



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

Détection de la formation de biofilms chez les isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*

Présenté et soutenu par : NADJI Nihad
MIZOU Aziza

Le : 17 /06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : ABDELAZIZ Wided (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).

Rapporteur : BOUCHLOUKH Warda (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).

Examineurs : MERGOUD Lilia (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).

Année universitaire

2014 - 2015

Remerciement

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

*En seconde lieu, nous tenons à remercier notre chère encadreur Mlle **Bouchloukh Warda** pour ses précieux conseils sa confiance et son aide durant toute la période du travail.*

*Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par Mme **ABDELAZIZ Wided***

Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.

*A Mme **MERGOUD Lilia** d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

NOTRE profondes remerciement vont également à tous les enseignants qui nous ont donné les bases de la recherche pendant les cinq ans et les Personnes qui nous ont aidé et contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

Nous dédions ce travail à :

A nos chères parents, nous n'oublions jamais vos sacrifices exprimés. A notre égard, votre attention corrective et votre dévouement pour Notre éducation.

*A nos chères sœurs, nos chères frères
A nos chères amies, pour tous les moments qui nous avons partagé.*

A tous les membres de nos familles.

Et

A la mémoire des gents qui nous à quittés et que dieu le tout Puissant L'accueille en son vaste paradis.

Nihad © Aziza

Sommaire

INTRODUCTION	1
Partie I. Synthèse bibliographique	2
Chapitre I: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1. Définition.....	2
2. Habitat.....	2
3. Taxonomie.....	3
4. Caractères bactériologiques	3
5. Caractères morphologiques.....	3
5.1. Caractères biochimiques et métaboliques.....	4
5.2. Caractères cultureux.....	4
5.3. Caractères génomiques.....	5
6. Le diagnostic bactériologique.....	6
7. Les infections causées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
8. Les facteurs de virulence	7
9. La résistance aux antibiotiques	9
Chapitre II : Généralités sur les biofilms	11
1. Historique.....	11
2. Définition.....	11
3. Formation de biofilm.....	12
3.1.Adhésion réversible	12
3.2.Adhésion irréversible	12
3.3.Formation de micro-colonies.....	12
3.4.Maturation de biofilm	12
3.5.Dispersion du biofilm.....	13
4. Composition et organisation.....	14
4.1. Composition.....	14
4.1.1. Les microorganismes.....	14
4.1.2. La matrice.....	14

4.2. Organisation.....	14
5. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm.....	15
5.1. Les caractéristiques de la surface.....	15
5.2. Les caractéristiques du milieu.....	15
5.3. Caractéristiques des microorganismes.....	15
6. Le Quorum sensing.....	16
7. Les domaines d'intervention des biofilms.....	16
7.1. Dans l'environnement et le domaine industriel.....	16
7.2. Dans le domaine médical.....	17
7.2.1. Les biofilms sur les dispositifs médicaux.....	17
7.2.2. Résistance aux antibiotiques.....	18
7.2.3. Biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Chapitre III : Les méthodes de détection de biofilm.....	20
1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	20
2. La méthode en tube (TM).....	22
3. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA).....	22
4. Le Biofilm Ring Test (BFRT).....	23
Partie II. Matériel et méthodes.....	25
1. Origine des souches bactériennes.....	25
2. Isolement et identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.1. Isolement.....	25
2.2. Identification.....	26
2.2.1. Examen macroscopique des cultures.....	26
2.2.2. Examen après coloration de Gram.....	26
2.2.3. La recherche de l'oxydase.....	26
2.2.4. La pigmentation.....	26
3. Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	27
4. Détection de la formation de biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	28
4.1. La détection par la technique de coloration au Cristal violet.....	28
4.2. La détection par la méthode de Rouge Congo agar (RCA).....	30

Liste des abréviations

- ADH** : Arginine di hydrolase
- AHL** : Acyl Homosérines Lactones
- AI** : Auto-Inducteur
- ATB** : Antibiotique
- BCC** : Bouillon Cœur Cerveau
- BFRT** : Biofilm Ring Test
- BHIB** : Brain Heart Infusion Broth
- BN** : Bouillon Nutritif
- CV** : Cristal Violet
- DO** : Densité Optique
- EPS** : Exo polysaccharides
- G+C%** : Guanine + Cytosine %
- GN** : Gélose Nutritive
- IgA** : immunoglobuline A
- IgG** : immunoglobuline G
- LDC** : Lysine décarboxylase
- LPS** : Lipopolysaccharides
- LT** : Lymphocyte T
- MEB** : microscopie électronique à balayage
- NE** : Non Entérobactérie
- ODC** : Ornithine décarboxylase
- ONPG** : Orthonitrophényl – B-D – galactopyranoside
- PIA** : Polysaccharide Intercellular Adhesin
- QS** : Quorum Sensing
- RCA** : Rouge Congo Agar (Red Congo Agar)
- TCP** : Plaque de Culture de Tissus
- TM** : Méthode en tube

Liste des figures

Figure 1 : Quelques individus de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
Figure 2 : Ciliature monotriche de <i>P. aeruginosa</i>	4
Figure 3 : Les aspects différents de colonies de <i>P. aeruginosa</i>	5
Figure 4 : Représentation des différentes étapes de développement d'un biofilm.....	13
Figure 5 : Une coupe transversale d'une sonde urinaire en silicone à demeure. L'image montre l'incrustation de la sonde par un biofilm.....	18
Figure 6 : Formation de biofilm en microplaque.....	21
Figure 7 : Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM.....	22
Figure 8 : Culture sur la gélose Rouge Congo.....	23
Figure 9 : Le principe de Biofilm Ring Test.....	24
Figure 10 : Formation de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> sur polystyrène après 24 heures d'incubation en bouillon nutritif.....	35
Figure 11 : Croissance de <i>P. aeruginosa</i> sur polystyrène après 24 heures d'incubation en bouillon nutritif.....	37
Figure 12 : Formation de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> sur polystyrène après 48 heures d'incubation en bouillon nutritif.....	38
Figure 13 : Croissance de <i>P. aeruginosa</i> sur polystyrène après 48 heures d'incubation en bouillon nutritif.....	39
Figure 14 : Formation de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> sur polystyrène après 24 heures d'incubation en bouillon cœur cerveau.....	40
Figure 15 : Croissance de <i>P. aeruginosa</i> sur polystyrène après 24 heures d'incubation en bouillon cœur cerveau.....	41
Figure 16 : Formation de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> sur verre après 7 jours en bouillon cœur cerveau.....	42

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> : leurs modes d'action et leurs conséquences cliniques.....	8
Tableau 2 : Classification des principaux antibiotiques actifs sur <i>P. aeruginosa</i>	9
Tableau 3 : Liste partielle d'infections humaines impliquant des biofilms	17
Tableau 4 : Antibiotiques testés pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Tableau 5 : Tests de formation de biofilm effectués.....	29
Tableau 6 : Les résultats d'identification de <i>P. aeruginosa</i>	32
Tableau 7 : Les profils de sensibilités aux antibiotiques des souches étudiées.....	33
Tableau 8 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.....	42

Introduction :

Actuellement, *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 de Rochemonteix, 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 coloration au cristal violet (CV) et la méthode de culture sur milieu au rouge congo (RCA) (Djelloul Daouadji, 2010).

Le présent travail a pour objectif de 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 deux 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*.

CHAPITRE I: *Pseudomonas aeruginosa*

1. Définition

Pseudomonas aeruginosa a été isolé pour la première fois en 1882 par Gessard. Il l'a appelé *Bacillus pyocyaneus* du nom du pigment pyocyanique, diffusible dans le milieu extracellulaire et à l'origine de la coloration des cultures (Touati, 2013).

P. aeruginosa est responsable d'infections graves communautaires et surtout nosocomiales. 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 (Figure 1) (Plesiat, 2008).

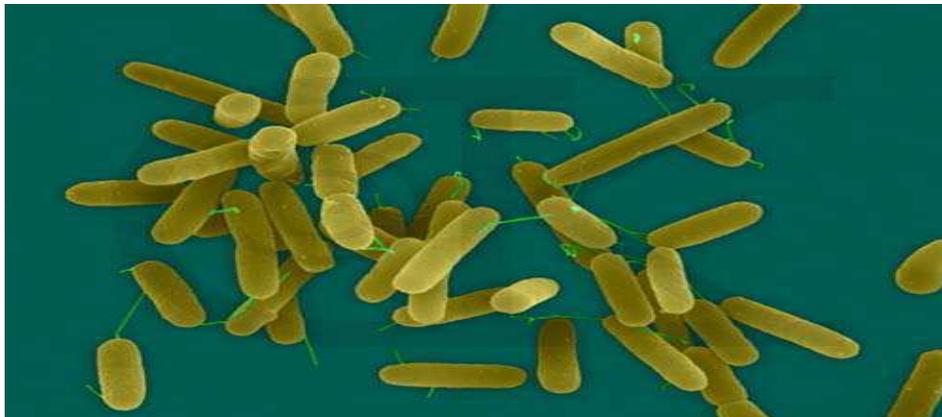


Figure 1. Quelques individus de *Pseudomonas aeruginosa* (Dubois, 2013).

2. Habitat

P. aeruginosa ou bacille pyocyanique est une bactérie ubiquiste, saprophyte dans les eaux douces et marines, dans l'air, dans les sols humides ou sur les végétaux. Elle est commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, mais aussi pathogène pour eux.

Cette bactérie se rencontre dans l'environnement hospitalier au niveau du matériel médical ou chirurgical, et dans des solutions d'antiseptiques (Delarras, 2007).

Dans son habitat naturel, *P. aeruginosa* peut être trouvée sous forme planctonique, mobile ou en biofilm (Méar, 2014).

3. Taxonomie

La classification de *P. aeruginosa* a d'abord été fondée sur l'étude de leurs caractères phénotypiques (morphologiques, biochimiques....) puis sur leur caractères génotypiques (Aissa, 2012). Seule la composition en G+C % et qui est égale à 67 fût rajouté comme caractéristique génétique (Madigan et Martinko, 2007 ; Mezaache, 2012).

Selon la 9^{ème} édition de Bergey's manual of systematic bacteriology (1994), *P. aeruginosa* est classée comme suit (Delarras, 2007) :

Domaine: <i>Bacteria</i>
Phylum: <i>Proteobacteria</i>
Classe: <i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre: <i>Pseudomonadales</i>
Famille: <i>Pseudomonaceae</i>
Genre: <i>Pseudomonas</i>
Espèce: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

4. Caractères bactériologiques

4.1. Caractères morphologiques

P. aeruginosa, bactérie à Gram négatif, se présente sous forme de bacilles fines droites de 0,5 à 0,8 µm de diamètre sur 1,5 à 3,0 de longueur, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature mono triche (Figure 2), et dépourvus de spores et de capsule (Khalilzadeh, 2009 ; Touati, 2013).



Figure 2. Ciliature monotriche de *P. aeruginosa* (Aissa, 2012).

4.2. Caractères biochimiques et métaboliques

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 gélatinase et des réponses négatives pour les tests suivants : LDC, ODC, indole, β -galactosidase (quelques souches hydrolysent l'ONPG au moyen d'une enzyme différente de la β -galactosidase) (Diarra, 2009 ; Touati, 2013).

4.3. 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 3** représente les différents aspects de colonies de *P. aeruginosa*.

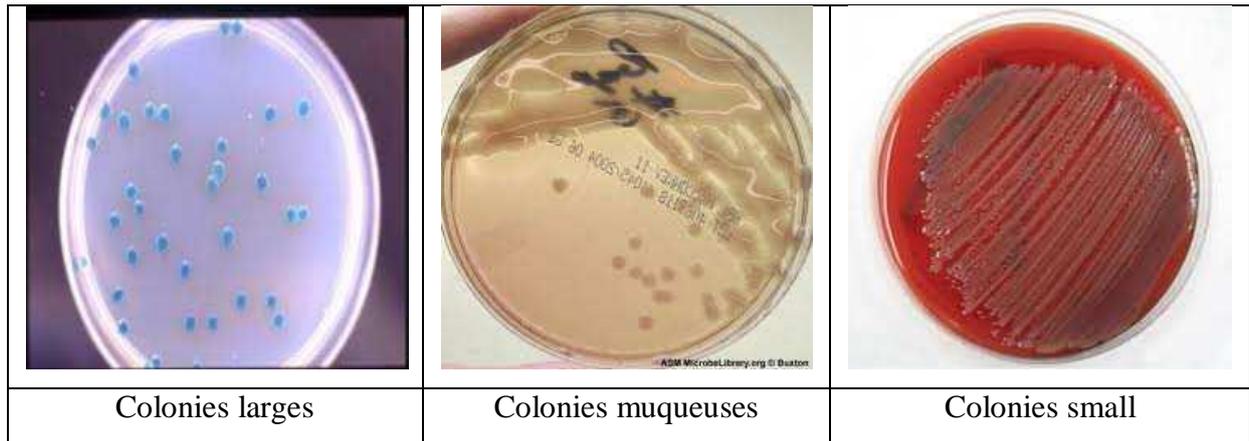


Figure 3. Les différents aspects de colonies de *P. aeruginosa* (Aissa, 2012).

Leur température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C mais elles tolèrent aussi une température de 42°C. Aucune culture n'est obtenue à 4° C ou à 46° C (Khalilzadeh, 2009 ; Sausseureau, 2013).

La grande majorité des souches de *P. aeruginosa* synthétisent de la pyocyanine (bleu-vert), de la pyoverdine (jaune-verts) et plus rarement de la pyomélanine (brun-noire ou acajou) ou de la pyorubine (brun-rouge) (Khalilzadeh, 2009 ; Aissa, 2012 ; Sausseureau, 2013).

4.4. Caractères génomiques

Le génome de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé en 2000, il s'agit d'un des plus grands génomes bactériens connus, avec 6,3 méga bases (Didier, 2005). Il est constitué d'une partie conservée qui représente jusqu'à 90% et d'une partie variable caractérisée par les échanges horizontaux de gènes (Essoh, 2013).

Le génome chromosomique code notamment pour la plupart des facteurs de pathogénicité et pour les multiples protéines, conférant la résistance aussi à différentes classes d'ATB. La proportion de gènes de régulations est la plus importante de tous les génomes bactériens séquencés connus. *P. aeruginosa* possède aussi de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction.

La taille, la complexité et la variabilité de génome de *P. aeruginosa* reflètent une évolution adaptative de l'espèce qui lui confère la capacité d'utiliser un grand nombre de composés organiques et ainsi de se développer dans de nombreuses niches écologiques même pauvres en nutriments (**Filopon, 2005 ; Aissa, 2012**).

5. Le diagnostic bactériologique

Le diagnostic présomptif du genre *Pseudomonas* doit être évoqué lorsque les bactéries sont mobiles, à Gram négatif, aérobies strictes, oxydase positive et non indologènes.

P. aeruginosa se développe facilement sur milieux ordinaires tels que : la gélose nutritive et l'eau peptonée. L'isolement à partir de prélèvements plurimicrobiens peut être facilité par l'utilisation des milieux sélectifs au cétrimide (**Delarras, 2007 ; Smahi, 2008**). Sur les milieux sélectifs pour entérobactéries, la bactérie forme des colonies lactose négatif.

Le diagnostic bactériologique des souches typiques est très facile. Il est fortement orienté par l'aspect des colonies (colonies plates à bord irrégulier et prenant un aspect irisé métallique avec le temps) et l'odeur des cultures (odeur de seringa). La mise en évidence de la pyocyanine (milieu de King A) et de la pyoverdine (milieu de King B) suffit à assurer le diagnostic.

Certaines souches peuvent présenter des caractères différents : leurs colonies sont non pigmentées ou être colorées en brun ou en rouge (dû à la production de pyomélanine ou pyorubrine) (**Clave, 2011**).

