de *P. aeruginosa* présentent une réaction d'oxydase positive.

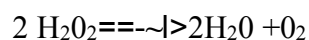
Tache violette



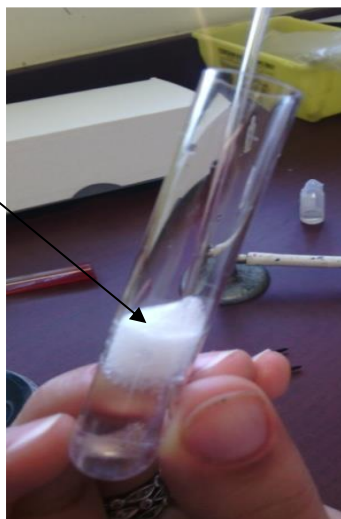
**Figure 16 :** la recherche l'oxydase chez *Pseudomonas aeruginosa* (Darghout et Metheni, 2016).

##### 4-2-3-2-La recherche de catalase :

La catalase est une enzyme qui à la propriété de décomposer l'eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) avec dégagements d'oxygène (**Figure 17**). Sur une lame stérile, on dissocie une anse de culture dans une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. La réaction positive se traduit par l'effervescence.



Bulles d'air



**Figure 17** : la recherche de catalase (Darghout et Metheni, 2016).

### 4-2-3-3 - La galerie API 20 NE :

#### ➤ Principe :

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation. On inocule chaque tube avec la suspension bactérienne à identifier, Certains des puits auront des changements de couleur résultants des différences de pH qui se traduisent par des virages colorés ; d'autres produisent des sous-produits qui doivent être identifiés avec des réactifs. Un numéro de profil est déterminé d'après la série de tests (+ et -), qui permet d'identifier l'espèce.

#### ➤ Technique :

- Préparation de l'inoculum : Faire une suspension bactérienne, une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé met dans une ampoule d'API NaCl 0.85% Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.

#### - L'inoculation de la Galerie API 20 NE :

- Remplir uniquement les tubes des tests NO<sub>3</sub> avec la suspension bactérienne.

- Créer une anaérobiose dans les tests : GLU, ADH, URE en remplissant leur cupule avec l'huile de paraffine.
- Remplir les tubes et les cupules des tests : GLU à PAC avec la suspension bactérienne.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 48 heures.

### ➤ **Lecture :**

Les Réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés, sauf certaines sont révélées par l'addition de Réactifs :

- Test NO<sub>3</sub> : NIT I + NIT II.
- Test TRP : Réactif de Kovacs.

Noter les résultats et comparer les réactions avec le tableau de différenciation (Annexe N°1).



**Figure 18 : Galerie API 20 NE (Bouab et Taibi, 2020).**

### **5- Conservation des souches :**

Toutes les souches identifiées sont conservées en double réplique sur une gélose nutritive inclinée +4°C.

### **6- Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques :**

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques à concentrations connues.

#### **-Principe :**

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard imprégnés d'antibiotiques à tester sont

déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface d'un milieu Muller-Hinton, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier.

### **-Technique :**

#### **-Réalisation d'une suspension :**

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on prélève une colonie bien isolée d'une culture de 18h à 24h, puis décharger la pipette dans un tube qui contient de l'eau physiologique. La concentration de la suspension doit être équivalente à 0.5 McFarland.

#### **-Ensemencement :**

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum. Il est réalisé par le trempage d'un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ensuite on l'essor en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum. Enfin, l'ensemencement est réalisé par le frottement de l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de la boîte de Pétri.

Cette opération se répète deux fois en tournant la boîte 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Ils finissent l'ensemencement en passant l'écouvillon sur le périphérique de la gélose.

#### **-L'application des disques :**

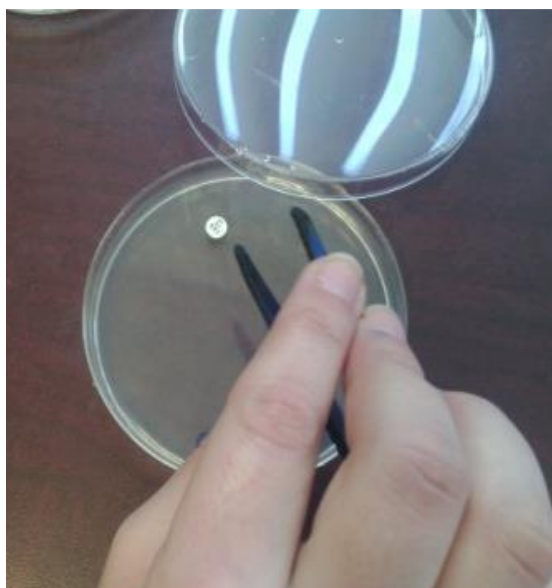
Les disques choisis sont posés à l'aide d'une pince stérile. Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance doit séparer un disque périphérique au bord de la boîte et deux disques doivent être éloignés pour que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas (**Figure 19**).

#### **-Incubation et lecture :**

Après l'incubation à 37°C pendant 24h, la lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une règle, puis de comparer aux valeurs critiques.

La mesure de ces diamètres permet de classer la bactérie en 3 catégories :

sensible (S), intermédiaire (I), résistant (R).



**Figure 19** : Emplacement des disques d'antibiotiques (Darghout et Metheni, 2016).

### **7-Détection de la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* :**

Afin de mettre en évidence la capacité de formation d'un biofilm, chez les isolats de *P. aeruginosa*, les méthodes sont choisies à savoir ; la méthode de culture sur gélose au Rouge Congo (RCA), méthode de plaque de culture de tissus (TCP), et méthode en tube (TM).

#### **7-1-La méthode de plaque de culture de tissus (TCP) :**

##### **Technique :**

Le test TCP décrit par O'Toole et al., (2000) permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm (Figure 20).

A partir d'une culture de 18 heures dans le milieu BHIB, les puits d'une microplaque de 96 puits (polystyrène) sont inoculés avec 150  $\mu$ L de la suspension bactérienne ajustée à une DO de 0,1. Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Les puits sont lavés trois fois avec l'eau distillée stérile afin d'éliminer les bactéries libres (planctoniques). Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet (0,1%) pendant 15 min. L'excès du colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques sont laissées pour le séchage afin d'évaluer l'importance de la coloration du biofilm (Stepanovic et al., 2000).

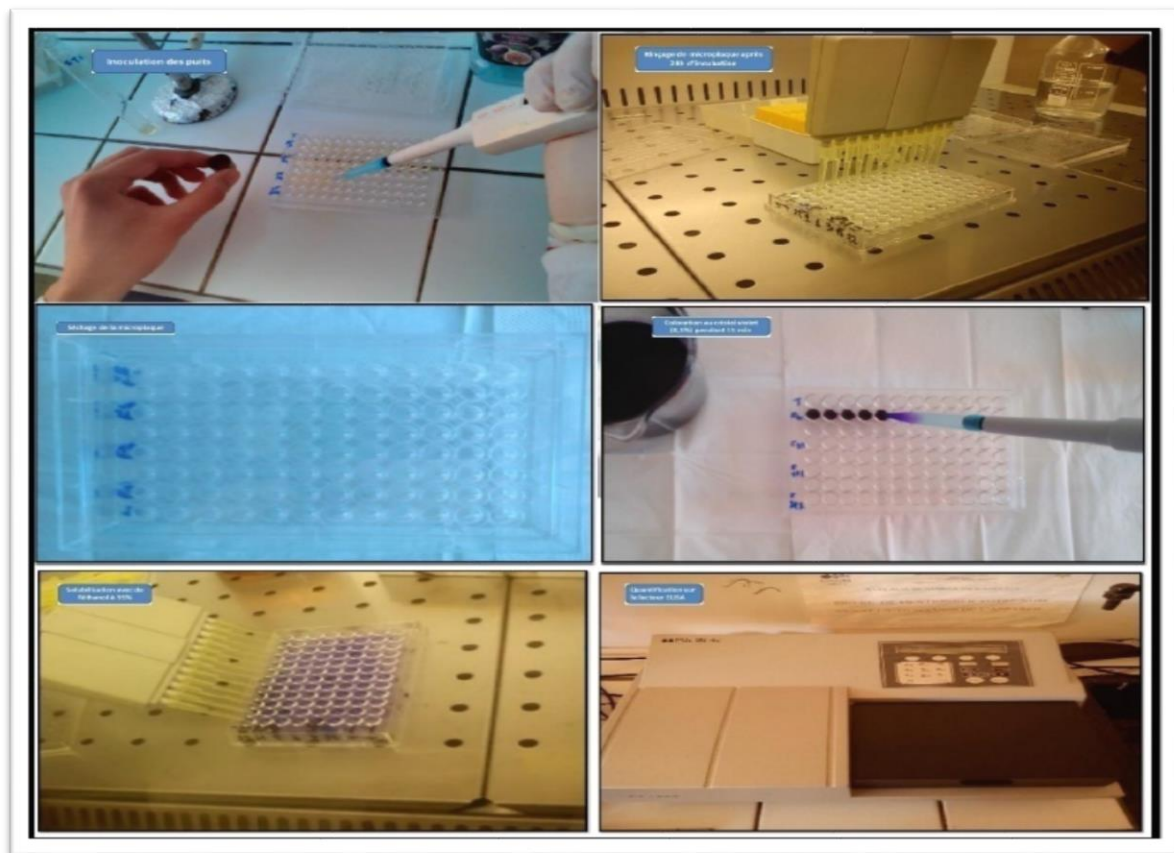
**-Lecture :**

La classification des résultats obtenus présente sur la base du DO témoin. Les souches ont été classées comme suit :

$DO \leq DO_t(\text{Témoin})$  : non formatrice du biofilm,

$DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$  : Modérée,

$DO_t \times 4 \leq DO$  : Fortement formatrice du biofilm (**Christensen et al., 1985**).



