



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

**Caractérisation morphologique, biochimique et mutagenèse des souches
de *Pseudomonas aeruginosa* dans la région de Constantine.**

Présenté et soutenu par : *DARGHOUT Sofia*
METHENI Amina

Le : 21/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme *SATTA Dalila* (Professeur - UFM Constantine 1).

Rapporteur : Mme *BECHKRI Sarah* (MAA- UFM Constantine 1).

Co-encadreur : Mr *RAMDANI Hakim* (Dr spécialiste en microbiologie médical HMRUC).

Examineurs : Mme *SAOUDI Mouna* (MAA-UFM Constantine 1).

Année universitaire
2015 - 2016

REMERCIEMENTS

Nous remercions **DIEU** le tout puissant de nous avoir donnée la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Nous tenons à exprimer toute notre gratitude et remercier madame **BECHKRI S** 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 le docteur **RAMDANI H**, qui nous a Co-encadrés, guidée et patiemment conseillée pour la réalisation de la grande partie de notre travail au sein de laboratoire de bactériologie au niveau de l'hôpital militaire de Constantine.

Nous remercions également

Madame **SATTA D**, qui a bien voulu honoré ce travail en acceptant de présider le jury.

Madame **SAOUDI M** pour avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail et aussi assuré la continuité de ce travail au sein du laboratoire des biotechnologies au niveau de l'université des frères Mentouri.

Ainsi que tout le personnel administratif et médical de l'hôpital militaire de Constantine qui nous ont soutenues et aidées de près ou de loin pour la réussite de ce travail, spécialement le docteur **KHMISSI S**.

Ces remerciement ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Avec un énorme plaisir, je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, source de tendresse, de noblesse et d'amour, qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique model de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

*A mes chères sœurs **Chaima** et **Hadjer**, pour leurs soutien moral, et leurs sacrifices le long de ma formation et aussi mon très cher frère **Adem** et je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur.*

*Je dédie particulièrement à tous mes oncles et tantes, cousines et cousins et toute la famille **METHENI**.*

*Je ne saurai terminer sans citer mes très chères amies : **Imene, Sofia, Meissa, Safa, Hadjer, Houyem, Soulef et Roukia**.*

Enfin je le dédie à tous mes amis que je n'ai pas cités, et à tous ceux qui me connaissent.

A tous ceux que j'aime.

Amina

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

*A Mes **chers parents**, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leur encouragement contenu, leur aide, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices*

*A Ma chère sœur **Maya** et mon cher petit frère **Raouf***

*A la personne qui était toujours là pour me soutenir et m'encourager et assurer de me rendre heureuse, à l'homme de ma vie **Seif Eddine** et toute la famille **HARKOU***

*A mes chères **grands-mères** pour leur soutien moral*

*A mes chères amies : **Amina, Maissa, Safa, Randa, Safia***

*A toute la famille **DARGHOUD** et **RAHALI***

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

SOFIA

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : Revue bibliographique	
I-Présentation de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
I-1-Morphologie et structure.....	3
I-2-Caractères cultureux.....	4
I-3-Caractères biochimiques.....	4
I-3-1-Métabolisme.....	4
I-3-2-Production de pigments	5
I-4-Caractères génomiques	5
I-5-Lysotypie	6
I-6-Facteurs de virulence.....	6
I-6-1-Facteurs de virulence de surface	6
I-6-2-Facteurs de virulence secrétées	8
I-7- Pouvoir pathogène	13
II-Les bêta-lactamines.....	14
II-1-Classification des bêta-lactamines.....	15
II-1-1-Les pénèmes ou pénicillines.....	15
II-1-2-Les céphèmes ou céphalosporines	15
II-2-Mécanismes d'action des bêta-lactamines.....	16
II-2-1-Pénétration des bêta-lactamines à travers la membrane externe et peptidoglycane	
II-2-2-Traversé de l'espace périplasmique.....	16
II-2-3-Fixation et action sur les protéines de la pénicilline	16
II-2-4-Lyse bactérien sous l'effet de bêta-lactamines.....	17
III-L'antibiorésistance.....	17
III-1-Différents types de résistance bactérienne.....	17

III-1-1- Résistance naturelle	17
III-1-2- Résistance acquise	18
III-2-Différents mécanismes de résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux bêta-lactamines	
III-2-1-Mécanismes enzymatique	18
III-2-2-Mécanisme non enzymatique.....	20

Chapitre II : Matériels et méthodes

I-Lieu de stage.....	23
II-Objectifs	23
III-Matériels biologique (origine de la souche).....	23
IV-Matériels et méthodes utilisées	24
IV-1-Méthodes	25
IV-1-1-L'examen à l'état frais	25
IV-1-2-Ensemencement.....	25
IV-1-3-Coloration de Gram	26
IV-1-4-Identification biochimique	26
IV-1-5-Antibiogramme	28
IV-1-6-La galerie API 20 NE.....	30
IV-1-7-L'induction des mutants par ultra-violet (UV).....	33

Chapitre III : Résultats et discussion

I-Caractères cultureux.....	36
I-1-Etat frais	36
I-2-Morphologie	36
I-3-Coloration de Gram	37
II-Caractères biochimiques	37
II-1-Recherche d'oxydase	37
II-2-Recherche de catalase	38

II-3-Mise en évidence des pigments.....	38
II-4-Antibiogramme	38
II-5-Recherche de bêta-lactamase à spectre élargie	39
II-6-Galerie API 20 NE.....	40
II-7-L'induction des mutants par ultra-violet (UV).....	41
Conclusion	44
Références bibliographiques.....	46
Résumés.....	54
Annexes	

Liste des figures

Figure 1 : La bactérie dans l'espace.....	4
Figure2 : Génome circulaire de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
Figure3 : Mécanisme de pathogénicité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
Figure 4 : Structure de noyau bêta-lactame.....	15
Figure 5 : Antibiogramme de la souche sauvage de référence PAO1.....	18
Figure 6 : Mécanisme de transport proposé pour les pompes d'efflux de la famille RND.....	20
Figure 7 : Bandelette d'oxydase.....	27
Figure 8 : Les milieux King A et King B.....	27
Figure 9 : Le frottage de l'écouvillon sur Le milieu gélosé.....	29
Figure 10 : Trempage d'écouvillon dans la suspension bactérienne.....	29
Figure 11 : Emplacement des disques d'antibiotiques choisis.....	29
Figure 12 : Test du BLSE.....	30
Figure 13 : Préparation et inoculation de la galerie.....	32
Figure 14 : Remplissage des tubes.....	33
Figure 15 : Lampe à UV.....	34
Figure 16 : Aspect des colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dans une boîte de pétri.....	37
Figure 17 : Les bacilles Gram négatif de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> à objectif 100X.....	37
Figure 18 : Résultat positif de l'oxydase chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
Figure 19 : Résultat positif pour la recherche de catalase.....	38
Figure 20 : Les zones d'inhibition des antibiotiques testés.....	39
Figure 21 : Résultat de test BLSE.....	39
Figure 22 : Résultat de galerie API 20 NE.....	41
Figure 23 : Résultat de l'induction des mutants par Ultra-violet.....	42

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
Tableau 2 : Principales pathologies causées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et classées Selon le site d'infection.....	13
Tableau 3 : Origine des souches utilisées.....	24
Tableau 4 : Les différentes concentrations des disques d'antibiotiques.....	28
Tableau 5 : Pourcentage de résistance des antibiotiques.....	39

Introduction

Introduction

Considéré longtemps comme un organisme largement opportuniste, *Pseudomonas aeruginosa* est aujourd'hui clairement reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez les patients immunocompromis ou affaiblis (PIER et RAMPHAL, 2005).

Pseudomonas aeruginosa est un germe à Gram négatif non fermentant d'origine environnementale strictement aérobie très mobile et versatile présentant des profils de multirésistance.