Pour les souches atypiques quant à leurs caractères culturels, la réalisation d'une identification biochimique pourra être lancée à l'aide d'une galerie API 20 NE (système d'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux): les caractères principaux sont la production d'une arginine dihydrolase, gélatinase, nitrate réductase et l'assimilation de certains hydrates de carbone comme le glucose (**Pellerin, 2006 ; Clave, 2011**).

6. Les infections causées par *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes. L'opportunisme de ce pyocyanique est à l'origine de sepsis graves sur les terrains fragilisés: brûlures graves, immunodéprimés, malades de réanimation, ventilation assistée invasive, dispositifs invasifs (sonde, cathéters périphériques et centraux) (**Didier, 2005 ; Chaibdraa et al., 2008**).

Chez les patients atteints de mucoviscidose, *P. aeruginosa* est aujourd'hui le principal pathogène et pose des problèmes tout à fait spécifiques (**Mesaros et al., 2007**).

P. aeruginosa est capable de coloniser une grande diversité de tissus provoquant entre autres des bactériémies, ou des infections oculaires, intestinales, ou urinaires, des méningites et ostéomyélites en infectant le système nerveux central et les structures osseuses (**Didier, 2005**).

7. Les facteurs de virulence

P. aeruginosa est invasif en raison de la production de nombreux facteurs de virulence. Ces facteurs sont impliqués dans les diverses phases d'infection (**Mesaros et al. 2007**).

On distingue 2 classes de facteurs de virulence :

- **Les facteurs de virulence associés à la bactérie** : le biofilm, les flagelles, les pili type IV, facteur d'attachement de type Fimbriae et le lipopolysaccharide (**Didier, 2007**).
- **Les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie**: les toxines (exemple les exotoxines), les enzymes protéolytiques (élastases, protéase IV, protéase alcaline), enzymes lipolytiques (lipase, estérase et phospholipase C), rhamnolipides et chromophores (**Kukavica-Ibrulj, 2007**).

Le **tableau 1** suivant résume les mécanismes de virulence et les effets pathogènes induits par les principaux facteurs de virulence.

Tableau 1. Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa*: leurs modes d'action et leurs conséquences cliniques (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011).

Facteurs de virulence	Mécanisme de virulence	Effet pathogène induit
Lipopolysaccharide (LPS)	Stimulation de la production de cytokines	Choc
Pili	Adhésion aux cellules épithéliales respiratoires	Pathogénicité respiratoire
Flagelle	Adhésion aux mucines Mobilité : rôle dans l'internalisation	Diffusion bactérienne
Alginate	Provoque le phénotype muqueux Adhésion aux cellules trachéales Inhibition de la phagocytose, de l'action des antibiotiques et de la réponse immunitaire	Pathogénicité respiratoire Résistance aux défenses de l'hôte (phagocytose) et aux ATB Responsable du caractère mucoïde des souches
Exotoxine A	Inhibition des synthèses protéiques des cellules Cibles	Mort cellulaire : nécrose tissulaire Rôle important dans la virulence
Exoenzyme S	Effet cytotoxique Prolifération des LT	Nécrose tissulaire Entraîne des lésions du glycopeptide, de lavimentine et des IgG et IgA
Exoenzyme U	Rôle antiphagocytaire	Lésions des cellules épithéliales Responsable de bactériémie voire de choc Septique
Rhamnolipide	Effet détergent	Hydrolyse du surfactant
Elastases (LasA+LasB)	Dégradation de l'élastine, de la fibrine, de l'interféron, du complément et du collagène	Destruction des tissus contenant de l'élastine Rôle important dans la virulence
Pyocyanine+Pyoverdine	Action bactéricide sur les autres bactéries Augmentation de la libération d'élastase Inhibition des battements des cils Captage du fer Induisent la synthèse de radicaux libres	Favorise l'émergence du bacille pyocyanique Diminution de la clairance des bacilles Rôle dans la survenue de vascularite d'artères pulmonaires.
Lectines solubles	Inhibition des battements ciliaires des cellules pulmonaires	Pathogénicité respiratoire Rôle dans l'infection chronique
Phospholipase C	Effet cytolytique local	Lyse des cellules cibles Rôle dans l'infection aiguë et chronique.
Protéase alcaline	Protéolyse	Rôle dans les infections cornéennes

8. La résistance aux antibiotiques

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

8.1. La résistance naturelle

P. aeruginosa présente un niveau très élevé de résistance naturelle aux nombreux ATB (**Diarra, 2009**) par différents mécanismes :

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

8.2. 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).
- L'hydrolyse enzymatique.
- La surexpression de l'efflux actif.
- La modification de cible (**Cattoen, 2009 ; Elyajouri, 2012 ; Dubois, 2013**).

P. aeruginosa n'est sensible qu'à quelques ATB (**Bricha et al., 2009**) présentés dans le **tableau** suivant :

Tableau 2. Classification des principaux antibiotiques actifs sur *P. aeruginosa* (Aissa, 2012).

Antibiotiques	Familles	Mode d'action
Ticarciline	Carboxypenicillines	Les β -lactamines agissent au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane, entraînant une lyse bactérienne.
Aztréonam	Monobactames	
Imipénèmes	Carbapénèmes	
Céftazidime	Céphalosporine de 3 ^{ème} génération	
Gentamicine Amikacine	Aminoglycosides	Ils perturbent la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome entraînant la destruction bactérienne. Ils sont bactéricides.
Colistine	Polymyxine	Agit au niveau de la membrane cytoplasmique bactérienne entraînant l'éclatement de la bactérie.
Ciprofloxacine	Quinolones de 2 ^{ème} génération ou fluoroquinolone	Les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-gyrase" en empêchant la réplication et la transcription de l'ADN bactérien.

CHAPITRE II : Généralités sur les biofilms

1. Historique

La découverte des biofilms microbiens est attribuée à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek, le premier qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés microbiennes adhérentes à la surface des dents (**Roux et Chigo, 2006**).

En 1978, Costerton *et al.* ont proposé les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes. Ils ont proposé pour la première fois la théorie de « biofilms », qui a expliqué les mécanismes par lesquels les microorganismes adhèrent aux surfaces vivantes et inertes et les avantages accumulés par cette niche écologique (**Branger et al., 2007 ; Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Kara Terki, 2014**).

Plus récemment, les études sur les biofilms étaient développées dans divers domaines industriel, environnementale et médicale. Beaucoup de travaux dans les deux dernières décennies ont compté sur les outils tels que : la microscopie électronique à balayage (MEB) ou les techniques de cultures microbiologiques standards pour la caractérisation des biofilms (**Donlan, 2002**).

2. Définition

Le biofilm est un ensemble de microorganismes, formé de la même espèce ou d'espèces différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il est constitué d'un ensemble de cellules et de micro-colonies associées entre elles et à des surfaces biotiques ou abiotiques.

Ces surfaces peuvent prendre plusieurs formes ; minérales (roche, interface air-liquide.....) ou organiques (peau, tube digestif des animaux, racines et feuilles des plantes), industrielles (canalisation, surface alimentaires ou coques des navires) ou médicales (prothèse, cathéter, valves cardiaques) (**Branger et al., 2007 ; Bellifa, 2014**).

3. Formation de biofilm

Les différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quel que soit l'environnement qu'ils colonisent. La formation se fait généralement en cinq étapes (**Haras, 2005**) (**Figure 4**).

3.1. Adhésion réversible

C'est l'étape préliminaire de la formation de biofilm et le résultat de l'interaction entre les bactéries et un substrat solide (attractions correspondante aux forces de Van der Waals et des forces de répulsion électrostatiques). Les cellules s'adsorbent sur une surface pendant un certain temps, mais peuvent se détacher (**Branger *et al.*, 2007 ; Pecastaings, 2010; Muller et Guaguere , 2014**).

3.2. Adhésion 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. Dans ce cas des interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe (**Bellifa, 2014 ; Branger *et al.*, 2007**).

3.3. Formation de micro-colonies

Une fois que la bactérie est irréversiblement adhérente à la surface, sa multiplication conduit à la formation de micro-colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface (**Bellifa, 2014**).

3.4. Maturation de biofilm

C'est l'étape clé de la formation de biofilm. Elle est caractérisée par la sécrétion d'exo-polymères contribuant à la forte adhésion des cellules les unes aux autres d'un côté et à la surface d'un autre côté. Le biofilm grandit jusqu'à devenir macroscopique en condition optimales (**Branger *et al.*, 2007 ; Alnnasouri, 2010**).

3.5. Dispersion du biofilm

Le détachement des cellules associées aux biofilms intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition ou modification de la nature des nutriments disponibles.

Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement.

Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement (Haras, 2005 ; Parot, 2007).

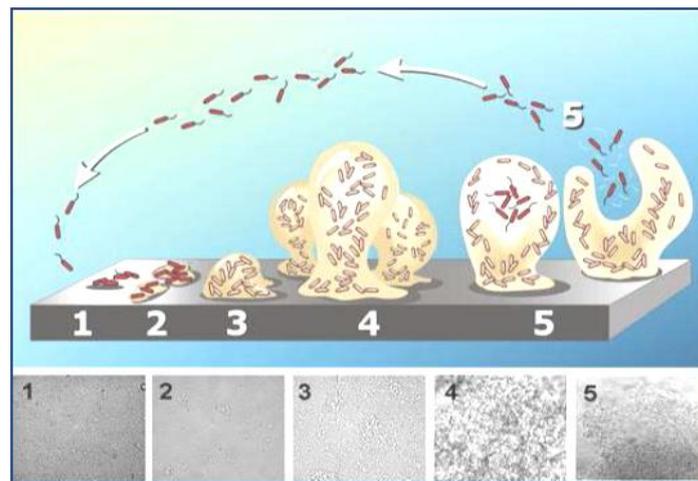


Figure 4 . Représentation des différentes étapes de développement d'un biofilm.
(Besassier *et al.*, 2005).

4. Composition et organisation

4.1. Composition

Le biofilm est constitué essentiellement de microorganismes et de la matrice qu'ils synthétisent. Les microorganismes représentent 2 à 5 % de la matrice du biofilm selon l'espèce impliquée alors que la matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée du biofilm (**Bellifa, 2014**).

4.1.1. Les microorganismes

Seuls quelques biofilms sont composés d'un seul type de microorganisme. Ce phénomène est lié aux conditions environnantes, plus souvent qu'à la nature même des microorganismes. Alors que les biofilms naturels sont souvent composés de nombreux types de microorganismes : bactéries, protozoaires, algues, mycètes, chaque groupe exécutant des fonctions métaboliques spécialisées (**Branger et al., 2007 ; Alnnasouri, 2010**).

4.1.2. La matrice

Elle est composée principalement de :

- L'eau : demeure le principal composant du biofilm.
- Des Exo polysaccharides (EPS) : éléments structuraux majeurs de biofilm, représente jusqu'à 85% de la masse totale.
- Débris cellulaires (protéines, acides nucléiques).
- Déchets du métabolisme cellulaire.
- Débris issus des matières en contact avec les surfaces (produits alimentaires) (**Branger et al., 2007 ; Bellifa, 2014**).

4.2. Organisation

Le biofilm est composé d'agrégats de microorganismes séparés par des « canaux aqueux » assurant la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments à la bactérie et l'élimination de leurs produits de dégradation.

Le biofilm n'est pas un environnement homogène, car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments, (qui présentent des valeurs de pH différents), les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (**Roux et Ghigo., 2006**).

5. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels: la surface, le milieu et les microorganismes (**Branger et al., 2007**).

5.1. Les caractéristiques de la surface

La rugosité, les propriétés physicochimiques et la formation préalable d'un film protéique sur une surface influencent l'attachement des bactéries à cette surface et par conséquent la formation d'un biofilm. (**Klein, 2011 ; Bellifa, 2014**).

5.2. Les caractéristiques du milieu

Comprenant les conditions environnementales telles que : la disponibilité de nutriments (excès ou carence) et les différents stress physicochimiques (pH, température, présence de composés bactéricides, etc.) (**Marchal, 2010**).

5.3. Caractéristiques des microorganismes

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Cette hydrophobicité influence l'attachement des bactéries sur une surface ; moins les surfaces sont polarisées plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. (**Liesse Iyamba, 2012; Bellifa, 2014**), Cette association stable avec la surface s'établit grâce à des structures adhésives telles que des adhésines filamenteuses (fimbriae, pili) ou non (EPS, capsule, ...) (**Perrin, 2009 ; Alyajouri, 2012**).

Toutes les souches bactériennes n'ont pas la même capacité à coloniser les surfaces et de grandes différences existent au sein d'une même espèce bactérienne (**Kukavica-Ibrulj, 2007**).

6. Le Quorum sensing

Ce mécanisme a été retrouvé chez des bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*. Il contrôle des processus ayant lieu au sein des cellules par des facteurs moléculaires diffusibles « les auto-indicateurs ». C'est le phénomène de comportement communautaire « Biofilm » où les bactéries communiquent entre elles (**Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Djelloul Daouadji, 2010 ; Pecastaings, 2010**).

Ce mécanisme est lié à l'accroissement de la densité de la population bactérienne, qui conduit à l'augmentation de la concentration d'une molécule signal (AI) dans l'environnement extracellulaire.

Quand la concentration d'une molécule signal atteint un niveau seuil, capable d'activer la production des gènes cibles, cela induit la réponse correspondante aux signaux, comme la production d'EPS (**Alnnasouri, 2010 ; Pecastaings, 2010**). Il existe plusieurs molécules signal chez les micro-organismes parmi lesquelles les Acylhomoserine lactones (AHL) produites par les bactéries à Gram négatif.

7. Les domaines d'intervention des biofilms

7.1. Dans l'environnement et le domaine industriel

Les biofilms peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur l'homme ou ses activités :

- Les biofilms sont utilisés dans la production du vinaigre (acide acétique).
- Les réacteurs à biofilm ont également été utilisés dans la production d'antibiotiques par exemples : un réacteur à biofilm à lit fluidisé a donné de meilleurs résultats de la production de pénicilline.
- Les biofilms sont également utilisés pour le traitement biologique des eaux résiduaires.
- La formation des biofilms dans les réseaux de distribution d'eau est également un des problèmes importants rencontrés dans le maintien de la qualité des aliments et de contamination dans les équipements de l'industrie agroalimentaire (**Alnnasouri, 2010**).

7.2. 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 de Rochemonteix, 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 (**Tableau 3**) (**Costerton et al., 1999**).

Tableau 3 .Liste partielle d'infections humaines impliquant des biofilms
(**Costerton et al., 1999**).

Infections	Espèces bactériennes communément impliquées
Caries dentaires	➤ Cocci à Gram positif acidogènes (<i>Streptococcus spp.</i>)
Périodonties	➤ Bactéries anaérobies orales, à Gram négatif
Otites moyennes	➤ Souches d' <i>Haemophilus influenzae</i>
Mucoviscidose pulmonaire	➤ <i>P. aeruginosa</i> et <i>Burkholderia cepacia</i>
Endocardites	➤ <i>Streptococcus sp.</i> et <i>Staphylococcus spp.</i>
Ostéomyélites	➤ Plusieurs espèces bactériennes et fongiques souvent mixés
Infections de tractus biliaire	➤ Bactéries Entériques (<i>Escherichia coli</i>)
Prostatites bactériennes	➤ <i>Escherichia coli</i> et autres bactéries à Gram négatif

7.2.1. Les biofilms sur les dispositifs médicaux

Dans la nature, les microorganismes ont une tendance naturelle à l'adhésion aux surfaces. Il en est de même dans le domaine médical au niveau des prothèses et implants (**Herard, 1998**). Parmi les dispositifs médicaux sur lesquelles les biofilms peuvent se développer :

- Les cathéters centraux veineux
- Lentilles de contact
- Tubes endotrachéaux
- Les stérilets
- Les joints prosthétiques
- Les sondes urinaires (**Donlan, 2001**) (**Figure 5**).

