

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



**Université Frères Mentouri Constantine 1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biologie Appliquée**



## *Mémoire*

**Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Professionnalisant**  
**Filière : Sciences biologiques, Spécialité: Microbiologie et Hygiène**  
**Hospitalière**

**Par : MEMDOUH Sara**  
**REDDAF Norelhouda**

**le : 28-06-2018**

## *Thème*

***Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* au***  
***CHU de Constantine***

### **Jury d'évaluation :**

**Président de jury: M<sup>f</sup>. MOULAHM.T**  
**Rapporteur : M<sup>me</sup>. KHELILI .K**  
**Examineur: M<sup>me</sup>. ZITOUNI.H**  
**Maitre de stage: M<sup>f</sup>. BENLABED. K**

**Prof. CHU. Constantine.**  
**MCB. UFM. Constantine 1.**  
**MCB. UFM. Constantine 1.**  
**Prof. CHU. Constantine.**

**ANNEE UNIVERSITAIRE : 2017-2018**

## ***Remerciements***

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.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude et remercier **Dr KHELILI K.** pour avoir accepté d'encadrer notre travail, pour ses conseils, et son aide ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité, son assistance et son soutien indéfectible.

Nous prenons aussi un réel plaisir à remercier chaleureusement **Pr BENLABED K.** qui nous a guidé et patiemment conseillé pour la réalisation de la grande partie de notre travail au sein de laboratoire de bactériologie au niveau de CHU de Constantine.

A tous les membres du laboratoire de microbiologie du CHU de Constantine qui nous ont aidé à effectuer ce travail.

Nous tenons à remercier vivement les membres de jury d'avoir accepté de juger ce travail.

Nos remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

## ***Dédicaces***

*Avec un énorme plaisir, nous dédions ce modeste travail de fin  
d'études à nos chers parents ; source de tendresse, de noblesse et d'amour  
qui ont sacrifié leur vie pour notre réussite et nous ont éclairé le chemin par  
leurs conseils judicieux.*

*Nous espérons qu'un jour nous pourrions leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait  
pour nous, que Dieu leur prête bonheur et longue vie.*

*Nous dédions aussi ce travail à nos frères et sœurs,  
nos familles, nos amis, tous nos professeurs qui nous ont enseigné  
et à tous ceux qui nous sont chers.*

## Table des matières

<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Synthèse Bibliographique</b>	
I. Les Pseudomonas.....	<b>2</b>
I.1. Taxonomie.....	<b>2</b>
I.2. Etude bactériologique des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	<b>3</b>
I.3. Habitat.....	<b>5</b>
I.4. Facteurs de virulence.....	<b>6</b>
I.5. Résistance aux antibiotiques.....	<b>14</b>
II. Pouvoir pathogène et expression clinique.....	<b>17</b>
III. Diagnostic.....	<b>17</b>
III. 1. Prélèvement.....	<b>17</b>
III. 2. Transport et fiche de renseignements.....	<b>18</b>
III. 3. Examen macroscopique.....	<b>18</b>
III. 4. Examens microscopiques.....	<b>18</b>
III. 5. Culture /isolement.....	<b>19</b>
III. 6. Identification.....	<b>19</b>
III. 7. Antibiogramme.....	<b>19</b>
IV. Prophylaxie et prévention.....	<b>20</b>
IV.1. Hygiène et bon usage des antibiotiques.....	<b>20</b>
IV.2. Place de la vaccination et de l'immunothérapie.....	<b>22</b>
<b>Matériel et méthodes</b>	
I. Lieu et durée du stage.....	<b>23</b>
II. Type de l'étude.....	<b>23</b>
<b>III. Matériel</b> .....	<b>23</b>
III.1. Matériel pour prélèvements.....	<b>23</b>
III.2. Matériel pour analyse et antibiogramme.....	<b>23</b>
III.3. Matériel biologique.....	<b>25</b>
<b>IV. Méthodes</b> .....	<b>27</b>
IV.1. Techniques de prélèvement.....	<b>27</b>
IV.2. Transport et fiche de renseignements.....	<b>30</b>
IV.3. Techniques d'analyses.....	<b>31</b>
<b>Résultats et discussion</b>	
I. Identification bactériologique.....	<b>43</b>

I.1. Caractères morphologiques .....	43
I.2. Caractères culturaux.....	43
I.3. Caractères biochimiques.....	44
I.4. Sérotypage.....	45
I.5. Résistance aux antibiotiques .....	46
II. Répartition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47
II.1. Répartition selon l'unité .....	47
II.2. Répartition selon le sexe.....	48
II.4. Répartition selon le service.....	49
II.5. Répartition selon la nature du prélèvement.....	50
II.6. Répartition des germes associés à <i>P. aeruginosa</i> .....	52
<b>III. Résistance aux antibiotiques</b> .....	<b>53</b>
III.1. Taux de résistance selon le service .....	54
III.1.1. Taux de résistance au centre des brûlés .....	55
III.1.2. Taux de résistance au service de chirurgie viscérale.....	56
III.1.3. Taux de résistance au service de réanimation médicale.....	56
III.1.4. Taux de résistance chez les patients traités en externe.....	57
<b>Conclusion</b> .....	<b>59</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>60</b>
<b>Annexes</b>	

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Image tridimensionnelle générée par ordinateur (3D) <i>P. aeruginosa</i> .....	<b>3</b>
<b>Figure 2.</b> Structure du flagelle bactérien.....	<b>7</b>
<b>Figure 3.</b> Structure du lipopolysaccharide (LPS).....	<b>9</b>
<b>Figure 4.</b> Aspect des isolats bactériens sur milieu Hektoen .....	<b>44</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau1.</b> Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	<b>2</b>
<b>Tableau2.</b> Sérums (anticorps) anti-O polyvalents avec leurs sérums monovalents.....	<b>25</b>
<b>Tableau3.</b> Origine des souches utilisées.....	<b>26</b>
<b>Tableau4.</b> Caractères morphologiques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	<b>47</b>
<b>Tableau5.</b> Caractères cultureux de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	<b>47</b>
<b>Tableau6.</b> Résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour les 26 souches étudiées de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	<b>48</b>
<b>Tableau7.</b> Répartition de 26 souches <i>Pseudomonas aeruginosa</i> selon le sérotype.....	<b>49</b>
<b>Tableau8.</b> taux de résistances des 26 souches .....	<b>50</b>
<b>Tableau9.</b> Répartition selon les unités.....	<b>51</b>
<b>Tableau10.</b> Répartition selon le sexe.....	<b>52</b>
<b>Tableau11.</b> Répartition selon les services de CHUC.....	<b>53</b>
<b>Tableau12.</b> Répartition selon la nature du prélèvement.....	<b>54</b>
<b>Tableau13.</b> Répartition des germes associés à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	<b>56</b>
<b>Tableau14.</b> Taux de résistance aux antibiotiques (n= 630).....	<b>57</b>
<b>Tableau15.</b> Taux de résistance au centre des brûlés.....	<b>59</b>
<b>Tableau16.</b> Taux de résistance au service de chirurgie viscérale.....	<b>60</b>
<b>Tableau17.</b> Taux de résistance au service de réanimation médicale.....	<b>60</b>
<b>Tableau18.</b> Taux de résistance chez les patients traités en externe.....	<b>61</b>

## Liste des abréviations

<b>AARN</b>	: Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance aux Antibiotiques
<b>AMM</b>	: Autorisation de mise sur le marché
<b>AmpC</b>	: Céphalosporinase chromosomique de type C
<b>ATP</b>	: Adénosine Tri-Phosphate
<b>ATB</b>	: Antibiotique
<b>BGN</b>	: Bactérie à Gram négatif
<b>BCC</b>	: Bouillon cœur-cervelle
<b>BM</b>	: Bleu de méthylène
<b>BMR</b>	: Bactéries multi-résistantes
<b>°C</b>	: Degré Celsius
<b>CFTR</b>	: Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator).
<b>CHU</b>	: Centre Hospitalo-Universitaire
<b>CLSI</b>	: Clinical and laboratory standards institute
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Dioxyde de carbone
<b>ECBU</b>	: Examen cytbactériologique des urines
<b>ETA</b>	: Exotoxine A
<b>EDTA</b>	: Ethylene Diamine Tetracetic Acid
<b>H<sub>2</sub>S</b>	: Hydrogène sulfuré
<b>I</b>	: Intermédiaire
<b>IATS</b>	: International Antigenic Typing System).
<b>IgA</b>	: Immunoglobuline A
<b>IgG</b>	: Immunoglobuline G
<b>IL-8</b>	: Interleukine 8
<b>IST</b>	: Les infections sexuellement transmissibles
<b>kDa</b>	: kilo dalton
<b>L</b>	: Large
<b>LCR</b>	: Liquide Céphalorachidien
<b>LPS</b>	: Lipopolysaccharides
<b>M</b>	: Muqueuse
<b>OMP</b>	: Outer Membrane Protein
<b>Opr</b>	: Outer membrane protein
<b>ORL</b>	: Oto-Rhino-Laryngologie
<b>pH</b>	: Potentiel Hydrogène
<b>PLC</b>	: Phospholipases C
<b>PMN</b>	: Leucocytes PolyMorphoNucléaire)
<b>R</b>	: Résistant
<b>RM</b>	: Rouge de méthyle
<b>S</b>	: Sensible
<b>TDA</b>	: Tryptophane-Désaminase
<b>TNF</b>	: Facteur nécrosant des tumeurs
<b>3D</b>	: tridimensionnelle générée par ordinateur
<b>TSI</b>	: Triple Sugar Iron
<b>VP</b>	: Voges-Proskauer
<b>µm</b>	: Micro mètre
<b>USI</b>	: Unité de Soins Intensifs





# **Introduction**

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont caractérisées par leur ubiquité. Leurs exigences nutritives modestes leur permettent de survivre et de se multiplier sur des surfaces humides. De ce fait, elles sont fréquemment rencontrées en milieu hospitalier [1].

*P. aeruginosa* est considéré comme un pathogène opportuniste infectant préférentiellement des sujets hospitalisés immunodéficients ou affaiblis : brûlés, cancéreux, malades d'unités de soins intensifs, transplantés, dialysés ou sujets atteints de mucoviscidose... [2].

Avec un large arsenal de facteurs de virulence, il provoque une gamme d'infections aiguë et chronique en milieu communautaire, mais surtout en milieu hospitalier où il est impliqué dans diverses infections associées aux soins. Responsable de 10 à 20% des infections nosocomiales, le bacille pyocyanique est considéré de nos jours comme un sérieux problème de santé publique [3,4].

Il peut causer des infections des voies urinaires, des voies respiratoires surtout chez les patients atteints de mucoviscidose, et des infections de plaies chez les brûlés. Sa pathogénicité est conférée par l'interaction avec certaines structures de surface et par la sécrétion de nombreux facteurs de virulence.

Cette bactérie opportuniste est caractérisée par son fort potentiel d'adaptation au milieu environnant et par sa rapidité d'acquisition de résistances aux antibiotiques, d'autant plus qu'elle présente un niveau élevé de résistances naturelles.

Ainsi, les molécules habituellement actives sur cette bactérie sont très restreintes. Les résistances acquises sont très fréquentes et sont dues, en plus des facteurs intrinsèques à la bactérie, à l'utilisation abusive des antibiotiques.

Les objectifs de notre travail sont :

- ✓ Rechercher des souches de *P. aeruginosa* à partir des différents prélèvements (pus, urines, sonde...) provenant de malades hospitalisés dans les différents services du CHU de Constantine en vue de l'identification des souches ;
- ✓ Déterminer leurs caractères biochimiques et antigéniques ;
- ✓ Déterminer leurs profils de résistance aux antibiotiques.



# **Synthèse bibliographique**

## I. Les *Pseudomonas*

### I.1. Taxonomie

Les bactéries du genre *Pseudomonas* appartiennent à la famille des *Pseudomonadaceae*. Elles sont ubiquitaires et présentent un intérêt particulier en microbiologie médicale, alimentaire, aquatique et environnementale ainsi qu'en agronomie [5].

La famille des *Pseudomonadaceae* inclut dix genres : *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, ***Pseudomonas***, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, et *Serpens* [6].

Le genre *Pseudomonas* regroupe 7 espèces : ***P.aeruginosa***, *P.chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P.pertucinogena*, *P.putida*, *P.stutzeri* et *P.syringae* [7] dont ***Pseudomonas aeruginosa*** ou bacille pyocyanique est l'espèce type. Sa taxinomie est présentée dans le tableau 1 :

**Tableau 1.** Taxonomie de *P. aeruginosa* [7].

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

## **I.2. Etude bactériologique des *Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* a été isolé pour la première fois en 1882 par Gessard [7].

Etymologiquement, le mot issu du grec pseudo (=simili ou imitation) et monas (=unité) désignait les germes du début de la microbiologie. Le mot *aeruginosa*, qui signifie, en latin, vert de gris, fait référence au pigment produit par la bactérie et qui donne à la colonie sa couleur caractéristique [8].

### **I.2.1.Morphologie**

*P. aeruginosa* est un bacille fin sous forme de bâtonnet de 1 à 5  $\mu\text{m}$  de longueur et 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de largeur [7]. C'est une bactérie à Gram-, mobile grâce à un flagelle polaire généralement unique (**Fig.1**), dépourvu de spores et de capsules [9].



**Figure.1** : Image tridimensionnelle générée par ordinateur (3D) *P. aeruginosa* [10].

### **I.2.2.Caractères culturaux**

Le bacille pyocyanique est une bactérie à besoins très limités, et en croissance sur des milieux synthétiques simples. Elle pousse facilement à 37 °C pendant 24 heures [11].

Elle peut croître entre 5 et 42°C avec un optimum de 30 °C. Par contre, elle supporte de moindres variations de pH (6,5 à 7,5) avec un pH optimal de 7,2 [11].

C'est une bactérie aérobique stricte mais capable d'utiliser les nitrates en conditions anaérobies [12]. Elle est caractérisée par une odeur florale [13].

En bactériologie médicale, un milieu sélectif à base de cétrimide (ammonium quaternaire) permet la recherche et l'isolement de *P. aeruginosa* à partir de produits biologiques (selles, urines, pus, liquide céphalo-rachidien...) [14].

Trois types de colonies peuvent être observées simultanément ou de manière isolée sur milieux solides [15] :

- ✓ Colonies larges « L » de 2 à 3 mm de diamètre, à bord irrégulier, rugueuses, une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques.
- ✓ Colonie plus petites lisses « S » bombées à bord régulier.
- ✓ Colonies muqueuses « M » bombées, coalescentes, filantes rencontrées chez les souches produisant un slime composé d'un polymère d'alginate.

### **I.2.3. Caractères biochimiques**

#### ***A. Métabolisme***

*Pseudomonas aeruginosa* est caractérisé par un métabolisme oxydatif. Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tels que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose [8, 16].

Il possède aussi une nitrate réductase (réduction des nitrates pouvant aller jusqu' au stade de N gazeux), une arginine –dihydrolase, une lécithinase (qui ne peut être révélée qu'en milieu liquide) [11].

C'est une bactérie dépourvue d'enzymes dégradant le lactose et dégageant une odeur de raisin ou seringa [17].

#### ***B. Production de pigments***

Selon **BARIR** et d'après **DELARRAS** le *P.aeruginosa* produit deux types de pigments (fluorescent ou non) qui servent à son identification, ils peuvent être mis en évidence dans les milieux de King B et King A.

- **Pyoverdine** : pigment jaune-vert fluorescent, soluble dans l'eau, insoluble dans le chloroforme.
- **Pyocyanine (phénazinique)** : pigment bleu-vert non fluorescent soluble dans l'eau et le chloroforme, *Pseudomonas aeruginosa* est la seule espèce à le produire.



#### **I.2.4. Caractères antigéniques**

Il existe, chez *P. aeruginosa*, **un antigène somatique O** thermostable, responsable d'une antigénicité de type. La spécificité de cet antigène O est supportée par plusieurs polysaccharides correspondant aux chaînes latérales du lipopolysaccharide (LPS), dont la longueur et la composition sont variantes [18].

Le sérotypage des souches, grâce à des antisérums dirigés contre cet antigène, permet de distinguer 16 sérotypes différents selon la classification de l'IATS (International Antigenic Typing System). Habituellement, 90 à 95% des souches peuvent être typées avec ce système [18]

Les antigènes O:1 à O:11 sont les plus fréquents ; le sérotype O:12 présente la particularité d'être le plus résistant aux antibiotiques et est le plus souvent incriminé dans les infections nosocomiales [19]

Les souches M, en particulier celles qui proviennent de patients atteints de ***mucoviscidose***, peuvent être difficiles à typer du fait d'un déficit plus ou moins prononcé en chaînes latérales du LPS de ces souches.