Le phénomène de résistance aux antibiotiques est connu depuis l'utilisation de ces molécules. Cette résistance concerne essentiellement le milieu hospitalier, mais on assiste à l'heure actuelle à une dissémination des bactéries résistantes voir multirésistante. De plus, de nouveaux mécanismes de résistance sont actuellement décrits comme les protéines d'efflux... etc.

Parmi les antibiotiques utilisés, les bêta-lactamines représentent la principale famille d'antibiotiques utilisés pour le traitement des infections sévères à *Pseudomonas aeruginosa*. Du fait de résistances naturelle et acquise, le choix de la bêta-lactamine à utiliser en thérapeutique est restreint et doit être guidé par l'antibiogramme.

Cette étude a été réalisée pour atteindre les objectifs suivants :

- Caractérisation biochimique de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Profil de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux bêta-lactamines.
- Une mutagénèse de *Pseudomonas aeruginosa* par UV.

La partie pratique a été réalisée au niveau du service de bactériologie générale du laboratoire central de l'hôpital militaire régional universitaire de Constantine pendant environ un mois et demi.

Le mémoire est structuré de la manière suivante :

- Une introduction
- Une revue bibliographique
- Matériels et méthodes
- Résultats et discussion.
- Une conclusion.

Chapitre I : Revue bibliographique

I- Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, est une bactérie versatile et ubiquitaire dans l'environnement. Elle est communément trouvée dans le sol et l'eau (eaux douces et marines) et sur les surfaces en contact avec ces milieux. 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 vert de gris en latin, fait référence au pigment contenu par la bactérie qui donne à la colonie sa couleur caractéristique. *Pseudomonas aeruginosa* est l'espèce type de *Pseudomonas*, également composé de 12 autres membres (YETERIAN, 2010). La taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* est représentée dans le tableau 1

Tableau 1 : Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* (BENABID, 2009).

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

I-1-Morphologie et structure

Pseudomonas aeruginosa est un bacille Gram négatif en forme de bâtonnet, de 0.5 à 0.8 µm de diamètre sur 1 à 3µm de long. Mobile grâce à un flagelle polaire généralement unique, dépourvu de spores et de capsules. La paroi du bacille pyocyanique est caractéristique de celle des bactéries à gram négatif (SADOLFF., ARTENSTEIN, 1974). Elle est constituée d'une membrane externe et d'un espace péri plasmique et du peptidoglycane. La membrane externe est une bicouche asymétrique constituée du lipopolysaccharide (LPS) et de phospholipides (PL) où se trouvent de nombreuses protéines telles que les porines qui assurent la diffusion de divers types de molécules à travers la membrane externe (PAGES, 2004). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, on distingue plusieurs types de porines : Opr D (D1 et D2), Opr E (E1 et E2), OprH (H1 et H2), Opr G et Opr F qui présentent la majorité de porines non spécifiques dans cet organisme (NIKAIDO et al., 1991). La membrane de *Pseudomonas aeruginosa* est aussi caractérisée par l'existence de nombreuses

pompes d'efflux telles que MexA- MexB –OpeM, MexC-MexD-OprJ, qui jouent un rôle important dans l'injection des agents antimicrobiens (Xavier et *al.*, 2010).



Figure 1 : la bactérie dans l'espace (KAMER, 2013).

I-2-Caractères culturaux

Le bacille pyocyanique est une bactérie aux besoins très limités. Croissant sur des milieux synthétiques simples, elle pousse facilement en 24 heures à 37°C. 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. *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie aérobienne stricte mais capable d'utiliser les nitrates en conditions anaérobies (SOULEY, 2002). Elle est caractérisée par une odeur florale (FLANDROIS, 1997). Un milieu sélectif à base cétrimide (ammonium quaternaire) permet la recherche et l'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* à partir de produits biologiques (selles, urines, pus, liquide céphalo-rachidien...) en bactériologie médicale (DELARRAS, 2007). Selon Denis (2007), trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée sur milieux solides :

- Colonies larges "la" de 2 à 3 mm de diamètre à bord irrégulier rugueuses une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques.
- Colonies 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-3-Caractères biochimiques

I-3-1-Métabolisme

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* possède :

- Une oxydase.
- Une nitrate-réductase (réduction des nitrates pouvant aller jusqu'au stade de N gazeux).
- Un métabolisme oxydatif des sucres appréciable sur milieu MEVAG (milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides).
- Une arginine-dihydrolase.

I-3-2-Production de pigments

D'après DELARRAS (2007), *Pseudomonas aeruginosa* produit deux types de pigments (fluorescent ou non) qui servent à son identification. Ils peuvent être mis en évidence dans le milieu 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.

Cette espèce est la seule à le produire.

I-4-Caractères génomiques

Le génome de la souche PA01 de *Pseudomonas aeruginosa* a été complètement séquencé en 2000. Il est le plus grand génome bactérien qui comprend 6,3 millions de paires de bases. Ce génome contenant 5570 gènes, la plupart sont riches en guanine et cytosine (G+C) (66,6). Seuls 6,7 % de ces gènes ont une fonction bien connue. Le pourcentage de séquences régulatrices est plus important dans le génome entier de *Pseudomonas aeruginosa* (8,4%) (STOVER et al., 2000). Le chromosome de cette bactérie code notamment pour la plupart des facteurs de pathogénicité : environ 200 à 300 gènes ce qui représente 5% du génome (KOHLENER et DELDEN,2009).

Le bacille pyocyanique contient plusieurs plasmides donnant différents caractères phénotypiques (résistance aux antiseptiques et aux antibiotiques, modification du taux de croissance, acquisition d'activités cataboliques sur certains substrats) ceci peut compliquer la reconnaissance de cette espèce (FLANDROIS ,1997).

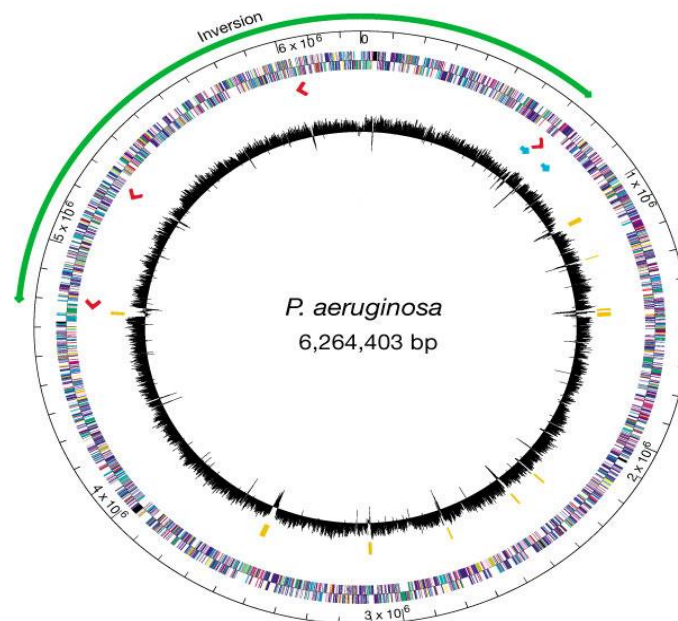


Figure 2 : Génome circulaire de *Pseudomonas aeruginosa* (STOVER, 2000).

I-5-Lysotypie

Pseudomonas aeruginosa est très facilement lysée par des bactériophages et la sensibilité des souches à effet lytique d'une batterie de ces phages permet de distinguer des lysotypes. Elle est employée pour classer les différentes variétés de *Pseudomonas aeruginosa* dans les laboratoires spécialisés (SOULEY, 2002).

I-6-Facteurs de virulence

Pseudomonas aeruginosa est invasive et oxygène en raison de la production de facteurs de virulence de surface (qui lui permettent de s'attacher, de coloniser et d'envahir les tissus), et secrétés (qui endommagent les tissus et déclenchent des processus inflammatoires). Il est souvent difficile de distinguer entre colonisation et invasion pathogène en l'absence d'outil diagnostique adéquat (MESAROS et *al.*, 2007).