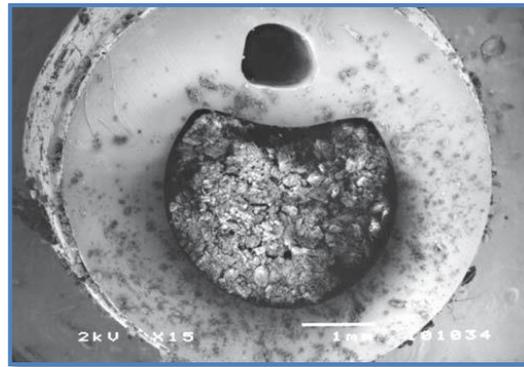


Figure 5. Une coupe transversale d'une sonde urinaire en silicone à demeure. L'image montre l'incrustation de la sonde par un biofilm (Stickler, 2008).

7.2.2. Résistance aux antibiotiques

Le biofilm est une structure résistante aux agents antimicrobiens dont les bactéries associées sont moins sensibles aux ATB et aux désinfectants par comparaison à leurs homologues planctoniques (Haras, 2005).

Les concentrations d'ATB nécessaires pour inhiber les bactéries au sein d'un biofilm, peuvent être 10 à 100 fois plus élevées que celles utilisées pour inhiber les mêmes bactéries à l'état planctonique, mais ne permettent pas l'élimination complète ce qui provoque de nombreux problèmes en milieu médical (Anger, 2013).

Cette résistance, accrue multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène, etc....). Elle modifie les propriétés physiologiques des microorganismes et induit des mécanismes de résistance connus et cela est dû à la structure du biofilm qui facilite le transfert horizontal de gènes entre les bactéries, processus impliqué dans l'acquisition des gènes de résistance aux ATB (Roux et Ghigo, 2006 ; Soussereau, 2012).

7.2.3. Biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa, comme d'autres bactéries à Gram négatif, produit des agrégats structurés ou biofilms maintenue par une matrice (**khalilzadeh, 2009**). Cette dernière est composée majoritairement d'un mélange comprenant en proportions des alginates (exopolysaccharide), des polyoses ainsi que des protéines et des rhamnolipides (**Pecastings, 2010 ; Ben Haj Khalifa et al., 2011 ; Barakat, 2012**).

Dès que la bactérie a réussi à s'implanter, elle devra y survivre et ce malgré la présence des défenses de l'hôte innées et acquises, et d'événements répétés d'antibiothérapie pour réussir la formation de biofilms (**Ben Haj Khalifa et al., 2011**).

La formation d'un biofilm mature chez *P. aeruginosa* a lieu 5 à 7 jours et s'effectue en 5 étapes (**Soussereau, 2012**).

CHAPITRE III : Les méthodes de détection de biofilm

Il existe différentes méthodes pour détecter la production d'un biofilm, parmi lesquelles ; la méthode de Plaque de culture de tissus (TCP), la méthode en Tube (TM), la culture sur milieu rouge Congo (RCA) et le Biofilm Ring Test (BFRT).

1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

La méthode de plaque de culture de tissus (TCP) décrit par O'Toole *et al.*, (2000) permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm (**Bellifa, 2014**). Les biofilms mono-espèces peuvent se former sur des supports en polystyrènes en utilisant des microplaques à 96 puits.

A partir d'une culture de 18 heures dans le milieu Bouillon infusion cœur cerveau (BHIB), les puits d'une microplaque de 96 puits sont inoculés avec des bactéries. Les microplaques sont incubées par la suite pendant 24 heures à 37°C. Les puits sont lavés trois fois avec de tampon phosphate salin (PBS) (**Figure 6**).

Les biofilms ainsi formés par l'adhésion des bactéries sessiles sont colorés avec du Cristal Violet (CV) à 0,1%. En fonction de la lecture des densités optiques (DO) de la phase biofilm, les bactéries sont classées comme suit : non formatrices du biofilm, formation modérée, fortement formatrice du biofilm (**Mathur et al., 2006 ; Afreenich et al., 2011 ; Bellifa, 2014**).

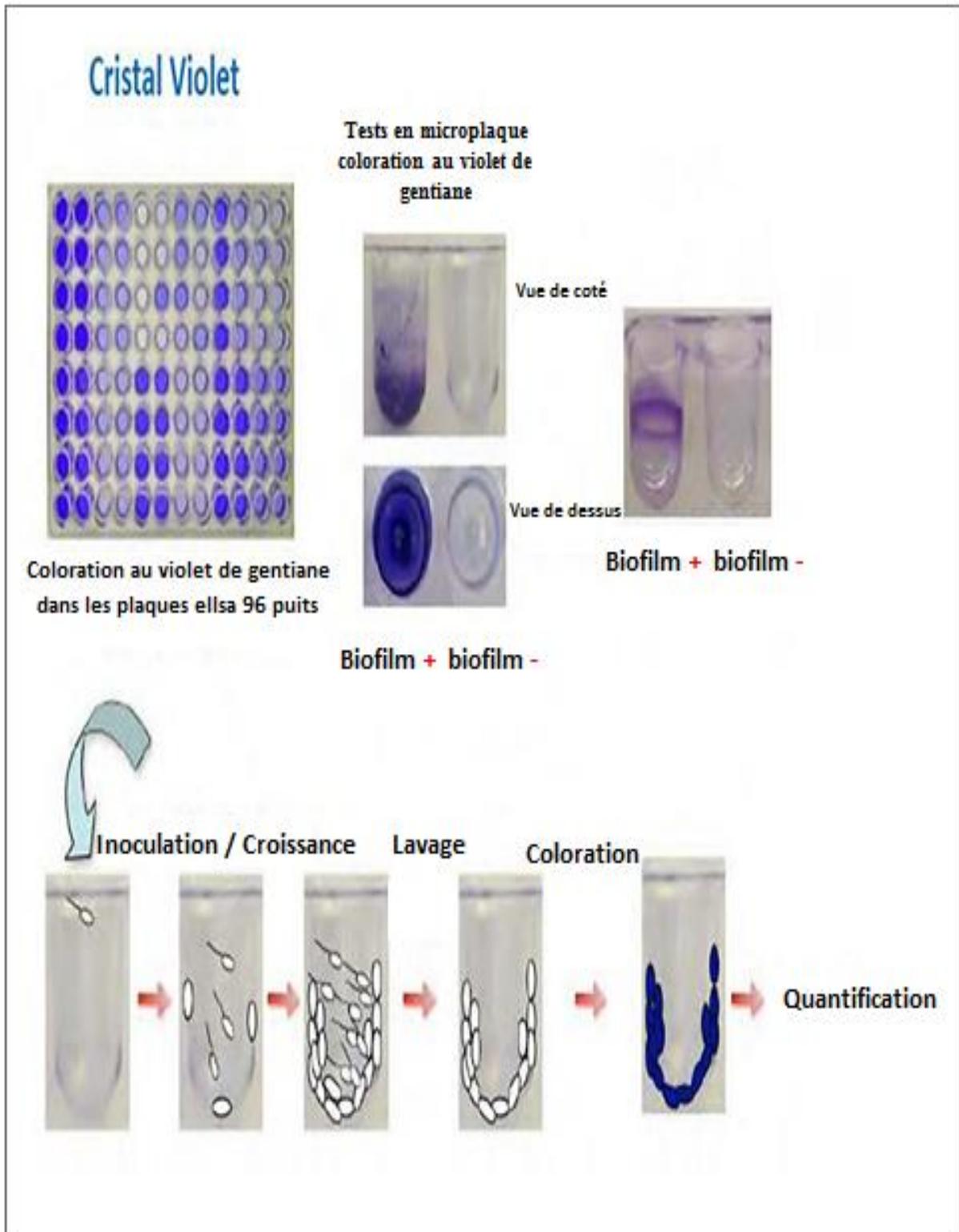


Figure 6. Formation de biofilm en microplaque (Bellifa, 2014).

2. La méthode en tube (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par Christensen *et al.*, (1982). (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 7**).

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

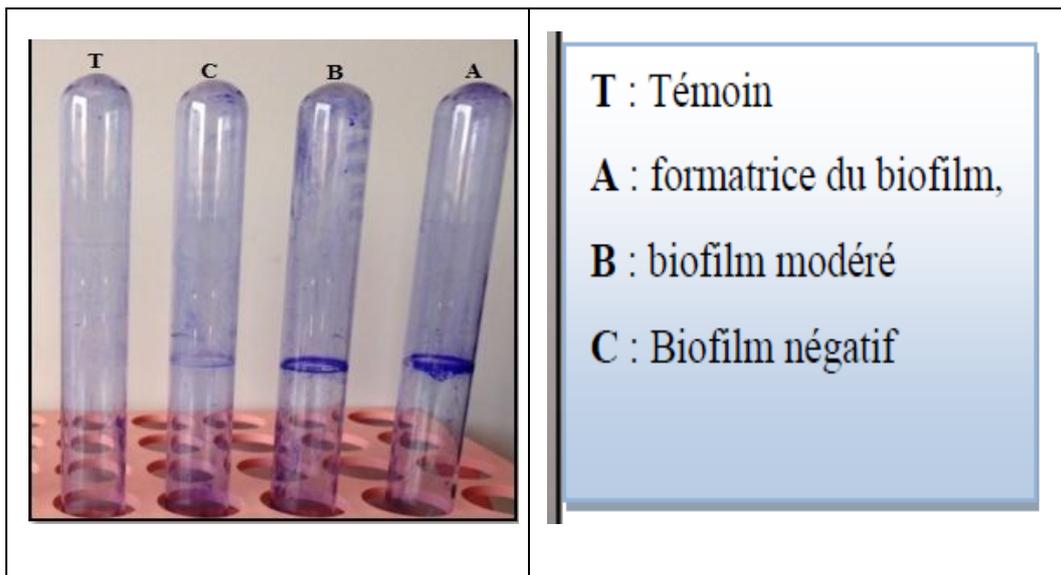


Figure 7. Evaluation de la production de biofilm par la méthode TM (Bellifa, 2014).

3. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA)

Selon Freeman *et al.*, (1989), la gélose Rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime (Nagaveni *et al.*, 2010 ; Kara Terki, 2014) (**Figure 8**).

Sur ce milieu les souches exprimant le Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA) donnent des colonies noires contre des colonies de couleur rouge pour les souches PIA négatives. Les souches à phénotype variable donnent des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Mathur *et al.*, 2006 ; Afreenich *et al.*, 2011 ; Rewatkar et Wadher, 2013 ; Bellifa, 2014).



Figure 8. Culture sur la gélose Rouge Congo (Hou *et al.*, 2012).

(A) RCA-positif souche de *S. epidermidis* (colonies noires), (B) RCA-positif souche de *S. aureus* (colonies noires), (C) RCA-négatif souche de *P. aeruginosa* (colonies rouges).

4. Le Biofilm Ring Test (BFRT)

Une nouvelle technique de détection et d'évaluation quantitative des biofilms : le Biofilm Ring Test (BFRT) technique décrite par Chavant *et al.* (2007) (Liesse Iyamba, 2012 ; Nagant, 2013) et développé par la Société Biofilm Control. Cette méthode devait permettre de suivre la formation de biofilm d'une façon simple et rapide, sans étapes de lavage ni de coloration (Perrin, 2009).

Elle permet de suivre de façon simple et rapide l'immobilisation de billes magnétiques par les cellules bactériennes adhérant au fond du puits. Plus les billes seront piégées, moins elles se déplaceront dans le champ magnétique et moins elles se regrouperont au centre du puits.

L'immobilisation des billes est secondaire soit au fait qu'elles sont «piégées» par des bactéries qui adhèrent au fond du puits, soit au fait que les propriétés rhéologiques du milieu sont modifiées. (Liesse Iyamba, 2012 ; Nagant, 2013) (Figure 9).

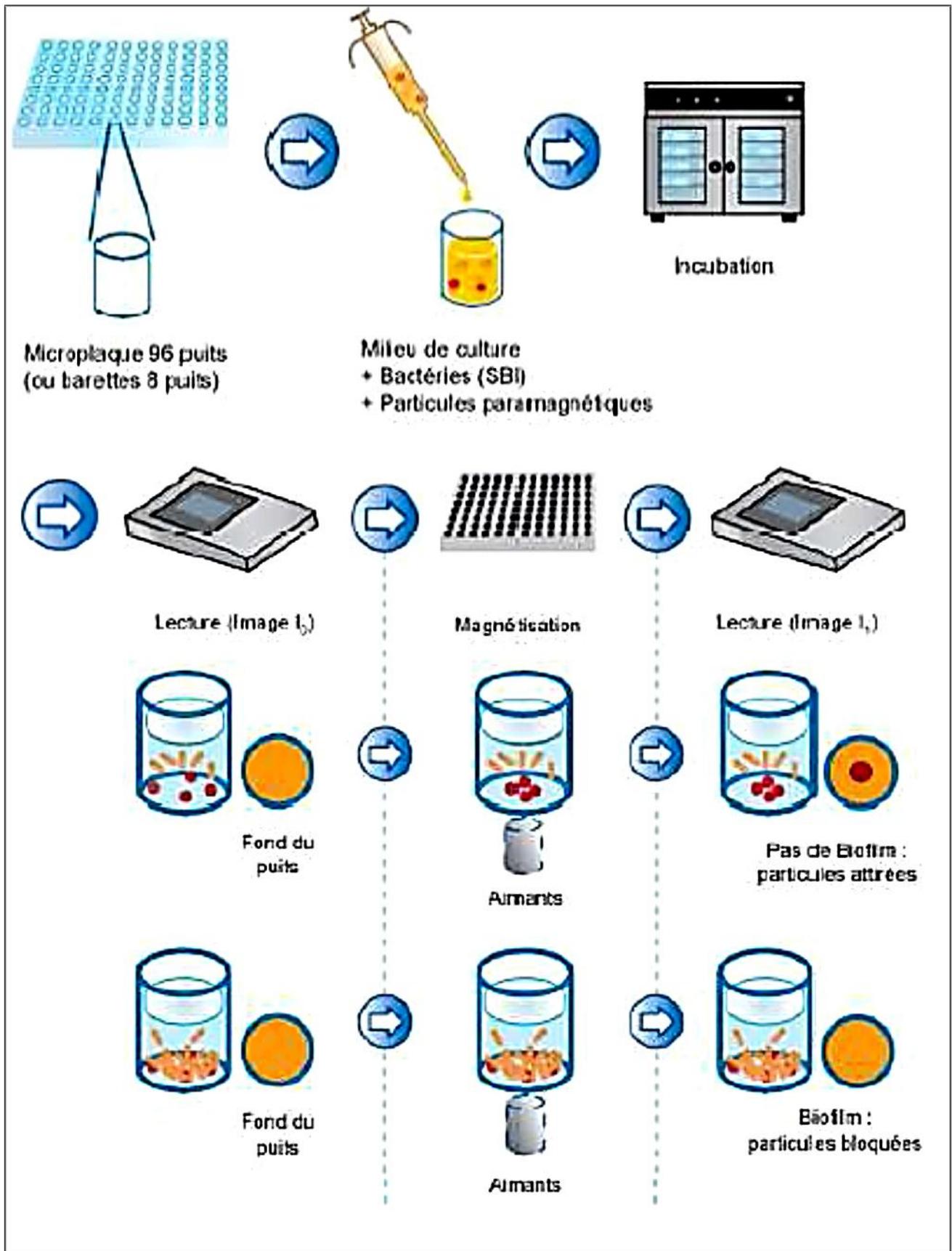


Figure 9. Le principe de Biofilm Ring Test (Perrin, 2009).