#### **I .3. Habitat**

*P. aeruginosa* est une bactérie ubiquitaire, parfois commensale du tube digestif de l'homme, saprophyte de l'eau ; son réservoir naturel est le sol, les lacs, les rivières, l'eau polluée, les piscines et les jacuzzis. Elle est largement répandue dans les poussières et les aliments crus (particulièrement les légumes : tomates, carottes, céleris) [8].

En milieu hospitalier, *P. aeruginosa* est parfois présent dans les solutions aseptiques et sur les instruments tels que les cathéters, les sondes, ou encore dans les canalisations et les lavabos [20].

#### **I.4.Facteurs de virulence**

La pathogénie de *P. aeruginosa* est attribuée à la production d'un vaste arsenal de facteurs de virulence (membranaires et extracellulaires) agissant à différents niveaux au cours de l'infection, lui permettant de survivre aussi bien dans différents hôtes que dans l'environnement.

Ces facteurs de virulence sont impliqués dans les différentes étapes du processus d'infection et permettent ainsi à *P. aeruginosa* de coloniser son hôte.

##### **I.4.1. Facteurs de virulence membranaires**

*P. aeruginosa* présente à sa surface des structures retrouvées chez d'autres Gram-négatif [21] certaines d'entre elles participent à la mobilité de la bactérie [22].

La bactérie peut provoquer des infections en interagissant directement et souvent spécifiquement avec des récepteurs cellulaires présents chez l'hôte, par le biais de structures superficielles [22].

##### **❖ Le flagelle :**

Le flagelle bactérien se compose de trois parties (**figure 2**) : le filament extra bactérien permettant le mouvement, le crochet et le corps basal ancré dans les membranes bactériennes [7, 23,24].

*P. aeruginosa* possède un seul flagelle monotriche polaire lui conférant une mobilité de type « swimming » dans un environnement aqueux et une mobilité de type « swarming » permettant le déplacement sur des surfaces semi solides [7, 25, 26, 27,28].

Le flagelle est impliqué dans la pathogénie de la bactérie. Il est également nécessaire pour la formation du biofilm. Il intervient dans l'adhérence à la surface [7, 29,30]. En outre, cette organelle participe à la reconnaissance de la bactérie par l'hôte en induisant la réponse inflammatoire [7].

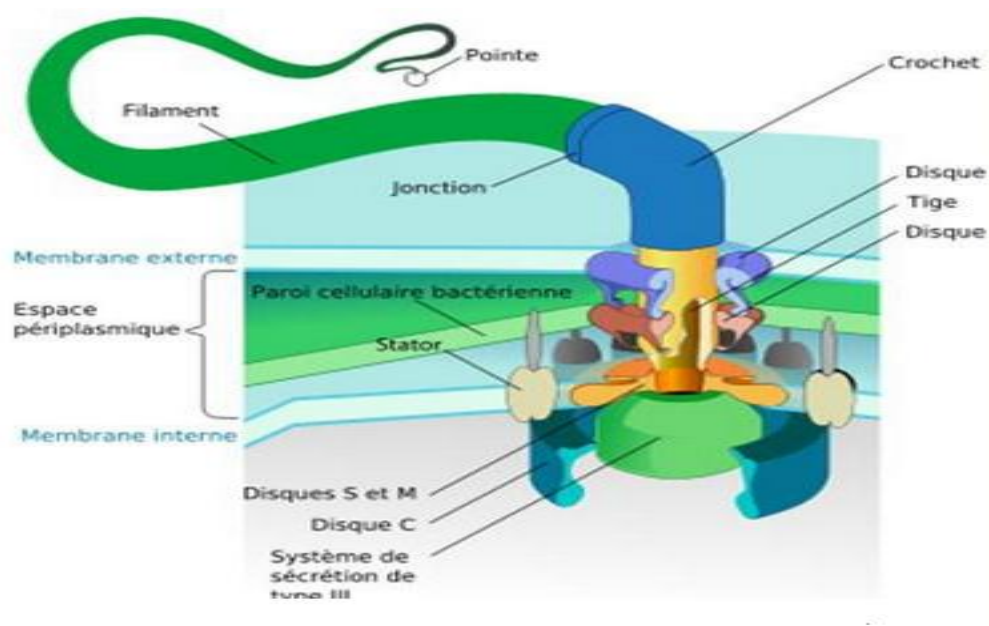


Figure 2. Structure du flagelle bactérien [31].

### ❖ Les pili

Sont des organelles filamenteuses longues, présentes sur la surface de nombreuses bactéries pathogènes tel que *P. aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, [7, 32, 33, 34, 35].

Ces structures sont multifonctionnelles et jouent un rôle crucial, en particulier dans l'initiation de la colonisation.

En effet, elles permettent l'adhérence de la bactérie aux surfaces épithéliales de l'hôte. C'est l'étape la plus importante du processus infectieux.

Les pili sont aussi impliqués dans la motilité de type « twitching » qui permet le déplacement sur une surface solide grâce à l'extension puis à la rétraction du pili, et la mobilité de type « swarming » [7, 36, 37,30].

Ils sont aussi importants pour la formation du biofilm [24], la transformation naturelle et l'initiation des infections par des bactériophages dont les pili jouent le rôle de récepteur [7, 38 ,39].

❖ **Lipopolysaccharide (LPS)**

La membrane externe de *P. aeruginosa* est principalement composée de LPS (LipoPolySaccharide). Ce dernier se compose de trois parties (**figure 3**).

- ✓ **Le lipide A**, une région hydrophobe permettant l'ancrage de la structure dans la bicouche lipidique [7] aussi appelé endotoxine, est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort [40,41].
- ✓ **Un coeur oligosaccharidique** hydrophile constitué de chaînes polysaccharidiques. Il se subdivise en un cœur interne et un autre externe.

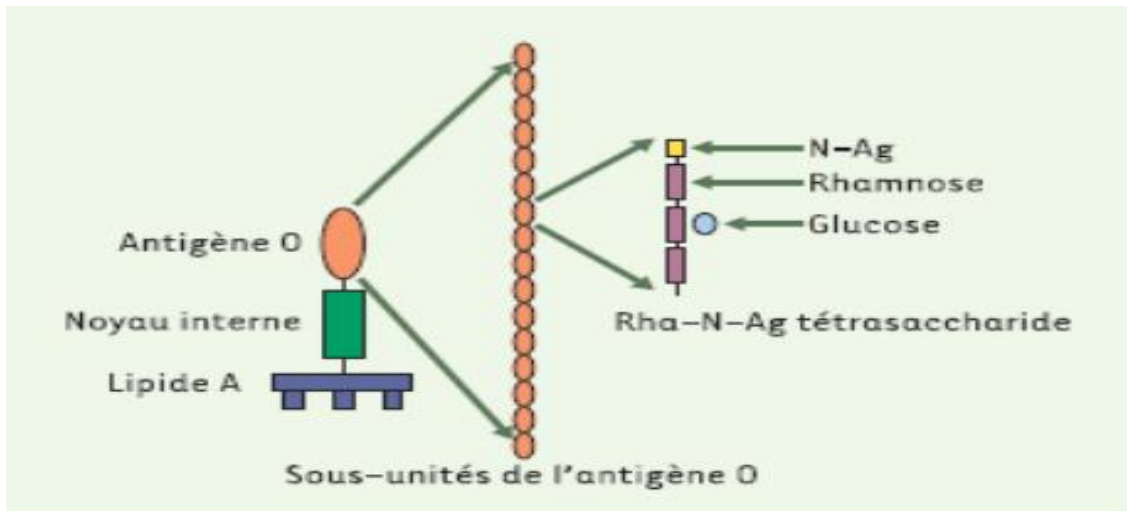
La partie externe semble être le ligand qui s'associe avec la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator). Cette dernière représente le récepteur pour la fixation de la bactérie aux cellules épithéliales [7,42].

- ✓ **L'antigène O ou polysaccharide O**, une partie polysaccharidique variable débordant de la membrane externe, sur laquelle sont basés le sérotypage et l'identification antigénique de *P. aeruginosa* [7,43].

Selon que l'antigène O est présent ou absent sur le cœur oligosaccharidique, on parle respectivement de phénotype lisse ou rugueux. Il est possible que cet antigène soit présent (phénotype lisse) ou absent (phénotype rugueux) sur le cœur oligosaccharidique [7].

Le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent. De plus, les souches "rugueuses" de *P. aeruginosa* sont lysées par le sérum humain, alors que les souches "lisse" sont résistantes au sérum [40].

Le LPS, localisé dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif est, d'une part, connu pour son rôle protecteur contre la lyse provoquée par le sérum et, d'autre part, pour son activité endotoxique. Il est également impliqué dans la stimulation de la réponse inflammatoire et dans les interactions avec les tissus hôtes [40].



**Figure 3.** Structure du lipopolysaccharide (LPS) [7,44].

#### ❖ Alginate

L'alginate est un exopolysaccharide mucoïde composé de polymères de l'acide mannuronique associé avec l'acide glucuronique.

*P.aeruginosa* produit l'alginate pour s'adapter dans certaines situations environnementales inappropriées au développement bactérien. C'est le cas des infections pulmonaires chroniques des patients atteints de mucoviscidose [45].

La production d'alginate par ces souches permet de la formation d'un biofilm qui favorise l'adhésion aux cellules épithéliales [11,46] et protège la bactérie de la phagocytose, des anticorps, de l'action des antibiotiques et des désinfectants [47].

#### I.4.2. Facteurs de virulence sécrétés

##### ➤ L'exotoxine A (ETA)

C'est la protéine la plus cytotoxique produite par *P. aeruginosa* jouant un rôle majeur dans la virulence de la bactérie [17,48], elle est sécrétée sous forme de pro-toxine inactive dans l'espace intercellulaire via le système de sécrétion de type II [17].

Comme la toxine diphtérique, l'exotoxine A est composée de deux domaines : le domaine A (26 kDa) qui possède l'activité mono-ADP-ribosyltransférase et le domaine B (45 kDa) qui interagit spécifiquement avec le récepteur présent à la surface de la cellule hôte et entraîne un arrêt de la synthèse protéique et provoque la mort de la cellule cible par nécrose [40,49,50].

*P. aeruginosa* est capable de sécréter certains produits qui sont toxiques pour les cellules et les tissus de l'hôte. Ces facteurs de virulence peuvent agir à distance. Ils sont associés à l'infection aiguë et interviennent principalement dans la dissémination de la bactérie en perturbant les défenses de l'hôte [7].

Sa production dépend de la quantité du fer dans le milieu. Un maximum de production a été détecté dans un milieu pauvre en fer [7,48].

#### ➤ **Les sidérophores**

Le fer est un élément essentiel à la croissance bactérienne. Ainsi, la bactérie entre en compétition avec l'eucaryote qui l'héberge et notamment avec des molécules comme la transferrine [51].

Les sidérophores, dont les principaux sont la pyoverdine et la pyochéline, se comportent comme de véritables chélateurs du fer. Ils sont excrétés dans le milieu environnant, puis récupérés sous leur forme complexée avec le fer ferrique grâce à certaines protéines de la membrane externe [52].

*La pyoverdine*, pigment jaune fluorescent, responsable pour partie de la couleur caractéristique des colonies de *P. aeruginosa*, est le plus puissant des sidérophores [11].

La pyoverdine joue un rôle régulateur dans la sécrétion de certains facteurs de virulence (exotoxine A, des protéases) ainsi que sa propre sécrétion [40, 53,54].

*La pyochéline* a une activité moindre, et deux molécules sont nécessaires pour chélater le fer ferrique [11,55].

➤ **Les phospholipases C**

Les phospholipases sont des enzymes extracellulaires thermolabiles d'environ 80 kDa, contenant des ions zinc essentiels à l'activité enzymatique [40,56]. Sécrétées par le système de sécrétion de type II, elles présentent différentes spécificités de substrats et ont particulièrement pour cible la partie lipidique de la membrane des cellules eucaryotes. L'action des phospholipases est facilitée par les rhamnolipides bactériens [17].

Trois phospholipases C (PLC) de spécificité de substrats différents ont été identifiées chez *P. aeruginosa* [40]. Les phospholipases sont importantes pour la virulence de la bactérie. Elles déstabilisent la membrane des cellules de l'hôte et sont à l'origine de la mort cellulaire [7].

➤ **Elastase**

L'activité élastolytique de *P. aeruginosa* est médiée par l'action combinée de deux enzymes protéolytiques, LasA et LasB.

*L'élastase LasA* (également nommée protéase staphylolytique ou staphylolysine) est une protéase à sérine qui agit en synergie avec LasB augmentant ainsi le pouvoir de dégradation. LasA coupe l'élastine, et la rend ainsi plus accessible à l'action d'autres protéases comme l'élastase LasB (également nommée protéase LasB ou pseudolysine) est une métalloprotéase à zinc qui a une activité protéolytique très importante [57,58].

La protéase LasB dégrade l'élastine mais elle est également capable d'inactiver de nombreuses protéines comme les IgA et les IgG, des composants du complément, le collagène et la fibrine. LasB s'attaque aussi aux cytokines comme l'interféron gamma et au facteur nécrosant des tumeurs (TNF) [57,59].

➤ **Les rhamnolipides**

Les rhamnolipides sont des biosurfactants glycolipidiques résistants à la chaleur. Ils sont composés de rhamnose lié à des acides gras  $\beta$ -hydroxylés [7]. *P. aeruginosa* produit 25 rhamnolipides qui sont différents soit par la longueur de la chaîne ou le degré de saturation de l'acide gras [7,60].

Plusieurs stimuli environnementaux tels que la densité cellulaire, le stress et la carence nutritionnelle stimulent la biosynthèse des rhamnolipides. Cette biosynthèse coïncide avec la phase stationnaire de croissance. Elle est régulée soit au niveau de la transcription soit au niveau post-transcriptionnel [7].

Ils ont la capacité d'inhiber le phénomène de clairance ciliaire. En outre, les rhamnolipides jouent un rôle dans le changement de l'hydrophobicité de la surface cellulaire, la mobilité de type « swarming » [60] et dans l'architecture du biofilm. Ils ont une activité antimicrobienne et une activité hémolytique. De plus, ils inhibent la phagocytose et induisent la nécrose des PMN (leucocytes PolyMorphoNucléaire) [61].

Ce sont des glycolipides extracellulaires, qui peuvent émulsionner les phosphates membranaires grâce à leur activité détergente, les rendant plus accessibles au clivage par phospholipase C [11].

#### ➤ **Les lectines**

Parmi les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie, deux lectines solubles ont été découvertes récemment.

La première, PA-IL (ou LecA), d'une taille de 12,7 kDa, montre une spécificité pour le galactose, et la deuxième, PA-IIL (ou LecB) d'une taille de 11,7 kDa, montre une très forte affinité pour le fucose [62,63].

Les deux protéines sont principalement présentes dans le cytoplasme de la bactérie mais ont aussi été identifiées sur la surface de la membrane externe de la bactérie [64].

Elles ne montrent aucune identité de séquence mais sont toutes les deux dépendantes de la présence du calcium pour être actives.

Des travaux récents ont montré que la lectine pourrait être impliquée dans la reconnaissance et l'adhésion bactérie-hôte, bactérie-bactérie ou encore bactérie-biofilm [40,65].



➤ **Les protéases alcalines**

La protéase alcaline est une protéase qui dégrade la fibrine. Elle est sécrétée par le système de sécrétion de type I [40,66]. Elle peut dégrader les interférons et les composants du complément [11]. Son rôle pathogène est documenté dans les infections cornéennes comme toutes les protéases produites chez *P. aeruginosa*. Elle participe aussi dans la physiopathologie des pneumopathies aiguës [40,66].

➤ **La Pyocyanine**

La pyocyanine est un pigment bleu vert sécrété par la bactérie et impliqué dans de nombreux mécanismes de pathogénicité. Elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte, induit l'apoptose des neutrophiles et induit la production d'IL-8 [11,17].

➤ **Les toxines sécrétées via le système de sécrétion de type III**

Le système de sécrétion de type III induit la nécrose des cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles et macrophages) et permet ainsi à la bactérie d'échapper au système immunitaire. Par ailleurs, il provoque une déstructuration du cytosquelette des cellules épithéliales. Il joue donc un rôle primordial dans la phase de colonisation [17].

Il est certainement le système le plus étudié, il est composé d'une vingtaine de protéines. *P. aeruginosa* utilise ce système qui est un déterminant majeur de la virulence et permet à la bactérie d'injecter ses toxines dans la cellule hôte [67].