I-6-1-Facteurs de virulence de surface

Les facteurs de virulence de surface incluent le flagelle, le pili, les LPS et l'alginate.

-Le flagelle

Pseudomonas aeruginosa possède un seul flagelle polaire qui est responsable de la mobilité de type "swimming" mais qui intervient également dans la mobilité de type "swarming" (KOHLENER et *al.*, 2000). Le flagelle bactérien est une structure rotative actionnée par un moteur situé à la base, qui entraîne un filament agissant comme une hélice (BARDY, 2003). L'implication du flagelle dans la pathogénicité de nombreuses bactéries pathogènes, comme *Pseudomonas aeruginosa*, a déjà été bien établie (MONTIE et *al.*, 1982). Le flagelle serait également impliqué dans l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires (FELDMAN et *al.*, 1998). Par l'intermédiaire d'un composant commun de membrane asialo-GM1, le flagelle participe aussi à la virulence en induisant une réponse inflammatoire par interaction avec les récepteurs *Toll*, TR5 et TR2, ce qui a pour conséquence la production d'IL-8, d'IL-6 et de mucine (ADAMO et *al.*, 2004). Le flagelle est très immunogène, surtout au cours des infections chroniques et particulièrement dans la mucoviscidose. *Pseudomonas aeruginosa* s'adapte à cette situation en sélectionnant des mutants dépourvus de flagelles pour contourner la réponse de l'hôte. Il joue aussi un rôle important dans les stades précoces du développement du biofilm bactérien *in vitro* (O'TOOLE et *al.*, 1998).

-Les pili de type IV

Le pili de type IV est la principale adhésine de *Pseudomonas aeruginosa* responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales (HAHN, 1997). Les pili de type IV sont impliqués dans les mobilités de type "switching" (WALL, 1999), et de type "swarming". De plus, ces structures interagissent *in vitro* avec la région glycosylée des glycosphingolipides asialo GM1 et asialo GM2, située à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Son expression est soumise au contrôle d'un système de régulation de la transcription à deux composants *pilS* et *pilR* (HOBBS et *al.*, 1993).

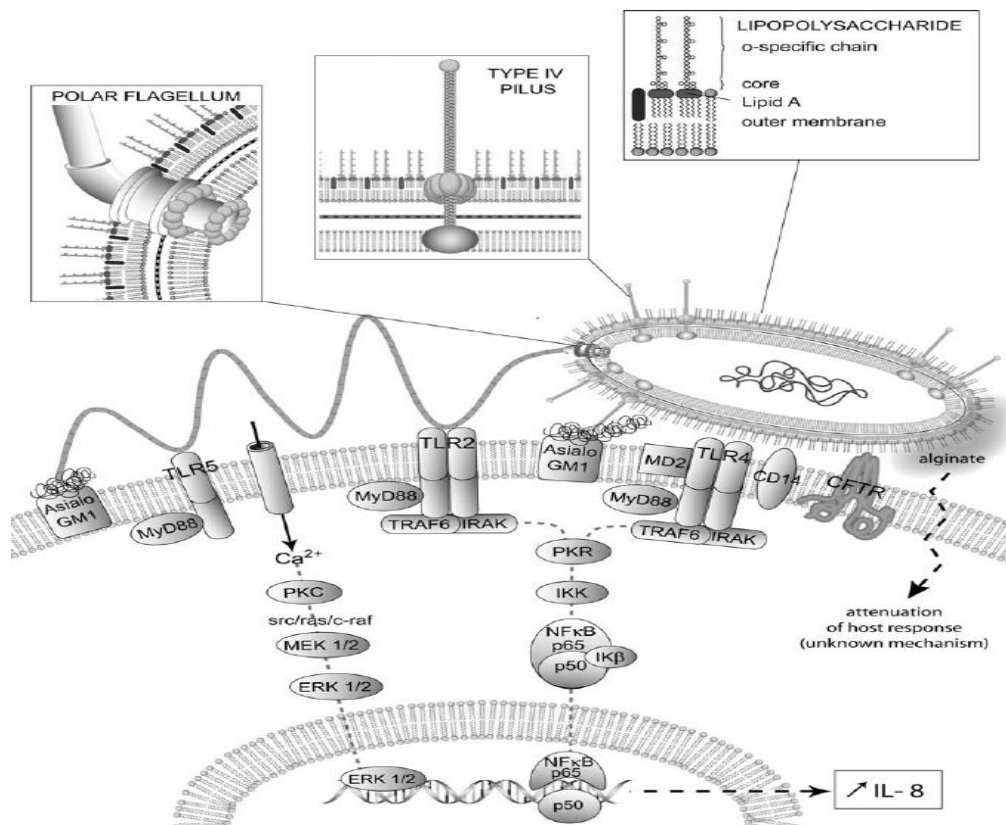


Figure 3 : Mécanisme de pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* (KIPNIS et al., 2004).

-Facteur d'attachement de type fimbriae (ou Cup)

Un nouveau facteur d'attachement a été récemment mis en évidence chez *Pseudomonas aeruginosa*. Il s'agit de *pilide* type *fimbriae* qui sont assemblés par la voie "chaperone/usher/pathway" (Cup) (VALLET I, 2001). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, trois systèmes Cup appelés *CupA*, *CupB* et *CupC* ont été identifiés (LAZDUNSKI, 2003). Ces facteurs d'attachement sont essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques et dans la formation du biofilm.

-Le lipopolysaccharide (LPS)

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. La molécule de LPS peut être divisée en trois parties (ROCHETTA, 1999) :

- Le lipide A, aussi appelé endotoxine, est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort (LYNN et al., 1992)
- Le cœur oligosaccharidique ;
- L'antigène O qui est une région polysaccharidique variable.

Pseudomonas aeruginosa est capable de synthétiser deux formes de LPS A et B (LAM et al., 1989). Selon que l'antigène O est présent ou absent sur le cœur oligosaccharidique, on parle respectivement de phénotype lisse ou rugueux. Le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent qu'un mutant isogénique

possédant un phénotype rugueux (CRYZ, 1984). De plus, les souches “rugueuses” de *Pseudomonas aeruginosa* sont lysées par le sérum humain, alors que les souches possédant un LPS lisse sont résistantes au sérum (DASGUPTA et al., 1994). La variabilité des chaînes polysaccharidiques des antigènes O est à la base du sérotype de *Pseudomonas aeruginosa* et de ce fait, cette immunogénicité en fait des cibles évidentes pour l’immunothérapie. Cependant, l’immunisation active basée sur des vaccins d’antigènes O montre un faible pouvoir protecteur quand plusieurs antigènes O de sérotypes différents sont conjugués (LANGG et al., 2004).

-Alginate

L’alginate est un exopolysaccharide mucoïde composé de polymères de l’acide mannuronique associé avec l’acide glucuronique. *Pseudomonas 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 (CARPENTIER et al., 2003). La production d’alginate par ces souches permet la formation d’un biofilm qui favorise l’adhésion aux cellules épithéliales et protège la bactérie de la phagocytose, des anticorps, l’action des antibiotiques et des désinfectants (RUIMY et ANDERMONT, 2004).

I-6-2-Facteurs de virulence sécrétée

Au cours de la phase d’adhésion, *Pseudomonas aeruginosa* est capable de produire un grand nombre des facteurs de virulence pour provoquer une lésion tissulaire (GUERY et al., 2009).