**Figure 20** : Les étapes de formation du biofilm par la technique TCP (**Bouhadjar et Terbeche, 2017**).

**7-2-La méthode en tube (TM) :**

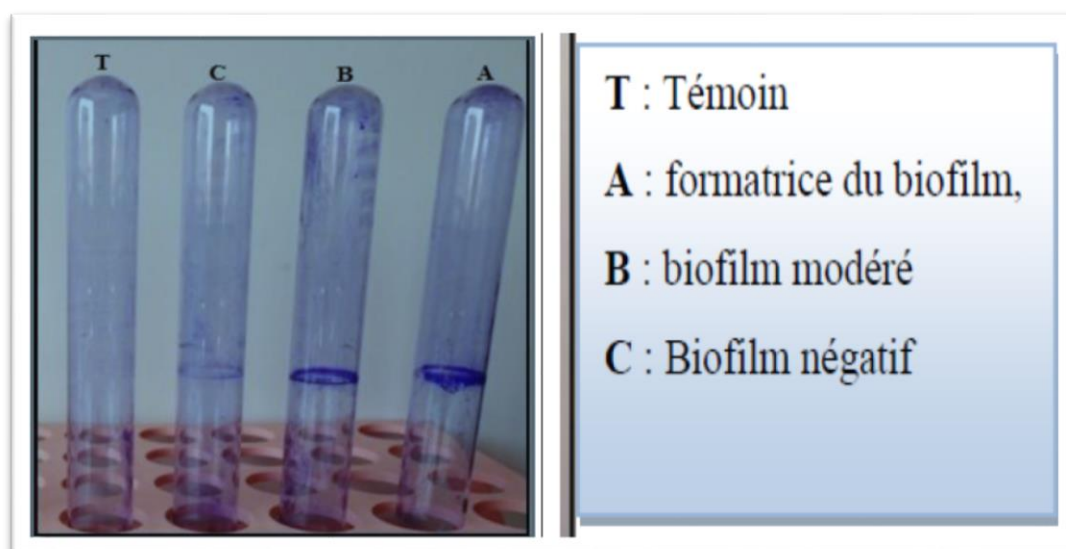
**Technique :**

**Christensen et al., (1982)** décrit une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm (**Nagaveni et al., 2010 ; Rewatkar et Wadher, 2013; Kara Terki, 2014**).

A partir d'une culture de 18-24 heures, une colonie est ensemencée dans de BHIB supplémenté de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24 h. Les tubes sont lavés avec du PBS puis séchés. Chaque tube est ensuite coloré par le CV (**Figure 21**).

### Lecture :

La formation du biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvre le muret le bas du tube (**Mathur et al., 2006 ; Alnnasouri, 2010 ; Djelloul Daouadji, 2010 ; Taj, 2012 ; Bellifa, 2014**).



**Figure 21** : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM (**Bellifa, 2014**).

### 7-3-La méthode de Rouge Congo agar (RCA) :

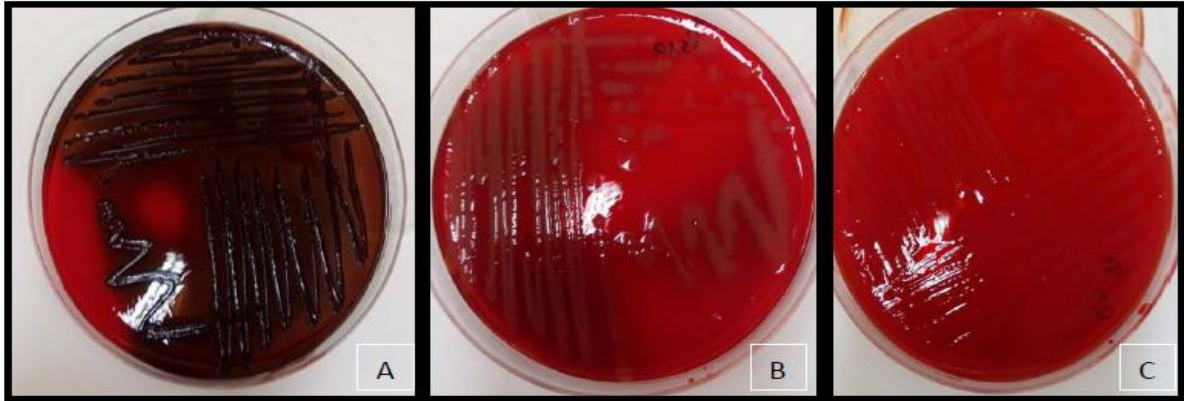
#### -Technique :

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

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

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

-**Lecture** : Les souches de *P. aeruginosa* productrices de slime donnent des colonies noires (résultat positif), contrairement aux souches non productrices qui donnent des colonies rouges (résultat négatif) (**Figure 22**).



**Figure 22** : Culture sur la gélose Rouge Congo (Hou et al., 2012).

**TROISIEME PARTIE**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**



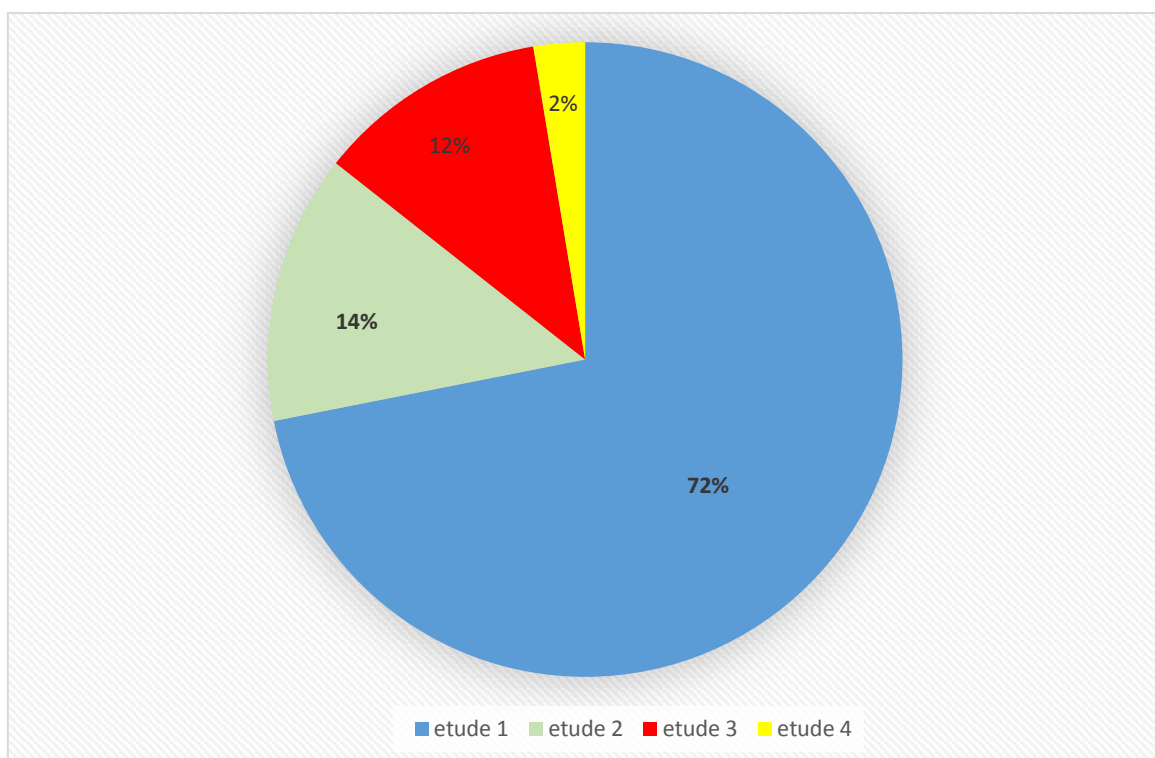
# *Résultats*



**1-Prélèvements :**

Cent dix (110) souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées à partir de 460 prélèvements réalisés au niveau de trois centres hospitalo-universitaires (CHU) de la ville d'Annaba, dont 74 souches ont été isolées au niveau du CHU d'Ibn Sina, 21 souches au niveau du CHU de Dorban et 14 souches au niveau du CHU d'Ibn Rochd **Meradji (2017)**, Et pour l'autre l'étude qui réaliser par **Chibi (2015)** à partir de cultures positives a trouvé 21 souches *Pseudomonas aeruginosa*. Mais dans la recherche de **Madouri (2017)** les 12 sondes urinaires et après des repiquages successifs réalisés à partir des amas cellulaires obtenus sur boites de pétri, elle a pu isoler 18 souches bactériennes de différents genres et espèces, dont 4 appartenant au genre *Pseudomonas* représentant 22%. Puis la dernière étude de **Derardja (2018)** montre que les souches bactériennes isolées à partir des sondes urinaires et les cathéters veineux de l'espace *Pseudomonas* avec un grand pourcentage.

La répartition des souches de *P.aeruginos a* isolées par différents services est donnée dans la figure 23.



**Figure 23** : Répartition des souches selon différents études (**Meradji, (2017)** ; **Chibi, (2015)** ; **Madouri (2017)** ; **Derardja, (2018)**).