*P. aeruginosa* secrète quatre exotoxines à travers ce système:

**L'exoenzyme S:** sa cible est le cytosquelette. Elle dépolymérise les filaments d'actine et de vimentine. Cette activité se manifeste en particulier sur les macrophages. Elle interfère aussi avec plusieurs échelons de la défense immunitaire [45].

**L'exoenzyme T:** elle est impliquée dans l'infection pulmonaire. Cette exotoxine semble interférer avec l'organisation des filaments d'actine et empêche l'exocytose, la progression du cycle cellulaire et la phagocytose.

**L'exoenzyme Y:** c'est une adénylate cyclase, elle augmente la concentration d'AMP cyclique dans les cellules infectées de l'hôte.

**L'exoenzyme U:** cette toxine possède une activité phospholipase détruisant la membrane cellulaire, elle pourrait de contribuer à la mort de la cellule par nécrose [68]. Sa toxicité est 100 fois plus grande que celle de l'exo S [69].

### **I.5.Résistance aux antibiotiques**

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste redoutable en milieu hospitalier, essentiellement responsable d'infections nosocomiales de localisation variées et sévères. Le traitement de ces infections est souvent difficile, de par la résistance naturelle et acquise de ce germe à de nombreux antibiotiques [70].

*P. aeruginosa* est caractérisé par son aptitude particulière à acquérir et à cumuler de nombreux et variés mécanismes de résistance : sécrétion des bêta-lactamases, modification de la perméabilité membranaire (efflux, impérméabilité) et modification de la cible notamment les topoisomérases [24].

#### **I.5.1.Résistance naturelle et antibiotiques habituellement actifs**

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toute les souches de l'espèce considérée (phénotype sauvage) [71] et qui peut se traduire par une faible perméabilité de la membrane externe aux différents antibiotiques. Les LPS et les protéines de la membrane externe (OMPs) seraient responsables de cette obstruction [72].

*P. aeruginosa* présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques. Ainsi, les molécules habituellement actives sur cette bactérie sont de nombre limité et sont représentées par certaines  $\beta$ -lactamines (pipéracilline et ticarcilline, avec ou sans inhibiteur, ceftazidime, céfépime, aztréonam, imipénème, méropénème, doripénème), les fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine), les aminosides (sauf la kanamycine), la fosfomycine, la colimycine [73]. *Pseudomonas aeruginosa* est naturellement résistant aux pénicillines des groupes V G M et A, à la plupart des céphalosporines de première, deuxième et troisième génération [74].

### **I.5.2.Épidémiologie des résistances acquises aux antibiotiques**

En plus de ces résistances naturelles, les résistances acquises sont très fréquentes pour les antibiotiques antipyocyaniques.

Les mécanismes de résistance, liés à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes exogènes de résistance, sont variés. Ils confèrent des phénotypes de résistance détectables à l'antibiogramme par les biologistes.

Par groupes de service, les souches les moins sensibles sont rencontrées dans les services de soins intensifs et de brûlés [75]. Parmi les principaux types de prélèvements, les taux les plus bas de sensibilité sont rapportés pour les échantillons d'origine respiratoire pour les bêtalactamines et dans les échantillons urinaires pour la ciprofloxacine. Cette résistance plus importante dans les sites respiratoires et urinaires peut s'expliquer par la fréquence et l'importance des colonisations à *P. aeruginosa* sur sonde urinaire ou dans le tractus respiratoire et la pression antibiotique exercée chez ces patients avec les familles d'antibiotiques les plus utilisés dans ces localisations spécifiques. Dans les bactériémies, les données françaises issues de l'European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) montrent qu'en 2008, la sensibilité aux antibiotiques de *P. aeruginosa* est de 78 % pour la pipéracilline, 85 % pour la ceftazidime, 84 % pour les carbapénèmes, 71,5 % pour les aminosides, 75 % pour la ciprofloxacine.

Dans le réseau de surveillance REA-Raisin qui inclut 40 % des lits de réanimation adulte en France (176 services), on note une diminution du pourcentage de souches présentant une résistance à la ceftazidime. En effet 26,2 % des souches de *P. aeruginosa* étaient résistantes à la ceftazidime en 2004, contre 18,2 en 2009 [76]. L'association de plusieurs mécanismes de résistance aboutit à des souches multirésistantes à la plupart des antibiotiques habituellement utilisés en thérapeutique dans les infections à *P. aeruginosa* [77]. Une souche multirésistante est définie comme ayant acquis une résistance dans au moins trois familles d'antibiotiques habituellement actifs comme les bêtalactamines anti-Pseudomonas, les fluoroquinolones et les aminosides. En pratique, la plupart des réseaux de surveillance se basent sur la sensibilité de *P. aeruginosa* à la ceftazidime pour juger de l'évolution de sensibilité des souches.

Par rapport aux données de sensibilité de l'étude multicentrique GERPA (Groupe d'étude de la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques) de 2004, la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques n'augmente pas de façon globale en France. Cependant, la nature de cette résistance devient de plus en plus inquiétante avec l'émergence à bas bruit de souches productrices de bêtalactamases à spectre étendu ou de carbapénémases. Si les souches multirésistantes restent encore confinées sous forme de petits foyers en France [78], le risque d'extension est bien présent. D'autre part, le risque d'importation à partir de pays où ces souches sont de plus en plus répandues doit être pris en compte. Ceci doit appeler à une vigilance renforcée pour les dépister et renforcer rapidement les mesures d'hygiène autour des cas d'infection ou de portage afin d'éviter leur transmission.

### **I.5.3. Activité des antiseptiques et désinfectants**

*P. aeruginosa* se situe parmi les bactéries à Gram négatif les moins sensibles à l'action bactériostatique et bactéricide des antiseptiques et désinfectants. La faible sensibilité de cette espèce est liée à la structure de la membrane externe et au LPS, qui font obstacle au passage des molécules biocides [79].

Il peut développer des résistances aux produits désinfectants utilisés dans le milieu hospitalier, notamment grâce à la faible perméabilité de sa membrane mais également par la présence de biofilm et à l'acquisition potentielle de résistance par des mécanismes non enzymatiques [80].

Les antiseptiques et les désinfectants les plus actifs sur *P. aeruginosa* sont les dérivés chlorés, les dérivés iodés, les aldéhydes, le peroxyde d'hydrogène. L'alcool, les dérivés phénoliques (hexachlorophène, triclosan), les ammoniums quaternaires, les biguanides (chlorhexidine), les dérivés mercuriels ou les dérivés argentiés [79].

Concernant les produits désinfectant utilisés dans l'eau, le chlore pénètre dans les cellules planctoniques malgré la faible perméabilité et tue ainsi la bactérie en provoquant une oxydation des enzymes présentes dans le cytoplasme. En revanche, lorsque *P. aeruginosa* se trouve à l'intérieur d'un biofilm, les hypochlorites ne pénètrent pas la matrice de polysaccharides et de glycoprotéines qui constituent ce biofilm [81].

## **II. Pouvoir pathogène et expression clinique**

Les infections à *P. aeruginosa* sont connues pour être difficiles à traiter, en raison de sa capacité à bien résister à beaucoup d'antibiotiques, et sa capacité d'acquérir de nouveaux mécanismes de résistance très rapidement [82]. Ce qui le qualifie de pathogène opportuniste impliqué, par excellence, dans les infections nosocomiales les plus redoutables [83].

*P. aeruginosa* est une bactérie opportuniste qui provoque rarement des infections chez les sujets immunocompétents. Il s'agit alors d'infestations massives par exemple chez les nageurs de piscines contaminées ou d'inoculations traumatiques directes dans un tissu ou une cavité (méningites ou ostéomyélite d'inoculation) [57].

En fait, il est de règle que les infections à pyocyanique surviennent chez des malades fragilisés en milieu hospitalier. L'antibiothérapie favorise l'implantation des bactéries sur la peau ou les muqueuses de ces malades. Le concept d'immunodépression inclut l'état consécutif aux stress, à des traumatismes divers (brûlures, fractures, interventions chirurgicales, injections intraveineuses d'héroïne, manœuvres instrumentales), à des chimiothérapies neutropéniantes utilisées pour le traitement des cancers ou des leucémies mais aussi les tares (diabète, mucoviscidose...) la malnutrition, l'âge (prématurité) ou le délabrement physiologique (vieillesse) [12].

## **III. Diagnostic**

### **III. 1. Prélèvement**

Les prélèvements permettant de mettre en évidence une bactérie responsable d'une infection dépendent du site anatomique atteint, mais peuvent correspondre à des liquides biologiques comme le liquide pleural dans lesquels la bactérie ou des antigènes bactériens peuvent être détectés [15].

Ces prélèvements sont soit de consistance liquide (urine, pus, liquide céphalorachidien, liquides d'épanchement, etc.) soit de consistance solide (cathéters, redons ; drain, matériel prothétique, etc.) dans le cas des hémocultures, le prélèvement de sang est directement mis dans un flacon de culture dès sa réalisation [15].

### **III. 2. Transport et fiche de renseignements**

Les résultats des examens bactériologiques dépendent pour une grande partie des conditions de prélèvements et de transport [84, 45].

Les échantillons biologiques sont prélevés dans des flacons stériles puis transmis au laboratoire le plus rapidement possible [15].

Il faut donc veiller à ce que le prélèvement soit correctement fait, et que les délais de transport et les techniques de conservation soient respectés. De même, une fiche de renseignements remplie correctement doit toujours accompagner le prélèvement [84,45].

### **III .3. Examen macroscopique**

L'examen macroscopique permet de noter les principaux caractères des prélèvements:

- **Trouble:** urine, LCR, liquide pleural ou articulaire.
- **Couleur:** une couleur bleue-verte peut être retrouvée sur les plaies infectés ou les expectorations purulentes.

### **III. 4. Examens microscopiques**

L'examen microscopique en bactériologie peut être effectué en deux phases: sans coloration de l'échantillon par observation directe entre lame et lamelle ou bien après coloration de l'échantillon [15].

#### **III .4.1. Examen à l'état frais**

C'est une méthode rapide qui consiste à observer entre lame et lamelle un prélèvement bactérien à l'objectif 40. Les renseignements obtenus par cette observation concernent principalement la mobilité des bactéries [15].

Il permet l'observation des bactéries vivantes et la détermination de leur cytologie, de leur morphologie, de leur mode de groupement et sur tous leur mobilité éventuelle [14].

#### **III .4.2. Coloration au bleu de méthylène**

La coloration au bleu de méthylène permet la mise en évidence de la forme, la taille et le mode de regroupement des bactéries. Cette technique est utilisée également pour confirmer l'étude cytologique faite au cours de l'examen à l'état frais [84,85] et pour certains prélèvements comme les ponctions (ex: LCR).

### **III .4.3. Coloration de GRAM**

La coloration de Gram permet de diviser le monde des bactéries en deux groupes distincts Gram + et Gram - . Cette coloration est toujours réalisée en routine lors des premiers examens de produits pathologiques en bactériologie médicale ; elle permet aussi d’apprécier la pureté des souches bactériennes avant toute identification [14].

### **III. 5. Culture / isolement**

Les bactéries d’intérêt médical les plus fréquemment responsables d’infection arrivent à se développer sur des milieux de culture. Ces milieux sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite une identification ainsi que l’étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure [15].

Les milieux de culture utilisés en bactériologie doivent contenir les éléments nécessaires à la survie et à la multiplication des bactéries, et doivent posséder les propriétés physicochimiques convenant à cette culture (pH en particulier) [15].

*P. aeruginosa* peut être cultivé en aérobiose sur milieu usuel non enrichi, à 37C° ainsi qu’à 42C°. Des milieux sélectifs, comme le milieu au cétrimide, peuvent être utilisés en cas de recherche spécifique sur des prélèvements polymicrobiens.

### **III .6. Identification**

L’identification est faite sur la base des différentes informations relatives à l’aspect des colonies, à la coloration de Gram, aux caractères biochimiques (test à l’oxydase surtout) [69].

L’identification d’espèce peut reposer sur une identification biochimique (galeries manuelles ou automates) ou par spectrométrie de masse [79] et le sérotypage.

### **III .7. Antibiogramme**

Un antibiogramme est une technique de laboratoire visant à tester la sensibilité d’une souche bactérienne vis-à-vis d’un ou de plusieurs antibiotiques à concentrations connues [57].

Pour *P. aeruginosa*, la liste standard des antibiotiques comporte la ticarcilline, la pipéracilline, la ceftazidime, l’imipénème (ou le méropénème), l’aztréonam, la gentamicine, la tobramycine, l’amikacine, la cipro- floxacine et la colistine [79].

## **IV. Prophylaxie et prévention**

### **IV.1. Hygiène et bon usage des antibiotiques**

La prévention des infections à *P. aeruginosa* repose sur trois principes :

- ✓ **la maîtrise de la pression de sélection antibiotique**: cet élément est majeur, il s'agit d'éviter, par le biais d'une antibiothérapie visant d'autres espèces bactériennes, et inactive ou peu active sur *P. aeruginosa*, de favoriser l'émergence de cette espèce.

De même, l'utilisation d'antibiotiques habituellement actifs sur *P. aeruginosa* doit suivre les recommandations de bonne prescription (associations, posologie, mode et durée d'administration) pour éviter l'émergence de résistances acquises [86]. Ceci entre dans la politique générale de bon usage des antibiotiques.

Toute antibiothérapie doit donc être justifiée et raisonnée afin de limiter ce risque. En pratique, les choses ne sont pas toujours simples, car les impératifs cliniques (choc septique par exemple) conduisent souvent à instituer une antibiothérapie à large spectre qui ne peut pas toujours être adaptée secondairement, par manque de documentation bactériologique ;

- ✓ **la maîtrise de la transmission croisée entre patients ou par l'intermédiaire des soignants**: elle repose sur l'application des précautions standards d'hygiène et, dans certains cas particuliers, par l'application de précautions complémentaires dites « contact ».

L'isolement des patients porteurs de bactéries multirésistantes (BMR) est un isolement, de type septique, associant un isolement géographique et un isolement technique ;

- ✓ **la maîtrise des gîtes de *P. aeruginosa* dans l'environnement hospitalier**, que ce soit sur des supports inertes humides (lavabos, nébulisateurs), dans le réseau d'eau ou dans des solutions antiseptiques contaminées (ammoniums quaternaires, chlorhexidine).

L'intérêt du dépistage des porteurs de *P. aeruginosa* dans les services de soins intensifs a donné lieu à de nombreux débats. Selon les recommandations de la Société française d'hygiène hospitalière d'avril 2009, concernant la prévention de la transmission croisée [87], ce dépistage, à l'admission, au cours du séjour ou à la sortie de réanimation, n'est pas recommandé s'il a été établi que l'incidence du portage est faible.



Il est par contre recommandé en cas d'épidémie récente, d'épidémie installée ou de situation endémoépidémique (avec notion de clonalité). Il doit alors être effectué sur un prélèvement de gorge, une aspiration trachéale ou par écouvillonnage rectal.

Il a été établi que l'identification d'une souche de *P. aeruginosa* présentant une résistance à l'imipénème associée à d'autres résistances, que ce soit en situation de portage ou d'infection, doit conduire à la mise en place de précautions complémentaires contacts (mesures barrières type isolement en chambre seule, matériel dédié, renforcement de l'hygiène des mains, etc.). Ceci ne concerne donc ni les souches de *P. aeruginosa* de phénotype sauvage, ni les souches qui présentent une résistance isolée à l'imipénème (mécanisme d'imperméabilité liée à la perte de la porine OprD). En revanche, la conduite à tenir vis-à-vis des souches résistantes à la ceftazidime n'a pas fait de consensus et doit donc être décidée localement entre les services cliniques, l'équipe opérationnelle d'hygiène hospitalière et le comité de lutte contre les infections nosocomiales.

*P. aeruginosa*, impliqué dans plus de 10 % des infections endémiques à l'hôpital, est également un agent fréquent d'épidémies acquises à l'hôpital avec environ 15 % des épidémies d'infections acquises à l'hôpital [79]. Il importe de disposer, au niveau de chaque structure hospitalière, d'un système de surveillance organisé par les équipes d'hygiène hospitalière capable de détecter une modification du bruit de fond endémique, d'identifier rapidement une épidémie et de donner précocement l'alerte. Les infections qui font suite à des actes exploratoires ou invasifs et celles qui surviennent dans les services de soins intensifs ou abritant des patients immunodéprimés font l'objet d'une surveillance particulière.

À partir de la détection initiale de cas groupés, l'investigation doit respecter plusieurs étapes : confirmation du phénomène épidémique, enquête épidémiologique et microbiologique à la recherche de la source, prise de mesures correctives, évaluation des résultats de ces mesures correctives, et parfois, recours à des méthodes de typage épidémiologique.