-Les sidérophores

Le fer est un élément essentiel à la croissance de tous les organismes vivants, mais dans la majorité des milieux, la concentration du fer biodisponible est largement en deçà des niveaux requis pour la croissance des bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* (RATLEDGE et DOVER, 2000). Les bactéries ont évolué en développant plusieurs stratégies en vue d’acquérir, transporter et rendre soluble le fer. La méthode la plus répandue d’acquisition du fer est la production de composés chélatant le fer : les sidérophores. Après sa sécrétion, le sidérophore chélate le fer dans l’environnement extracellulaire. Le complexe moléculaire résultant, le ferri-sidérophore, est ensuite transporté à l’intérieur du cytoplasme via des récepteurs membranaires spécifiques pour ces complexes. *Pseudomonas aeruginosa* produit un sidérophore majeur appelé pyoverdine. La pyoverdine chargée de fer est transportée via le récepteur membranaire *FpvA*. La pyoverdine peut également agir comme molécule de signalisation induisant la sécrétion de deux autres facteurs de virulence : l’exotoxine A et l’endoprotéase *PrpL* (protéase IV). L’interaction de la ferri-pyoverdine avec *FpvA* transduit un signal transpériplasmique via *FpvR*, un facteur anti-sigma, qui à son tour provoque l’activation du facteur sigma de type ECF, *PvdS*, le régulateur transcriptionnel clé du métabolisme du fer chez *Pseudomonas aeruginosa* (BEARE et al., 2003).

-La pyocyanine

La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie, qui est impliqué dans de nombreux mécanismes pathogènes (KIPNIS et al., 2004). Elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte, induit l’apoptose

des neutrophiles et augmente la production d'interleukine IL-8. La pyocyanine a un rôle crucial dans la virulence de *Pseudomonas aeruginosa*. Plusieurs auteurs ont montré ses propriétés oxydoréductives : la pyocyanine oxyde le glutathion et inactive la catalase dans les cellules épithéliales respiratoires et les cellules endothéliales, participant ainsi au stress oxydatif et entraînant une nécrose du tissu respiratoire. Récemment, il a été démontré que la pyocyanine inactive l'ATPase vacuolaire et le transport mitochondrial, ce qui a pour conséquence une détérioration des canaux chlorures au cours de la mucoviscidose (LAU et al., 2004).

-Protéase alcaline

La protéase alcaline est une protéase qui dégrade la fibrine. Elle est sécrétée par le système de sécrétion de type I (GUZZO et al., 1991). Son rôle pathogène est documenté dans les infections cornéennes comme toutes les protéases produites chez *Pseudomonas aeruginosa*. Elle participe aussi dans la physiopathologie des pneumopathies aiguës (KIPNIS et al., 2004).

-L'exotoxine A

L'exotoxine A (ETA) est le composé protéique le plus toxique produit par *Pseudomonas aeruginosa* avec une DL50 de 0,2 mg chez la souris. Elle est sécrétée sous la forme d'une pro-toxine inactive de 71 kDa. Comme la toxine diphtérique, l'ETA est composée de deux domaines : le domaine A (26 kDa) qui possède l'activité mono-ADP-ribosyltransférase (D'ARGENIO et al., 2001) 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 (BELL et EISENBERG, 1996).

-Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires amphiphiles qui possèdent un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire, ce qui les rend ainsi plus accessibles aux phospholipases bactériennes. Les rhamnolipides perturbent le transport mucociliaire et les mouvements ciliaires de l'épithélium respiratoire humain (READ et al., 1992). De plus, ils inhibent la phagocytose. Ils contribuent donc à l'invasion du tissu pulmonaire par *Pseudomonas aeruginosa*. Comme le flagelle et les pilide type IV, les rhamnolipides sont impliqués dans la mobilité de type "swarming" (KOHLENER et al., 2000) et la formation de biofilms (DAVEY et al., 2003).

-Les phospholipases C

Les phospholipases sont des enzymes extracellulaires thermolabiles d'environ 80 kDa contenant des ions zinc essentiels à l'activité enzymatique sécrétées par le système de sécrétion de type II. Trois phospholipases C (PLC) de spécificité de substrat différente ont été identifiées chez *Pseudomonas aeruginosa* (STONEHOUSE et al., 2007).

-L'élastase

L'activité élastase de *Pseudomonas 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 LasB. L'élastase (également nommée protéase LasB ou pseudolysine) est une métalloprotéase à zinc qui a une activité protéolytique très importante (GALLOWAY, 1991). Cette protéase dégrade l'élastine mais elle est également capable d'inactiver de nombreuses protéines comme les IgA et les IgG, des composants du complément, des constituants majeurs de la matrice de l'épithélium pulmonaire comme l'élastine, le collagène et la fibrine. LasB s'attaque aussi aux cytokines comme l'interféron gamma et au facteur nécrosant des tumeurs (TNF) (PARK et al., 1996). Le 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone, dénommée aussi *signal Pseudomonas quinolone* (PQS), peut induire à la fois le LasB et RhlI chez *Pseudomonas aeruginosa* et est produite au maximum au cours de la fin de phase stationnaire de croissance (CALFEE et al., 2001). Le système « las » contrôle notamment l'expression des gènes des élastases (*lasA* et *lasB*), de la protéase alcaline, de l'exotoxine A, et des protéines de la machinerie de sécrétion de type II. Le système « rhl » régule la production des rhamnolipides et active l'expression d'une série de gènes dont le gène de l'élastase B, de la protéase alcaline, de la pyocyanine (PESCI EC et al., 1999). Un homologue des régulateurs transcriptionnels LasR et RhlR, appelé QscR (*Quorum-sensing controlled repressor*) a été identifié en 2001 (LEDGHAM et al., 2003).

-Facteurs de virulence sécrétés via le système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III permet à la bactérie d'injecter directement les toxines à l'intérieur de la cellule. La translocation des toxines depuis la bactérie s'effectue en traversant la membrane bactérienne à l'aide d'un appendice ressemblant à une aiguille capable de percer la membrane de la cellule eucaryote. Des travaux ont montré que le système de sécrétion III permettait à des souches de *Pseudomonas aeruginosa* issues de patients atteints de mucoviscidose de résister à l'action bactéricide des neutrophiles humains et induisait leur mort cellulaire, alors qu'un système de sécrétion III rendu non fonctionnel ne pouvait plus induire la mort cellulaire de ces neutrophiles (BERTHELOT et al., 2003), et que les protéines sécrétées par le SSTT conduisaient à l'apoptose des macrophages (EPAULARD et TOUSSAINT, 2003). Plusieurs toxines sont maintenant connues pour être sécrétées via ce système par *Pseudomonas aeruginosa*: l'ExoS, l'ExoT, l'ExoU et l'ExoY.

-L'exoenzyme S

L'exoenzyme S (ExoS) est la cytotoxine la mieux caractérisée actuellement. Cet effecteur est principalement transloqué dans le cytoplasme de la cellule eucaryote cible mais il est également sécrété dans le milieu extracellulaire (BARBIERI, 2000). ExoS est une protéine bifonctionnelle de 49 kDa. D'une part, elle possède une activité GAP spécifique des petites protéines G de la famille Rho (protéines Rho, Rac et Cdc42), aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (KRALL et al., 2002) inhibant ainsi la mobilité et la phagocytose. D'autre part, la région C-terminale d'ExoS possède, *in vitro* et *in vivo*, une activité catalytique d'ADP-ribosyltransférase des protéines de la famille Ras (GANESAN et al., 1999). L'expression du domaine ADP-

ribosyltransférase inhibe aussi l'internalisation de *Pseudomonas* par les cellules épithéliales et les macrophages. Le rôle pathogène d'ExoS est principalement attribuable à l'activité de l'ADP-ribosyltransférase qui entraîne une perturbation de l'organisation normale du cytosquelette. L'ExoS peut aussi moduler la réponse immunitaire et inflammatoire de l'hôte (EPELMANPEL et al.,2004).