**2-Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques :**

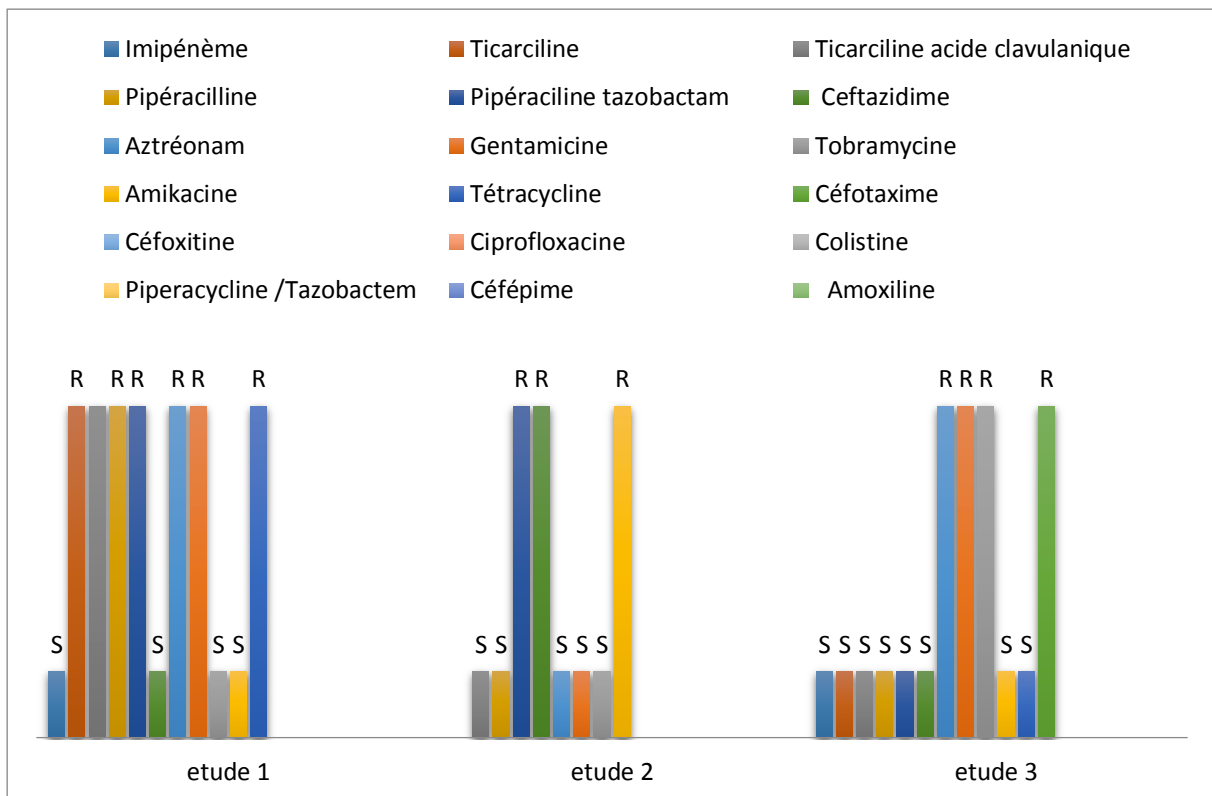
Selon résultats de **Meradji (2017)**, les 80 souches de *P. aeruginosa* isolées ont montré différents niveaux de résistance vis-à-vis des antibiotiques, mis à part la colistine, à laquelle tous les isolats étaient sensibles (**Figure 24**). Des taux de résistance de 18.75% à l'Imipénème, 61.25% à la Ticarcilline, 56.25% à la Ticarcilline + acide clavulanique, 36.25% à la Pipéracilline, 36,7% à la Pipéracilline + tazobactam, 56.25% à la Ceftazidime et 41.25% à l'Aztréonam sont observés. Les taux de résistance aux aminosides sont respectivement : Gentamicine (21.75%), Tobramycine (30.4%) et Amikacine (7,6%). Pour les fluoroquinolones, un taux de résistance important a été observé pour la Ciprofloxacine (43.75%). Presque le même résultat a été trouvé dans l'étude de **Madouri (2017)** qui a trouvé les souches *P. aeruginosa* résistantes aux 4 antibiotiques de la famille  $\beta$ -lactamines (Ceftazidime, Pipéracilline et Tazobactam, Ticarcilline, Aztréonam). Les 4 souches se sont avérées résistantes à la gamme d'antibiotiques testés. Ainsi, dans les derniers résultats de **Derardja (2018)**, il trouve que la détection des phénotypes de résistance a été réalisée en pratiquant la méthode conventionnelle de diffusion des disques en gélose MH et les critères de lecture et d'interprétation. Le profil de résistance déterminé révèle que la souche ; *P. aeruginosa* (PA) présente comportements différents vis-à-vis des divers ATB testés. Effectivement, *P. aeruginosa* apparaît sensible à l'ensemble des ATB testés à l'exception d'AML, TE, FOX et CTX ou elle montre une résistance face à ces quatre ATB.



**Figure 24 :** Antibiogramme des souches de *P. aeruginosa* multirésistantes (**Meradji, 2017**).

Tableau 4 : Représente les résultats de la sensibilité aux ATB des souches : *P. aeruginosa*.

Antibiotiques	Etude 01			Etude 02			Etude 03		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
/									
Imipénème				/	/	/			
Ticarcilline									
Ticarcilline+acide clavulanique				/	/	/	/	/	/
Pipéracilline				/	/	/			
Ceftazidime									
Aztréonam				/	/	/			
Gentamicine				/	/	/	/	/	/
Tobramycine				/	/	/	/	/	/
Amikacine				/	/	/			
Ciprofloxacine				/	/	/			
Céfépime				/	/	/			
Amoxiline	/	/	/	/	/	/			
Tétracycline	/	/	/	/	/	/			
Céfotaxime	/	/	/	/	/	/			
Céfoxitine	/	/	/	/	/	/			
Aztéonam	/	/	/				/	/	/

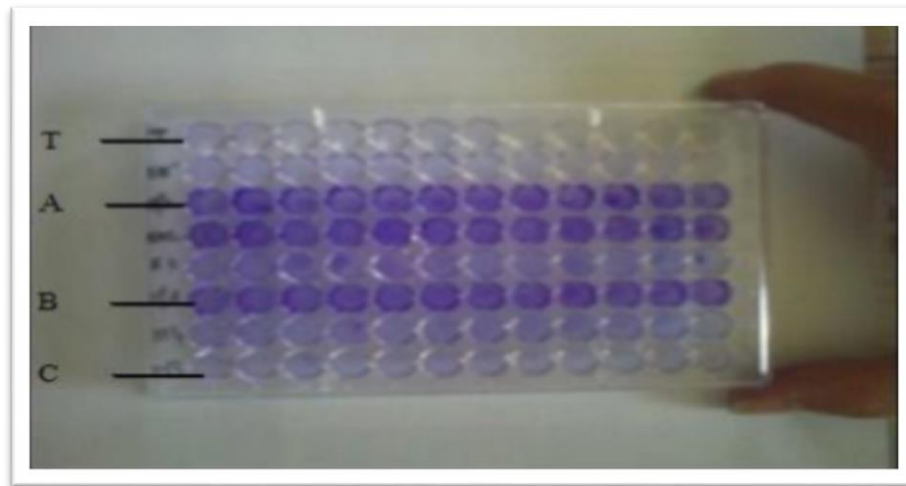


**Figure 25 :** Répartition de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *P. aeruginosa* (Meradji, (2017) ; Madouri (2017) ; Derardja, (2018)).

### 3-Formation de Biofilm :

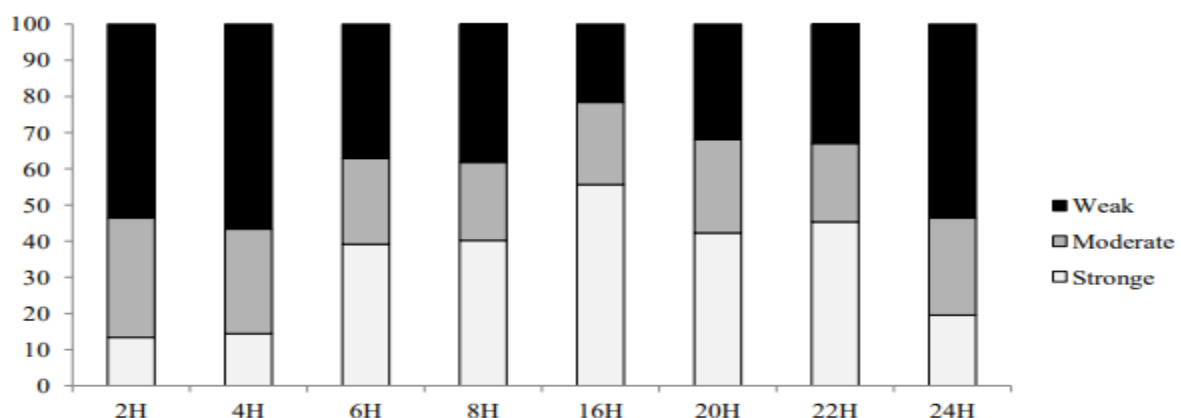
Les biofilms médicales sont associés à des problèmes majeurs de santé publique et sont impliqués dans un large éventail de maladies infectieuses qui touchent majoritairement les personnes immunodéprimés ou porteurs de dispositifs médicaux (Tasse, 2017).

Vu le prolongement de la durée d'hospitalisation surtout dans les deux services les plus incriminés (l'endocrinologie et service des brûlés) et la multirésistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées chez tous les patients étudiés, il apparait donc indispensable de connaitre et savoir si toutes ces souches sont capables de former un biofilm pouvant être responsable des situations précitées. La méthode quantitative de la microplaque à 96 puits a été établie pour de la détection de la production de biofilm in vitro (Mathur et al., 2006). Les 110 souches isolées lors de cette étude ont été testées pour leur capacité à former des biofilms par la technique de la microplaque à 96 puits (Figure 26).