Le rôle du comité de lutte contre les infections nosocomiales est primordial pour la prise de décision qui peut concerner l'ensemble de l'établissement. Lors de la phase analytique de l'enquête épidémiologique, une attention particulière doit être portée sur les possibles sources de contamination liées à l'environnement humide. Les gestes invasifs nécessitant un contact avec des solutions aqueuses, du matériel humide ou désinfecté en phase liquide, peuvent être à l'origine d'infections épidémiques. La transmission croisée impliquant du personnel ayant eu en charge des patients déjà infectés ou colonisés doit être envisagée.

#### **IV.2. Place de la vaccination et de l'immunothérapie**

L'élaboration de vaccins ou d'anticorps monoclonaux contre l'infection à *P. aeruginosa* présente un double objectif: limiter l'inflammation lente et inexorable du parenchyme pulmonaire chez les patients souffrant de mucoviscidose et obtenir une activité protectrice vis-à-vis des infections sévères à *P. aeruginosa*, en particulier chez les brûlés.

Plusieurs vaccins, utilisant l'alginate, le LPS, l'exotoxineA, la flagelline, ont été testés par voie orale, parentérale ou intra nasale. Si beaucoup de vaccins expérimentaux ou d'anticorps monoclonaux ont été évalués avec, pour certains, des résultats prometteurs dans des essais précliniques, très peu ont atteint le stade de l'essai clinique et aucun n'a obtenu d'AMM [88,89].

En 2012, deux vaccins étaient en phase d'essai clinique, aucun vaccin n'a encore pu prouver son efficacité en pratique clinique dans la prévention des infections chroniques à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose [90]. L'utilisation d'un vaccin anti *Pseudomonas* ou d'anticorps efficaces en pratique courante demandera encore du temps.

# **Matériel et méthodes**

## **I. Lieu et durée du stage**

Ce travail a duré trois mois (de 18 février au 18 mai 2018). Il a été réalisé au niveau du Service de Microbiologie du Centre Hospitalo-universitaire BenBadis de Constantine (CHUC).

## **II. Type de l'étude**

Il s'agit de :

- Une étude rétrospective portant sur des résultats bactériologiques de différents prélèvements provenant des patients hospitalisés et des patients traités en externe sur une période de 12 mois (année 2017).
- Une étude prospective (du 18 février au 18 mai 2018) portant sur l'identification phénotypique de 26 souches.

## **III. Matériel**

### **III.1. Matériel pour prélèvements**

- Flacons d'hémoculture, bouillon citraté, milieux de castanèda et flacons bact/alert (système automatisé)
- Seringues
- Tubes stériles
- Sacs collecteurs
- Ecouvillons
- Cathéters d'aspiration
- Polyvidone iodée
- Alcool à 70°

### **III.2. Matériel pour analyse et antibiogramme**

Pour la réalisation de cette étude, nous avons utilisés :

#### **III.2.1. matériel**

- Anse de platine
- Lames et lamelles
- Pipettes Pasteur
- Microscope

- Cellule de Nageotte
- Boîtes de Pétri
- Bec Bunsen
- Papier Joseph
- Etuve à 37° + CO<sub>2</sub>
- Tubes à essais
- Ecouvillons
- Pince
- Distributeur d'ATB

### **III.2.2. Les milieux**

- Milieu Hektoen
- Gélose Nutritive
- Milieu Hektoen
- Milieu Chapman
- Gélose au sang cuit (chocolat)
- Milieu Mueller-Hinton
- Milieu Mannitol
- Milieu Citrate de Simmons
- Milieu TSI (Triple Sugar Iron)
- Milieu urée-indole
- Bouillon cœur-cerveille (BCC)
- Milieu Clark et Lubs

### **III.2.3. Réactifs**

- Bleu de Méthylène
- Violet de Gentiane
- Lugol
- Alcool à 95°
- Fuchsine
- Disques d'oxydase
- Réactif de Kovacs
- Réactif TDA (perchlorure de fer)
- Rouge de Méthyle
- NaOH ou KOH (VP1)

- $\alpha$ - Naphtol (VP2)
- Sérums (anticorps) anti-O polyvalents
  - Sérums (anticorps) anti-O polyvalents: PMA –PMC- PME – PMF
  - Sérums monovalents de P1 à P16

**Tableau 2.** Sérums (anticorps) anti-O polyvalents avec leurs sérums monovalents

<b>PMA</b>	P1	P3	P4	P6
<b>PMC</b>	P9	P10	P13	P14
<b>PME</b>	P2	P5	P15	P16
<b>PMF</b>	P7	P8	P11	P12

- Antibiotiques en disque:

Ticarcilline, Piperacilline, Piperacilline + Tazobactam, Ceftazidime, Cefepime, Aztreonam, Imipénème, Fosfomycine, Kanamycine, Tobramycine, Gentamicine, Amikacine, Pefloxacin, Ciprofloxacine, Sulfaméthoxazole, Triméthoprime, Sulfaméthoxazole + Triméthoprime, Colistine, Chloramphénicol.

### **III.3. Matériel biologique :**

- Pour l'étude rétrospective, nous avons étudiés 630 souches de *P. aeruginosa* de l'année 2017.
- Pour l'étude prospective, nous avons étudiés 26 souches de *P. aeruginosa* isolées à partir de prélèvements de patients des deux sexes et de différents services de 3 mois de 2018 (**tableau 3**).

Tableau 3. Origine des souches utilisées.

N° du prélèvement	N° de référence	Sexe	Nature de prélèvement	service
1	1262	F	Plaie (péritonite)	Urgence Chirurgicale
2	1052	F	Sonde	Centre de Brûlés
3	1031	H	Pus (dos)	Traitement Ambulatoire
4	857	F	pus	Urgence Chirurgicale
5	1626	H	Sonde urinaire	Urgence Chirurgicale
6	1602	H	Pus	ORL
7	1298	F	Sonde	Centre de Brûlés
8	1288	F	Pus	Chirurgie A
9	1273	F	Plaie chirurgicale	Médecine Interne
10	1705	F	Pus (prélèvement de la fesse)	Réanimation Médicale
11	1982	H	Pus D'une Plaie Infecté	Chirurgie A
12	1989	F	pus	Chirurgie B
13	1992	H	Pus	Centre de traumatologie
14	2007	H	2 prélèvements de pus (plaie infecte)	Orthopédie B
15	2010	F	Pus (jambe)	Traitement Ambulatoire
16	524	F	drain thoracique	Réanimation Médicale
17	1228	H	sang	Réanimation de

				Brûlés
18	1295	F	Sonde vésicale	Centre de Brûlés
19	1973	F	prélèvement trachéal	Urgence Chirurgicale
20	2039	F	ECBU	Médecine Interne
21	702	F	Sang	Centre de Brûlés
22	894	F	Pus	Dermatologie
23	2006	H	2 prélèvements de pus (plaie infecte)	Orthopédie B
24	2121	F	ECBU	Traitement Ambulatoire
25	2376	F	ECBU	Service des Maladies Infectieuses
26	1502	F	pus	Nurserie

**H** : homme

**F** : femme

## **IV. Méthodes**

### **IV.1. Techniques de prélèvement**

#### **IV.1.1. Prélèvements urinaires**

##### **↳ Chez l'adulte :**

- Recueil si possible le matin, au lever, sinon au moins 4 heures après la dernière miction ;
- Se laver soigneusement les mains avec un savon ;
- Faire une toilette intime soignée à l'eau et au savon si le recueil se fait au domicile du patient ou avec une lingette antiseptique si le recueil est réalisé au laboratoire ;
- Ouvrir le flacon stérile au dernier moment et sans toucher ni l'intérieur du flacon, ni l'intérieur du couvercle ;
- Il est essentiel de ne recueillir que le mi-jet ;



- Uriner ensuite directement dans le flacon et le refermer soigneusement sinon recueillir dans un tube stérile (environ 20 ml);
- Identifier l'échantillon et noter sur le flacon ou le tube : nom, prénom, âge, ainsi que la date et l'heure du recueil.

↳ **Chez le nourrisson:**

**Le prélèvement peut être réalisé par un parent ou le personnel de santé.**

- Se laver très soigneusement les mains ;
- Installer l'enfant sur le dos les jambes écartées, comme pour lui mettre une couche ;
- Nettoyer soigneusement la zone uro-génitale à l'eau et au savon. Un antiseptique peut être utilisé sur prescription médicale ;
- Bien sécher la peau qui ne doit pas être recouverte de poudre ou de crème et ne présenter aucune irritation ;
- Placer une poche à urine, en faisant attention à ne pas toucher l'intérieur de la poche ;
- A la fin de la miction, le sac est fermé hermétiquement et porté au laboratoire avec la fiche de renseignements ;
- le dispositif doit être gardé seulement 30 minutes, sinon il faut refaire l'opération.

↳ **Chez le patient sondé à demeure :**

Chez un patient porteur d'une sonde urinaire, le recueil se fait par ponction (seringue) sur un site spécifique dans la paroi de la sonde en respectant les étapes suivantes :

- Clamper le tuyau de la sonde, en dessous du site de prélèvement 10 à 15 minutes avant le prélèvement ;
- Réaliser une désinfection des mains par friction ;
- Porter des gants stériles ;
- Désinfecter le site de prélèvement avec des compresses imprégnées d'alcool à 70 ou un autre antiseptique alcoolique ;
- Réaliser la ponction et transvaser dans un tube stérile ;

**IV.1.2. Prélèvements de pus**

Le prélèvement se fait :

- *Soit par écouvillonnage d'une plaie superficielle*

- Un écouvillon que l'on peut immerger ou imbiber de milieu de transport est préférable à un écouvillon sec qui ne permet pas la recherche de germes anaérobies.
- On repérera et on prélèvera les traces purulentes qui devront être échantillonnées. En leur absence, le prélèvement devra être réalisé au fond de la plaie ou aux endroits où celle-ci est peu accessible aux contaminations, il faut au besoin écarter les berges.
- *Soit à la seringue purgée d'air en évitant de contaminer le prélèvement par la flore commensale*
  - Il se fait par ponction du pus ou des sécrétions à analyser.
  - Après désinfection de la peau à l'alcool, on peut envoyer rapidement le prélèvement dans la seringue, après avoir recouvert l'aiguille de son capuchon et purgé l'air éventuellement présent dans la seringue. Si le délai est trop lent, utiliser un milieu de transport dans lequel on injecte le prélèvement.

#### **IV.1.3. Prélèvements sanguins**

La ponction veineuse constitue la méthode habituelle des hémocultures :

- Nouveau-né / nourrisson : veine jugulaire, cathéter ombilical, en cas de disponibilité de dispositif de micro-hémoculture : talon.
- Adulte : veine du pli du coude.

L'hémoculture est réalisée avant toute antibiothérapie au moment des :

- Frissons.
- Et /ou pics fébriles.
- Si la température est en plateau, le prélèvement se fait à n'importe quel moment.

Et dans des conditions d'asepsie rigoureuse :

- Le préleveur doit se désinfecter les mains et porter des gants ;
- Le site de prélèvement doit être soigneusement désinfecté du centre vers la périphérie successivement avec de l'alcool à 70° puis avec un produit iodé ;
- Le bouchon du flacon d'hémoculture est désinfecté soigneusement avec le polyvidone iodée ou de l'alcool à 70°.

On ponctionne le sang veineux à raison de :

- 5-10 ml pour l'adulte.
- 1-5 ml pour l'enfant et le nourrisson.

2 à 3 hémocultures par 24 heures sont suffisantes ; un espace de temps de 30 à 60 minutes entre deux prélèvements est nécessaire.

Les flacons d'hémocultures contiennent des bouillons d'enrichissement simples ou enrichis, favorisant la croissance de la plupart des bactéries comme par exemple: bouillon citraté, milieu de castanêda.

Les systèmes automatisés permettent une détection précoce de la croissance bactérienne. Lors de la croissance bactérienne, les bactéries produisent du CO<sub>2</sub>, entraînant une baisse du pH qui sera détectée par l'automate.

Il faut acheminer les flacons le plus rapidement possible au laboratoire où ils sont immédiatement placés à l'étuve à 37°C ou introduits dans l'automate [73].

#### **IV.1.4. Prélèvement des liquides de ponction**

Les liquides d'épanchements (les liquides pleuraux, liquides d'ascite, liquides péricardiques, liquides de péritonite, liquides articulaires) sont précieux, car le prélèvement peut parfois se révéler difficile. La ponction est réalisée dans des conditions d'asepsie rigoureuse à l'aide d'une seringue. Le liquide (Quantité nécessaire  $\geq 3\text{ml}$ ) recueilli dans un tube stérile est rapidement porté au laboratoire.

#### **IV.1.5. Prélèvement de LCR**

Le LCR est prélevé par ponction lombaire (PL). Cette ponction doit se faire dans des conditions extrêmes d'asepsie (peau du patient et doigts du médecin), pour éviter les contaminations de conséquences, souvent, graves.

Le prélèvement est réalisé dans le bas du dos

La PL se fait entre les vertèbres lombaires L4 - L5 ou L5 -S1.

Le LCR est recueilli dans des tubes stériles étiquetés au nom du malade (2 à 5 ml chez l'adulte, moins chez l'enfant).

Il est préconisé de le recueillir dans 3 tubes numérotés de 1 à 3 pour distinguer entre une hémorragie méningée (liquide rouge incoagulable dans les trois tubes puis devient xanthochromique) et une blessure au cours du prélèvement (la teinte se modifie dans les trois tubes avec éclaircissement progressif du LCR).

#### **IV.2. Transport et fiche de renseignements**

- Les prélèvements doivent être réalisés stérilement, acheminé rapidement (<30 min.) au laboratoire ;

- Les retards de transport peuvent fausser les résultats des analyses cytologiques et bactériologiques ;
- Les conditions de transport sont essentielles à la qualité des résultats ;
- Conserver le prélèvement à température ambiante, ne pas exposer les prélèvements à des températures trop chaudes ou trop froides.

***Le prélèvement doit toujours être accompagné d'une fiche de renseignements qui comporte :***

- Nom et prénom du malade, son âge et son sexe ;
- Date et heure du prélèvement ;
- Nature de prélèvement ;
- Service d'hospitalisation ;
- La température du malade au moment du prélèvement dans le cas d'hémoculture ;
- Renseignements cliniques, diagnostic présomptif ;
- Une éventuelle antibiothérapie (antibiotique et durée).

### **IV.3. Techniques d'analyses**

#### **IV.3.1.Examen macroscopique**

##### **IV.3.1.1. LCR**

Un prélèvement de LCR peut prendre différents aspects [68]:

- Liquide clair (eau de roche) : normal ou méningite virale.
- Liquide trouble (eau de riz) : méningite purulente bactérienne.
- Liquide hémorragique : hémorragie méningée ou blessure au cours du prélèvement.
- Liquide xanthochromique : hémorragie ancienne ou compression médullaire.

##### **IV.3.1.2. Urine :**

L'urine normale a une couleur claire, d'aspect jaune citron tandis que l'urine infectée est souvent trouble, d'odeur nauséabonde et de couleur plus foncée.

##### **IV.3.1.3. Pus :**

Lors d'un examen macroscopique d'un pus, on note la consistance, la couleur, l'aspect, ainsi que la viscosité du pus.

Le pus peut être épais, visqueux, élastique, mélangé au sang ou non, fluide ou séreux.

La couleur varie de la teinte chocolat au blanc, certains pus sont verdâtres ou bleutés. Il peut parfois contenir des grumeaux.

### **IV.3.2.Examens microscopiques**

#### **IV.3.2.1.L'examen à l'état frais**

- **Principe**

Le but de cette étape est de déterminer la forme des bactéries ainsi de leur mobilité [84]. Elle permet l'observation des bactéries vivantes entre la lame et lamelle à l'objectif 40 et de mettre en évidence la mobilité des bactéries, leur morphologie et éventuellement la présence de levures, de cristaux ou de cellules sanguines [18].

L'étude de la cytologie se fait sur un hématimètre type cellule de Nageotte qui permet de compter le nombre de cellules de l'inflammation dans un prélèvement pathologique. Cette étude est surtout réalisée sur le LCR, les ponctions et les urines. Elle est qualitative et quantitative.

- **Technique**

L'examen à l'état frais se fait directement sur un produit pathologique ou sur des cultures en milieu liquide (sur un milieu solide, la mobilité s'exprime mal).

- Déposer une goutte du bouillon ou du prélèvement pathologique sur une lame propre grâce à une pipette pasteur ou à l'anse de platine ;
- Recouvrir la goutte d'une lamelle en évitant la formation de bulles d'air ;
- Observer immédiatement au microscope optique à l'objectif x40.