-L'exoenzyme T

Comme l'exoenzyme S, l'exoenzyme T (ExoT) est une protéine bifonctionnelle de 53 kDa. *In vitro*, ExoT possède une activité GAP spécifique de la GTPase *RhoA*. Cependant, contrairement à l'ExoS, l'activité catalytique d'ADP-ribosylation FAS-dépendante d'ExoT n'est pas spécifique *in vitro* de Ras mais des protéines CrkI et II (SUN et BARBIERI, 2003).

-L'exoenzyme U

L'exoenzyme U (ExoU) est une protéine de 74 kDa. C'est la plus grande des quatre cytotoxines sécrétées par le SSTT de *Pseudomonas aeruginosa*. Récemment, SATO et al (2003), ont montré qu'ExoU possède une activité phospholipase A2. La large spécificité de substrats de cette lipase entraîne une mort nécrotique des cellules eucaryotes (SATO et al., 2003). De plus, l'activité lipolytique d'ExoU envers l'un des principaux surfactants pulmonaires, le dipalmitoylphosphatidyl choline, pourrait contribuer à la dissémination rapide des souches bactériennes exprimant l'ExoU du tissu pulmonaire au système sanguin (ALLEWELT et al.,2000). L'ExoU possède une activité phospholipase/lysophospholipase dégradant la membrane cellulaire une fois transloquée dans le cytosol et activée par des cofacteurs eucaryotes encore inconnus (SATO et al.,2005). L'ExoU montre une cytotoxicité 100 fois plus grande que celle d'ExoS (LEE et al.,2005). La sécrétion d'ExoU seule par le TTSS entraîne une cytotoxicité dans les modèles animaux allant de l'atteinte du tissu pulmonaire jusqu'au sepsis (ALLEWELT et al.,2000). L'ExoU induit *in vitro* une cytotoxicité sur les cellules épithéliales (FINCK et al.,1997).*In vivo*, son expression accroît la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* dans un modèle de pneumopathie aiguë chez la souris (RABIN et HAUSER, 2005).

-L'exoenzyme Y

L'exoenzyme Y (ExoY) est une adénylate cyclase de 48 kDa. La translocation d'ExoY dans les cellules cibles provoque une augmentation du niveau intracellulaire d'AMPc, induisant un changement de la morphologie de ces cellules qui deviennent arrondies (VALLIS et al.,1999), ce qui engendre la formation de trous intercellulaires et aboutit à la détérioration des cellules endothéliales pulmonaires (SAYNER et al.,2004). L'activation de l'activité adénylate cyclase d'ExoY nécessite un ou des facteurs inconnus de la cellule eucaryote. Cependant, ce rôle de l'ExoY dans l'ensemble des pathologies engendrées par *Pseudomonas aeruginosa* nécessite d'être exploré plus loin. Les modèles *in vitro* et *in vivo* étudiant cette cytotoxicité ont montré uniquement un effet mineur de l'ExoY (LEE et al.,2005).

I-7-Pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie opportuniste qui provoque rarement des infections chez les sujets en bonne santé. 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).

En fait, il est de règle que les infections à pyocyanique surviennent chez les 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 par le traitement des cancers ou des leucémies mais aussi les tares (diabète, mucoviscidose...) la malnutrition (kwashirkor), l'âge (prématurité) ou le délabrement physiologique (vieillesse) (SOULEY, 2002). Les principales pathologies causées par *Pseudomonas aeruginosa* sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Principales pathologies causées par *Pseudomonas aeruginosa* et classées
Selon le site d'infection (MESAROS, 2007).

Site d'infection	Pathologie spécifique	Fréquence (dans une population à risque)
Tractus respiratoire	Pneumonie aigüe	Fréquent (hôpital, soins intensifs)
	Infections chroniques de l'arbre bronchique	Mucoviscidose
Sang	Bactériémie et septicémie	Fréquent
Tractus urinaire	Infections aiguës Infection chroniques	Relativement fréquent (complication suite à la présence de corps étrangers)
Oreille	Otite externe ("oreille du nageur") Otite externe maligne Otite moyenne chronique suppurative	Fréquent
Peau et tissus mous	Dermatite Infections de plaies	Relativement fréquent (Traumatismes)

Tableau 2 : Principales pathologies causées par *Pseudomonas aeruginosa* et classées

Selon le site d'infection (MESAROS, 2007) (Suite et fin)		
	Ecthyma gangrenosa pyodermite Folliculite acnévulgaris résistant	Relativement fréquent (Traumatismes)
Œil	Kératite (ulcère cornéen) Enophtalmie Ophtalmie néonatale	Rare (traumatisme)
Système nerveux central	Méningite Abcès cérébral	Rare (secondaire à une neurochirurgie ou à un traumatisme)
Tractus gastro-intestinal	Entérocolite nécrosante Infections périrectales	Rare
Cœur	Endocardite	(Abus de drogues intraveineuses)
Os et articulations	Pyoarthrose sténo-articulaire Ostéomyélite vertébrale Infection de la symphyse pubienne Ostéochondrite du pied Ostéomyélite	Rare

Les antibiotiques sont des composés antimicrobiens naturels ou de synthèse, ils sont produits par des microorganismes fongiques ou bactériens, capables de tuer ou inhiber d'autres microorganismes (MADIGAN et MARTINCO, 2007). Généralement, ce terme est réservé aux molécules ayant une action antibactérienne. Les antibiotiques sont des bactéricides (ils détruisent directement les microorganismes) ou des bactériostatiques ; ils empêchent leur croissance.

II-Les Bêta lactamines

Les Bêta lactamines constituent la plus vaste famille d'antibiotiques cette famille comprend un grand nombre de molécules qui contiennent toutes un noyau bêta lactame dans leur structure moléculaire (Figure 1), ce noyau confère à la molécule son activité antibiotique (CASAMAJOR et DESCROIX, 2009).

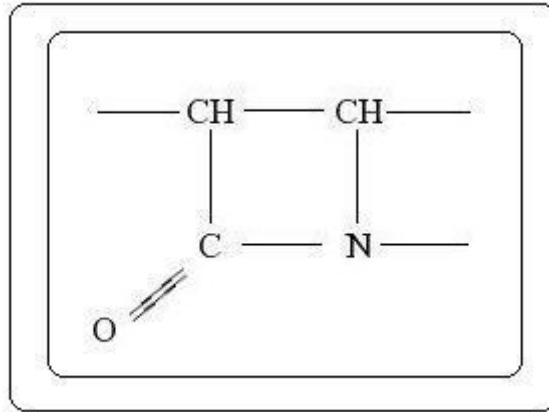


Figure 4 : Structure de noyau bêta-lactame (CASAMAJOR, 2009)

II-1-Classification de Bêta-lactamines

D'après LECONTRRE et LIBBRUE (1999), la classification des Bêta-lactamines dépend de leur structure chimique et leur activité antibactérienne :

II-1-1-Les pénames ou pénicillines

Le noyau de base des pénicillines, l'acide 6-aminopénicillanique est constitué d'un cycle thiazolidine lié au cycle Bêta-lactame. Le noyau Bêta-lactame peut être substitué par acylation sur la fonction aminée pour donner naissance à des dérivés, on distingue :

-Pénicilline M

Ce sont des pénicillines à spectre étroit, on les utilise contre les *staphylococcus*.

-Pénicilline A ou Aminopénicilline

Les pénicillines A comprend : ampicilline, amoxicilline, bacampicilline, proampicilline, pivampicilline (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

-Carboxypénicilline et acylurédopénicilline

Les dérivés de ce groupe sont : ticarcilline, pipéracilline, mezlocilline. Ils sont inactifs si les bacilles ont acquis une résistance par production de pénicillinase (PERRONN, 1999)

II-1-2-Les céphemes ou céphalosporines

La famille des céphalosporines constituent indubitablement l'un des principaux groupes d'antibiotiques utilisés en milieu hospitalier, (YERNAULT et DEMEDTS, 1997)

-Céphalosporines de 1ère génération

Selon BUSTANY et CHAUMET-RIFFAND (1993), les céphalosporines de 1 ère génération sont représentés par 11 dérivés. La céphalothine est le chef de file de ce groupe d'antibiotique et son spectre moyen est commun à toutes les céphalosporines « de première génération » (MOULIN et COQUEREL, 2002).