**Figure 26 :** Evaluation de la production de biofilm par la méthode de CV. T : témoin négatif ; A : souches fortement formatrice de biofilm ; B : formation modérée ; C : faiblement formatrice de biofilm (Meradji, 2017).

Les résultats obtenus ont montré que tous les isolats de *P. aeruginosa* sont capables de former un biofilm après 24h d'incubation. Une distribution des souches selon leur capacité de formation de biofilm a été faite, nous avons divisé notre collection de souches en trois groupes : des souches fortes formatrices de biofilm, celles qui sont modérées et des souches qui sont faibles formatrices de biofilm. Après 16h d'incubation, plus de 50% des isolats ont été fortement formateurs du biofilm, 30% étaient modérément et 25% souches ont été faibles formatrices du biofilm contrairement à l'incubation pendant 24h, on a obtenu plus de 50% des souches qui ont été faiblement formatrice de biofilm (Figure 27).



**Figure 27 :** Capacité des souches de *P. aeruginosa* à former un biofilm (Meradji, 2017).

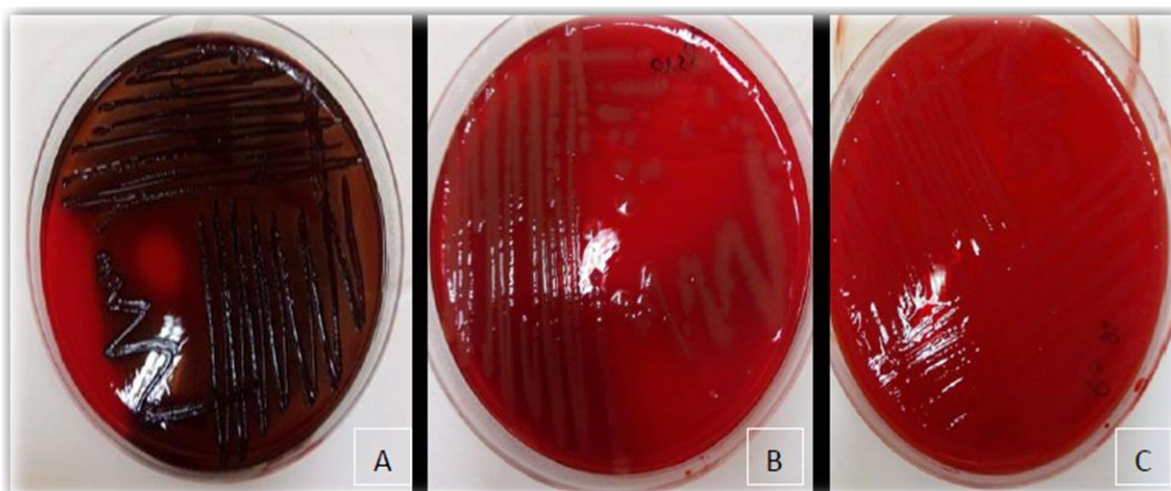
La deuxième étude qui utilisée deux méthodes différents : méthode de Rouge Congo (RCA) et méthode de plaque de Culture de Tissu (TCP) pour testées la capacité de *Pseudomonas aeruginosa* à former le biofilm. Les résultats de rouge Congo sont montrés dans le tableau suivant :

**Tableau 5** : Résultats de la production de slime par la méthode RCA (Chibi, 2015).

Souches	Nombre de souches testés					
	positif		variable		négatif	
	N <sup>0</sup>	%	N <sup>0</sup>	%	N <sup>0</sup>	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	9.52%	3	14.28%	16	76%

La recherche de la production de slime sur milieu rouge Congo.

Les souches productrices de slime avaient un phénotype variable ou positif (**Figure 28**).

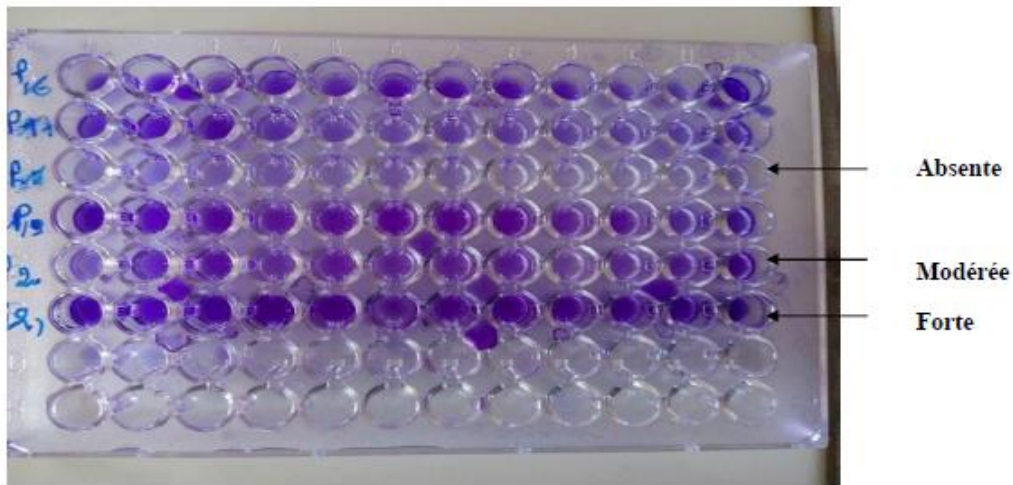


**Figure 28** : Production de slime chez les souches isolées sur milieu rouge congo

A : formatrice de slime, B : variable C : non formatrice de slime (Chibi, 2015).

Taj *et al.*, (2012) ont montré que le dépistage par la technique de rouge Congo n'est pas recommandé pour l'étude de la formation de biofilm. Pour la deuxième technique de plaque de Culture de Tissu (TCP) : Le protocole d'essai TCP décrit par Christensen *et al.*, (1985) est le plus largement utilisé et a été considéré comme la norme d'essai pour la détection de la formation de biofilm. D'après les résultats de Bellifa *et al.* (2013) ; Kara Terki *et al.*, (2013),

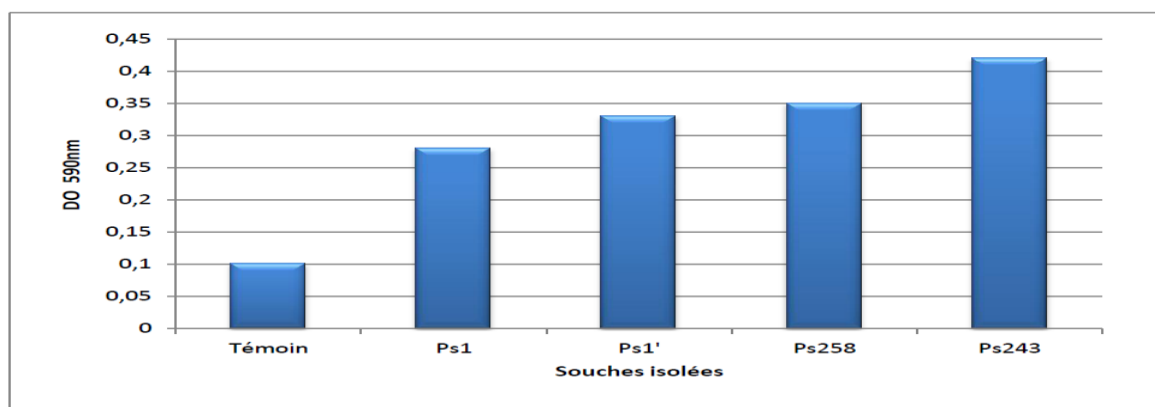
la technique TCP reste la meilleure technique pour le dépistage de la formation du biofilm in vitro (**Figure 29**).



**Figure 29** : Formation de biofilm par *P. aeruginosa* par la technique TCP.

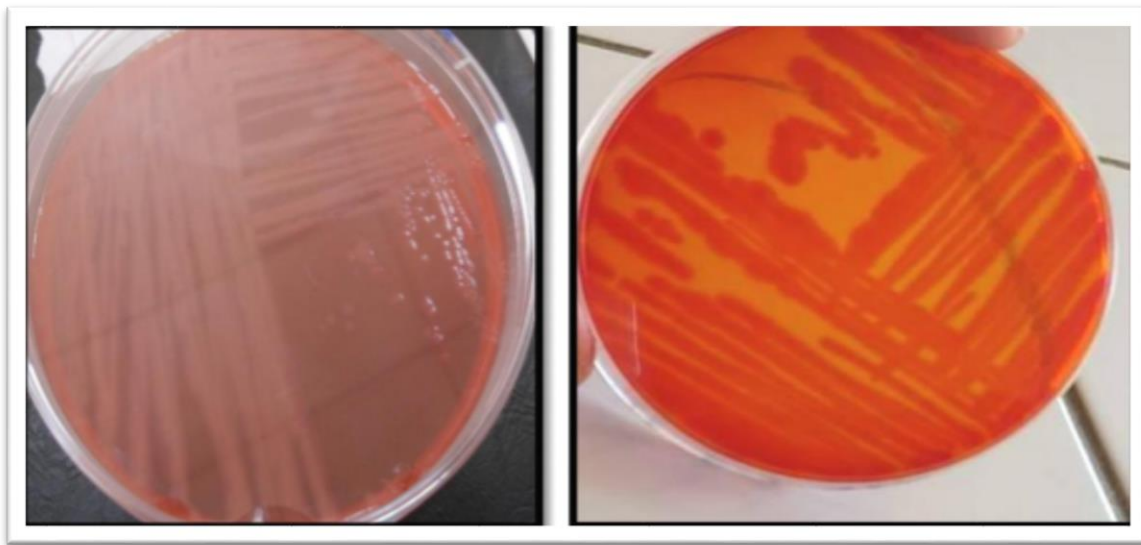
T : témoin négatif ; A : souches fortement formatrice de biofilm ; B : formation modérée ; C : faiblement formatrice de biofilm (**Chibi, 2015**).