Pour l'étude de la cytologie :

- Remplir par capillarité avec le prélèvement pathologique la cellule de Nageotte préalablement recouverte d'une lamelle ;
- Placer sur un microscope optique à l'objectif x40 ;
- Attendre quelques minutes pour permettre le dépôt des cellules ;
- Compter le nombre de cellules et déterminer leur nature (polynucléaires, lymphocytes).

- **Résultats**

A l'état frais, *P. aeruginosa* apparaît sous forme de bacille isolé et très mobile se déplaçant en ligne droite grâce à son unique flagelle polaire.

- **Principe**

La coloration au bleu de méthylène (BM) permet de confirmer la cytologie et de différencier les cellules inflammatoires (polynucléaires, lymphocytes), de distinguer la forme, la disposition (intra ou extracellulaires), ainsi que le mode de groupement des bactéries éventuellement présentes [18].

- **Technique**

- Réaliser un frottis et le fixer :

- Déposer sur une lame propre une goutte de bouillon, une culture ou un prélèvement pathologique. Etaler ensuite sur la lame du centre vers l'extérieur ;
- Sécher et fixer le frottis en 2 ou 3 passages à la flamme d'un bec Bunsen.
- Couler une solution de bleu de méthylène sur le frottis;
- Le temps de contact est de 1-10 min ;
- Rincer la lame à l'eau du robinet ;
- Sécher entre deux feuilles de papier buvard ;
- Observer au microscope à immersion, au x100 ;
- Les structures colorables apparaissent bleues [18].

- **Résultats**

- Les noyaux des cellules apparaissent plus foncés, ce qui permet de différencier facilement entre les différentes cellules (polynucléaires, lymphocytes, cellules épithéliales...).
- Les bactéries sont colorées en bleu sombre. Cette coloration permet une observation rapide des frottis.

#### **IV.3.2.3. Coloration de Gram**

- **Principe**

Sur le frottis bactérien préparé, le premier colorant, le cristal violet oxalaté, va colorer en violet les bactéries, puis le lugol( iodo-inodurée) libère de l'iode qui va fixer le colorant précédent.

Un complexe iode-cristal violet se forme ; il sera solubilisé par l'alcool à 95° lors de la phase de décoloration. Uniquement pour les bactéries à Gram -.

Le deuxième colorant, dit de contraste, la fuchsine, va colorer en rose les bactéries à Gram -. Les bactéries à Gram +, non décolorées par l'alcool, vont conserver leur couleur violette [14].

- **Technique**

- Réaliser un frottis et le fixer ;
- Recouvrir la lame de violet de gentiane 1 minute ;
- Rejeter le violet de gentiane ;
- Recouvrir de lugol 30 seconds ;
- Rejeter le lugol ;
- Décolorer à l'alcool, la lame étant tenue inclinée. La durée de décoloration à l'alcool est variable selon l'épaisseur du frottis ;
- Rincer abondamment à l'eau du robinet;
- Recouvrir la lame de fuchsine diluée, 30 seconds à 1 minute ;
- Rincer à l'eau du robinet;
- Sécher entre deux feuilles de papier filtre;
- Observer au microscope optique à l'objectif X100, à l'aide d'huile d'immersion.

Les bactéries à Gram positif seront colorées en violet et les bactéries à Gram négatif en rose [91].

- **Résultats**

A la coloration de Gram, *P. aeruginosa* apparaît sous forme de bacille à Gram négatif (coloré en rose).

#### **IV.3.3. Isolement et culture**

L'isolement peut se faire à partir d'un prélèvement pathologique, ou à partir d'un bouillon de 18h.

- Homogénéiser le produit pathologique par une simple agitation ;
- Flamber l'anse de platine et prendre une goutte d'un bouillon ou d'un produit pathologique ;

- La culture se fait par ensemencer sur gélose nutritive (GN), gélose Hektoen (milieu sélectif pour BGN), gélose Chapman (milieu sélectif pour les staphylocoques) et gélose au sang cuit (gélose chocolat) par étalement ;
- Incuber à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

- **Résultats**

Le *P. aeruginosa* pousse sur la gélose nutritive, la gélose Hektoen et la gélose au sang cuit.

#### **IV.3.4. Tests biochimiques**

##### **IV.3.4.1. Test d'oxydase**

- **Principe**

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme de la chaîne respiratoire: la cytochrome oxydase.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N-diméthyl-paraphénylène-diamine. Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé violet.

- **Technique**

- Déposer un disque d'oxydase sur une lame, l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ;
- Prélever une colonie sur un milieu gélosé avec une pipette pasteur boutonnée et la déposer sur le disque.

- **Lecture**

La présence d'un cytochrome oxydase se traduit par l'apparition d'une coloration violette en 20 à 60 secondes.

- **Résultat**

Le test de *P. aeruginosa* à l'oxydase donne une coloration violette du disque. *P. aeruginosa* est oxydase positive.

##### **IV.3.4.2. Galerie biochimique**

Après l'isolement et l'identification des caractères cultureux de *Pseudomonas*, nous avons réalisés la mini galerie biochimique classique pour mettre en évidence les caractères biochimiques de cette bactérie.



Pour chaque souche, préparer d'abord la suspension en mettant une colonie prélevée de la boîte de pétri après repiquage dans 5 ml d'eau physiologique.

Les milieux d'identification suivants ont été utilisés :

#### ↳ **Milieu Triple Sugar Iron (TSI)**

- **Principe**

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du saccharose, du glucose (avec ou sans production de gaz), et de la production de sulfure d'hydrogène.

- **Technique**

- Prendre quelques gouttes de la suspension bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ou une anse de platine ;
- Ensemencer le culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées ;
- Incuber à 37°C pendant 24 heures.

- **Lecture**

L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par un virage au jaune du rouge de phénol.

- Culot de couleur jaune : glucose fermenté (positif).
- Culot de couleur rouge (inchangé) : glucose non fermenté (négatif).
- Pente virant au jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s) (positif(s)).
- Pente rose-rouge : lactose et saccharose non fermentés (négatifs).

La production d'H<sub>2</sub>S se traduit par le noircissement de la zone séparant le culot de la pente ou au niveau du culot (H<sub>2</sub>S positif).

La production de gaz se traduit par la formation de bulles dans la masse du milieu repoussant parfois le milieu vers le haut du tube.

- **Résultats**

L'étude de *P. aeruginosa* par le milieu TSI donne un culot et une pente de couleur rouge. *P. aeruginosa* est une bactérie non fermentative, donc, il est glucose, lactose, saccharose. De plus, il est, H<sub>2</sub>S et gaz négatif.

### ↳ **Milieu citrate de Simmons**

- **Principe**

Le but de ce test est de savoir si la bactérie utilise le citrate (acide organique) comme seule source de carbone et d'énergie.

Ce milieu contient du bleu de bromothymol comme indicateur de pH (à pH acide : jaune, à pH neutre : vert, et à pH alcalin : bleu). L'utilisation du citrate s'accompagne d'une alcalinisation du milieu, mise en évidence par le virage du bleu de bromothymol au bleu.

- **Technique**

- Prendre une goutte de la suspension bactérienne à l'aide d'une anse de platine stérile ;
- Déposer la goutte sur le milieu citrate de Simmons incliné ;
- Ensemencer la moitié supérieure du milieu au citrate de Simmons par une strie unique centrale. Garder la moitié inférieure du milieu comme témoin ;
- Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.

- **Lecture**

- Culture et/ou virage au bleu (alcalinisation) : citrate positif.
- Absence de culture et pas de virage au bleu (milieu vert) : citrate négatif.

- **Résultats**

Sur le milieu citrate de Simmons, *P. aeruginosa* provoque un virage du milieu en bleu. *P. aeruginosa* est citrate positif.

### ↳ **Milieu mannitol mobilité**

- **Principe**

Il s'agit d'un milieu semi-solide contenant du mannitol et du rouge de phénol comme indicateur. Il est utilisé pour l'étude de deux caractères qui sont :

- La fermentation du mannitol : lors de l'utilisation du mannitol, il y a acidification du milieu et l'indicateur du pH (le rouge de phénol).
- La mobilité : s'exprime par l'apparition d'un trouble au milieu dû à la diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement.

- **Technique**

- Réaliser une piqure centrale à travers le milieu, à l'aide d'une pipette Pasteur contenant quelques gouttes de la suspension bactérienne ;

- Incuber à l'étuve à 37°C durant 18 à 24 heures.

- **Lecture**

- Virage du milieu au jaune (acidification) : mannitol positif.
- Le milieu garde sa couleur initiale (rouge) : mannitol négatif.
- Culture dans toute la gélose (trouble) et diffusion à partir de la piqûre : bactérie mobile.
- Culture le long de la piqûre seulement et pas de diffusion : bactérie immobile.

- **Résultats**

L'étude de *P. aeruginosa* par le milieu mannitol-mobilité donne un milieu de couleur rouge avec une culture en dessus de la gélose en contact avec l'air. *P. aeruginosa* est une bactérie mannitol négatif (métabolisme oxydatif).

↳ **Milieu Clark et Lubs**

- **Principe**

Ce milieu permet d'étudier une voie de fermentation du glucose : la voie du butane diol

**Test VP (Vosges-Proskauer) :** il permet de détecter la production d'acétoïne, de diacétyl et de butane-diol à partir de la fermentation du glucose. L'ajout des réactifs VP1 et VP2 permet d'obtenir une coloration rosé ou rouge acétoïne après 10 à 15 min.

**Test du rouge de méthyle :** ce test permet la mise en évidence, après addition du rouge de méthyle, de la fermentation acide mixte (apparition immédiate d'une couleur rouge).

- **Technique**

- Ajouter 3 à 5 gouttes de la suspension dans le milieu Clark et Lubs ;
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24 heures.
- Après incubation nous avons partagé le milieu en deux tubes d'hémolyse pour pratiquer les deux tests :

**Test de RM :**

- Ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyle.
- Lecture immédiate.

**Test de VP :**

- Ajouter 2 à 3 gouttes de VP1 et 2 à 3 gouttes de VP2.
- Agiter et incliner le tube pour favoriser l'oxygénation du milieu.
- Lire au bout de 15 minutes.

- **Lecture**

**Test de RM :**

- Milieu rouge : RM positif.
- Milieu marron : RM négatif.

**Test de VP :**

- Coloration rouge en surface : VP positif.
- Pas de coloration : VP négatif.

- **Résultat**

*P. aeruginosa* est une bactérie non fermentative, il est donc RM et VP négatifs.

↳ **Milieu urée-indole**

- **Principe**

Le milieu urée-indole permet de mettre en évidence trois caractères : l'uréase, l'indole et la TDA.

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée et conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone. L'ammoniac alcalinise le milieu et entraîne le virage du rouge de phénol (indicateur du pH) au rose-rouge.

L'indole est le produit de l'hydrolyse du tryptophane par une enzyme, la tryptophanase. Il est mis en évidence grâce à la coloration rouge caractéristique qu'il donne avec le réactif de Kovacs.

Le tryptophane désaminase (TDA) est une enzyme qui dégrade (désamination) le tryptophane en acide indole-pyruvique. En présence du perchlorure de fer et en milieu acide, l'acide indole-pyruvique donne un précipité brun-noir caractéristique.

- **Technique**

- Mettre 2 à 3 gouttes de la suspension bactérienne dans le milieu urée-indole.
- Incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

Après avoir constaté la couleur du milieu :

- Ajouter 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs pour la mise en évidence de l'indole.
- Ajouter 2 à 3 gouttes de perchlorure de fer (réactif de TDA) pour la mise en évidence du tryptophane désaminase.

- **Lecture**

Noter dans l'ordre :

- Virage du milieu au rose-rouge : uréase positive.
- Le milieu a une teinte jaune : uréase négative.

Après ajout du réactif de Kovacs :

- Formation d'un anneau rouge à l'interface : indole positif.
- Absence d'anneau rouge (anneau marron) : indole négatif.

Après ajout du perchlorure de fer (réactif de TDA) :

- Formation d'un précipité brun-noir : bactérie TDA positive.
- Coloration jaune : bactérie TDA négative.

- **Résultat**

Dans le milieu urée-indole, *P. aeruginosa* peut être uréase positive, il est indole positif, mais toujours TDA négative.

#### **IV.3.4.3. Test sérologique (Sérotypage)**

- **Principe**

Le sérotypage est une technique immunologique qui consiste en la mise en évidence d'antigènes structuraux bactériens et permet l'identification de sérotypes.

Le test repose sur l'agglutination, par des sérums spécifiques, de bactéries possédant les antigènes correspondants. Les antisérums de *P. aeruginosa* sont destinés à l'identification sérologique de *P. aeruginosa* par la méthode d'agglutination sur lame, à des fins épidémiologiques.

- **Technique**

Le sérotypage est effectué, après identification de l'espèce, à partir d'une culture pure et fraîche de *P. aeruginosa* isolé sur milieu gélosé.

- Déposer sur une lame propre une goutte de sérum.
- Prendre avec l'anse de platine flambée et refroidie une colonie de *P. aeruginosa* et la mélanger avec le sérum d'une manière homogène.
- Agiter la lame par mouvements lents et circulaires.
- Observer l'apparition d'agglutinats fins, granulaires et difficiles à dissocier (s'aider éventuellement d'un fond noir ou d'une loupe pour une meilleure visualisation des agglutinats).

- La souche est d'abord agglutinée avec les sérums polyvalents, en cas d'agglutination, continué avec les sérums monovalents correspondants au sérum polyvalent positif.

- **Lecture**

L'apparition d'une agglutination fine signifie que l'on est en présence du sérotype correspondant au sérum monovalent qui a servi à l'agglutination.

#### **IV.3.5. Antibiogramme**

- **Principe**

Au laboratoire et après l'isolement et l'identification de microorganisme à étudier, on peut tester sa sensibilité à divers antibiotiques. Nous avons utilisé la méthode de l'antibiogramme selon la recommandation du **CLSI** [92].

On Prépare des boîtes de Pétri en coulant de la gélose Mueller Hinton (sur une épaisseur de 4mm) et on sèche avant l'emploi.

- **Technique**

- **Réalisation d'une suspension**

- Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile 4 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques à partir d'une culture pure de 18 heures sur un milieu d'isolement ;
- Mettre ces colonies en suspension (avec 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile).

- **Ensemencement**

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

Cette opération est répétée deux fois en tournant la boîte 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Passer enfin l'écouvillon sur le bord de la gélose.

➤ **Application des disques**

A l'aide d'un distributeur, déposer les disques des antibiotiques sur le milieu selon la méthode suivante :

- Ramener les distributeurs à température ambiante ;
- Sortir le distributeur du coffret ;
- Positionner le distributeur sur la boîte de pétri ;
- Appuyer franchement et verticalement sur la poignée, puis relâcher ;
- A la fin de l'utilisation, remettre le distributeur dans son coffret avec la capsule de déshydratant puis stocker le coffret fermé entre +2 et +8°C ;
- Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, centre à centre ;
- Une fois appliquée le disque ne doit pas être déplacé (appuie avec une pince) ;
- Incubation pendant 18 à 24 heures dans l'étuve à 37°C.

• **Lecture**

Après incubation, il apparaît des zones claires autour des disques ayant des diamètres variables, ce sont des zones d'inhibition ou de sensibilité.

La lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique à l'aide d'un pied à coulisse métallique, de la boîte fermée.

Les valeurs retrouvées sont comparées aux valeurs critiques reportées dans la table de lecture, et classer les bactéries dans l'une des classes : **Sensible**, **Intermédiaire** ou **Résistante**, en fonction des antibiotiques testés.

## **Résultats et discussion**



## A. Etude prospective

### I. Identification bactériologique

#### I.1. Caractères morphologiques

D'après les tests utilisés, les 26 isolats bactériens possèdent les mêmes caractères morphologiques (**tableau 4**)

**Tableau 4.** Caractères morphologiques des isolats bactériens

Etat frais	Coloration de Gram
Bacilles très mobiles, se déplaçant en ligne droite grâce à un flagelle polaire généralement unique	Bacilles fins colorés en rose ; à Gram négatif apparaissent isolés ou en diplobacilles

L'examen à l'état frais montre que les 26 souches bactériennes sont des bacilles mobiles grâce à un flagelle polaire généralement unique.

Après la coloration de Gram, les souches purifiées sont apparues sous forme de bacilles roses. Elles sont donc à Gram négatif.