Les céphalosporines de première génération sont plus efficaces contre les bactéries pathogènes Gram positives que contre les Gram négatives (PRESCOTT et *al.*, 2007).

-Céphalosporines de la 2ème génération

Leurs propriétés sont très proches de celles des céphalosporines de première génération, elles en diffèrent cependant par leur plus grande activité vis-à-vis d'un certain nombre de souche de germes à Gram négatif.

-Céphalosporines de la 3ème génération

Sont des molécules de grande activité intrinsèque et de bonne stabilité vis-à-vis de nombreuses bêta - lactamases .Bon nombre de bactéries d'hôpitaux, y compris les *Pseudomonas aeruginosa* sont sensibles à ces molécules (GREGORY et al., 2008).

-Les Céphalosporines de la 4ème génération

Céfépime, céfpirome : cumulent une bonne activité sur les pneumocoques et sur de nombreux bacilles à Gram négatif d'hôpitaux.

II-2-Mécanisme d'action des bêta -lactamines

D'après JEHT et al (2003) l'action de bêta-lactamines nécessite quatre étapes :

II-2-1-Pénétration des bêta -lactamines à travers la membrane externe et peptidoglycane

La membrane externe constituée une barrière hydrophobe. A cause de sa nature lipidique. Les bêta - lactamines qui sont des molécules hydrophiles, doivent traverser la membrane externe à travers les porines pour atteindre les PLP cibles par voie des porines (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

Pour *Pseudomonas aeruginosa*, il existe deux porines ont une fonction importante pour permettre le passage des bêta -lactamines, les porines Opr F et Opr D. La porine Opr D laisse passer spécifiquement les carbapénèmes. Alors qu'Opr F est la porine majeure qui laisse passer les autres bêta -lactamines anti-*Pseudomonas* (CAVALLO et al., 2004).

II-2-2-Traversée de l'espace périplasmique

Le système de double membrane de bactérie à Gram négatives crée un compartiment appelé espace périplasmique ou périplasme autour de la membrane cytoplasmique ce compartiment contient des enzymes, les bêta -lactamases, qui inactivent les bêta-lactamines (pénicillines ou céphalosporines).

II-2-3-Fixation et action sur les protéines de la pénicilline

Après la pénétration, les bêta-lactamines fixent sur différents protéines de liaison à la pénicilline (PLP) en particulier les transpeptidases .La fixation de bêta -lactamines sur les PLP bloque la synthèse des peptidoglycane (PAURIAT et MARTIN, 2005).

II-2-3-Lyse bactérien sous l'effet des bêta-lactamines

L'arrêt de la synthèse du peptidoglycane, qui résulte de la fixation sur les PLP, va entrainer un arrêt de la croissance bactérienne qui correspond à l'effet bactériostatique de l'antibiotique (MOULIN et COQUEREL, 2002). L'action bactéricide des bêta -lactamines sur les bactéries sensibles est liée à une dégradation du peptidoglycane qui conduit à une lyse de la bactérie. Elles sont actives au cours de la phase de croissance bactériennes (CAVALLO et al., 2004).

Les bêta -lactamines activeraient des protéines bactériennes appelées des holines et inactiveraient également des inhibiteurs endogènes des hydrolases bactériennes.

III-L'antibiorésistance

La résistance bactérienne à un antibiotique est définie comme la capacité d'une bactérie à survivre à une concentration bien déterminée de cette molécule. En pratique, cette résistance se traduit de différentes façons. Pour le clinicien, c'est la présence d'échec clinique d'antibiothérapie après un traitement adapté (WEISS, 2002). Pour le biologiste, c'est l'acquisition par une bactérie de mécanismes lui permettant de résister à la concentration minimale inhibitrice déterminée pour des souches sensibles.

III-1-Différents types de la résistance bactérienne

III-1-1-Résistance naturelle

Pseudomonas aeruginosa possède une résistance naturelle à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une bêta-lactamase chromosomique inductible de classe C qui n'est pas inhibé par le clavulanate, et une mauvaise perméabilité membranaire. *Pseudomonas aeruginosa* est donc naturellement résistant aux pénicillines des groupes V G M et A, à la plupart des céphalosporines de troisième génération (Figure 5). *Pseudomonas aeruginosa* est aussi résistant à la kanamycine (POOLE, 2004). A ces différents mécanismes naturels.

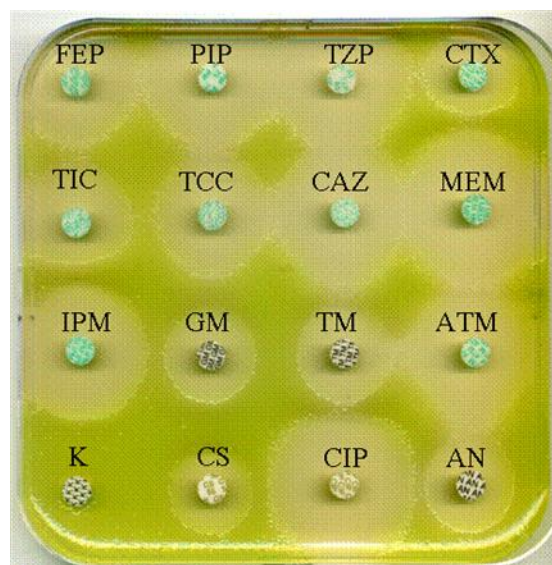


Figure 5 : Antibiogramme de la souche sauvage de référence PAO1, (MESAROS et *al.*, 2007).

III-1-2-Résistance acquise

A côté de la résistance naturelle existe aussi la résistance acquise. Cette résistance ne concerne que quelques ou de nombreuses souches d'une espèce donnée. Ces souches dérivent de bactéries initialement sensibles (phénotype résistance). Elle résulte de changements dans le génome bactérien par une mutation soit l'acquisition des informations génétiques étrangères (MULVEY et SIMOR, 2009).

III-2 Différents mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux bêta-lactamines

III-2-1-Mécanismes enzymatiques de résistance aux bêta -lactamines

A l'heure actuelle, la production d'enzymes hydrolytiques appelées bêta-lactamases est le mécanisme de résistance prédominant des bactéries à Gram négatif vis-à-vis des bêta-lactamines.

Au début des années 1980, seuls quelques enzymes de type plasmidique comme TEM-1, TEM-2 et SHV-1 étaient connues, mais rapidement après l'introduction d'antibiotique à large spectre tels que les céphalosporines de troisième génération, sont apparues des bêta-lactamases à spectre étendu ou BLSE, (FAURE, 2009).

-Les bêta -lactamases

Les bêta-lactamases sont des enzymes bactériennes qui hydrolysent la liaison amide du cycle Beta-lactame des bêta-lactamines pour donner un acyl-enzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif. L'hydrolyse irréversible du noyau bêta-lactame entraîne alors l'inactivation de l'antibiotique et la perte totale de son activité antibactérienne (VAN et al., 2010).

Pseudomonas aeruginosa peut produire un nombre important de bêta-lactamases des quatre classes moléculaires, mais aussi les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu appartiennent de ces classes (THOMSON et BONOMO, 2005).

-Bêta -lactamases de la classe A

On distingue dans la classe A, les pénicillinases et les Beta-lactamases à spectre étendu (BLSE). Parmi les pénicillinases, sont décrites PSE-1(pour *Pseudomonas* specific enzyme) encore dénommée CARB-2, PSE-4(CARB-1), PSE-3 à 5, CARB-3 et CARB-4.