II. Matériel et méthodes

1. Origine des souches bactériennes

Sept souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* ont été sélectionnées pour cette étude, isolées de patients hospitalisés au niveau de Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Ben Badis de Constantine et l'établissement hospitalier spécialisé clinique d'urologie Néphrologie et transplantation Rénale, à partir de 15 Février jusqu'à 29 mai 2015.

Ces souches provenaient de prélèvements pathologiques suivants ; de sonde vésicale (N° 01), de cathéter sanguin (N° 02), de prélèvement de pus (N° 03), de plaie purulent (N° 04), des urines (N° 05, 06 et 07).

2. Isolement et identification de *Pseudomonas aeruginosa*

2.1. Isolement

L'isolement est pratiqué sur les milieux ; gélose nutritive, gélose au sang cuit (au chocolat), l'Hektoen et Chapman préalablement coulés en boîtes de pétri. Les milieux sontensemencés, en stries serrées sur la surface, de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation à 37 °C pendant 24 heures.

Le traitement des sondes urinaires et des cathéters sanguins nécessite une préalable immersion et incubation dans le bouillon cœur cerveau (BCC).

Des repiquages successifs sont effectués sur les milieux d'isolement d'origine afin de confirmer la pureté des souches pour entreprendre l'étape d'identification.

2.2. Identification

L'identification de *P. aeruginosa* est habituellement facile. Cette identification est basée sur :

2.2.1. Examen macroscopique des cultures

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. Seules les colonies caractéristiques du genre *Pseudomonas* seront prises en considération accompagnées par une odeur caractéristique de seringa.

La majorité des souches de bacille pyocyanique sont immédiatement repérées par la présence de leurs pigments.

2.2.2. Examen après coloration de Gram

La coloration de Gram permet non seulement d'observer la morphologie de cellules des *Pseudomonas* et leurs modes de regroupement, mais aussi de différencier ces bactéries à Gram négatif des bactéries à Gram positif. Les *Pseudomonas* apparaissent alors roses au microscope.

2.2.3. 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. La réaction est considérée comme étant positive après apparition d'une couleur violette.

Les cultures de *P. aeruginosa* présentent une réaction d'oxydase positive.

2.2.4. La pigmentation

Sur la plupart des milieux, *P. aeruginosa* élabore 2 pigments diffusibles (**Pellerin, 2006**) : la pyocyanine et la pyoverdine.

L'ensemencement est réalisé à partir d'une culture pure faisant des stries sur la pente de des deux milieux à savoir ; les géloses King A et King B. Par la suite, ces milieux sont incubés à 37 °C pendant 24 heures.

La pyocyanine (pigment bleu) est synthétisé par *P. aeruginosa* sur le milieu King A, alors que la pyoverdine (pigment jaune fluorescent) sur le milieu King B.

3. Étude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité de toutes les souches, vis-à-vis différentes familles d'antibiotiques, est testée par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations du CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) recommandées par l'OMS (**La standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, avec collaboration de l'OMS 6^{ème} édition, 2011**).

Le **tableau 4** suivant montre la liste des antibiotiques testés sur *P. aeruginosa* selon les recommandations du CLSI.

Tableau 4. Antibiotiques testés pour *Pseudomonas aeruginosa*.

N°	Antibiotique	Abréviation	Charge (µg)	Famille
01	Ticarcilline	TIC	75	β-Lactamines
02	Pipéracilline	PIP	100	
03	Céftazidime	CAZ	30	
04	Aztréonam	ATM	30	
05	Céfépime	FEP	30	
06	Imipenème	IPM	10	
07	Amoxicilline	AML	25	
08	Céfazoline	KZ	30	
09	Augmentin	AMC	30	
10	Céfoxitine	FOX	30	
11	Céfotaxime	CTX	30	
12	Ciprofloxacine	CIP	5	Fluoroquinolones

Procédure opératoire :

A partir d'une culture de 24 heures, trois colonies identiques des bactéries à étudier sont prélevées puis inoculées dans l'eau physiologique. L'écouvillon stérile est plongé dans la suspension bactérienne. Le sortir du tube en l'essorant doucement sur les parois internes de tubes afin de les décharger au maximum.

À l'aide d'un écouvillon, la boîte estensemencée sur toute la surface de la gélose par des stries serrées, en tournant la boîte trois fois de 60 °.

À l'aide d'une pince préalablement flambée, les disques d'antibiotiques sont appliqués sur la surface de la gélose. Les boîtes sont, ensuite, incubées pendant 24 heures à 37 °C.

Les différents diamètres des zones d'inhibition, obtenus autour des disques d'antibiotiques, sont mesurés. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par les recommandations de CLSI.

4. Détection de la formation de biofilm de *P. aeruginosa*

Afin de mettre en évidence la capacité de formation d'un biofilm, chez les sept isolats de *P. aeruginosa*, deux méthodes sont choisies à savoir ; la méthode standard de coloration au Cristal Violet (CV) et la méthode de culture sur gélose au Rouge Congo (RCA).

4.1. La détection par la technique de coloration au Cristal violet

Cette technique de quantification est parmi les méthodes indirectes d'estimation de la production de biofilm sur différents types de support (**Djordjevic *et al.*, 2002**). La coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci (**Musk *et al.*, 2005**).

Le tableau 5 ci-dessous répertorie les informations sur les différents tests de formation de biofilm effectués.

Tableau 5 . Tests de formation de biofilm effectués.

Test	Milieu de culture	Tubes	Incubation
01	Bouillon nutritif (BN)	En polystyrène de 5 ml	24 h
02		En polystyrène de 5 ml	48 h
03	Bouillon cœur cerveau (BCC)	En polystyrène de 5 ml	24 h
04		Tubes à vis en verre de 23 ml	7 jours

Une suspension bactérienne ($DO_{600} = 0,8$) est préparée, dans un tube BN ou BCC, à partir d'une culture de 24 heures de *P. aeruginosa* sur gélose nutritive.

La suspension est répartie dans des tubes en polystyrène de 5 ml à raison de 2 ml par tube ou dans des tubes en verre à raison de 7 ml par tube. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant des périodes déjà mentionnés dans **le tableau 5** .

Après chaque période d'incubation et pour chaque tube, l'absorbance de la culture bactérienne résultante est mesurée à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Après, chaque tube est soigneusement vidé de la culture bactérienne, et rincés 3 fois à l'eau distillée en vue d'éliminer les cellules planctoniques non adhérentes.

La biomasse fixée sur les parois du tube (formation de biofilm) est révélée après coloration à l'aide d'une solution aqueuse de cristal violet à 1 % (m/v). Après un temps de contact de 45 minutes, l'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'eau distillée (jusqu'à l'obtention des gouttes transparentes). Les tubes sont enfin égouttés et mis à sécher à l'air libre.

Le cristal violet fixé sur les parois du tube est solubilisé à l'aide d'une solution constituée d'un mélange éthanol-acétone (75 : 25). Après 1 heure du temps, l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La masse bactérienne accumulée au sein des biofilms formés est ainsi quantifiée. La quantité de colorant retenue étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries fixées.

4.2. La détection par la méthode de Rouge Congo agar (RCA)

Le Rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime et donnant des colonies noires sur milieu RCA contrairement aux colonies non productrices qui restent 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 ensuiteensemencé par des striés serrées à l'aide une anse de platine, à partir des cultures de 24 heures sur gélose nutritive, puis incubé à 37° pendant 24 heures à 48 heures.

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

III. Résultats et discussion

1. Isolement et identification de *Pseudomonas aeruginosa*

Sur une période de deux mois, des souche appartenant à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées et identifiées, après traitement de divers échantillons cliniques, dont sept souches seulement ont été sélectionnées à fin d'étudier leur capacité à former des biofilms.

Ces souches proviennent d'une multitude de prélèvements. Deux souches ont été isolés à partir de deux dispositifs médicaux différents à savoir une sonde vésicale et un cathéter sanguin (souches N° 01 et N° 02). Les autres souches proviennent de trois types de produits pathologiques ; deux souches proviennent respectivement d'un prélèvement de pus et d'une plaie purulent (N° 03 et N° 04) et le reste des souches a été isolé à partir des urines (N° 05, 06 et 07).

Les colonies suspectes de *P. aeruginosa* ont ainsi été isolées séparément sur les différents milieux de culture utilisés puis purifiées sur la gélose nutritive ordinaire pour une éventuelle identification. Cette dernière est basée essentiellement sur des examens macroscopiques et microscopiques.

Le **tableau 6** ci-dessous résume les aspects de colonies de *P. aeruginosa* sur les divers milieux de culture utilisés, l'aspect microscopique après coloration de Gram de même que le résultat d'oxydase.

Tableau 6 .Les résultats d'identification de *P. aeruginosa*.

Examen macroscopique	Milieu de culture	Aspect de colonies
	Gélose nutritive	Grandes colonies, convexes et lisses. Virage de la couleur de la gélose vers le vert dû à la production du pigment (Annexe 2.1). Les souches cliniques donnent généralement des colonies larges avec une odeur caractéristique de « acacia » ou « seringa ».
	Gélose Hektoen	Colonie grandes convexes et lisses. La couleur du milieu ne change pas ; la bactérie est non fermentaire (Annexe 2.2).
	Gélose King A	La couleur vire au vers bleu (Annexe 2.3).
	Gélose King B	La couleur vire au jaune (Annexe 2.3).
Examen microscopique	L'examen microscopique après coloration de Gram révèle la présence des bacilles, colorés en roses, longs et fins à extrémité effilée (Annexe 2.4).	
Test d'oxydase	Coloration violette, dû à la présence de l'enzyme oxydase, indiquant une réaction positive (Annexe 2.5).	

2. La sensibilité aux antibiotiques des souches isolées

La détection des phénotypes de résistance, des souches bactériennes isolées, a été réalisée en pratiquant la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé et les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du CLSI (**Annexe 3**).

Les profils de résistances déterminés montrent que les 07 souches de *P. aeruginosa* présentent différents comportements vis-à-vis les ATB testés. **Le tableau 7** montre les profils de résistances des souches étudiées.

Selon les profils déterminés, certaines souches sont sensibles et d'autres sont résistantes. Les souches 05, 06 et 07 présentent les taux de résistances les plus élevées notées pour cinq ATB testés. Contrairement aux autres souches, les souches 03 et 04 apparaissent sensibles à l'ensemble des ATB apparentant aux bêta-Lactamines et aux Fluoroquinolones.

Tableau 7. Les profils de sensibilités aux antibiotiques des souches étudiées.

Famille	N°	ATB	Souches de <i>P. aeruginosa</i>						
			S 01	S 02	S 03	S 04	S 05	S 06	S 07
β-Lactamines	01	TIC	R	R	S	S	/	S	/
	02	PIP	S	S	S	S	/	S	/
	03	CAZ	R	S	S	S	S	S	I
	04	ATM	R	S	S	S	R	S	I
	05	FEP	S	S	S	S	/	S	/
	06	IPM	S	S	S	S	S	S	S
	07	AML	S	S	S	S	R	R	R
	08	KZ	S	S	S	S	/	R	/
	09	AMC	S	S	S	S	R	R	R
	10	FOX	S	S	S	S	R	R	R
	11	CTX	S	S	S	S	R	R	R
Fluoroquinolones	12	CIP	S	S	S	S	S	S	R

/ : ATB non testé

3. Détection de la formation de biofilm de *P. aeruginosa*

C'est la croissance qu'on étudie dans les laboratoires de façon artificielle alors que le mode de développement naturel de la bactérie est la possibilité de se reproduire attachée grâce aux biofilms. Dans ces biofilms, il y a une communauté fonctionnelle, une collaboration entre les cellules tandis que la croissance planctonique correspond à un mode de dissémination.

Toutes les bactéries en générale et *P. aeruginosa* en particulier résident de manière prédominante sous la forme d'un biofilm (Nagant, 2013). Cette bactérie est l'une des bactéries les plus étudiées dans le contexte des biofilms (Musk *et al.*, 2005).

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 matériel (Méar, 2014).

Dans cette étude, la détection de la formation de biofilm de *P. aeruginosa* est basée sur deux techniques, couramment décrites dans ce contexte à savoir ; la coloration du biofilms formés au cristal violet(CV) et la méthode de culture sur rouge congo agar (RCA).Les différentes expériences ont été menées sur sept souches de *P. aeruginosa*.

3.1.La technique de coloration au CV

Cette technique de quantification est parmi les méthodes indirectes d'estimation de la production de biofilm sur différents types de substrats (Djordjevic *et al.*, 2002). La coloration absorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci (Musk *et al.*, 2005) (Annexe 4.1).

3.1.1. Formation de biofilms en bouillon nutritif

3.1.1.1.Formation de biofilms après 24 heures d'incubation

Après 24heures d'incubation à 37 °C sur polystyrène, la formation des biofilm a été exprimée en absorbances mesurées à 570 nm du colorant incorporé par les cellules formants des biofilms.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la capacité de toutes les souches de *P. aeruginosa* isolées à former des biofilms sur surface hydrophobe (polystyrène) après culture en bouillon nutritif (BN) (Annexe 4.2). L'observation visuelle des tubes montre que la formation du biofilm de *P. aeruginosa* se caractérise, 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 et en dessous de celui-ci. L'intensité de l'anneau formé est variable d'une souche à l'autre.

P. aeruginosa, une bactérie aérobie stricte, forme des biofilms à l'interface air-liquide (**Filoux et Vallet, 2003**), ce qui correspondant ici à la position des anneaux violets. Les travaux de **Musk et al. (2005)** ont montré que cette bactérie est capable de former des biofilms avec une densité cellulaire importante localisée à l'interface air – liquide.

Dans les conditions statiques de culture, la formation de biofilms à l'interface air – liquide fournit l'accès des bactéries à la phase gazeuse (oxygène) et à la phase liquide (éléments nutritifs) (**Constantin, 2009**).

La grande valeur d'absorbance est notée pour la souche 04 (DO = 0,340) à l'opposé de souches 03 et 07 qui ont donné de faibles valeurs (DO = 0,168 et DO = 0,141). Les valeurs de densités optiques des souches restantes S 05, S 02, S 01 et S 06 sont respectivement : 0,270 ; 0,253 ; 0,245 et 0,234. Les résultats de la formation de biofilms sur polystyrène en bouillon nutritif et après 24 heures d'incubation sont représentés dans **la figure 10**.