Le résultat de l'étude **Madouri** d'évaluation de la formation de biofilm chez les souches *Pseudomonas* isolée de sondes urinaires qui a été utilisé de deux méthodes différentes. Les 4 isolats identifiés ont été testés pour leur capacité de produire du biofilm in vitro. Ceci par la méthode quantitative de coloration au cristal violet sur microplaque 96 puits en polypropylène. Les valeurs des densités optiques (DO) obtenues par le lecteur d'absorbance pour microplaques ont été converties en histogramme sur Excel (**Figure 30**). La valeur moyenne des puits de control (sans Biofilm) est égale à 0.1.



**Figure 30** : Résultats de la quantification de la formation de biofilm in vitro par les souches isolées à partir des sondes urinaires (**Madouri, 2017**).

La densité optique des 4 souches était plus élevée que celle de témoin, ce qui traduit leur capacité de former un biofilm. Sur les 4 isolats, la DO de la souche Ps243 est 4 fois plus élevée que la DO de témoin ( $DO_t \times 4 \leq DO$ ) ce qui la classe comme fortement formatrice de biofilm. Les souches Ps1, Ps1' et Ps258 présentaient une  $DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$  les classant ainsi modérément adhérentes aux puits de la microplaque. Il a été constaté par la deuxième méthode de RCA que les résultats obtenus montraient que les quatre souches de *P. aeruginosa* n'étaient pas susceptibles de produire du mucus et présentaient un phénotype négatif au milieu (**Figure 31**).



**Figure 31** : Culture de *P. aeruginosa* sur gélose Rouge Congo (Madouri, 2017).

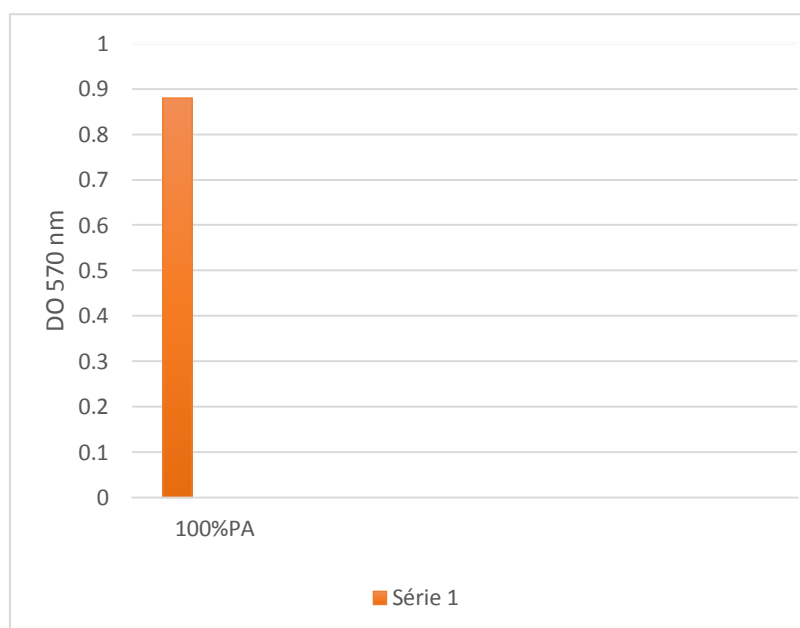
**Derardja** préféré de testé la formation de biofilm en polystyrène. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la capacité des isolats étudiés à former des biofilms importants sur surface hydrophobe (polystyrène) après culture en bouillon LB (**Figure 32**). La formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* est caractérisée non seulement par la présence d'un anneau à l'interface air-liquide, mais également par la présence d'un prolongement de la croissance cellulaire au-dessus en dessous de celui-ci.



**Figure 32** : Résultats de formation de biofilms après coloration au CV (Derardja, 2018).

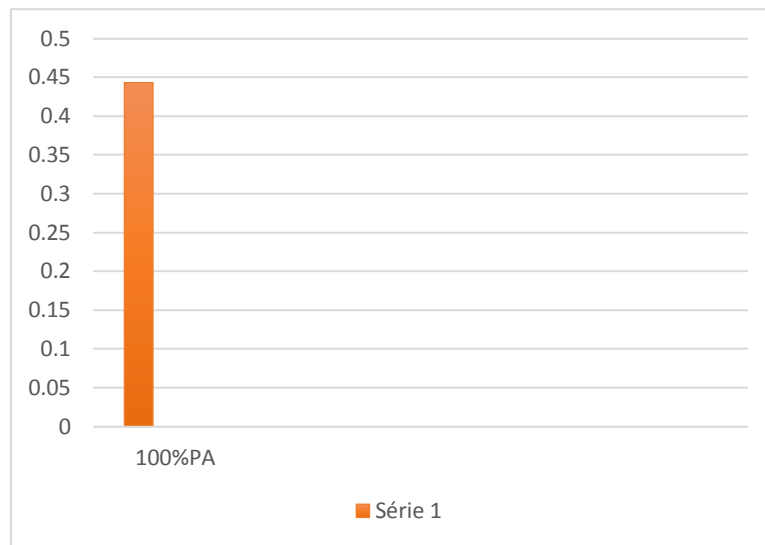
La plus grande valeur d'absorbance, pour le biofilm *Pseudomonas aeruginosa* est (DO570= 0,794).

Les résultats de la formation de biofilms sur polystyrène en bouillon LB et après 24 heures d'incubation sont représentés dans la **figure 33**.



**Figure 33** : Formation de biofilm de *P. aeruginosa* sur polystyrène (Derardja, 2018).

Comme le montre la figure 32, la valeur DO600 obtenue après 24 heures d'incubation en milieu LB, est directement corrélée à la croissance bactérienne des cellules planctoniques et des bactéries PA cultivées se voit attribuer une valeur élevée : DO600 = 0,443 (**Figure 34**).



**Figure 34** : Croissance de *P. aeruginosa* en bouillon LB sur polystyrène (Derardja, 2018).



# *Discussion*



Les bactéries du genre *Pseudomonas* ont été impliquées dans de nombreuses maladies infectieuses. Bien qu'elles soient principalement associées aux infections nosocomiales. *Pseudomonas aeruginosa* représente aujourd'hui un modèle d'adaptation particulièrement efficace en termes d'antibiorésistance, sa capacité à survivre de façon prolongée en milieu hospitalier associée à l'émergence de résistances potentialise sa capacité de propagation nosocomiale (**Touati et al, 2013**).

Toutes les études se sont basés sur la détection de la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* pathogènes isolés de dispositifs médicaux (cathéters, sondes urinaires, etc.) et d'évaluer la formation de biofilm in vitro par diverses méthodes et les études sur la sensibilité des antibiotiques.

Un nombre limites de méthodes conventionnelles est disponible pour détecter rapidement la capacité d'une souche bactérienne à former un biofilm.

La résistance aux antibiotiques et surtout l'implication des biofilms bactériens dans la majorité des situations infectieuses rendent les décisions thérapeutiques aléatoires.

D'après leurs résultats, nous avons montré que la majorité des échantillons forment un biofilm et résistant aux antibiotiques.

Les résultats obtenus dans l'étude de **Meradji, (2017)** pour les souches de *P. aeruginosa* qui ont été isolées au niveau du CHU d'Annaba, concordent avec les données d'une étude rapportée en Pakistan sur les infections nosocomiales à *P. aeruginosa* qui ont révélé un taux de 40% de *P. aeruginosa* dans le service d'endocrinologie, classé en deuxième position après le *staphylocoque aureus* (**Sabir et al. 2014**).

Plusieurs travaux similaires ont montré des prévalences d'isolement de *P. aeruginosa* beaucoup plus inférieurs à ceux obtenus dans la présente étude. Au Maroc, une étude rétrospective portant sur 84 patients hospitalisés au sein du service de réanimation des brûlés de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat, sur une période de 3 ans, a montré que *P. aeruginosa* est apparu en seconde position après le *Staphylocoque* (33.3%) avec 21 cas d'infections nosocomiales (19,6%) dont le site cutané était majoritaire, avec 87 cas (81,3%) (**Siah et al. 2009**).

*P. aeruginosa* est résistant naturellement à un grand nombre d'antibiotiques. Les fluoroquinolones, les aminosides, quelques  $\beta$ -lactamines dont les carbapénèmes, et la colistine sont efficaces contre cette bactérie. Les résistances acquises contre ces quelques antibiotiques sont fréquentes, rendant la prise en charge des infections à *P. aeruginosa* de plus en plus compliquée.

Le premier fait marquant de l'étude est le taux de résistance élevé de *P. aeruginosa* aux différentes classes d'antibiotiques testées. Les taux de résistance à Amikacine (7,6%) est différents, par rapport au ceux obtenus par (Maha et al., 2018) Amikacine (61.9%). Par contre les taux de résistance à la Ciprofloxacine (43.75%) très élevé par rapport au l'autre étude qui donner (9.09%). Les taux de résistance à l'imipénème Gentamicine étaient de (18.75%) et (21.75%) respectivement. Ces résultats sont assez comparables à l'étude réalisée à l'échelle internationale sur la résistance aux antibiotiques aux hôpitaux de Bagdad entre décembre 2016 et avril 2017, Les taux de résistance à l'imipénème Gentamicine étaient (39%) et (69.84%) ces résultats ne sont pas les mêmes. *P. aeruginosa* est devenu infections difficiles à traiter. Cliniquement, résistant aux antibiotiques les bactéries sont responsables de l'allongement hospitalisation, coût et mortalité (Mansouri et al., 2013).