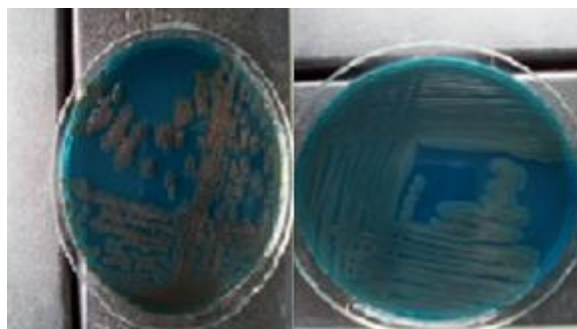
Nos résultats sont similaires à plusieurs études liées à *P. aeruginosa* [51,10, 4].

#### I.2. Caractères cultureux

Les résultats d'isolement et de repiquages des 26 souches étudiées sur Hektoen, ont permis d'observer deux types de colonies *P. aeruginosa* caractérisées par une odeur florale (**tableau5**) (**figure 14**):

**Tableau 5.** Caractères cultureux des isolats bactériens

Type1	Type 2
Grandes colonies de couleur verte foncée, rugueuses, bombées à bord irrégulier	Petites colonies, mûtes, bombées à contour régulier, lisses



**Figure 4.** Aspect des isolats bactériens sur milieu Hektoen

A partir des cultures des différents prélèvements, deux types de colonies ont été observés; des colonies de grande taille avec un aspect bombé et contour irrégulier et des colonies de petite taille, mûtes, à contour régulier, lisses. Ces colonies sont caractérisées par une odeur florale, ainsi qu'une pigmentation bleu-vert diffusant dans toute la boîte de Pétri.

Ces résultats sont en concordance avec la littérature [79,84]; il s'agit donc de colonies de *P. aeruginosa*.

### I.3. Caractères biochimiques

La mini galerie biochimique nous a permis d'identifier quelques caractères biochimiques de *P. aeruginosa*.

Les résultats obtenus sont les mêmes pour les 26 souches bactériennes (**tableau 6**) :

**Tableau 6.** Résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour les 26 souches étudiées.

Milieu	Citrate de Simmons	Milieu TSI	Urée indole		
			Urée	Indole	TDA
Résultats	+	-	-	+	-

+ : indique qu'il y'a un changement de couleur dans le milieu.

- : indique qu'il n'y'a aucun changement de couleur.

L'analyse biochimique a montré que toutes les souches sont glucose-, lactose-, saccharose-, H<sub>2</sub>S-, gaz-, Citrate+, urée-, Indole+.

Nous avons constatés que toutes les souches isolées sont des bactéries non fermentatives (glucose-, lactose-, saccharose-, H<sub>2</sub>S-, gaz-), utilisent le citrate comme seule source de carbone (Citrate+), elles sont d'uréase négative, indole positif et TDA négative.

Nos résultats sont les mêmes que ceux rapportés dans la littérature [8, 93, 94]. Ce qui révèle et assure que nos souches sont des *P. aeruginosa*.

#### **I.4. Sérotypage**

La mise en évidence d'antigènes structuraux bactériens nous a permis d'identifier les sérotypes suivants (**tableau 07**).

**Tableau 7.** Répartition des 26 souches *P. aeruginosa* selon le sérotype

<b>Sérotype</b>	<b>Nombre des souches</b>	<b>Pourcentage</b>
<b>P1</b>	7	26.92%
<b>P6</b>	6	23.08%
<b>P16</b>	4	15.38%
<b>P3</b>	3	11.54%
<b>P11</b>	2	7.69%
<b>P12</b>	2	7.69%
<b>P2</b>	1	3.85%
<b>P7</b>	1	3.85%
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>100%</b>

Les résultats d'agglutination a révélé que les sérotypes les plus fréquents sont P1 (26.92 %), P6 (23.08%) et P16 (15.38%), suivis des sérotypes P3 (11.54%), P11et P12 (7.69%).

Nos résultats sont différents de ceux d'une étude tunisienne qui rapporte que les sérotypes prédominants sont les P11 (51%), P6 (17%) et P3 (8%). D'autre part, une étude iranienne rapporte que parmi 117 isolats de *P. aeruginosa*, 20% sont du sérotype P6 et 18% du sérotype P11 [95].

Une étude française note que les sérotypes les plus fréquents au cours des pneumonies étaient P6 (29%) et P11 (23%), tandis que le sérotype P3 n'était que faiblement représenté (4.1%) [96].

### I.5. Résistance aux antibiotiques

**Tableau 8.** Taux de résistances des 26 souches.

<b>Antibiotique</b>	<b>Nombre de souches testées</b>	<b>Nombre de souches résistantes</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Ticarcilline</b>	26	7	26.92
<b>Pipéracilline</b>	24	6	25
<b>Ceftazidime</b>	23	5	21.74
<b>Céfépime</b>	20	5	25
<b>Aztréonam</b>	22	1	4.54
<b>Imipénème</b>	24	5	20.83
<b>Gentamicine</b>	26	6	23.07
<b>Amikacine</b>	13	2	15.83
<b>Ciprofloxacine/Pefloxacine</b>	26	6	23.07

Nos isolats se sont révélés résistants à de nombreux antibiotiques : 26.92% à la ticarcilline, 25% à la piperacilline et la céfépime et 21.74 % à la ceftazidime. De plus, 20.83 % sont résistants à l'imipénème.

Pour les aminosides, les taux de résistance sont de 23.07% pour la gentamicine et 15.83% pour l'amikacine, 23.07% des souches sont résistantes aux fluoroquinolones (ciprofloxacine et pefloxacine).

Il faut noter que toutes les souches isolées sont sensibles à la colistine.

Nos résultats sont proches de ceux d'une étude tunisienne dont les taux sont de 26.2% pour la ticarcilline, 23.6% pour la piperacilline et 21.8% pour la ceftazidime.

Pour l'imipénème, nos souches sont plus résistantes par rapport à celles isolées dans d'autres études: 14.6% en Espagne et 15.2% en France [97,98].

Concernant les fluoroquinolones, 23.07% de nos souches sont résistantes à ces antibiotiques. Nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus dans une étude Bulgare (80.3%) et ceux d'une étude iranienne (55%) [99,100].

La sensibilité à la colistine est rapportée par de nombreuses études comme celle réalisée au Maroc [101].

## **B. Etude globale (rétrospective et prospective)**

### **II. Répartition de *Pseudomonas aeruginosa***

L'étude globale s'est déroulée du 1<sup>er</sup> janvier 2017 au 18 mai 2018. Il s'agit d'une étude rétrospective (du 1<sup>er</sup> janvier 2017 au 18 février 2018) et l'autre prospective durant les trois mois de l'année 2018 (du 18 février 2018 au 18 mai 2018).

Durant notre étude, 27067 bactéries ont été isolées, dont 630 des *P. aeruginosa*, soit 2.33%.

#### **II.1. Répartition selon l'unité**

**Tableau 9.** Répartition selon les unités

<b>Unité</b>	<b>Nombre</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Bactériologie médicale</b>	368	58.41
<b>ECBU</b>	120	19.05
<b>Hémoculture (sang)</b>	80	12.70
<b>RNM/UM</b>	61	9.68
<b>IST</b>	1	0.16
<b>Total</b>	<b>630</b>	<b>100%</b>

**ECBU** : Examen Cytobactériologique des Urines

**RNM/UM** : Réanimation Médicale / Urgence Médicale

**IST** : Infections Sexuellement Transmissibles

*P. aeruginosa* est isolé essentiellement au niveau de l'unité de bactériologie médicale : 368 (58.41%) suivie par l'unité des ECBU : 120 (19.05%), les hémocultures: 80 (12.70%) et la réanimation médicale : 61 (9.68%) (**tableau 9**).

Ces résultats peuvent s'expliquer par le nombre plus élevé des traités par l'unité de bactériologie médicale par rapport aux autres unités.

Mais il faut signaler que cette bactérie est peu isolée à partir des urines, même si le nombre des ECBU réalisés est important (près de 10000/an).

## II.2. Répartition selon le sexe

**Tableau 10.** Répartition selon le sexe (n=630)

<b>Sexe</b>	<b>Nombre</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Homme</b>	339	53.81
<b>Femme</b>	291	46.19
<b>Total</b>	<b>630</b>	<b>100%</b>

Une légère prédominance masculine est notée, 53.81% pour 46.19% (**tableau 10**). Le sex-ratio est de 1,16.

Nos résultats sont similaires à une étude marocaine [102]. Mais il faut noter que d'autres études rapportent une équivalence d'isolement chez les deux sexes [60] ou même une prédominance du sexe féminin [61].

Le sexe n'est donc pas un facteur déterminant au cours des infections à *P. aeruginosa*.

**II.4. Répartition selon le service**

**Tableau 11.** Répartition selon les services de CHUC

<b>Services</b>	<b>Nombre</b>	<b>Pourcentage %</b>
Centre des brûlés	124	19.68
Chirurgie viscérale	99	15.71
Réanimation médicale	56	8.89
Médecine interne	55	8.73
ORL	38	6.03
Pédiatrie	34	5.40
Orthopédie	28	4.44
maladies infectieuses	24	3.81
Hématologie	21	3.33
Neurologie	20	3.17
Cardiologie	11	1.75
Dermatologie	9	1.43
Nurserie	9	1.43
Rhumatologie	8	1.27
Urgences chirurgicales	6	0.95
Médecine légale	6	0.95
Oncologie /radiothérapie	5	0.79
Centre de maxillo-faciale	4	0.63
Pneumo-physiologie	4	0.63
Endocrinologie	2	0.32
Hémodialyse	1	0.16
<b>Traitement ambulatoire</b>	<b>66</b>	<b>10.48</b>
<b>Total</b>	<b>630</b>	<b>100%</b>

La plupart des services de CHUC sont représentés. Les souches proviennent essentiellement du centre des brûlés (19.68%), suivi par le service de la chirurgie viscérale (15.71%) et le service de réanimation médicale (8.89%).

66 souches sont isolées chez les patients qui consultent en externe. Nous sommes incapable d'affirmer qu'il s'agit de véritable souches communautaires ou de souches provenant d'autres structures de soins que le patient a fréquenté avant d'être soigné au CHU de Constantine, car les fiches de renseignements sont rarement remplies correctement.

Ces taux sont différents à ceux retrouvés dans plusieurs études. Comme l'étude réalisée au CHU Fatouma Bourguiba de Monastir entre 2002 et 2005 qui rapporte que 33.5% des souches sont isolées dans les services de réanimation et 24.3% dans les services de chirurgie [103] et celle faite dans différents hôpitaux de l'Ouest Algérien et qui rapporte que *P. aeruginosa* est isolé essentiellement en réanimation (65.9%), en chirurgie générale (15.2%) et en neurochirurgie (7.8%) [104].

## **II.5. Répartition selon la nature du prélèvement**

**Tableau 12.** Répartition selon la nature du prélèvement

<b>Prélèvement</b>	<b>Nombre</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Pus</b>	275	43.65
<b>Urine</b>	133	21.11
<b>Sang (hémoculture)</b>	95	15.07
<b>Sonde vésicale</b>	55	8.73
<b>Prélèvement trachéale</b>	36	5.71
<b>Cathéter</b>	9	1.43
<b>LCR</b>	9	1.43
<b>Liquide péritonéal</b>	8	1.27
<b>liquide pleural</b>	6	0.95
<b>Drain thoracique</b>	3	0.48
<b>Liquide d'ascite</b>	1	0.16
<b>Total</b>	<b>630</b>	<b>100%</b>



*P. aeruginosa* est isolé essentiellement dans les pus (43.65 %), suivis des urines (21.11%), du sang (15.07%) et des sondes viscérales (8.73%) (**tableau 12**).

Nos résultats sont en concordance avec ceux d'une étude réalisée à l'hôpital Cheikh Zaid à Rabat, et celle dans un centre hospitalier universitaire à Monastir, qui rapportent que *P. aeruginosa* est isolé essentiellement, à partir des pus, des urines, et des hémocultures [105,103].

Mais ils sont différents de ceux retrouvés dans une études réalisée à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de Rabat [101] qui apporte que 26.7% des souches *P.aeruginosa* sont isolées à partir des urines (26.7%), des pus (24%), et des cathéters (21.3%) et ceux d'une étude libanaise qui note que *P. aeruginosa* est majoritairement isolé dans les urines (39,3 %), suivies par les prélèvements de plaies (21,2 %) et les prélèvements d'oreille (16,5 %) [2].

II.6. Répartition des germes associés à *P. aeruginosa*

Tableau13. Répartition des germes associés à *P. aeruginosa*

germes associés	Nombre	Pourcentage %
<i>E.coli</i>	36	18%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31	15.5%
<i>Staphylococcus aureus</i>	31	15.5%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	24	12%
<i>Enterococcus faecalis</i>	15	7.5%
<i>Enterobacter spp.</i>	12	6%
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	6%
Staphylocoque à coagulase négative (SCN)	8	4%
<i>Morganella morganii</i>	7	3.5%
<i>Providencia spp.</i>	5	2.5%
<i>Proteus mirabilis</i>	5	2.5%
<i>Serratia marcescens</i>	4	2%
<i>Providencia stuartii</i>	2	1%
<i>Citobacter spp.</i>	2	1%
<i>Proteus vulgaris</i>	2	1%
<i>Enterococcus faecium</i>	2	1%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0.5%
Levures	1	0.5%
<b>Total</b>	<b>200</b>	<b>100%</b>

Nous avons constatés, au cours de notre études, que *P. aeruginosa* est isolé dans certaines situations en association avec d'autres bactéries : 36 fois avec *E.coli* (18%), 31 avec *K.pneumonie* et *Staphylococcus aureus* (15.5% pour chaque bactérie) et 24 avec *Acinitobacter baumannii* (12%) (tableau 13).

Ces résultats sont légèrement différents de ceux retrouvés dans une étude réalisée dans le même établissement entre 2015 et 2016, et qui rapporte que les bactéries les plus associées à *P. aeruginosa* sont *Klebsiella pneumoniae* (18.9%) et *E.coli* (18%) [84].

### III. Résistance aux antibiotiques

**Tableau 14.** Taux de résistance aux antibiotiques (n= 630).

<b>Antibiotiques</b>	<b>Nombre de souches Testées</b>	<b>Nombre de souches Résistantes</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Ticarcilline</b>	620	432	69.57
<b>Pipéracilline</b>	609	414	67.09
<b>Ceftazidime</b>	600	346	57.66
<b>Céfépime</b>	575	321	55.73
<b>Aztréonam</b>	608	340	55.92
<b>Imipénème</b>	590	155	26.27
<b>Gentamicine</b>	600	205	34.16
<b>Amikacine</b>	600	319	53.16
<b>Ciprofloxacine/pefloxacine</b>	590	149	25.25

Les souches de *P. aeruginosa* se sont révélées résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques testées, à part la colistine, pour laquelle tous les isolats sont restés sensibles.

Pour les bêta-lactamines, les taux de résistance sont de 69.57% à la ticarcilline, 67.09% à la pipéracilline, 57.66% à la ceftazidime et 55.92% à l'aztréonam.

Le taux de résistance à l'imipénème est de 26.27 %. Nos souches sont moins résistantes par rapport à celles isolées dans des études nationales et internationales : 35% en Algérie (AARN) et 42.3% en Bulgarie [106,99].

Le principal mécanisme par lequel *P.aeruginosa* acquiert une résistance à cet antibiotique est la réduction de la perméabilité par perte de la porine OprD2, voie préférentielle de pénétration des carbapénèmes. Ce mécanisme de résistance est stable depuis plusieurs années et il est présent en France chez 15 à 20 % des souches [107].

Les taux de résistance aux aminosides sont : 53.16% pour l'amikacine et 34.16% pour la gentamicine. Alors que le taux de résistance à la ciprofloxacine est de 25.25% (**tableau 14**).

Nos souches sont plus sensibles à la piperacilline comparativement aux souches isolées entre 2001 et 2006 dans un hôpital universitaire à Sofia en Bulgarie (86.2%) [70]. Selon une étude réalisée en Espagne, nos souches sont plus sensibles à la gentamicine (34.16 % contre 54.9%), mais plus résistantes à l'imipénème (26.27% contre 14.6%) et à l'amikacine (53.16% contre 5.3%) [108].

Mais nos souches sont beaucoup plus résistantes par rapport que celles isolées dans un centre hospitalier français entre 2002 et 2006 (23.9% pour ceftazidime et 5.3% pour l'amikacine) [97].

Pour l'imipénème, nos souches sont plus résistantes par rapport à celles isolées dans des études nationales et internationales : 14.6% en Espagne [110], 15.2% en France [98], 23% à l'hôpital Cheikh Zaid à Rabat [105] et 35% en Algérie (AARN) [108].