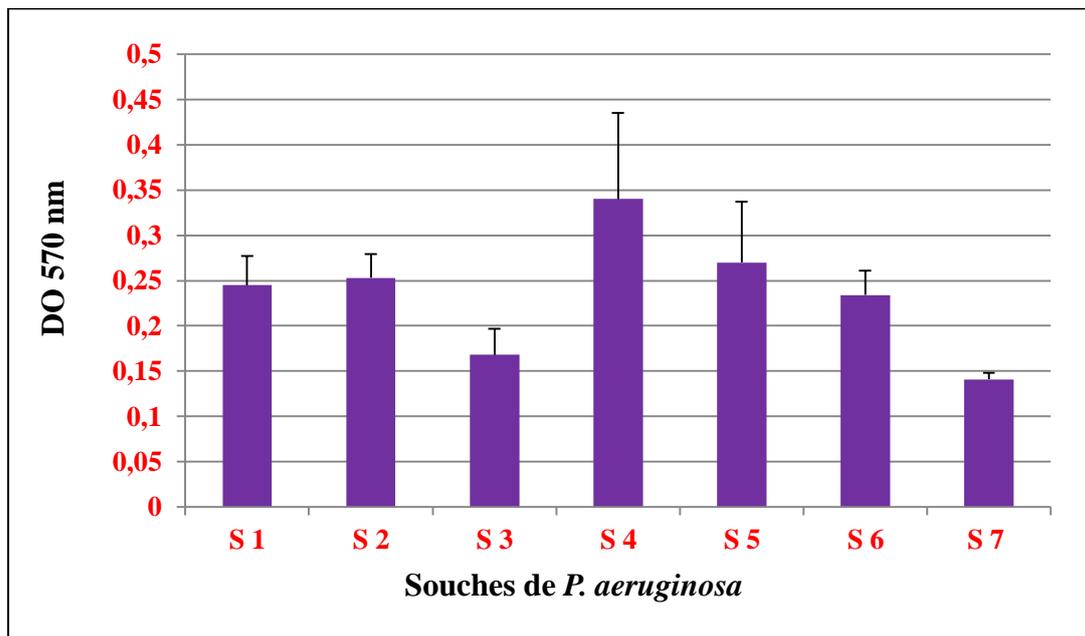


Figure 10. Formation de biofilms de *P. aeruginosa* sur polystyrène après 24 heures d'incubation en bouillon nutritif.

Dans la nature *P. aeruginosa* existe rarement sous forme planctonique, libre, mais plutôt sous la forme de biofilm (**Méar, 2014**). En 2014, **Saxena et al.** ont montré que sur 80 souches de *Pseudomonas*, isolées à partir de crachat, seulement 16 souches ont été de bonnes formatrices de biofilm par contre 47 ont donné une formation faible.

D'après nos résultats obtenus à l'issue de l'observation visuelle des tubes et celle de la mesure de DO 570, la souche 04 isolée à partir d'une plaie purulente (sensible aux ATB) peut être considérée comme de bonne formatrice de biofilm par rapport au reste des souches qui ont été soit des formatrices modérées (S 05, S 02, S 01 et S 06) ou de faibles formatrices comme les souches 03 (sensible aux ATB) et 07 (résistante aux ATB).

Les études de **Coban et al. (2009)** et **d'Oncel et al. (2010)** ont montré également la capacité des isolats cliniques de *P. aeruginosa* à produire des biofilms dont la détection a été basée sur la méthode de coloration au CV et avec des pourcentages significatifs.

Les biofilms formés sur les plaies peuvent retarder la cicatrisation de certaines plaies (**Delorne, 2012**) et l'éradication des biofilms bactériens pose de graves problèmes sur le plan médical puisque si les traitements ATB classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils s'avèrent bien moins probants sur les biofilms (**Filloux et vallet, 2013**).

Par ailleurs, et selon les résultats obtenus, le phénotype de résistance n'a rien avoir avec la formation de biofilm. Donc, pas forcément qu'une bactérie qui est notée comme bonne formatrice de biofilm soit résistante aux ATB et vice versa. Ce qui explique que la formation de biofilm est un phénomène complexe sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels: la surface, le milieu et les microorganismes (**Branger et al., 2007**).

La formation de biofilm chez *P. aeruginosa* est toujours en transition entre deux formes ; la forme fixée (biofilm) et la forme libre (planctonique). Afin d'évaluer la proportion de cellules planctoniques, non fixées sur polystyrène, les valeurs de densités optiques sont mesurées à 600 nm. La mesure doit se faire avant l'élimination de la culture bactérienne, une étape nécessaire avant d'entamer la coloration au CV.

Comme l'illustre **la figure 11** la souche 04 (la bonne formatrice de biofilm) enregistre le taux de cellules planctoniques le plus élevé (DO = 1,259) à l'inverse de la souche 06 (production moyenne de biofilm) avec un taux le plus faible (DO = 0,222). De même que la formation de biofilm, ces valeurs indiquent que la proportion de cellules non fixées est variable d'une souche à l'autre et elle n'est pas en corrélation directe avec les valeurs obtenues pour la formation de biofilm. Cette variabilité peut être en relation avec les conditions de croissance qui permettent ou non la formation de biofilm ainsi que la capacité de la souche elle-même à adhérer sur polystyrène (surface hydrophobe) et former un biofilm.

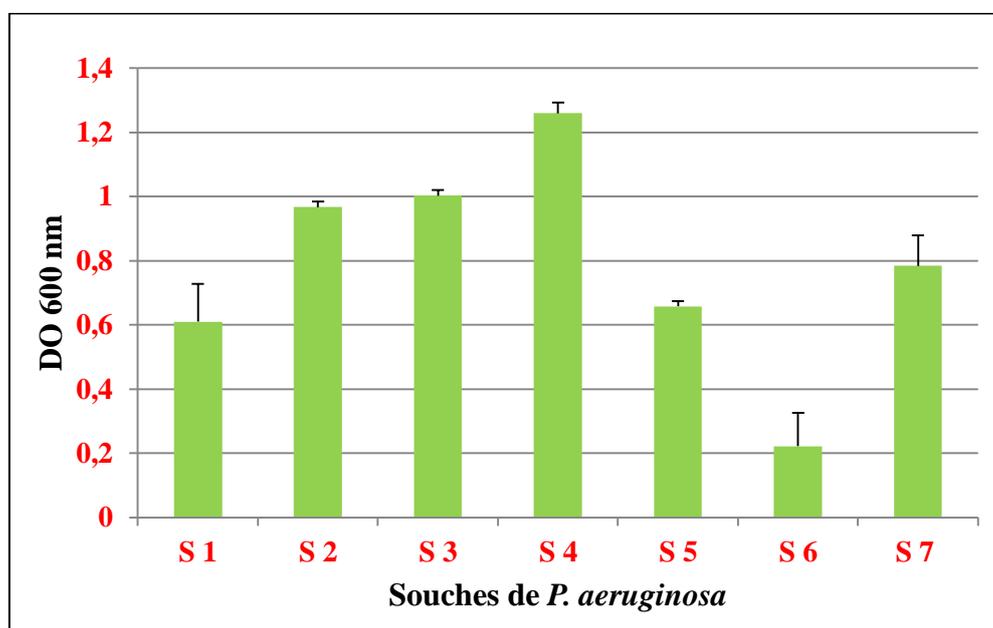


Figure 11. Croissance de *P. aeruginosa* sur polystyrène après 24 heures d'incubation en bouillon nutritif.

3.1.1.2. Formation de biofilms après 48 heures d'incubation

Après 48 heures d'incubation, les absorbances de CV en corrélation directe avec la formation de biofilm augmentent pour toutes les souches étudiées (**Figure 12**). Une augmentation significative importante est notifiée pour les souches 01 isolée à partir d'une sonde vésicale (DO = 1,435) et la souche 06 d'origine urinaire (DO = 1,318). La souche 07 reste la faible formatrice même après 48 heures.

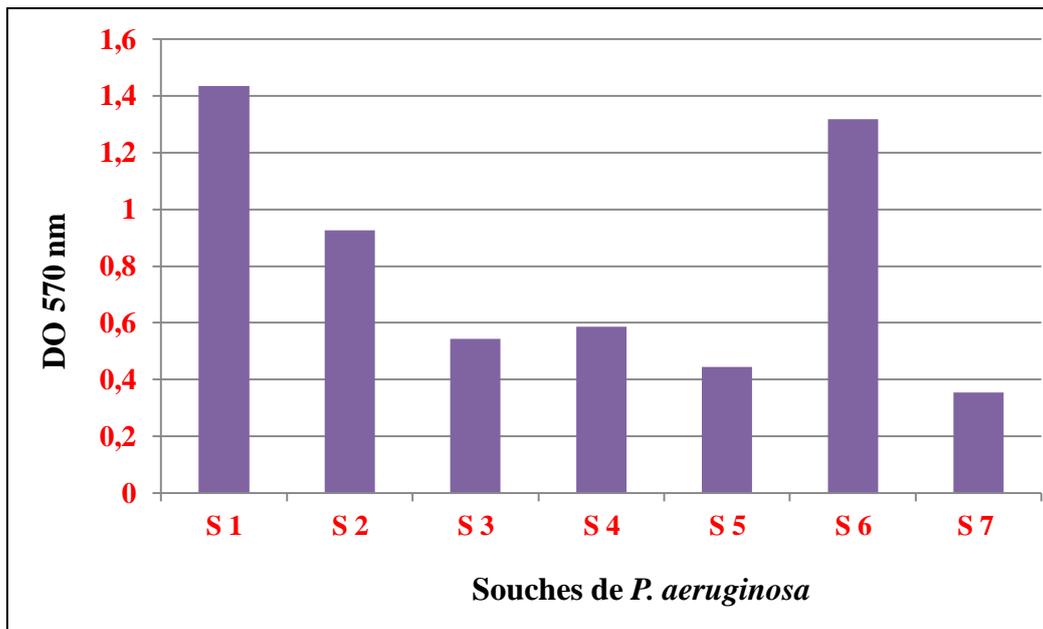


Figure 12. Formation de biofilms de *P. aeruginosa* sur polystyrène après 48 heures d'incubation en bouillon nutritif.

P. aeruginosa a la capacité de former des biofilms à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux tels que les sondes urinaires, ce qui pose un véritable problème de santé publique pour les personnes nécessitant ces implants (**Roux et Ghigoen, 2006 ; Chalvet de Rochemoteix, 2009**).

Le mécanisme de formation de biofilm sur une sonde urinaire est simple une fois la sonde posée, un film protéique va se déposer à sa surface et favoriser la fixation de micro-organismes et par conséquent entraîner la formation d'un biofilm. Une fois que les bactéries ont colonisé la sonde et l'uro-épithélium, elles doivent s'adapter à l'environnement formé par le tractus urinaire et se procurer des nutriments (**Chalvetde Rochemonteix, 2009**).

Ces observations sont en accord avec celles rapportées par **Nagant (2013)**, qui indiquent que lors de la détection de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* en fonction du temps, que la formation de biofilm varie entre souches et que les valeurs d'absorbances CV de toutes les souches étudiées augmentent après une longue incubation en particulier 48 heures.

La figure 13 montre aussi une augmentation dans les valeurs de densités optiques des cellules planctoniques, obtenues après 48 heures d'incubation, pour l'ensemble de souches étudiées. Par ailleurs, il n'existe aucune corrélation entre les résultats de la formation de biofilm et ceux des cellules planctoniques. En définitive, la proportion de cellules fixées et toute à fait différente de la proportion de cellules non fixées.

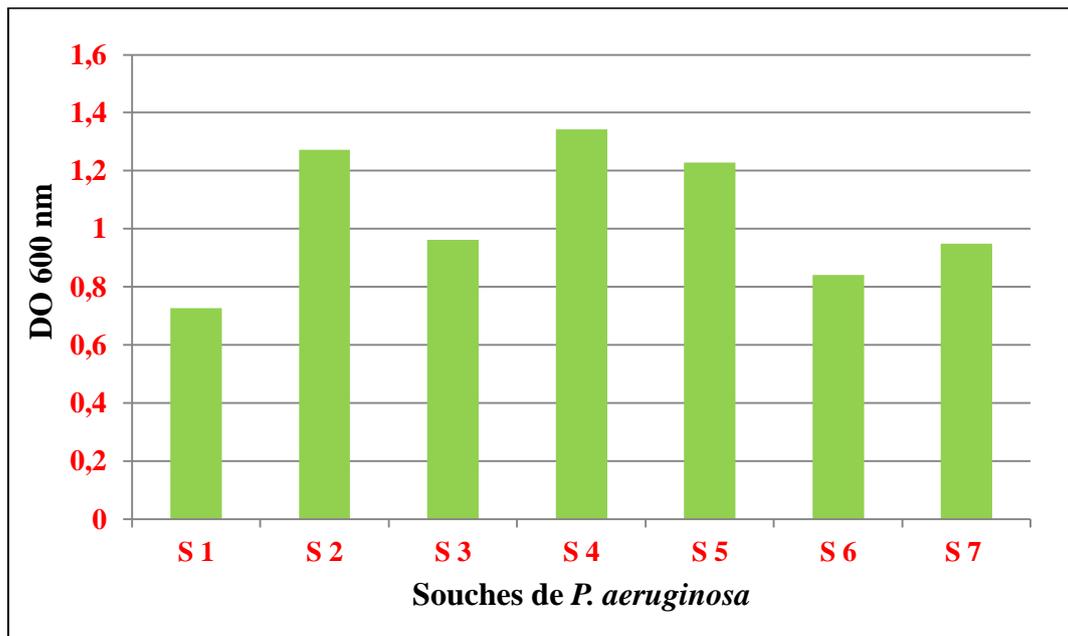


Figure 13. Croissance de *P. aeruginosa* sur polystyrène après 48 heures d'incubation en bouillon nutritif.

3.1.2. Formation de biofilms en bouillon cœur cerveau

3.1.2.1. Formation de biofilm après 24 heures d'incubation sur polystyrène

Les résultats de la formation de biofilms obtenus, après 24 heures d'incubation en milieu cœur cerveau (BCC) sont illustrés par la figure 14.

Ces résultats révèlent que les souches étudiées sont capables de former des biofilms également sur le BCC. La souche 04 reste la bonne formatrice (DO = 0,468) tandis que la souche 07 la faible formatrice (DO = 0,077). Les autres valeurs d'absorbance de CV s'avèrent intermédiaires pour les autres souches.

En outre, ces résultats montrent que le milieu BN a donné des formations importantes de biofilm en comparaison avec le BCC sauf pour le cas de la souche 04. Cette différence peut être expliquée par les différences de besoins de cellules formatrices de biofilm et les cellules planctoniques en ce qui concerne les éléments nutritifs.

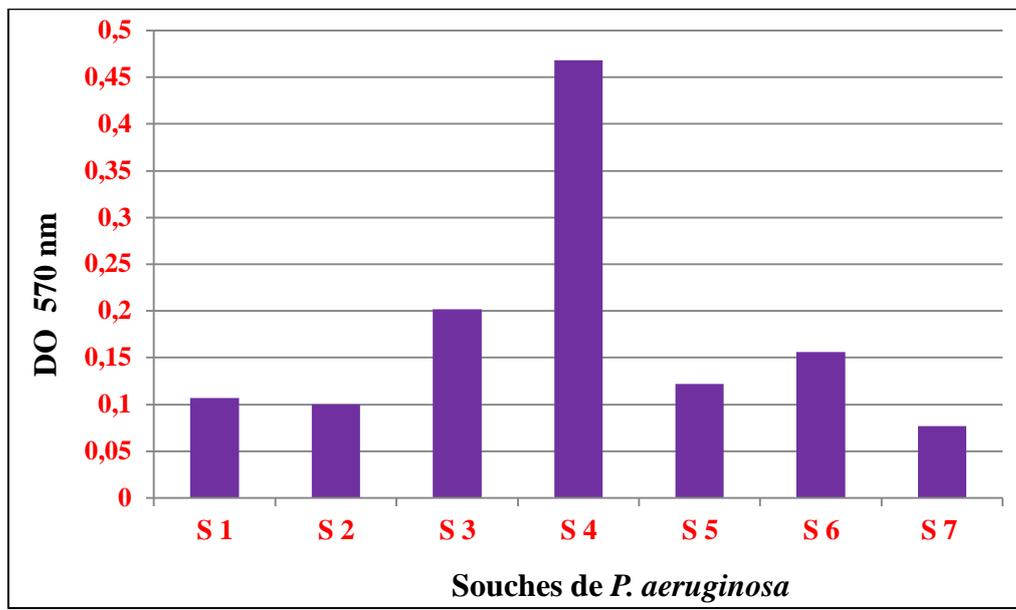


Figure 14. Formation de biofilms de *P. aeruginosa* sur polystyrène après 24 heures d'incubation en bouillon cœur cerveau.