Les résultats obtenus dans l'étude de Madouri, (2017) pour les souches de *P. aeruginosa* qui été isolées au niveau du service de réanimation du CHU de Tlemcen. Elles sont résistantes aux 4 antibiotiques de la famille  $\beta$ -lactamines (Ceftazidime, Pipéracilline et Tazobactam, Ticarcilline, Aztéonam). Les 4 souches se sont avérées résistantes à la gamme d'antibiotiques testés. Ceci est en accord avec d'autres études menées sur des souches *Pseudomonas aeruginosa* isolées du CHU de Tlemcen (Cherifi, 2016).

Mesaros et al. (2007) cite que *Pseudomonas aeruginosa* est responsable d'un grand nombre d'infections associées aux soins.

Ces résultats sont différents au ceux obtenus par (Abdelraheem et al., 2020). Les isolats étaient les plus sensibles à Ceftazidime.

Les résultats obtenus dans l'étude de Derardja, (2018) pour les souches de *P. aeruginosa* qui été isolées au niveau du laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Ben Badis de Constantine. Le profil de résistance déterminé révèle que la souche ; *P. aeruginosa* apparait sensible à l'ensemble des ATB testés à l'exception d'AML, TE, FOX et CTX ou elle montre une résistance face à ces quatre ATB. Ces résultats vont dans le même

sens ce qui semblable dans les études de (Eladawy et El-Mowafy, 2020) que les isolats de *P. aeruginosa* ont montré une résistance (R) à la ceftazidime (CAZ) et à la céfépime (FEP).

De nombreux problèmes associés au développement des biofilms au milieu médical, ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants). Cette résistance accrue est multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (Mulcahy et al., 2014).

Plusieurs chercheurs ont étudié les stratégies employées par les micro-organismes pour produire des biofilms, Ils ont montré que les bactéries productrices de biofilm sécrètent certaines substances chimiques qui les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et des systèmes immunitaires de l'hôte (Saitou, 2009).

Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm in vitro ont été établies, telles que la méthode quantitative de la microplaque 96puits (Freeman et al., 1989 ; Mathur et al., 2006), et la méthode qualitative du Rouge Congo (Mathur et al., 2006).

On a plusieurs méthodes pour la détection de formation de biofilm : Rouge Congo (RCA), méthode de plaque de Culture de Tissu (TCP) et méthode en tube (TM).

Les résultats obtenus de Meradji, (2017) ont montré que tous les isolats de *P. aeruginosa* sont capables de former un biofilm après 24h d'incubation. Par trois groupes divisé : des souches fortes formatrices de biofilm, celles qui sont modérées et des souches qui sont faibles formatrices de biofilm

A l'échelle internationale à l'Iraq l'étude est rapprochée de celui trouvé dans leurs résultats,

Les résultats de l'étude ont montré la capacité de formation de biofilm dans les isolats cliniques de *P. aeruginosa*. La formation de biofilm est un mécanisme important impliqué dans résistance des bactéries.

Les résultats de Chibi, (2015) par la méthode de rouge Congo sont montrés que les souches *Pseudomonas aeruginosa* produit de slime sur milieu rouge Congo ont révélé que : positif 9.52%, négatif 76%. Les souches productrices de slime donnent des colonies de couleur noire.

A l'échelle nationale (Constantine) par référence (**Nadji et Mizou, 2015**), les résultats sont les mêmes puisque les souches produisent du slime, et on remarque un pourcentage faible de formation de biofilm.

**Taj et al., (2012)** ont montré que le dépistage par la technique de rouge Congo n'est pas recommandé pour l'étude de la formation de biofilm.

D'après les résultats de **Bellifa et al., (2013)** ; **Kara Terki et al., (2013)** , la technique TCP reste la meilleure technique pour le dépistage de la formation du biofilm in vitro.

Elle permet une détermination quantitative pour comparer et examiner l'adhésion de différentes souches (**Racha et al., 2012**). Cependant, elle peut être moins précise pour déterminer la capacité des souches à sécréter le slime bactérien (**Castro et al., 2013**).

Selon leurs résultats 4 souches sont fortement formatrices de biofilm, 12 modérées et 3 sont non formatrices de biofilm. Après l'ajout de saccharose à 2% le nombre des souches fortement formatrices est élevé elle est de 4 à 11.

Des résultats similaires ont été rapportés par **Mathur et al. (2006)** qui ont démontré que le test TCP a été très satisfaisant en termes de détection de phénotype biofilm-positif.

Les résultats obtenus dans l'étude de **Madouri, (2017)** pour les souches de *P. aeruginosa* traduisent leur capacité de former un biofilm sur les 4 isolats.

Dans ce cadre plusieurs travaux ont été effectués pour voir la capacité de *P. aeruginosa* de former un biofilm in vitro citant (**Harisson et al., 2003**) ; (**Fu et al., 2010**) ; (**Oncel et al., 2010**), dont ils ont trouvés que cette souche est souvent fortement formatrice de biofilm et ils ont révélés que 60% des isolats de *P. aeruginosa* de rhinosinusite chronique produisent des biofilms bactériens par la méthode de TCP. A l'échelle internationale à l'Egypte.

Ces résultats concordent avec ceux décrits par (**Abdelraheem et al., 2020**) qui ont trouvé que différents isolats cliniques sont capables de produire le biofilm. Le même résultat a été obtenu par **Bellifa, (2013)** et aussi ils ont pensés que la technique TCP peut être recommandée comme méthode de dépistage rapide et général pour la détection des bactéries productrices de biofilms in vitro.

Le test de microplaque est la technique la plus utilisée pour quantifier la formation de biofilm, un indicateur important de la pathogénicité (**Stepanovic et al., 1999**).

Evaluation de la formation de biofilm par la méthode RCA : Les résultats obtenus nous ont permis de constater que les 4 souches de *P. aeruginosa* n'étaient pas susceptibles de produire un slime et montre un phénotype négatif dans le milieu.

D'après leurs résultats la méthode TCP semble être plus efficace que la méthode de Rouge Congo dont **Hassan et al. (2011)** estime que la méthode TCP est une méthode de criblage la plus fiable, sensible et reproductible pour la détection de la formation du biofilm. Les résultats obtenus par **Derardja, (2018)** ont permis de mettre en évidence la capacité des isolats étudiés à former des biofilms importants sur surface hydrophobe (polystyrène). , la souche *P. aeruginosa*, étant la bonne formatrice de biofilm, parce que en a une grande valeur d'absorbance par bactérie *P. aeruginosa*. Et par le test de formation de biofilms en verre *P. aeruginosa* reste toujours la bonne formatrice de biofilm. A l'échelle internationale à l'Egypt. Ces résultats concordent bien ou ceux décrits par **(Eladawy et El-Mowafy, 2020)**, selon les résultats d'un test qualitatif utilisant la méthode du tube, 103 isolats de *P. aeruginosa* ont des capacités de production de biofilm.

Enfin, la détection précoce de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* en pratique pourrait être l'une des étapes essentielles pour prévenir et gérer les maladies et les infections causées par ce pathogène. Un contrôle efficace des biofilms nécessite une éventuelle connaissance approfondie de leurs mécanismes de formation qui peut être obtenue grâce à l'utilisation de méthodes fiables.



# *Conclusion*



*P. aeruginosa*, une bactérie à Gram négatif, est la cause majeure d'infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés. Parmi lesquelles 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. La pathogénicité de *P. aeruginosa* met en jeu des adhésines permettant l'attachement et d'autres facteurs sécrétés. L'infection chronique se caractérise par la formation du biofilm bactérien, comme c'est le cas dans le poumon des patients atteints de mucoviscidose.

Toutes les études ont permis de la détection de formation de biofilm par *P. aeruginosa* sur dispositifs médicaux par des méthodes TCP, TM et RCA.

Par ordre de fréquence, les *Pseudomonas* représentent encore les germes les plus fréquemment isolés dans les colonisations et infections de la surface hospitalière.

L'étude de la cinétique in vitro d'adhésion a montré que le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* est formé dès les premières heures de la mise en place des sondes urinaires et les cathéters. Le biofilm devient mature après 48h de contact sur des dispositifs médicaux et rend l'infection possible.

Ces études ne sont que préliminaires, mais il nous encourage à vouloir continuer essentiellement dans la proposition de nouvelles perspectives pour réduire ou inhiber la formation de biofilm sur les dispositifs médicaux tels que les cathéters.



# *Bibliographie*



**A**

- Abdelouahabi F et Djeddaoui R, (2019).** Etude de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatifs Ur pathogènes isolées au niveau de l'hôpital de Naâma et Mécheria. Centre Universitaire Salhi Ahmed de Naâma, P 9-10.
- Abdelraheem W M, , Alyaa E, Abdelkader, Ebtisam S, Mohamed, Mohammed S, Mohammed., (2020).** Detection of biofilm formation and assessment of biofilm genes expression indifferent *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates.
- Aissa K, (2012).** Profil de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques aux services de réanimation à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de rabat entre 2006 et 2010. Thèse de doctorat. Université Mohammed V - faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.
- Alnnasouri M, (2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Archibald L K et Gaynes R P, (1997).** Hospital acquired infections in the United States: The importance of inter hospital comparisons. *Nosocomial Infection*. 11: 245-255.