En Tunisie, une étude sur *P. aeruginosa* à l'hôpital Charles Nicolas [109] rapporte une résistance à l'imipénème de 43.9%, plus élevée que celle observée au cours de notre étude.

Pour les aminosides, la résistance est de 53.16% pour l'amikacine et celle de la gentamicine est de 34.16%. Ces taux sont plus élevés que ceux de L'AARN : 16.4% à la gentamicine et de 11.6% à l'amikacine [98].

### **III.1.Taux de résistance selon le service**

Il faut noter que les taux de résistance sont différents selon le service d'isolement. Ils sont plus élevés dans les unités de soins intensifs (USI). Nous allons rapporter individuellement les résultats dans trois services où la bactérie est la plus isolée.

III.1.1. Taux de résistance au centre des brûlés

Tableau 15. Taux de résistance au centre des brûlés (n = 124)

Antibiotiques	Nombre des souches résistantes	Pourcentage(%)
Ticarcilline	82	66.12
Pipéracilline	82	66.12
Ceftazidime	44	35.48
Céfépime	41	33.06
Aztréonam	30	24.19
Imipénème	80	64.51
Gentamicine	68	54.83
Amikacine	25	20.16
Ciprofloxacine/pefloxacine	34	27.41

La résistance aux antibiotiques pose un problème au service du centre des brûlés. Notre étude rapporte des taux de résistances très élevés aux antibiotiques habituellement prescrits : ticarcilline et pipéracilline (66.12 %), céftazédime (35.48%), imipénème (64.51%), gentamicine (54.83%), l'amikacine (20.16%), et les fluoroquinolones (27.41%) (tableau 15).

Nos résultats sont plus élevés par rapport à ceux rapportés par l'étude tunisienne réalisée dans un centre des brûlés : 37.1% à l'imipénème, 11.5% à l'aztréonam, 27.1% à la ciprofloxacine et 29.6% à l'amikacine [99, 84].

*P. aeruginosa* est donc un agent majeur d'infections nosocomiales chez les brûlés. Les souches rencontrées sont fréquemment multi-résistantes. L'acquisition de nouvelles résistances est facile et rapide par une forte concentration bactérienne et une importante sélection par les antibiotiques.

**III.1.2. Taux de résistance au service de chirurgie viscérale**

**Tableau 16.** Taux de résistance au service de chirurgie viscérale (n=99)

<b>Antibiotiques</b>	<b>Nombre de souches résistantes</b>	<b>Pourcentage(%)</b>
<b>Ticarcilline</b>	65	65.65
<b>Pipéracilline</b>	60	60.60
<b>Ceftazidime</b>	42	42.42
<b>Céfépime</b>	38	38.38
<b>Aztréonam</b>	21	21.21
<b>Imipénème</b>	71	71.71
<b>Gentamicine</b>	46	46.46
<b>Amikacine</b>	25	25.25
<b>Ciprofloxacine/pefloxacine</b>	23	23.23

Les taux de résistances dans les services de chirurgie viscérale est de : 65.65% pour la ticarcilline, 60.60% pour la pipéracilline, 42.42% à la céftazédime, 71.71 % pour l'imipénème, 46.46% pour la gentamicine et 23.23% pour les fluoroquinilones.

**III.1.3. Taux de résistance au service de réanimation médicale**

**Tableau 17.** Taux de résistance au service de réanimation médicale (n=56)

<b>Antibiotiques</b>	<b>Nombre des souches résistantes</b>	<b>Pourcentage(%)</b>
<b>Ticarcilline</b>	18	32.14
<b>Pipéracilline</b>	15	26.78
<b>Ceftazidime</b>	16	28.57
<b>Céfépime</b>	12	21.42
<b>Aztréonam</b>	17	30.35
<b>Imipénème</b>	10	17.85
<b>Gentamicine</b>	10	17.85
<b>Amikacine</b>	1	1.78
<b>Ciprofloxacine/pefloxacine</b>	18	32.14

Les taux de résistance les plus élevés sont notés pour la ticarcilline et les fluoroquinolones : 32.14% pour chaque antibiotique.

Pour les autres antibiotiques : la ceftazidime : 28.57%, pipéracilline : 26.78%. Nos résultats sont similaires à ceux retrouvés dans des études Tunisiennes réalisées en réanimation [103,110].

Tous les antibiotiques sont touchés par la résistance en dehors de l'amikacine (1.78%).

Nos souches restent plus sensibles que celles isolées dans un hôpital universitaire à Sofia en Bulgarie, où on note que 86.2% des souches sont résistantes à la pipéracilline, 49.8% à l'aztreonam, 48.9% à la céfépime et 45.8% à la ceftazidime [99].

Pour les aminosides, nos résultats (17.85 % pour la gentamicine, 1.78% pour l'amikacine) sont inférieurs à ceux rapportés dans plusieurs études : 79.7% à la gentamycine et 59.1 % à l'amikacine dans l'étude bulgare [99], 86% à la gentamycine et 73% à l'amikacine dans l'étude iranienne [100].

Pour les fluoroquinolones, 32.14 % de nos souches sont résistantes dans ce service. Nos résultats sont moins élevés que ceux obtenus dans l'étude bulgare (80.3%) [99] et l'étude iranienne (55%) [100]. Les résultats tunisiens et français sont aussi moins élevés que les nôtres (21.6%, 29% respectivement) [64,85].

### **III.1.4. Taux de résistance chez les patients traités en externe**

**Tableau 18.** Taux de résistance chez les patients traités en externe (n=66)

<b>Antibiotiques</b>	<b>Nombre de souches résistantes</b>	<b>Pourcentage(%)</b>
<b>Ticarcilline</b>	19	28
<b>Pipéracilline</b>	13	19.69
<b>Ceftazidime</b>	12	18.18
<b>Céfépime</b>	9	13.63
<b>Aztréonam</b>	15	22.72
<b>Imipénème</b>	3	4.54
<b>Gentamicine</b>	10	15.15
<b>Amikacine</b>	4	6.06
<b>Ciprofloxacine/pefloxacine</b>	10	15.15

Chez les patients traités en externes, la résistance est un peu basse par rapport aux services pour tous les antibiotiques testés, le taux de résistance sont : ticarcilline : 28%, piperacilline : 19.69%, ceftazédime : 18.18 %, la gentamicine et les fluoroquinolones 15.15 % pour chaque antibiotique (**tableau 18**).

Les taux de résistance assez élevés constatés chez les patients traités en ambulatoire pose le problème de l'origine de ces souches comme nous avons notés plus haut. S'agit-il de réelles souches communautaires ? ou s'agit-il de souches hospitalières qui ont colonisé ou contaminé le patient lors d'un séjour antérieure dans une autre structure hospitalière avant d'arriver au CHU de Constantine ? Et dans ce cas, les taux sont acceptables vu le contexte épidémiologie de la résistance de la bactérie aux antibiotiques.

Notre étude a permis d'évaluer la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* au niveau des différents services de CHU de Constantine, la résistance multiple aux antibiotiques surtout dans les USI, pose un problème thérapeutique important.

Les données épidémiologiques montrent que si la résistance n'augmente pas de façon globale en Algérie, la nature de cette résistance devient de plus en plus inquiétante avec l'émergence de carbapénèmases. Le risque d'extension est bien présent avec le risque d'importation à partir de pays voisins où ces souches sont plus répandues [92,84].

Ceci doit donc appeler à une forte vigilance grâce au dépistage précoce de ces mécanismes de résistance mais surtout au renforcement des mesures d'hygiène autour des cas d'infection ou de portage afin d'éviter leur transmission.

L'usage rationnel des antibiotiques est aussi une mesure importante de lutte contre l'apparition des résistances.

À l'avenir, les solutions à ces problèmes de résistance ne résident pas uniquement dans la recherche des molécules actives sur cette bactérie, mais dans la prévention contre la diffusion de ce pathogène résistant.



# **Conclusion**

Malgré les progrès thérapeutiques, la mortalité due aux infections à *P. aeruginosa* reste élevée à cause d'une part, des difficultés thérapeutiques engendrées par cette bactérie et d'autre part, à cause des pathologies associées. Les infections à *P. aeruginosa* sont des évènements cliniques rares et sévères, très souvent décrites dans un cadre nosocomiale.

Nous avons noté au cours de notre travail que la bactérie est isolée essentiellement dans le centre de brûlés (19.68%), suivi par la chirurgie viscérale (15.71%) et la réanimation médicale (8.89%). Chez les patients traités en externe, le taux est de 10.48%. De plus, elle est retrouvée surtout dans les pus (43.65%) suivis par les urines (21.11%) et le sang (15.07%).

La résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* s'est révélée plus importante. En effet les différences observées peuvent être liées à la prise en charge des patients impliquant des soins invasifs, à la pression d'antibiotique exercée et à un problème de maîtrise de l'environnement hospitalier. Les taux de résistances retrouvés dans notre étude sont élevés : 21.74% à la ceftazidime, 20.83 % à l'imipénème, 23.07 % à la gentamicine et 23.07 % aux fluoroquinolones.

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

La surveillance de l'écologie des services à risque doit s'accompagner d'une formation/information de l'ensemble des personnels de santé.

# Résumé

## Résumé

*P. aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif, pathogène, opportuniste et responsable d'infections graves. Elles posent des problèmes préoccupant dans nos hôpitaux en raison de sa fréquence et de sa résistance aux antibiotiques.

L'objectif de ce travail est l'identification des caractères bactériologiques des souches isolées de divers prélèvements dans différents services du CHU de Constantine ainsi que leurs profils de résistance aux antibiotiques.

Au cours de notre étude, 630 souches de *P.aeruginosa* ont été isolées dont 19.68 % proviennent du centre des brûlés. Ces pathogènes ont été isolés essentiellement à partir des prélèvements de pus (43.65%).

L'étude de la résistance a révélé que les taux de résistances sont : 21.74% à la ceftazidime, 20.83 % à l'imipénème, 23.07 % à la gentamicine et 23.07 % aux fluoroquinolones.

Ces résultats montrent que la fréquence de ces souches augmente de façon inquiétante et leur réémergence représente un sérieux problème thérapeutique et épidémiologique, d'où la nécessité de la mise en place d'un système de surveillance de l'environnement microbien de l'hôpital et l'application stricte des mesures d'hygiène.

**Mots-clés :** *Pseudomonas aeruginosa* , Infection, Résistance aux antibiotiques

## Summary

*P. aeruginosa* is an opportunistic pathogenic Gram-negative bacterium responsible for serious infections, which are of concern in our hospitals because of its frequency and resistance to antibiotics.

The objective of this work is the identification of the bacteriological characteristics of strains isolated from various samples in different departments of the CHU of Constantine and their antibiotic resistance profiles.

In our study, 630 strains of *P. aeruginosa* were isolated, of which 19.68% were from the burn center. These pathogens were isolated mainly from pus samples (43.65%).

The study of the resistance revealed that the resistance rates are: 21.74% with ceftazidime, 20.83% with imipenem, 23.07% with gentamicin and 23.07% with fluoroquinolones.

These results show that the frequency of these strains is worryingly increasing and their re-emergence represents a serious therapeutic and epidemiological problem, hence the need for the establishment of a monitoring system for the microbial environment of the hospital. the strict application of hygiene measures.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa* , Infection, Antibiotic resistance

## ملخص

الزائفة الزنجارية هي بكتيريا سالبة الجرام ممرضة انتهازية مسؤولة عن التهابات خطيرة تسبب مشاكل مقلقة في المستشفيات بسبب نسبتها ومقاومتها للمضادات الحيوية.

الهدف من هذا العمل تحديد الخصائص البكتيريولوجية للسلاطات المعزولة لمختلف العينات في مختلف اقسام المستشفى الجامعي بقسنطينة وبالتالي ملامح مقاومة المضادات الحيوية الخاصة بهم.

في دراستنا ، تم عزل 630 سلالة من الزائفة الزنجارية ، منها 19.68 ٪ من مركز الحرق. تم عزل هذه العوامل الممرضة بشكل رئيسي من عينات القيح (43.65 ٪).

كشفت دراسة المقاومة أن معدلات المقاومة هي 21.74 ٪ السيفنازيديم، 20.83 ٪ ايميبينيم، 23.07 ٪ مع جنتاميسين و 23.07 ٪ مع الفلوروكينولونات.

تظهر هذه النتائج أن تكرار هذه السلالات يزيد بشكل مثير للقلق وتمثل عودة ظهورهم مشكلة علاجية وبائية خطيرة ، ومن هنا جاءت الحاجة إلى إنشاء نظام لرصد البيئة الميكروبية المستشفى والتطبيق الصارم لإجراءات النظافة.

**كلمات البحث:** الزائفة الزنجارية- عدوى- مقاومة المضادات الحيوية.

## **Références bibliographique**

- [1] Husson MO, Izard D, Hansen W. *Pseudomonas* et genres apparentés. In : Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet S, editors. *Manuel de bactériologie clinique*. Paris: Elsevier. 1994; 3:1141–63.
- [2] Hamze. M., Dabboussi .F., Izard. D. Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques : étude sur quatre ans (1998-2001) au nord du liban . *Médecine et maladies infectieuses*.2004 ; 34 :321-324.
- [3] Guilherme P., Ramos J., Felipe L.R., Tuon F., Seasonal humidity may influence *Pseudomonas aeruginosa* hospital-acquired infection rates. *International Journal of Infectious Diseases*. 2013 ; 17(9) : 757–761.
- [4] Bricha S.K .,Ounine S., Oulkheir N. E .,EL haloui . et B. Attarassi. Facteurs de virulence et epidemiologie lies au *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Tunisienne d’Infectiologie*. 2009 ; 2 : 7- 1.
- [5] Meghdas I., Monzer H., Dabboussi F., Baida N .,Daniel I. « Taxonomie du genre *Pseudomonas aeruginosa* : Retrospective et actualité », *Lebanese Science Journal*. 2003 ; 5(1) : 115 -27.
- [6] Elmeskini K. « Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa* ». Thèse de doctorat : pharmacie, Rabat: Université Mohammed v Souissi. 2011.
- [7] Chaker H. « Régulation de l’adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane ». Thèse de doctorat : Grenoble: Université de Grenoble : Science agricole.2012.
- [8] Boudouda R. « Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse de *Pseudomonas aeruginosa* ». Mémoire de master : Génétique Moléculaire, Constantine: Université des Frères Mentouri Constantine.2015.
- [9] Hafiane A. et Ravaoarino M. « Différentes méthodes de typage des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées des patients atteints de mucoviscidose ». *elsevier masson, Medecine et maladies infectieuses*.2008 ; 38 : 238- 47.
- [10] Science Source. « Find art america [en ligne] ». Find art america. 2016. Disponible sur: <https://fineartamerica.com/featured/1-mdr-pathogen-pseudomonas-aeruginosa-science-source.html>. 2016.



- [11] Barir O et Ghilani M. « Le Profil de résistance aux B-lactamines des souches de *Pseudomonas aeruginosa* d'origine Hospitalière ». Mémoire de master : Biochimie et biologie moléculaire, Biskra: Université Mohamed khider-Biskra.2011.
- [12] Souley L et Moustafa F.S. Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du point G .Université de BAMAKO Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. 2002 ; 95.
- [13] Flandrois J.P. Bactériologie médicale. Presse universitaire de Lyon, Foulongne..1997 ; 207.
- [14] Delarras C. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Tec & Doc Lavoisier.2007 ; 476.
- [15] Denis F., Poly M.C., Martin C., Bingen E.et Quentin R. Bactériologie médicale, technique usuelles. Masson, Cedex.2007; 333-335.
- [16] Palleroni N. Manual of Systematic Bacteriology.USA.1984;141–171.
- [17] Pouneh K. « Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing ». Thèse de doctorat : Microbiologie: Université de Toulouse. 2009.
- [18] Cady A. Etude génétique de la résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse pour le diplôme d'État de Docteur en Pharmacie.Étude Université de Nantes faculté de pharmacie.2006.
- [19] Oulymata G. Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles a Gram négatif. Thèse pour le diplôme d'État de Docteur en Pharmacie.Université cheikh anta diop de dakar facculté de médecine et de pharmacie.2007.
- [20] Essoh C.Y. « Étude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique. » Thèse de doctorat : Science agricole, Paris-sud: Université Paris-Sud.2013.
- [21] Giraud C., Bernard C., Ruer S., et al. Biological “glue” and “Velcro”: Molecular tools for adhesion and biofilm formation in the hairy and gluey bug *Pseudomonas aeruginosa*. Env Microbiol Rep. 2010 ; 2 : 343–358.