L'état planctonique de *P. aeruginosa* sur milieu BCC est représenté par la **figure 15**. Cette dernière indique que les valeurs d'absorbances des cellules non formatrices de biofilms sont variables en fonction des souches testées. De même que pour la formation de biofilm, aucune amélioration dans la croissance de souches n'a été obtenue après changement de milieu de culture sauf pour trois souches à savoir ; 01, 05 et 07.

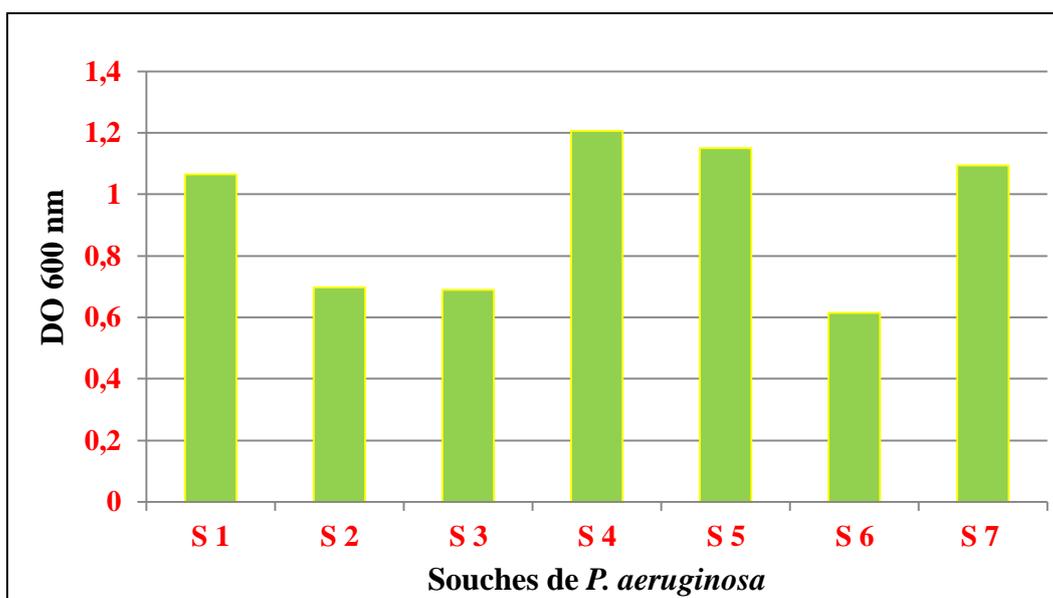


Figure 15. Croissance de *P. aeruginosa* sur polystyrène après 24 heures d’incubation en bouillon cœur cerveau.

3.1.2.2. Formation de biofilm après une semaine d’incubation sur verre

Dans ce cas, les tubes en polystyrène ont été changés par des tubes en verre (support hydrophile) mais la durée d’incubation est prolongée à une semaine. Après cette période d’incubation en BCC, des anneaux visuelles de couleur violette à l’interface air-liquide sont clairement observés (**Annexe 4.3**).

L’interface solide-liquide entre les parois des tubes et le milieu aqueux fournit un environnement idéal pour l’attachement et la formation de biofilm. Selon **Elyajouri (2012)**, les biofilms se forment à l’interface surface-liquide mais peuvent également être observés à l’interface air-liquide. Nos résultats confirment ces données dont les souches testées ont réussi à former des biofilms à l’interface air-liquide et même à l’interface surface-liquide ; soit au fond des tubes ou sur les parois.

Comme le montre **la figure 16**, le prolongement de la durée d'incubation a permis une formation significative de biofilm sur le verre avec des valeurs importantes différentes à celles obtenues dans les trois essais précédents. Les souches 06 et 04 ont été les bonnes formatrices de biofilms sur le verre avec des valeurs respectives de 0,963 et 0,917. Dans ce cas, la valeur de DO la plus faible est donnée par la souche 05 ; 0,548.

P. aeruginosa possède les mécanismes qui lui permettant de résister naturellement à de nombreux agents antibactériens, de coloniser les surfaces inertes et les épithéliums, de former des biofilms protecteurs (Essoh, 2014).

Il est admis que les micro-organismes se fixent plus facilement sur des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le téflon ou d'autres matières plastiques que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (Liesse iyamba, 2012). Chez *P. aeruginosa*, les facteurs d'attachement sont essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques, comme le verre (Bricha *et al.*, 2009).

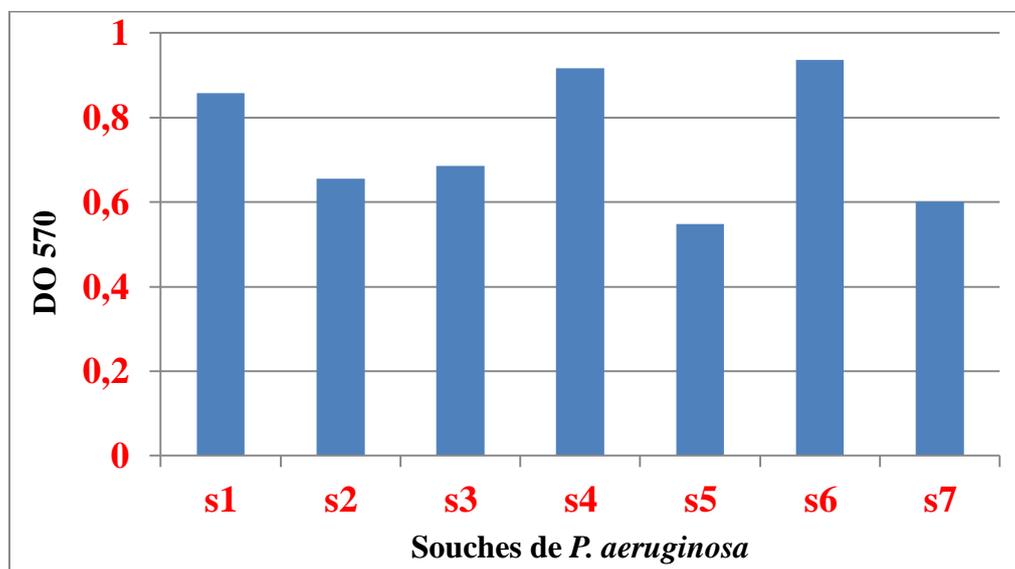


Figure16. Formation de biofilms de *P. aeruginosa* sur verre après 7 jours en bouillon cœur cerveau.

3.2.La méthode de culture sur rouge Congo agar (RCA)

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

Les 7 souches de *P. aeruginosa* isolées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à produire de slime sur milieu rouge Congo, Les souches productrices de slime avaient un phénotype variable ou positif (Annexe 4.4). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau8 suivant :

Tableau 8. Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

Souches	Couleur de colonies	Phénotype (slime)
S 01	Noire	Positive (+)
S 02	Grise	Positive (+)
S 03	Rose	Négatif (-)
S 04	Rose	Négatif (-)
S 05	Rose	Négatif (-)
S 06	Noire	Positive (+)
S 07	Rouge	Négatif (-)

Après 48heures d'incubation, la production de slime est remarquée respectivement chez les souches S 01, S06 et la S02 à l'opposé des autres souches exprimant un phénotype négatif. Les souches productrices de slime donnent des colonies soit de couleur noire (01 et 06) ou grise (02) par contre les non productrices donnent des colonies de couleur rose (03 et 05) ou rouge(07).

La méthode de RCA est couramment employée pour détecter la formation de biofilms chez les isolats cliniques. D'après les résultats obtenus, les souches productrices de slime sont les mêmes souches donnant des valeurs d'absorbances CV importantes après 48 heures d'incubation en BN à savoir la souche 01, souche 06 et ensuite la souche 02.

L'analyse des résultats montre que la méthode de coloration au CV a permis de mettre évidence une formation de biofilm variable chez l'ensemble de souches étudiées en comparaison avec la méthode de RCA qui a permis de détecter la formation de biofilms chez seulement 03 souches. Ces résultats sont semblables à ceux rapportés par plusieurs travaux traitant les biofilms de *P. aeruginosa* tels que l'étude de **Filloux et Vallet (2003)**.

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

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

Conclusion :

P. aeruginosa a fait l'objet d'études assez complètes et informatives sur les mécanismes moléculaires qui interviennent lors du développement d'un biofilm.

P. aeruginosa, une bactérie à Gram négatif, est la cause majeure d'infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés. Parmi les quelles 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.

Dans cette étude, sept souches de *P. aeruginosa* ont été isolées à partir de différents types de prélèvements cliniques ; à partir d'une sonde vésicale (S 01), d'un cathéter sanguin (S 02), d'un prélèvement de pus (S 03), d'une plaie purulente (S 04) et à partir des urines (S 05, S 06, S 07). L'identification de *P. aeruginosa* a été effectuée selon les méthodes conventionnelles. Ses souches ont fait l'objet de l'étude de leurs profils de résistance aux ATB ainsi que leur capacité à produire des biofilms *in vitro* selon deux méthodes à savoir la méthode de coloration des biomasses fixées au CV et la méthode de détection de slime sur rouge congo agar (RCA).

L'étude de l'antibiorésistance a montré que les souches 05, 06 et 07 sont les plus résistantes contrairement aux souches 03 et 04 qui apparaissent sensibles à l'ensemble des ATB testés.

D'autre part, les résultats obtenus, à l'issue de la méthode de CV, ont montré que toutes les souches de *P. aeruginosa* testées ont la capacité de produire des biofilms principalement à l'interface air – liquide des tubes, sous forme des anneaux visibles après coloration au CV. Les DO mesurées après 24 heures et après solubilisation de CV fixés, ont révélé que la souche 04, précédemment isolée à partir d'une plaie purulente, était fortement formatrice de biofilm sur les deux milieux BN et BCC tandis que la souche 07 était faiblement formatrice.

Le comportement de différentes souches, en ce qui concerne la production de biomasses fixées, varie également en fonction du milieu de culture (BN ou BCC) ainsi que la période d'incubation (24 h ou 48 h). En effet, ces résultats ont indiqué que le milieu BN a donné des formations importantes de biofilm en comparaison avec le BCC sauf pour le cas de la souche 04.

Les termes de bactéries sessiles (biofilm) et planctoniques décrivent des micro-organismes respectivement adhérents à une surface et libres dans une suspension. En effet, alors que les bactéries se divisent à l'échelle de quelques minutes dans leur état planctonique, elles arrêtent ce processus pendant des heures lors de leur attachement à une surface. Pendant cette période, se produisent de nombreux changements qui assurent la transition vers la phase biofilm.

Effectivement la forme planctonique de chaque souche étudiée a été évaluée en mesurant les DO à 600 nm avant d'entamer la méthode de coloration au CV. Les valeurs obtenues ont montré que la proportion de cellules non fixées est variable d'une souche à l'autre.

Il est généralement admis que les surfaces hydrophobes (comme le polystyrène) sont plus favorables à l'adhésion de bactéries que les surfaces hydrophiles (comme le verre). Le prolongement de la durée d'incubation a permis une formation significative de biofilm sur le verre avec des valeurs importantes.

Par ailleurs, les résultats obtenus à l'issue de la méthode RCA révèlent que les souches isolées à partir des implants médicaux ; sonde et cathéter (S 01 et S 02) et à partir d'un échantillon d'urine (S 06) ont donné des résultats positifs par production de slime après 48 heures d'incubation sur RCA, à l'opposé du reste des souches qui n'ont pas la capacité de produire de slime sur le même milieu. De plus, les résultats de cette méthode ont indiqué que seulement trois souches sont productrices de biofilm contre toutes les souches selon la méthode CV.

L'éradication d'un biofilm bactérien pose de gros problèmes cliniques, car l'antibiothérapie active habituellement sur les bactéries à l'état planctonique se révèle bien souvent moins efficace sur des structures organisées en biofilm. Il devient pourtant essentiel d'améliorer nos connaissances sur les mécanismes impliqués dans la formation de biofilm, afin de trouver de nouveaux moyens de prévenir ou de traiter les infections associées aux biofilms. Les approches expérimentales classiques pour étudier les bactéries d'intérêt médical doivent être adaptées à l'étude de leur mode de vie complexe en biofilms.

Références bibliographiques:

A

- Aissa K. (2012). Profil de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques aux services de réanimation à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de rabat entre 2006 et 2010. 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.
- Auger M. (2012). Formation de biofilm in vitro par des souches cliniques d'*Escherichia coli* : impact de la modification des conditions expérimentales. Thèse de doctorat. Université de Nantes, France.

B

- Barakat R. (2012). Etude des propriétés biologiques et antimicrobiennes de la pyocyanine, pigment redox-actif produit par *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université de La Rochelle de France
- 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.
- Ben Haj Khalifa A., Moissenet D., Vu Thien H., Khedher M. (2011). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. Ann Biol Clin; 69(4) : 393-403.
- Besassier R., Califano J., Carrette M. et Lombardo M. (2005). La lutte antibactérienne. *Université Nice Sophia Antipolis*.
- 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.

C

- Cattoen C. (2009). Epidémiologie des infections à *Pseudomonas*. Duacai, Valenciennes.
- Chaibdraa A., Medjellekh M.S., Saouli A. Et Bentakouk M.C. (2008). Le *Pseudomonas*: Expérience du Centre des Brûles D'Annaba et Revue de la Littérature. Ann Burns Fire Disasters. 21(4): 210–218.

- Chaieb K., Mandouani K., Bakhrouf A. (2005). Detection of icaA and icaD loci by Polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit, *Journal of Hospital Infection*, (61) 225-230.
- Chalvet de Rochemonteix A. (2009). Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'alfort Paris.
- Clave D. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*. Fiche technique bactériologie. Laboratoire de bactériologie hygiène CHU Toulouse, France, 4p.
- Coban A., Ciftci A., Onuk E., Erturan Z., Tanriverdi C.Y., Durupinar B. (2009). Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *Mikrobiyol. Bul.* 43 : 563-573.
- Constantin O.E. (2009). Bacterial biofilms formation at air liquid interfaces. *Innovative Romanian Food Biotechnology*; 5: 18– 22.
- Costerton J.W., Stewart Philip S. ET Greenberg E.P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 284: 1318 – 1322.

D

- Delarras, C. (2007). *Pseudomonas* et *ex-Pseudomonas*. Dans : *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Edition médicales internationales, Paris : Technique Et Documentation Lavoisier, Vol.1: p339-340. ISBN-10: 2743009454, ISBN-13: 978-2743009458.
- 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.
- Djordjevic D., Wiedmann M. And Mclands borough L.A. (2002). Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and environment al microbiology*; Vol. 68, No. 6: 2950– 2958.
- Djordjevic D., Wiedmann M. and Mclandsborough L.A. (2002). Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied And Environnemental Microbiology*; Vol. 68, No. 6 : 2950– 2958.
- Donlan R.M. (2001). Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases*; 33: 1387– 1392.
- Donlan R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*; 8, 9: 881– 890.
- Dubois. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* : réservoir, virulence et résistance. Laboratoire de Microbiologie, UMR CNRS 5234 « Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité ».

E

- Elyajouri A. (2012).Actualités des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- Souissi faculté de médecine et de pharmacie – Rabat.
- 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

- Faure K., Kipnis E., Guery B. (2007). Pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa*. .Mapar. Pathologies infectieuses : 547 - 563.
- Filloux A. Et Vallet I., (2003). Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. Médecine / Sciences, 19, 77-83.
- Filopon D. (2005).mécanismes de régulation impliqués dans la pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* : système de sécrétion de type III, Epigenèse et quorum sensing. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier – Grenoble I, France.