**B**

- Beloin C, Houry A, Froment M, Ghigo J M, Henry N., (2008).** A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. *Plos Biology*, 6(7), 1546- 1558.
- Beloin C, Roux A, Ghigo J M., (2008).** *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*322, 249-289. 84.
- Bellifa S, Hassaine H, M'hamedi I, Kara Terki I, Lachachi M, Didi W., (2013).** Formation of biofilm in microfermentor by *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the university hospital of Tlemcen. 4th International Woekschop on Biotechnology. Tlemcen Algeria.
- Bellifa S, (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat .Université abou bekr belkaid, Tlemcen.

-**Behlau I et Gilmore M S, (2008)**. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious diseases. Arch Ophthalmol 126, 1572-1581.

-**Biokar, (2009)**. Gélose de Mac Conkey. [www.solabia.com](http://www.solabia.com)

- **Bouab S et Taibi A, (2020)**. Manu-portage des germes pathogènes chez les personnels hospitaliers « service médecine homme et femme » - Hôpital de Mecheria -Centre Universitaire Salhi Ahmed de Naâma, page 39.

-**Bleichner G, Beaucaire G, Gottot S, Letulzo Y, Marty J, Minet M, Nicolas M H, Pinsard M, Potel G, Schaller M D., (1994)**. Xlle Conférence de consensus en réanimation et médecine d'urgence ,24 juin 1994 : infections liées aux cathéters veineux centraux en réanimation RéanUrg ; 3.321-30.

-**Bouhadjar et Terbeche, (2017)**. Evaluation de la formation du biofilm par *Staphylococcus aureus* isolées du cathéter veineux périphérique -CHU Tlemcen. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. P22.

-**Branger A, Richer M M, Roustel S., (2007)**."Microbiochimie et alimentation." 344.

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

-**Bricha S, Ounine K, Oulkheir S, EL Haloui N E, Attarassi B., (2009)**. Facteurs de virulence et épidémiologie lies au *Pseudomonas aeruginosa*. Revue Tunisienne d'Infectiologie - Tunisie Oct. 2009 ; Vol.2 : 7 – 14.

-**Brun Buisson C, Abrouk F, Legrand P, Huet Y, Larabi S, Rapin M., (1987)**. Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. Arch Intern Med 147: 873-7.

## C

-**Castro Melo P, Ferreira L M, Filho A N, Zafalon L F, Godoy Vicente H I, de Souza V., (2013)**. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. Brazilian journal of microbiology.44 (1):1517-8382.

- Cattoen C, (2009)**. Epidémiologie des infections à *Pseudomonas*. Duacai, Valenciennes.
- Carrière C et Marchan H, (2001)**. Infections liées aux cathéters veineux centraux, 22 (8), 433-437.
- Chalvet de Rochemonteix A, (2009)**. Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'Alfort Paris.
- Chaker H, (2012)**. « Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane ». Thèse de doctorat : Grenoble : Université de Grenoble : Science agricole.
- Cherifi Z, (2016)**. Identification, étude de l'antibiorésistance et quantification de la formation de biofilm par des souches isolées à partir des sondes endotrachea les prélevées des patients de réanimation. Mémoire master : Université Abou Bekr Blekaid Tlemcen.
- Chibi A, (2015)**. Thème Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen universite Aboubekr Belkaid Tlemcen p 43-46.
- Cosentino S, Tuberoso C I G et al., (1999)**. "In-Vitro Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Sardinian Thymus Essential Oils." LettApplMicrobiol.29 (2).
- Constantin O E, (2009)**. Bacterial biofilms formation at air liquid interfaces. Innovative Romanian Food Biotechnology; 5: 18– 22.
- Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel J C, Dasgupta M , Marrie TJ., (1987)**. Bacterial biofilms in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. 41: 435–464.
- **Costerton J W, (1999)**. "Introduction to Biofilm." International Journal of Antimicrobial Agents. 11, 217-721.
- **Costerton J W, Stewart P S, Greenberg E P., (1999)**. "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections." Science 284, 1318-1322.
- C.Clin, (2001)**. Hygiène des mains Guide de bonnes pratiques. 3ème Edition. ParisNord.60p.

**D**

- Darghout A et Metheni S, (2016).** Caractérisation morphologique, biochimique et mutagenèse des souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans la région de Constantine. Université des Frères Mentouri Constantine.
- De Chalvet, De Rochemonteix A, (2009).** Les biofilms et la peau. Doctoral dissertation, École vétérinaire de Maisons-Alfort.
- Delarras C, (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, Paris .P476.
- Denis F, (2007).** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Elsevier Masson.
- Denis F, M C Poly, C Martin, E Bingen, Rquentin, (2007).** Bactériologie médicale, techniques usuelles .MASSON, Cedex. P333-335.
- Derardja A, (2018).** Recherche de biofilms mixtes sur implants médicaux. Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie p 35-40.
- Diarra F, (2009).** Fréquence d'isolement des *Pseudomonas* au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel Toure de 2002 à 2008. Thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali
- Djelloul Daouadji S, (2010).** Détection de biofilm a *staphylocoques* sur cathéters veineux. Mémoire de Magister. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
- Donlan RM, (2002).** Biofilms : Microbial life on surface. Emerg. Infect. Dis. 8 (9), 881-890.
- Dubois, (2013).** *Pseudomonas aeruginosa* : réservoir, virulence et résistance. Laboratoire de Microbiologie, UMR CNRS 5234 « Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité ».

**E**

- Elyajouri A, (2012).** Actualités des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- Souissi faculté de médecine et de pharmacie – Rabat.
- El-abdani S, (2016).** Evaluation de la résistance bactérienne aux antibiotiques et conseils en antibiothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie. Université Mohammed V-Rabat.192pp.

- **Eladawy M , El-Mowafy M , Adel El-Sokkary M M, et Barwa R., (2020)**. Effects of Lysozyme, Proteinase K, and Cephalosporins on Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*.P03/04.
- El Bouamri M CH, (2017)**. Etude epidemio-moleculaire des Entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi au CHU de Marrakech. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V-Rabat.165pp.
- **El Brahim R, (2013)**. Profil épidémiologique et de résistance des bactéries multirésistantes au CHU Hassan II de Fés. Thèse de Doctorat en Médecine. Université sidi Mohamed Ben Abdellah .112pp.
- Emmanuelle B et El Amari, (2004)**. Traitement et pronostic des Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse n° 10406. Thèse présentée à la Faculté de Médecine De l'Université de Genève pour obtenir le grade de docteur en médecine.
- Espinasse F, Page B, Cottard-Boulle B., (2010)**. Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue francophone des laboratoires*, 2010(426), 51-63.
- Essoh C Y, (2013)**.Étude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique. Thèse de doctorat. Université PARIS-SUD XI. Paris, France.

## F

- Fauchère, J L, (2002)**. "Bactériologie générale et médicale." 365.
- Faure K, Kipnis E, Guery B., (2007)**.Pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa*. *Mapar. Pathologies infectieuses* : 547 - 563.
- **Filloux A et Vallet I, (2003)**. Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Med Sci (Paris)* 19, 77-83.
- Fisher L, (2011)**. Development and evaluation of an antimicrobial urinary catheter. Ph.D. thesis, University of Nottingham, 281 p
- Flandrois J P, (1997)**. Bactériologie médicale. Presse universitaire de Lyon, Lyon. P207.

- **Florence E, Bernard P et Brigitte C B., (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. Centre hospitalier universitaire Ambroise-Paré (AP-HP). (426), 51.
- **Florence Espinassea, Bernard Pageb, Brigitte Cottard-Boullea., (2010).** Article reçu le 31 mai, accepté le 30 août 2010. Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs.
- **Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin J J, Lehman S M, et Donlan R M., (2010).** Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an *in vitro* model system. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(1), 397-404.
- **Freeman D J, Falkiner F R, Keane C T., (1989).** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol* .42:872–4.
- **Frank V L, Hilde J, Emiel G., (2017).** Équipe d'hygiène hospitalière, UZA (hôpital universitaire d'Anvers). Évaluation de la prolongation de la durée de maintien des cathéters périphériques courts. 2021/07/14.

## G

- **Garnier M V, Delamare J, Delamare T et al., (2004).** Dictionnaire illustré des Termes de Médecine. Paris: Maloine; 1046 P.
- **Gessard C, (1984).** Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration, that appears on bandages. By Carle Gessard (1850-1925). *Rev Infect Dis* Sep-Oct; 6Suppl 3:S775-66.
- **G Li Jonesa, A D Russellb, Z Caliskana, D J., (2005).** Stickler. A Strategy for the Control of Catheter Blockage by Crystalline *Proteus mirabilis* Biofilm Using the Antibacterial Agent Triclosan. *European Urology* 48 -838–845.

## H

- **Harrison Balestra C, Cazzaniga A L, Davis S C, et Mertz, P M., (2003).** A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm *in vitro* within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatologic surgery*, 29(6), 631-635.

-**Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, et Iqbal, M., (2011).** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4), 305-311.

- **Hervé Jacquier, (2011).** Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques - Conférence internat - Paris Luxembourg.

### J

-**Jacobsen S M, Stickler D J, Mobley H L, et Shirtliff, M E., (2008).** Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev*21, 26-59.

-**John L Pace, Mark E Rupp, Roger G Finch., (2006).** Biofilms Infection and Antimicrobial Therapy. CRC Press Taylor & Francis Group. P4.