-Bêta -lactamases de la classe B : Métallo-bêta -lactamases (MBL)

La plupart des métallo-bêta-lactamases dégradent toutes les classes des bêta-lactamines. Les MBL ne sont pas inhibés par l'acide clavulanique. Au lieu de cela, ils sont inhibés par les chélateurs d'ion tels que l'EDTA (BUSH et JACOBY, 2010). Plusieurs types MBL ont été décrits chez *Pseudomonas aeruginosa* : IMP, VIM, GIM et SPM (PITOUT et al., 2005).

-Bêta-lactamases de la classe C (AmpC)

Les céphalosporinases appartiennent à la classe C de la classification d'Ambler, ce sont des sérine-enzymes. L'hyperproduction de céphalosporinase de type AmpC permet *Pseudomonas aeruginosa* de résister à toutes les bêta-lactamines à l'exception des carbapénèmes. Son action échappe à l'action des inhibiteurs de bêta-lactamases comme l'acide clavulanique.

-Bêta-lactamases de la classe D (Oxacillinase)

Les oxacillinases de la classe D sont séparés en 5 groupes. Les oxacillinases classiques, OXA-1, OXA-2, OXA-10, hydrolysent les carboxypénicillines et les uréidopénicillines. Par contre les oxacillinases à spectre étendu sont actives sur l'ensemble des bêta-lactamines à l'exception des carbapénèmes (BRADFORD, 2001). L'activité de ces enzymes n'est pas inhibée par l'acide clavulanique (BRADFORD, 2001).

-Bêta -lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE)

Depuis 1983 des bêta-lactamases ayant un spectre très large sont apparues : ce sont les bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE). Elles sont présentes initialement chez *Klebsiella pneumoniae* et peuvent trouver au sein de nombreuses autres espèces bactériennes, entérobactéries et bacilles non fermentant (ZAHAR et al., 2009).

Différents types de BLSE ont été identifiés chez *Pseudomonas aeruginosa* , qui peuvent être , soit des bêta-lactamases de classe A tel que TEM ,SHV ,PER,VEB-1et VEB-2... etc. , soit des oxacillinase de spectre élargi (classe D) tel que OXA-11 ,14, 16,17,19 et 28 .

III-2-2-Mécanisme non enzymatique

Le système d'efflux actif

Le séquençage entier du génome de *Pseudomonas aeruginosa* a permis d'identifier des gènes codant pour plusieurs pompes d'efflux dont 12 codant pour un transporteur de type RND(Resistance Nodulation cell Division), et l'implication de quatre d'entre elles a été prouvée dans la résistance aux antibiotiques. Chacune de ces pompes est composée de trois protéines (Figure 6).

1. Une protéine de la membrane cytoplasmique de la famille RND (MexB, MexD, MexF,MexY) qui agit comme une pompe utilisant la force protomotrice pour fonctionner et montrant une large spécificité pour les substrats à rejeter,
2. Une seconde protéine, OMF (Outer Membrane Factor family : OprM, OprJ, OprN,OprM) qui est intégrée dans la membrane externe,
3. Une troisième protéine, MFP(Membrane Fusion Protein family : MexA, MexC,MexE, MexX) qui est localisée dans l'espace périplasmique. Elle assure l'association entre les deux autres et est fixée à la membrane interne par une accroche N-terminale. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, ces pompes confèrent la résistance à la plupart des bêta-lactamines (SCHWEIZER, 2003).

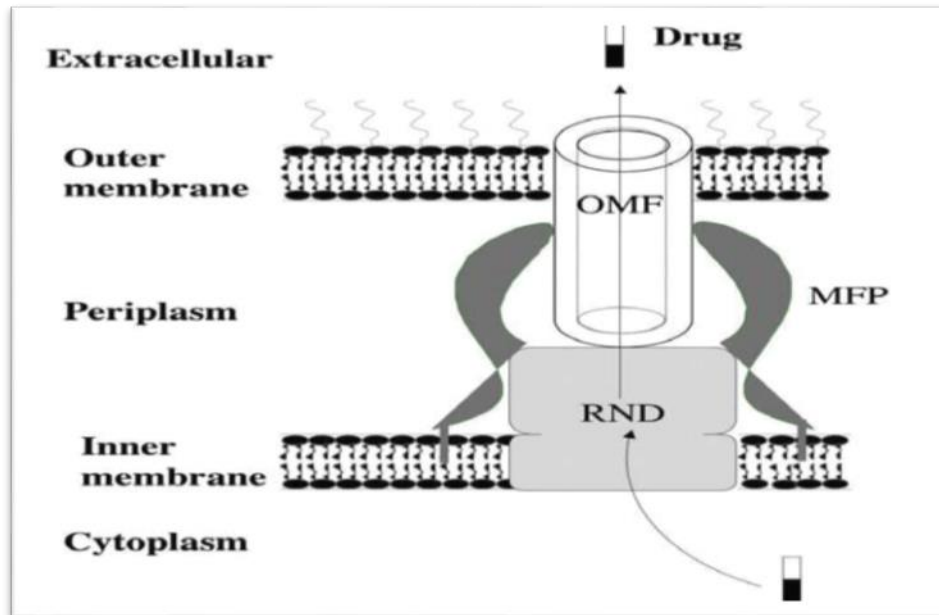


Figure 6 : Mécanisme de transport proposé pour les pompes d'efflux de la famille RND (SCHULDINER, 2006).

-Diminution de la perméabilité

Le déficit en porine OprD, protéine de la membrane externe empruntée spécifiquement par l'imipénème pour franchir la membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* se traduit par une imperméabilité membranaire. La réduction de l'expression de cette porine conduit à une baisse modérée de l'activité de tous les carbapénèmes.

-Modification de la cible « protéine de liaison à la pénicilline » (PLP)

L'efficacité de la fixation de bêta-lactamines sur leurs cibles PLPs peut être diminuée à la suite des mutations dans les gènes chromosomiques qui codent pour des PLPs nouvelles. Ces mutations peuvent aboutir à des altérations quantitatives et qualitatives des PLPs, avec diminution d'affinité pour les bêta-lactamines. (STRATEVA et YORDANOV, 2009).

Chapitre II : Matériels et méthodes

I-Lieu et durée du stage

Ce travail a duré environ un mois (de 15 mars au 15 avril). Il a été réalisé au niveau du service de microbiologie et bactériologie à l'hôpital militaire universitaire de Constantine, la mutagénèse a été effectuée au sein du laboratoire des biotechnologies de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des frères Mentouri Constantine.

II-Objectif

Cette étude consiste en la recherche des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées à partir des différents produits (urines, pus, cathéter, sonde...) provenant de malades hospitalisés dans les différents services de l'hôpital en vue de l'identification des caractères biochimiques des souches et mise en évidence du profil de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques spécialement à la famille des bêta-lactamines.

III-Matériel biologique (origine des souches)

Nous avons utilisés 20 souches de *Pseudomonas aeruginosa* prélevées à partir des patients des deux sexes et de différents âges des différents services.

Tableau 3 : Origine des souches utilisées.

N ° de prélèvement	N° de référence	Sexe	Nature de prélèvement	Service
01	411	F	Pus	Chirurgie générale
02	414	H	Pus (iso)	Chirurgie Générale
03	444	H	Pansement	Pédiatrie
04	434	H	Pus(steuase)	Gastrologie
05	829	F	Urine	Néphrologie
06	935	F	Urine	Cardiologie
07	467	H	Pus	Orthopédie
08	391	F	Pus (fixateur)	Orthopédie
09	381	H	Pus diabétique	Médecine interne
10	314	H	Pus diabétique	Médecine

Tableau 3 : Origine des souches utilisées (suite et fin)

				interne
11	363	F	Pus (fractus)	Orthopédie
12	440	H	Pus (iso)	Chirurgie générale
13	65	F	Prélèvement vaginal	Gynécologie
14	404	H	Pus (brulure)	Chirurgie générale
15	325	H	Pus de pied diabétique	Réanimation
16	576	H	Pus (pied diabétique)	Médecine interne
17	586	H	Pus	Orthopédie
18	587	H	Pus diabétique	Médecine interne
19	588	F	Pus	Orthopédie
20	308	H	Pus (brulure)	Chirurgie générale

H : Homme F : Femme

IV-Matériels et méthodes utilisés

IV-1- méthodes

1^{er} jour

IV-1-1-L'examen à l'état frais

L'état frais est une technique qui permet l'observation des bactéries vivantes entre la lame et lamelle à l'objectif 40. Le but de cette étape est de déterminer la forme des bactéries ainsi que le type de leur mobilité et leur forme de regroupement.