H

- Haras D. (2005) .Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. Matériaux & Techniques 93, 27–41 Hors-Série.
- Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M. (2011) Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz J Infect Dis.15 (4):305-11.
- Herard A. (1998). Rôle du biofilm en urologie. Progrès en Urologie ; 8 : 413– 414.
- Hou W., Sun X., Wang Z. et al., (2012), Investigative Ophthalmology& Visual Science, the Association for Research in Vision and Ophthalmology. (53) : 9. 5624.5631.
ISBN : 978- 2 -84444-558 -2.
ISBN : 978-27440-7209-3.

K

- Kara Terki, I. (2014). Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de *staphylocoques* isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- 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.
- Klein G. (2011). Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale, Bretagne.

- Kukavica-Ibrulj I. (2007). Chapitre 1. Introduction. Collection mémoires et thèses électroniques .Université Laval. Québec, Canada.

L

- Liesse Iyamba J-M. (2012).Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France

M

- Madigan M. Et Martinko J. (2007).diversité des procaryotes : les bacteria. Dans : biologie des micro-organismes. Pearson 11^éédition .Paris, France.P.333 – 411.
- Marchal M. (2010).Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat .Université de Strasbourg, France.
- 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
- Méar J-B. (2014). Étude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Thèse de doctorat. Université Lille nord de France, France.
- Mérens A., Jault P., Bargues L., Cavallo J.-D. (2013). Infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Résumé. Elsevier Masson SAS.
- Mesaros N. *et al.* (2007). *Pseudomonas aeruginosa* : Résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire.126, 8 : 305-316.
- Mezaache S. (2012).Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de la Rhizosphère de la pomme de terre. Université Ferhat Abbas, Sétif.
- Muller A.et Guaguere E. (2014).L'Antibiothérapie n'est pas la seule source d'antibiorésistance : notion de biofilm. Conflits AFVAC. Médecine interne / maladies infectieuses. Paris - la Défense.
- Musk D.J., Banko D.A., and Hergenrother P.J. (2005). Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. Chemistry & Biology; Vol. 12: 789– 796.

N

- Nagant C. (2013). Contribution à la recherche de nouveaux agents antibactériens actifs sur les biofilms de *P. aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.
- 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.

O

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

P

- Parot S. (2007). Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de doctorat. L'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- Pecastaings S. (2010). Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.
- Pellerin J.L. (2006). Les Genres *Pseudomonas* et *Burkholderia*. Unité de Microbiologie-Immunologie. Libre Livre.
- Périnet S. (2014). Génomique fonctionnelle du gène mod A essentiel à l'infection pulmonaire chronique chez *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de Magister. Université Laval .Québec, Canada.
- Perrin, C. (2009). Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'*Escherichia coli* K-12. L'Université Lyon I - Claude Bernard, France.

R

- Rewatkar A. R., Wadher B. J. (2013). *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*- Biofilm formation Methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. Volume 8, Issue 5 (Nov. – Dec. 2013), PP 36-40.
- Roux A. Et Chigo J-M. (2006). Les biofilms bactériens. Communication, *Bull. Acad. Vét*, 261-268.

S

- Saussereau E. (2013). Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité. Thèse de doctorat d'Université Pierre et Marie Curie. Paris VI.
- Saxena S., Banerjee G., Garg R., Singh M. (2014). Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Vol-8(5): 09-11.
- Smahi A. (2008). Contrôle biologique de la Fusariose vasculaire de la Tomate causé par *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*. Thèse de Magister. Université d'Oran Es-Senia, Algérie.
- Stickler D.J. (2008). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nature clinical practice Urology*; 5 no 11: 598 - 608.

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

Annexes 1 : Préparation de solutions et milieu de culture

- **Solutions**

- **Cristal violet (1%)**

Cristal violet.....	1 g
Eau distillée.....	100 ml

- **Solution éthanol-acétone (75 : 25)**

Ethanol.....	75 ml
Acétone	25 ml

- **Milieux de culture solides**

- **Milieu Rouge Congo Agar (RCA)**

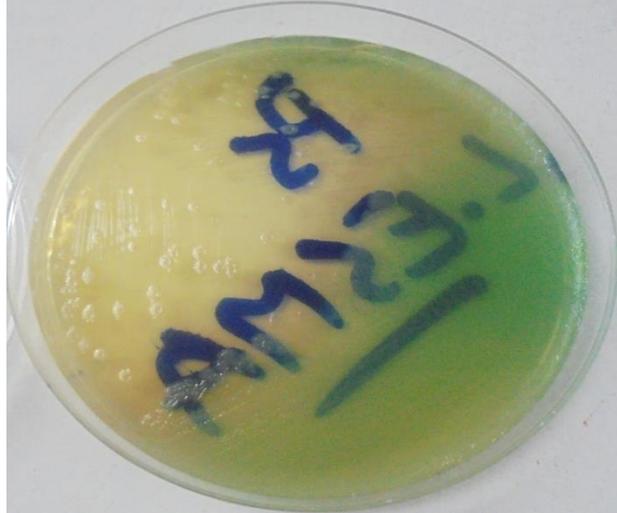
BHIB.....	37 g
Saccharose.....	50 g
Agar.....	10 g
Rouge Congo.....	0.8 g
Eau distillée	1000 ml

pH= 7,4

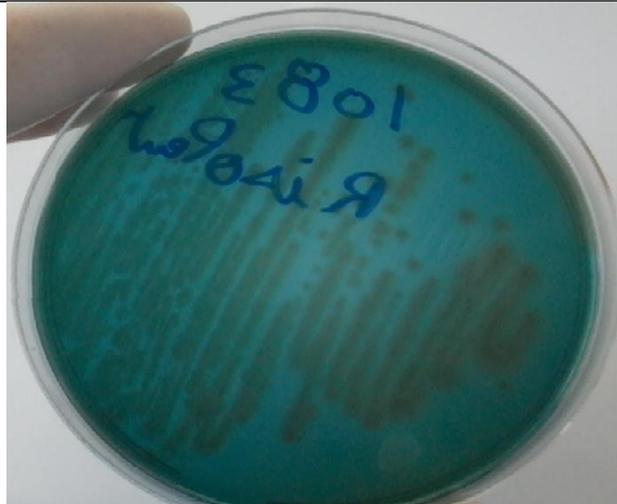
Stérilisation à l'autoclave : 121°C pendant 15 minutes

Annexes 2 : Résultats d'isolement et d'identification de *Pseudomonas aeruginosa*

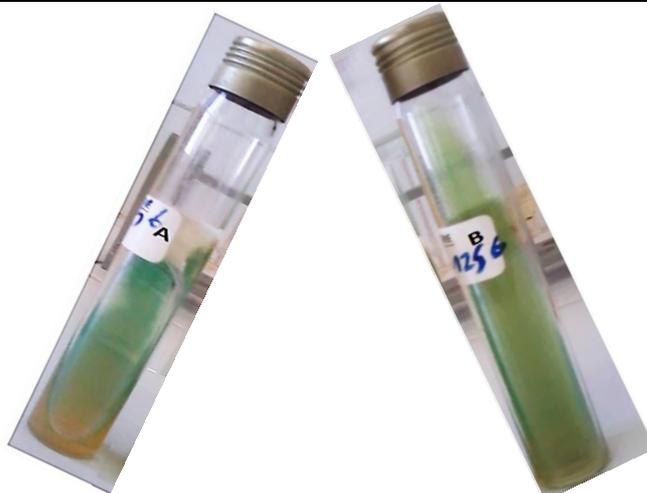
Annexe 2.1. Culture de *P. aeruginosa* sur gélose nutritive



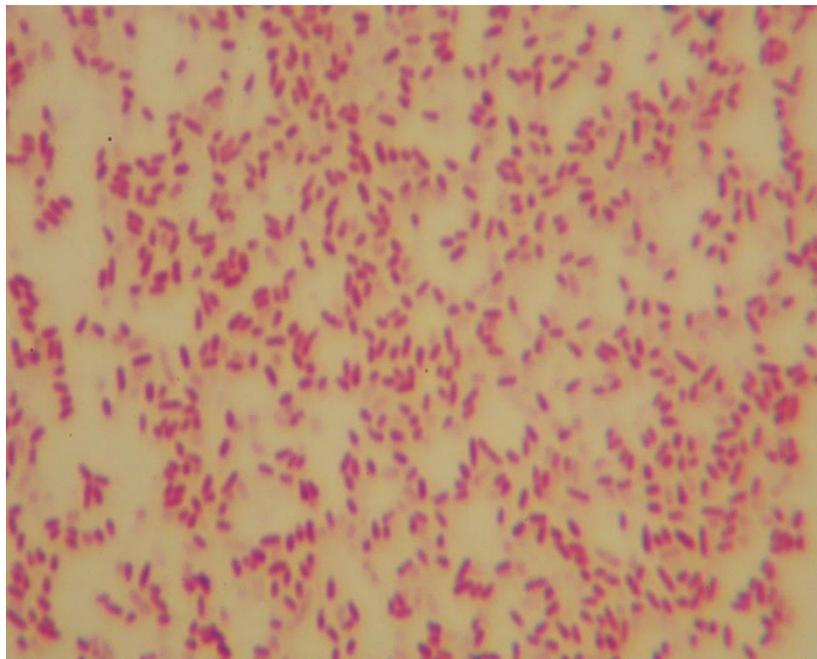
Annexe 2.2. Culture de *P. aeruginosa* sur gélose Héктоen



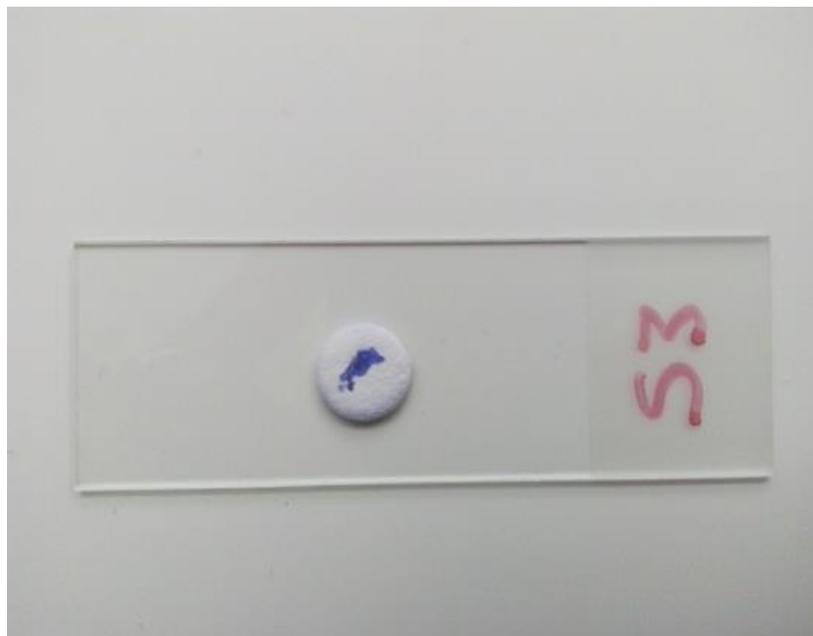
Annexe 2.3. Culture de *P. aeruginosa* sur géloses inclinés King A et King B

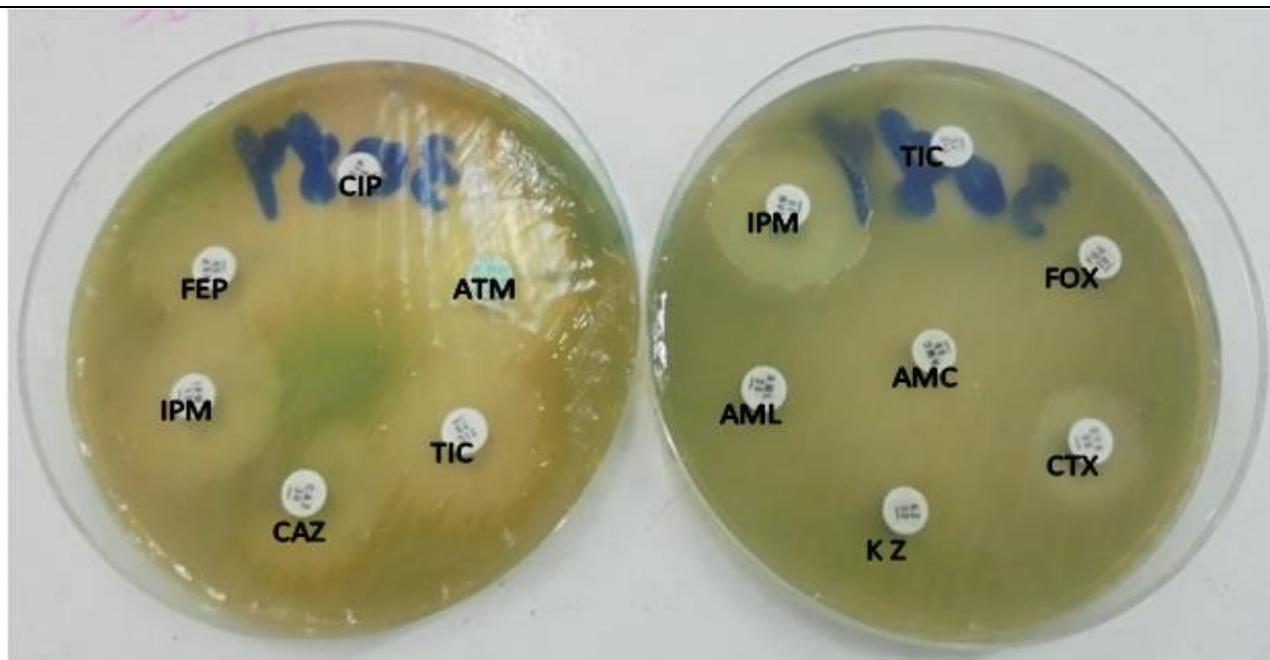


Annexe 2.4. Aspect microscopique des cellules de *P. aeruginosa*
(Grossissement 10X 100)



Annexe 2.5. Résultat de test de l'oxydase



Annexes 3 : Antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*Annexe 3.1. Antibiogramme d'une souche de *P. aeruginosa*Annexe 3.2. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *P. aeruginosa*