- [22] Bentzmann S.D., Plésiat P. « *Pseudomonas aeruginosa* : une virulence complexe », Revue Francophone des Laboratoires .2011; 435 : 73- 81.
- [23] Minamino T. et Namba K. Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. J Mol Microbiol Biotechnol.2004; 7 : 5–17.
- [24] Minchella A., Molinari L., Alonso S., Bouziges N., Sotto A., et Lavigne J.P. Evolution of antimicrobial resistance against *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital between 2002 and 2006. Pathol Biol (Paris).2010; 58: 1-6.
- [25] Kaiser D. Bacterial swarming: a re-examination of cell movement patterns. Curr Biol .2007;17: 561-570.
- [26] McCarter L. L. Regulation of flagella. Curr Opin Microbiol.2006; 9: 180-186.
- [27] Toutain C. M., Zegans M. E. & O'Toole G. A. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2005;187: 771-777.
- [28] Kohler T., Curty L.K., Barja F., Van Delden C., Pecher J.C. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagelle and pili. J Bacteriol.2000; 182: 5990-5996.
- [29] Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. J Bacteriol. 2002; 4:1140-1154.
- [30] O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol. 1998; 28 : 449-61.
- [31] Perrin. « Structure et croissance bactérienne Relations hôtes - bactéries ». Slide player. 2015; <http://slideplayer.fr/slide/3194550/>.
- [32] Tennent J. M. et Mattick J. S. Type 4 fimbriae. In P. Klemm (ed.), fimbriae: aspects of adhesion, genetics, biogenesis and Vaccines.1994; 127–146.
- [33] Strom M. S. et Lory S. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. Annu Rev Microbiol. 1993 ; 47: 565–596.

- [34] Dalrymple B et Mattick J. S. An analysis of the organization and evolution of type 4 fimbrial (MePhe) subunit proteins. *J Mol Evol.*1987; 25: 261–269.
- [35] Ottow J. C. G. Ecology, physiology and genetics of fimbriae and pili. *Annu Rev Microbiol.*1975; 29: 79–108.
- [36] Asikyan M. L., Kus J. V. & Burrows L. L. Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*2008; 190: 7022-7034.
- [37] Mattick J.S. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol.* 2002; 56: 289–314
- [38] Henrichsen J. Twitching motility. *Ann Rev Microbiol.*1983; 37: 81–93.
- [39] Bradley D. A. Pilus-dependent *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage with a long noncontractile tail. *Virology.* 1973; 51 : 489–492.
- [40] Ben haj khalifa A., Moissenet D., Vu thien H., Khedher M. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations Virulence. *Annales de Biologie Clinique.* 2011; 69 (4) : 393- 403.
- [41] Adamo R., Sokol S., Soong G., Gomez M. & Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and Toll-like receptor 2 as well as Toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 30: 627-641.
- [42] Pier G. B., Grout M., Zaidi T. S., Olsen J. C., Johnson L. G., Yankaskas J. R. & Goldberg J. B. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science.*1996;271 :64-67.
- [43] Rocchetta H. L., Burrows L. L. Lam J. S. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.*1999; 63:523-553.
- [44] Gilgenkrantz S [Small treatise on art of warfare. from *Shigella*]. *Med Sci (Paris).* 2005;21 : 443- 444.
- [45] Carpentier J.P., Morillon M., Petrognani R. et Cavallo J.D. Infections à bacille pyocyanique. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale.*2003 ; 8 : 25-50.
- [46] Fox G.j., Barthold S.W., Davisson M.T., Newcomer C.E., Quimby F.W. Smith A.L. The mouse in biomedical research. *Academic Press, London.*2006; 281-282.

- [47] Ruimy R., Andremont A. Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*: mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Reanimation* .2004; 13: 176–184.
- [48] Miyazaki S., Matsumoto T., Tateda K., Ohno A. & Yamaguchi K. Role of exotoxin a in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J Med Microbiol.*1995; 43: 169–175.
- [49] Bell CE., Eisenberg D. Crystal structure of diphtheria toxin bound to nicotinamide adenine dinucleotide. *Biochemistry.*1996; 35: 1137-49.
- [50] Wick M.J., Frank D.G., Storey D.G., Iglewski B.H. Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Annu Rev Microbiol.*1990; 44: 335-363.
- [51] Singlten P. *Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologie.* DUNOD, Paris.2005; 490.
- [52] Kipnis E., Sawa T., Wiener-Kronish J. « Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. », *Med Mal Infect.*2006; 36: 78- 91.
- [53] Takase H., Nitani H., Hoshino K., Otani T. Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun.*2000; 68: 1834–1839.
- [54] Lamont I.L., Beare P.A., Ochsner U., Vasil A.I., Vasil M.L. Siderophore- mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA.*2002; 99 : 7072
- [55] Briche S.K., Ounine S., Oulkheir N. E., EL haloui . et B. Attarassi. (2009). facteurs de virulence et epidemiologie lies au *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Tunisienne d’Infectiologie* 2, 7 – 1
- [56] Zuckert W.R., Marquis H. & Goldfine H. Modulation of enzymatic activity and biological function of *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase C by amino acid substitutions and by replacement with the *Bacillus cereus* ortholog. *Infect Immun.*1998; 10 : 4823-4831.
- [57] Darghout S et Metheni A. « Caractérisation morphologique, biochimique et mutagenèse des souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans la région de Constantine » Mémoire de master : Génétique Moléculaire, Université des Frères Mentouri Constantine.2016.

- [58] Galloway D.R. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol Microbiol.*1991; 5: 2315-21.
- [59] Park W.P., Biedermann K., Mecham L., Bissett D.L., Mecham R.P. Lysozyme binds to elastin and protects elastin from elastase-mediated degradation. *Journal of Investigative Dermatology.*1996; 106: 1075-1080
- [60] Déziel E., Lépine F., Dennie D., Boismenu D., Mamer O.A., Villemur R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim Biophys Acta.*1999 ;1440 : 244-252
- [61] Jensen P.O., Bjarnsholt T., Phipps R., Rasmussen T. B., Calum H., Christoffersen L., Moser C., Williams P., Pressler T., Givskov M. & Høiby N. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorumsensing- controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.*2007; 153: 1329-1338.
- [62] Gilboa G.N. Lectins of *Pseudomonas aeruginosa* : properties, biological effects and applications. In : Mirelman, D, ed. *Microbial lectins and agglutinins : properties and biological activity.*NewYork : JohnWiley & Sons.1986; 255-69.
- [63] Imberty A., Wimmerova M., Mitchell E. P. & Gilboa-Garber N. Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into molecular basis for host glycan recognition. *Microb Infect.* 2004; 6: 222–229.
- [64] Tielker D., Hacker S., Loris R., Strathmann M., Wingender J., Wilhelm S., Rosenau F., Jaeger K.E. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Revue: The Structural Biology Brussels.* 2005 ;5:1313-1323
- [65] Adam E. C., Mitchell B. S., Schumacher D. U., Grant G. & Schumacher U. *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am J Respir Crit Care Med.*1997;155: 2102-2104.
- [66] Guzzo J., Pages JM., Duong F., Lazdunski A., Murgier M. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease : evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol* .1991; 173: 5290-5297.

- [67] Shaver C. M., Hauser A.R. Relative Contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to Virulence in the Lung. *Infection And Immunity*.2004; 12 : 6969–6977
- [68] Ramos J.L. *Pseudomonas* virulence and gene regulation. Kluwer Academic, New York.2004.
- [69] Nyaledome A.I « *Pseudomonas aeruginosa* : épidémiologie et état actuel des résistances à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V. » Université Mohammed- V–RABAT–.2016.
- [70] David M., Lemeland J.F., Boyer S. Emergence de bêta-lactamases à spectres étendu chez *Pseudomonas aeruginosa* : a propos de 24 cas au CHU de Rouen. *Pathologie Biologie*. Volume.2008 ; 56 :429-434.
- [71] Mesaros N., Van Bambeke F., Glupczynski Y ., Vanhoof R., Tulkens P . M. L'efflux des antibiotiques : un mécanisme ubiquitaire conduisant a la résistance. Etat de la question et implications microbiologiques et cliniques. Unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire. *J Antibiotiques*. 2005 ; 8:308-320 .
- [72] Godfrey A.J., Bryan L.E. Penetration of bêta-lactam through *Pseudomonas aeruginosa* porin channels .*J Antimicrob. Agents. Chemother*.1987;31(8) ;1216-1221.
- [73] Mderreg B. Infection à *pseudomonase aeruginosa* en réanimation. Évolution de la résistance aux antibiotiques à travers le temps. Thèse n° 196. Thèse présentée à l'Université Mohamed V-RABAT.2015 ;408.
- [74] Mesaros N., Nordman P., Plesiat P.*Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect*. 2007 ; 6 : 560-78.
- [75] Cavallo JD, Hocquet D, Plesiat P, Fabre R, Roussel-Delvallez M, on behalf of GERPA. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials;a 2004 French multicentre hospital study. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:1021–4.
- [76] Institut de veille sanitaire. Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte – Réseau REA-Raisin, France, résultats 2009. Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice (Fra), octobre 2010. 43p.
- [77] Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002;34:634–40.

- [78] Bertrand X, Hocquet D, Costa Y, conseil scientifique de l'ONERBA. *Pseudomonas aeruginosa*: ONERBA network data and results of the 2007 survey. *Med Mal Infect* 2008;38(Suppl. 2):S63–4.
- [79] Mérens A., Jaut P., Bargues J.D., Cavallo. Infection à *pseudomonas aeruginosa*. EMC-Maladies infectieuses.2013 ; 12: 1166-8598.
- [80] Stokes H.W, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *J Mol Microbiol*.1989; 3:1669-83.
- [81] Rouillon S, Ourdanabias S, Jamart S, Hernandez C, Meunier O. Etude de l'efficacité d'un produit détergent désinfectant pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnement hospitalier. *Pathol biol*.2006 ; 54 :325-330.
- [82] Nauciel C, Vildé J.L. Bactériologie médicale. 2ème édition. MASSON.2005.
- [83] Fauchère J.L., Avril J.L. Bactériologie générale et médicale. Ed ellipses. Français. 2002; 280.
- [84] Achari N., Benchaita A., Benchikh El Fegoun R. *Pseudomonas aeruginosa* au CHU de Constantine. Mémoire de master : Département de Pharmacie, constantine : Université de Constantine 3.2016.
- [85] Véron M. *Pseudomonadaceae*. In : Leminor L, Véron M. Bactériologie médicale. Paris : Flammarion.1989;555-598.
- [86] Milatovic D, Braveny I . Development of resistance during antibiotic therapy. *Eur J Clin Microbiol*.1987;6 : 234–44.
- [87] Bernard G. Société Française d'Hygiène Hospitalière. Recommandations pour la prévention de la transmission croisée.2009 ; 17 : 2-60.
- [88] Döring G). Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol*.2010; 300: 573–577.
- [89] Döring G, Pier GB. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Vaccine*.2008;26 :1011–1024.
- [90] Johansen H.K., Gøtzsche P.C. Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*.2008;4: 1399.
- [91] CLSI, (2011). Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. M100-S21 31

[92] Sefraoui I. Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien [Thèse de doctorat]. Université Abou Bekr Belkaid. 2015.

[93] Dhayanithi N.B., Ajith Kumar T.T., Kathiresan K. Effect of neem extract against the bacteria isolated from marine fish. *Journal of Environmental Biology*.2010;31: 409-412.

[94] Nkang A.O., Okonko O.I., Fowotade A., Udeze A.O., Ogunnusi T.A., Fajobi E.A., et al. Antibiotics susceptibility profiles of bacteria from clinical samples in Calabar, Nigeria. *J. Bacteriol. Res.*2009; 1 (8): 89-96.

[95] Estahbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheh F. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns*. 2002 Jun; 28(4):340–348.

[96] Lu Q, Eggimann P, Luyt CE, Wolff M, Tamm M, François B, Mercier E, Garbino J, Laterre PF, Koch H, Gafner V, Rudolf MP, Mus E, Perez A, Lazar H, Chastre J, Rouby JJ. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Critical Care*. 2014 ; 18: 17.

[97] E. Sevillano et al. Resistance to antibiotics in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathologie Biologie*.2006 ; 54 : 493-497.

[98] Minchella A. et al. Evolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans un centre hospitalier universitaire entre 2002 et 2006. *Pathologie Biologie*.2010 ;58 :1-6.

[99] Starteva T., Ouzouna-Raykova V., Morkova B., Todorova A., Mateva-Proevska Y., Mitov I. Problematic Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia ; Bulgaria : Current Status of antimicrobial résistance and prevailing resistance mechanisms. *Journal of medical Microbiology*.2007 ; 56: 956- 96.

[100] Saderi H et al. Détection of Metallo- $\beta$ -lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Tehran, Iran, *LABMEDICINE*.2010 ; 3 : 609-61.

[101] Xavier .B., céline .S., pascal .C., Daniel T. épidémiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Elsevier masson.2011 ; 435 :36-39.

[102] Aissa.k. Profil de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques dans les services de réanimation de l'HMIM V de rabat entre 2006 et 2010. these de doctorat.2012.



- [103] H. Ben Abdellah, S. Noomen, A. Ben Elhadj Khélifa, O. Sahnoun, A. Elargoubi, M. Mastouri. Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la région de Monastir Médecine et maladie infectieuses. 2008; 38: 554-55.
- [104] Zoghlami A, Kanzari L, Boukadida J, Messadi AA, Ghanem A. Profil épidémiologique et résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au centre de Traumatologie et Grands Brûlés en Tunisie durant trois ans. La Tunisie Médicale. 2012; 90(11):803 – 806.
- [105] 43 K.Chokri, La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans l'hôpital cheikh zaid à rabat entre 2006-2008. Thèse du doctorat en pharmacie. 2009. 49.
- [106] M.Drissi et al. Antibiotics susceptibility and mechanisms of  $\beta$ -lactams resistance among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* : First report in Algeria. Médecine et maladies infectieuses. 2008 ;38 :187-191.
- [107] Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50: 1633-41.
- [108] 81. Sevillano E., Valderreya C., Canduelaa M.J., Umarana A., Calvob F., L. Gallegoa,. Resistance to antibiotics in clinical isolates, Pathologie Biologie. 2006 ; 54 : 493-497
- [109] Hammami S., Gautier V., Ghozzi R., et al. Diversity in VIM-2-encoding class 1 integrons and occasional blaSHV2a carriage in isolates of a persistent, multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone from Tunis. Clin Microbiol Infect. 2010;16: 189-93.
- [110] Kalai S., Jouaihia W., Mahjoubi F., Ghozzi R., Thabet L., Ben Redjeb S., et al. *Pseudomonas aeruginosa*. Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques (1999-2000). Tun Med. 2004; 82: 1070-4.

**Noms et Prénoms :** MEMDOUH Sara  
REDDAF Nor elhoda

**Date de soutenance :** le : 28-06-2018

**Thème :** *Les infections à Pseudomonas aeruginosa au CHU de Constantine*

**Résumé :**

*P. aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif, pathogène, opportuniste et responsable d'infections graves. Elle pose des problèmes préoccupant dans nos hôpitaux en raison de sa fréquence et de sa résistance aux antibiotiques.

L'objectif de ce travail est l'identification des caractères bactériologiques des souches isolées de divers prélèvements dans différents services du CHU de Constantine ainsi que leurs profils de résistance aux antibiotiques.

Au cours de notre étude, 630 souches de *P.aeruginosa* ont été isolées dont 19.68 % proviennent du centre des brûlés. Ces pathogènes ont été isolés essentiellement à partir des prélèvements de pus (43.65%).

L'étude de la résistance a révélé que les taux de résistances sont : 21.74% à la ceftazidime, 20.83 % à l'imipénème, 23.07 % à la gentamicine et 23.07 % aux fluoroquinolones.

Ces résultats montrent que la fréquence de ces souches augmente de façon inquiétante et leur réémergence représente un sérieux problème thérapeutique et épidémiologique, d'où la nécessité de la mise en place d'un système de surveillance de l'environnement microbien de l'hôpital et l'application stricte des mesures d'hygiène.

**Mots-clés :** *Pseudomonas aeruginosa* , Infection, Résistance aux antibiotiques.

**Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-universitaire BenBadis de Constantine (CHUC).**

**Président de jury:** M<sup>r</sup>. MOULAHM.T  
**Rapporteur :** M<sup>me</sup>. KHELILI .K  
**Examineur:** M<sup>me</sup>. ZITOUNI.H  
**Maitre de stage:** M<sup>r</sup>. BENLABED. K

**Prof. CHU. Constantine.**  
**MCB. UFM. Constantine 1.**  
**MCB. UFM. Constantine 1.**  
**Prof. CHU. Constantine.**