### K

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

-**Kaplan J B, (2010).** Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses, *Journal of Dental Research*, 89 (3): 205-215.

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

### L

-**Labdie J, (2001).** Les biofilms microbiens dans les ateliers de transformation de la filière viande : inconvénients et intérêts potentiels. *Rencontre Recherche Ruminants*, 8, 65-69.

-**Lopard, Eric.** Les complications des voies veineuses[en ligne].disponible sur : <https://www.macsf.fr/responsabilite-professionnelle/Actes-de-soins-et-technique-medicale/voies-veineuses> (consulté le 04/05/2021/11 :50h).

M

- Madouri M, (2017)**. Thème Formation de biofilm *in vitro* par des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de sondes urinaires universite abou bekr belkaid tlemcen.p37-39.
- Maha M et al., (2018)**. Pyocyanin and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Infections in Baghdad, Iraq
- Mainardi J.L, (2015)**.Mécanismes d'action et de résistance aux antibiotiques/Session interactive autour de l'antibiogramme.18/05/2021/12:15h.
- Maki DG, Kluger DM, Crnich CJ., (2006)**. The risk of bloodstream infection sin adults with different intravascular devices: a systematic review of200 published prospective studies. Mayo ClinProc; 81(9):1159-71.
- Mansouri S, Safa A, Najar SG et Najar AG., (2013)**. Inhibitory activity of Iranian plant extracts on growth and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Malaysian J Microbial*. **9(2)**:176- 183.
- Mathlouthi N, Areig Z, Al BayssariC, Bakour S, Ali El SalabiA, Ben Gwierif S, Zorgani A A, Ben Slama K, Chouchani C, Rolain J M., (2015)**. Emergence of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Collected from Some Libyan Hospitals. *Microb. Drug Resist*.**21**:335-341p
- Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A., (2006)**. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **24** (1):25-9.
- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et Tulkens P M., (2007)**. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical microbiology and infection*, **13(6)**, 560-578.
- Medjadji H et Zaoui S, (2019)**. Mémoire Évaluation de la production et de l'activité antimicrobienne de la pyoverdine chez des isolats de *Pseudomonas fluorescen* Rhizo sphériques p60.

- Meradji S, (2017)** THEME *Pseudomonas aeruginosa* : Facteurs de virulence et évaluation de la résistance aux bêta-lactamines et aux quinolones. Université badji mokhtar–Annaba p78-95-96.
- Mérens A et al., (2013)**. Infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Résumé. Elsevier Masson SAS.
- Mermell L et al., (2001)**. Guidelines for the management of intra vascular catheter-related infections. *Infect Control HospEpidemiol*; 22:222-42.
- Miller M B et B L Bassler, (2001)**. "Quorum sensing in Bacteria." *Annu Rev Microbiol* 55: 165-199.
- Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, et al., (2009)**, Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Infection and Public Health*, 2: 101—111.
- Monroe et Don, (2007)**. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol*, 5(11), e307.
- Mulcahy L R, V M sabella, et al., (2014)**. "*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease." *Microb Ecol* 68(1): 1-12.

N

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

- **Nadji N et Mizou A, (2015)**. Détection de la formation de biofilms chez les isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*. Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. P33/34.

O

- Oncel S, Pinar E, Sener G, et al., (2010)**, Evaluation of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. (39):52–55.

P

-**Philips PL, Wolcott RD, Feltcher J, Schultz GS., (2010).** "Biofilm Made Easy." Wonds International. 1-8.

-**Philippon A, (2007).** Faculté de médecine, Effet des antibiotiques et mécanisme de résistance.

-**Pourreau A, (2008)** .Thèse de doctorat. Analyse systémique des risques liés aux cathéters veineux centraux en service de réanimation (Doctoral dissertation, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne).

R

- **Racha A N, Abu Shady H M, Hussein H S., (2012).** Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medica. Human and Genetic* .13: 269–274.

-**Rahandi R, (2013).** Infections associées aux cathéters diagnostic et approche thérapeutique. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Mohammed V ,5 p.

-**Revellin N, (2001).** Les dispositifs médicaux et les biofilms. Superviseur des Directeurs d'Etude Microbiologie Support scientifique aux ventes NAMSA – Biomatech/15/05/2021.22 :55h.15-16-18-20.

-**Rewatkar A R et Wadher B J, (2013).** *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*- Biofilm formation Methods. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences. Volume 8, Issue 5 (Nov. – Dec. 2013), PP 36-40.

S

-**Saadaoui M, (2008).** La fréquence des bactéries multirésistantes à l'hôpital Hassan II de Settat. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université Mohamed V-Rabat. 121pp.

-**Sabir R, S F. Alvi et al., (2014).** "Antibiogram of *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in patients with diabetes." *Pak J Med Sci* **30**(4): 814-818.

-**Safdar N, Kluger DM, Maki DG., (2002).** A review of risk factors for catheter related bloodstream infection caused by precutaneously inserted, non-cuffed central venous catheters: implications for preventive strategies. *Medicine (Baltimore)*; 81(6):466-79.

-**Sauer K, Camper A K, Eherlich G D, Costerton J W, Davies D G., (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140-1154.

-**Souley Lie Moustapha F S, (2002).** Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du point G .Université de BAMAKO Thèse présentée pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. P95.

- **Siah S, Belefqih R, et al., (2009).** "L'Infection Nosocomiale en Réanimation des Brûlés."

*Annals of Burns and Fire Disasters* 22(2): 72-78.

**Stepanovic S, Dragana Vukovic D, Dakic I et al., (2000),** A modified microtiter plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation, *Journal of Microbiological Methods*, 40: 175–179.

-**Steven L, Percival James T, Walker Paul R, (2000).** *Microbiological Aspects of Biofilms and Drinking water.* CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C. p 164-168.

- **Stover CK, Pham XQ, Erwin AL et al., (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*; 406:959-64.

## T

-**Taj Y, Essa F, Aziz F, Shahana Kazmi U., (2012).** Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dev. Ctries* ; 5(6) :403-409.

-**Tasse J, (2017).** Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilm dans la prise en charge des infections ostéo-articulaires aux *staphylocoques*. Thèse de doctorat : Microbiologie. Lyon: Université Claude Bernard Lyon 1, 210 p.

-**Tenke P, Kovacs B, Jackel M, ET Nagy E., (2006).** The role of biofilm infection in urology. *World J Urol*24, 13-20.

-**Touati M, (2013)**. Antibio-résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar-Annaba.

-**Touati M, S M, Diene et al., (2013)**. Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria, *Antimicrob Agents Chemother.*57(5):2426-7.

**V**

-**Vallet I, Olson J W, Lory S, Lazdunski A, et Filloux A., (2001)**. The chaperone usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gen clusters (cup) and their involvement in biofilm formation, *Processing of the National Academy of Science of USA*, 98 (12), 6911–6916.

**W**

-**Wimalajeewa, D L S et Flett J D, (1985)**. A study of populations of *Pseudomonas syringa*pv. *Syringaeon* stone fruits in Victoria. *Plant. Pathology.* 34: 248-254.

# **Annexes**

**Annexe 01 : les milieux de cultures**

**Gélose de Mueller-Hinton (MH) :**

Infusion de viande de boeuf .....	300g
Hydrolysate de caséine .....	17,5g
Amidon .....	1,5g
Agar.....	17g
pH.....	7,4

**Gélose Mac conkey:**

Peptone de viande .....	3g
Peptone de caséine .....	17g
Mélange de sels biliaires.....	1,5g
Lactose .....	10g
Cristal violet.....	0.001g
Rouge neutre .....	0.03g
Chlorure de sodium.....	5g

**Bouillon cœur-cervele (BHIB) :**

Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de cœur de boeuf.....	5.0g
Peptone.....	10.0g
Glucose.....	2.0g
Chlorure de sodium.....	2.0g

Phosphatase di sodique.....5g

pH= 7.4

### Milieu Rouge Congo Agar (RCA)

BHIB.....37 g

Saccharose.....50 g

Agar.....10 g

Rouge Congo.....0.8 g

Eau distillée .....1000 ml

pH= 7,4

Stérilisation à l'autoclave : 121°C pendant 15 minutes.

#### Annexe 02 : Lecture de résultat de la Galerie API 20NE.

Tests	Réactions/Enzymes	Résultats	
		Négatif	Positif
NO3	Réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1+NIT 2 /5 min	
		Incolore	rose-rouge
	Réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min	
		Rose	Incolore
TRP	Tryptophane formation d'indole	JAMES / immédiat	
		Incolore vert pâle / jaune	Rose
GLU	Fermentation (Glucose)	bleu à vert	Jaune
ADH	Arginine Di Hydrolase	Jaune	orange/ rose /rouge
URE	Urease	Jaune	rouge / orangé
ESC	esculine citrate de fer Hydrolyse(E- glucosidase)	Jaune	gris / marron / noir

<b>GEL</b>	Gélatine (origine bovine) Hydrolyse (protéase)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
<b>PNPG</b>	$\beta$ -galactosidase	Incolore	Jaune
<b>GLU</b>	Glucose	Transparence	Trouble
<b>ARA</b>	Arabinose	transparence	trouble
<b>MNE</b>	Mannose	transparence	trouble
<b>MAN</b>	Mannitol	transparence	trouble
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine	transparence	trouble
<b>MAL</b>	Maltose	transparence	trouble
<b>GNT</b>	Potassium Gluconate	transparence	trouble
<b>CAP</b>	Acide Caprique	transparence	trouble
<b>ADI</b>	Acide Adipique	transparence	trouble
<b>MLT</b>	Acide Malique	transparence	trouble