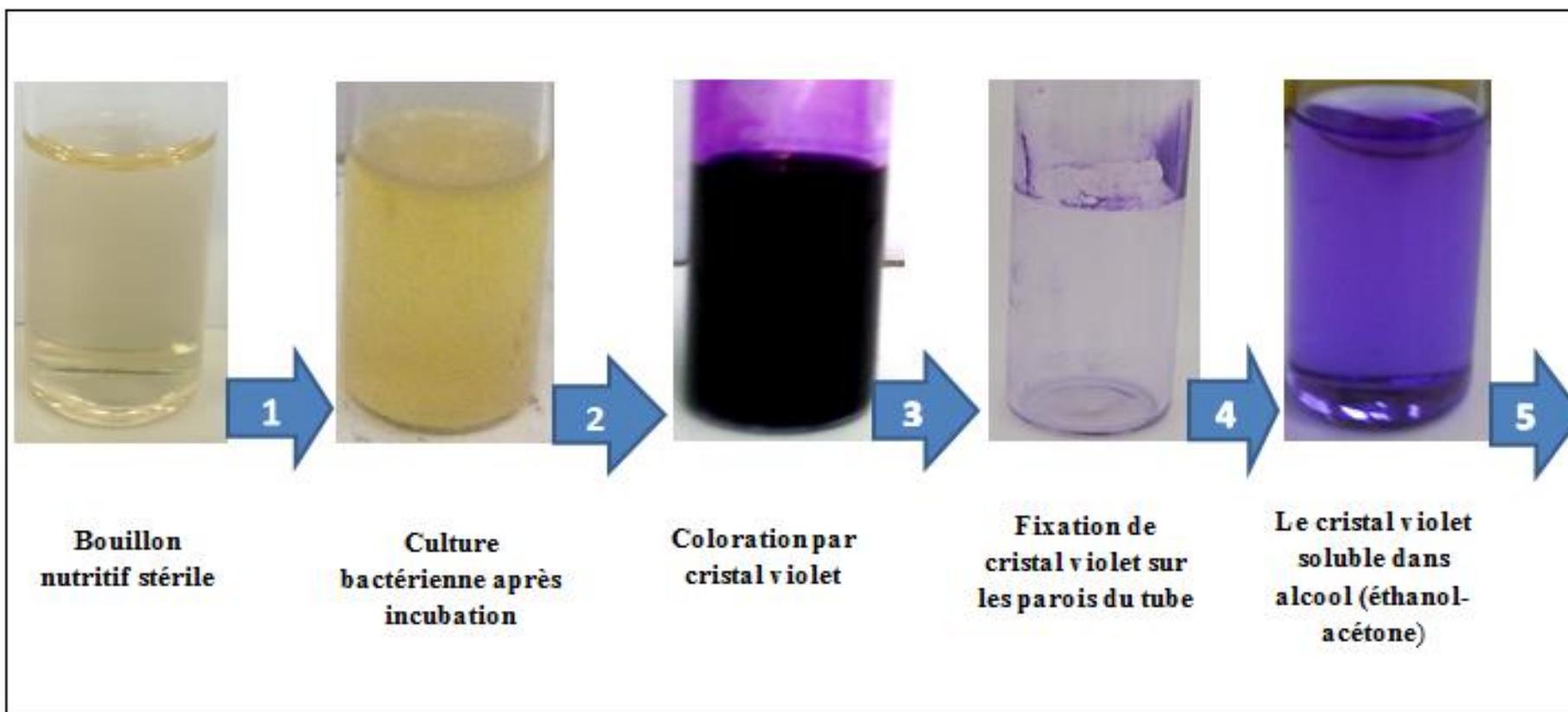
Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Ticarcilline	75 µg	≤ 15	16 - 23	≥ 24
Ticarcilline + ac. Clavulanique	75 / 10 µg	≤ 15	16 - 23	≥ 24
Pipéracilline	100 µg	≤ 14	15 - 20	≥ 21
Céftazidime	30 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18
Aztréonam	30 µg	≤ 15	16 - 21	≥ 22
Imipénème	10 µg	≤ 15	16 - 18	≥ 19
Amikacine	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Nétilimicine	30 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Tobramycine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 15	16 - 20	≥ 21
Lévofloxacine	5 µg	≤ 13	14 - 16	≥ 17
Fosfomycine
Colistine	10 µg	≤ 10	≥ 11

Tableau extrait du Document M100 – S24.Vol. 34, n°1. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; twenty-fourth informational supplement.
Extraits des recommandations 2014 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

Annexe 4 : Résultats de la formation de biofilm

Annexe 4.1. Evaluation de la production de biofilm par la méthode CV

(1) Inoculation / Croissance, (2) Lavage 3 fois et coloration au CV, (3) Lavage jusqu'à l'obtention des gouttes transparentes /égouttés et mis à sécher à l'air libre, (4) Solubilisation du CV fixé par un mélange d'éthanol-acétone 75 / 25 pendant une heure, (5) Quantification au spectrophotomètre.

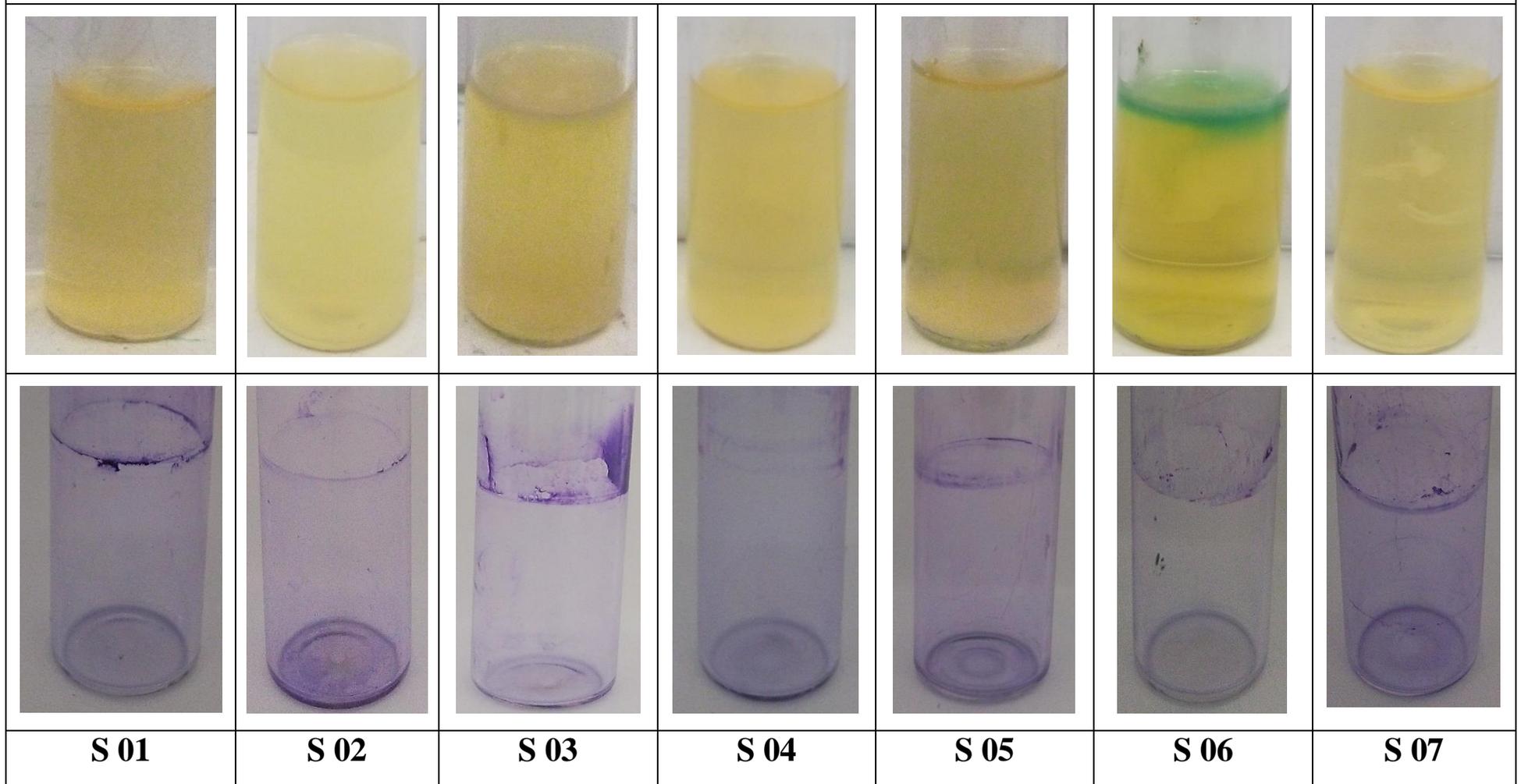


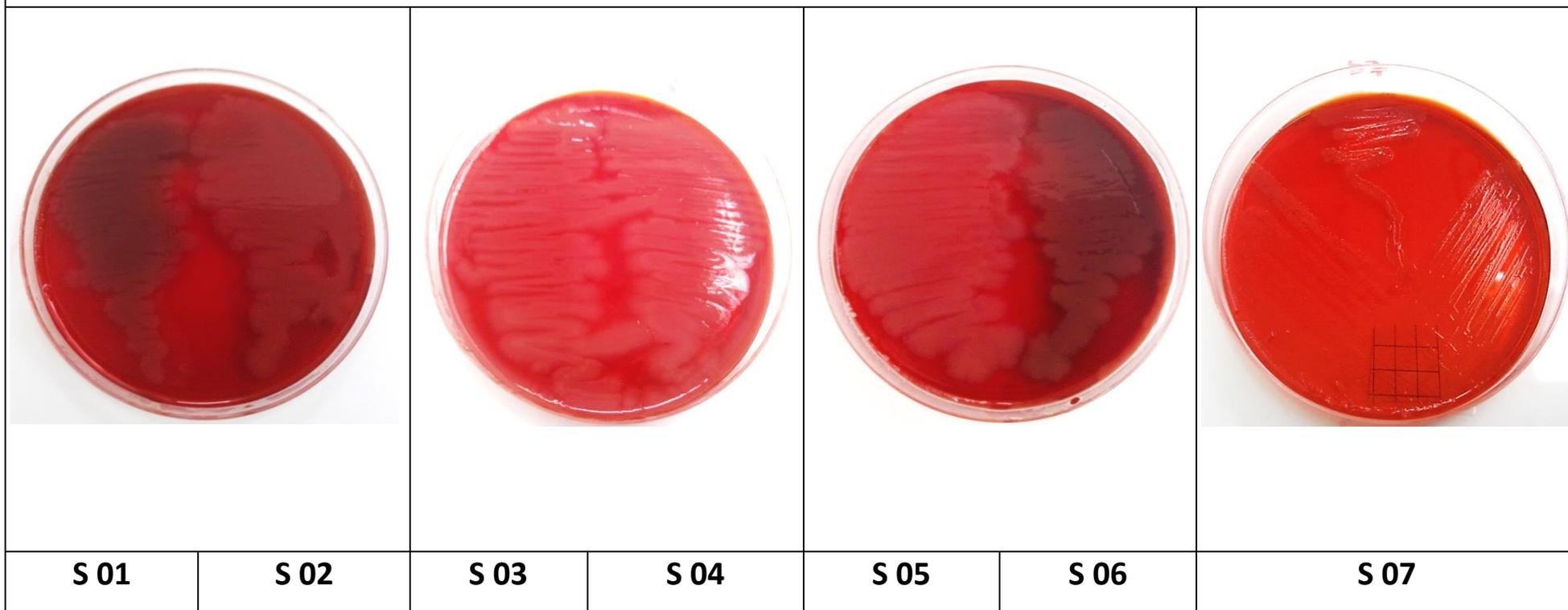
Annexe 4.2. Detection de la formation de biofilm de *P.aeruginosa* après coloration au CV

(Culture en BN après 24 heures d'incubation sur polystyrène)

						
						
S 01	S 02	S 03	S 04	S 05	S 06	S 07

Annexe 4.3. Detection de la formation de biofilm de *P.aeruginosa* après coloration au CV
(Culture en BCC après 07 jours d'incubation sur verre).



Annexe 4.4. Phénotype de production de slime chez *P. aeruginosa* sur milieu RCA.

Résumé

Les biofilms, communautés structurées de micro-organismes fixées à une surface, semblent être l'élément clé de nombreuses infections. Le biofilm formé par *P. aeruginosa* est notamment impliqué dans la mucoviscidose, les infections du tractus urinaire et les infections des plaies. Plusieurs méthodes d'étude des biofilms *in vitro* existent. La méthode au CV et la méthode RCA sont les plus utilisées dans la littérature.

L'objectif principal de notre étude était de détecter *in vitro* la formation de biofilm chez sept souches cliniques de *P. aeruginosa* qui sont caractérisées par différents profils de résistance aux ATB.

Nous avons pu observer une grande diversité dans la capacité des souches à former du biofilm, dans des conditions définies. Par ailleurs, la formation de biofilm varie pour une souche donnée en fonction du milieu de culture utilisé et la période d'incubation.

Cette étude montre également une variabilité phénotypique de production de biofilm entre les deux méthodes (CV) et (RCA).

Il devient essentiel de développer des méthodes phénotypiques simples permettant de prédire la capacité d'une souche d'intérêt médicale à produire du biofilm.

Mots-clés : *P. aeruginosa*, biofilm, infections à *P. aeruginosa*, la méthode (CV), la méthode (RCA).

Summary

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

The main objective of our study was to detect *in vitro* biofilm formation in Severn clinical *P. aeruginosa* strains which are characterized by different resistance profiles ATB.

We observed a great diversity in the ability of strains to form biofilm under defined conditions. In addition, biofilm formation varies to a given strain as a function of culture medium used and the incubation period.

This study also shows a phenotypic variability of biofilm production between the two methods (CV) and (RCA).

It becomes essential to develop simple phenotypic methods to predict the ability of a strain of medical interest in producing biofilm.

Key words: *P. aeruginosa* biofilm, *P. aeruginosa* infections, the method (CV), the method (RCA).

ملخص

الأغشية الحيوية هي عبارة عن مجتمعات منظمة من الكائنات الدقيقة التي تلتصق بالسطح، فتتسبب في الكثير من الأمراض. الغشاء الحيوي الذي تشكله الزائفة الزنجارية يتدخل خاصة في التليف الكيسي، والتهابات المسالك البولية والتهابات الجروح. توجد عدة طرق لدراسة الأغشية الحيوية في المختبر منها الطريقة CV والطريقة RCA الأكثر استعمالاً.

الهدف الرئيسي من دراستنا هو الكشف عن قدرة سبع سلالات سريرية من الزائفة الزنجارية التي تتميز باختلاف مقاومتها للمضادات الحيوية على تشكيل البيوفيلم في المختبر

لاحظنا تنوع كبير في قدرة السلالات على تشكيل البيوفيلم في ظل ظروف محددة بالإضافة إلى ذلك فان تشكيل البيو فيلم يختلف من سلالة إلى أخرى باختلاف وسط الزرع و زمن الحضانه. كما تبين هذه الدراسة أيضا ان الطريقتين المستعملتين تعطي تباين مظهري في إنتاج البيوفيلم.

من الضروري تطوير طرق بسيطة للتنبؤ بقدرة اي سلالة من الفائدة الطبية في إنتاج بيوفيلم.

الكلمات المفتاحية :

P. aeruginosa ، الغشاء الحيوي ، عدوى الزائفة الزنجارية ، الطريقة CV ، الطريقة RCA .

Thème : Détection de biofilm chez les isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa*.**Nature du diplôme :** Master.**Domaine :** Science de la nature et de la vie.**Mention :** Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes.**Résumé :**

Les biofilms, communautés structurées de micro-organismes fixées à une surface, semblent être l'élément clé de nombreuses infections. Le biofilm formé par *P. aeruginosa* est notamment impliqué dans la mucoviscidose, les infections du tractus urinaire et les infections des plaies. Plusieurs méthodes d'étude des biofilms *in vitro* existent. La méthode au CV et la méthode RCA sont les plus utilisées dans la littérature.

L'objectif principal de notre étude était de détecter *in vitro* la formation de biofilm chez sept souches cliniques de *P. aeruginosa* qui sont caractérisées par différents profils de résistance aux ATB.

Nous avons pu observer une grande diversité dans la capacité des souches à former du biofilm, dans des conditions définies. Par ailleurs, la formation de biofilm varie pour une souche donnée en fonction du milieu de culture utilisé et la période d'incubation.

Cette étude montre également une variabilité phénotypique de production de biofilm entre les deux méthodes (CV) et (RCA).

Il devient essentiel de développer des méthodes phénotypiques simples permettant de prédire la capacité d'une souche d'intérêt médicale à produire du biofilm.

Mots clés : *P. aeruginosa*, biofilm, infections à *P. aeruginosa*, la méthode (CV), la méthode (RCA).**Lieu du travail :**

Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Ben Badis de Constantine. L'établissement hospitalier spécialisé clinique d'urologie Néphrologie et transplantation Rénale. Laboratoire de Microbiologie (RDC), Faculté de Science de la Nature et de la Vie.

Jury d'évaluation :**Président du jury :** ABDELAZIZ Wided (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).**Rapporteur :** BOUCHLOUKH Warda (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).**Examineurs :** MERGOUD Lilia (Maître Assistante « A » - UFM Constantine).