L'observation est réalisée par une petite goutte de l'eau physiologique stérile qui est déposée à l'aide de pipette pasteur au centre d'une lame stérile. On prélève une partie d'une colonie bactérienne à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et on la dissocie dans la goutte on applique ensuite une lamelle stérile sur la goutte en évitant la formation des bulles d'air.

IV-1-2-Ensemencement

L'ensemencement est une méthode qui permet d'obtenir des souches bactérienne pures à partir d'un échantillon. La technique la plus utilisé est la technique des stries qui consiste à étaler sur la surface de la boîte (qui contient un milieu de gélose nutritif pour les urines et les autres milieux sélectifs pour les autres prélèvements). Les stries sont faites à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. L'étalement est réalisé selon un protocole précis. On dépose l'échantillon (urine, pus, sonde, ponction...) sur le bord de la boîte puis on étale en larges stries puis en stries serrées et à chaque fois on tourne la boîte 60 degrés et on recommence l'ensemencement.

Après l'incubation des boîtes 24 heures à 37°C dans l'étuve, on observe chaque colonie bien individualisée (figure 7).

2ème jour

IV-1-3-Coloration de Gram

-Principe

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi en : Bactéries à Gram positif et à Gram négatif (DENNIS, 2007). En effet quand les bactéries sont mises au contact du violet de gentiane puis soumises à l'action du Lugol, il se forme un complexe colorant qui colore en violet tout la couche en peptidoglycane de la membrane des bactéries. Cependant, lorsque ces bactéries colorées sont lavées à l'alcool, seules celles à Gram négatif (présence membrane externe et couche mince de peptidoglycane), qui perdent leur coloration et prennent la couleur rose après la coloration par la Fushine. Les bactéries à Gram positif possèdent une couche épaisse de peptidoglycane qui empêche la pénétration de l'alcool et donc restent en couleur violet.

-Les étapes

- Réaliser un frottis ou un étalement : A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on dépose une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- Ensuite on prélève une colonie bien isolée avec la pipette Pasteur boutonnée et dissociée dans la goutte.
- Fixer la préparation à la flamme, sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.
- Puis on recouvre totalement la lame de violet de gentiane pendant 1 min.
- Rincer à l'eau en transvasant les lames.
- On recouvre le frottis par le Lugol pendant 2 min.

- Laver à nouveau à l'eau ;
- Puis on ajoute l'alcool jusqu'à la disparition de la couleur violette pendant une dizaine de secondes et on lave rapidement à l'eau.
- Puis on colore à nouveau avec la solution de fuchsine diluée pendant 1 min.
- On Lave à l'eau et sécher à l'air.
- A la fin on Observe à l'objectif X100, à l'aide d'huile d'immersion.

IV-1-4-Identification biochimique

-Recherche de l'oxydase

L'activité oxydase a été déterminée par la méthode des bandelettes d'oxydases. A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée on dépose une colonie sur la bandelette. La réaction positive est révélée par l'apparition d'une tache violette (figure 8).

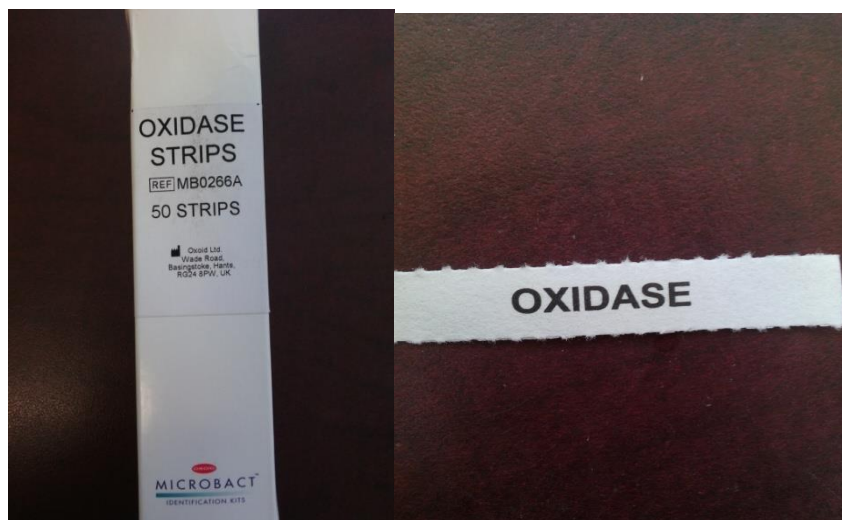


Figure 7 : Bandelette d'oxydase

-Recherche de catalase

Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par PRESCOTT et *al.*(2003). Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu gélosé à l'aide d'une pipette Pasteur boutonné dans l'eau oxygénée à 10V.

-Mise en évidence des pigments

Les milieux King A et King B sont utilisés pour mettre en évidence successivement la pyocyanine et la pyoverdine de *Pseudomonas aeruginosa*. En effet, la pyocyanine verdit le milieu King A et la pyoverdine jaunit le milieu King B.

A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile, des colonies bien isolées sont prélevées et ensemencées en stries serrées à la surface de chaque milieu. Ces tubes sont placés dans l'étuve à 37°C de 1 à 3 jours. La production de la pyocyanine est maximale sur le milieu King A et celle de la pyoverdine sur le milieu King B (figure 9).



Figure 8 : Les milieux King A et King B

IV-1-5- Antibiogramme

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

Dans notre étude, on a utilisés des disques d'antibiotiques à des concentrations différentes cités dans le tableau 5.

Tableau 4 : Les différentes concentrations des disques d'antibiotiques

Antibiotique	Concentration
Ceftazidime	30µg
Ticarcilline-acide Clavulanique	85 µg
Imipenème	10 µg
Ticarcilline	75 µg
Pipéracilline	100 µg
Aztréonam	30 µg

-Principe

Les méthodes de diffusion ou antibiogrammes standards sont les plus utilisées par les laboratoires de diagnostic. Des disques de papier buvard imprégnés d'antibiotiques à tester sont déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface d'un milieu Muller-Hinton, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier.

-Technique

- **Réalisation d'une suspension**

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

- **Ensemencement**

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum. Il est réalisé par le trempage d'un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne ensuite 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 le frottage de l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de la boîte de Pétri.

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



Figure 9 : Le frottage de l'écouvillon sur
Le milieu gélosé



Figure 10 : Trempage de écouvillon dans la
suspension bactérienne

- **L'application des disques**

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



Figure 11 : Emplacement des disques d'antibiotiques choisis.

- **Recherche de Bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE)**

La recherche de la Bêta-lactamase à spectre élargi se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme en déposant un disque de Ticarcilline-acide Clavulanique (TCC) ou (Tim) et un disque de céphalosporine de 3ème génération Ceftazidime (CAZ). Le test est positif s'il y a apparition d'une image de synergie. Il s'appelle aussi test Espagnol ou bouchon de champagne.



Figure 12 : Test du BLSE.

- **Incubation et lecture**

Après l'incubation à 37°C pendant 24h, la lecture s'effectue en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une règle, puis de comparer aux valeurs critiques. La mesure de ces diamètres permet de classer la bactérie en 3 catégories :

Sensible (S)

Intermédiaire (I)

Résistant (R)

IV-1-6-La galerie API 20 NE

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données.

API 20 NE ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements cliniques ou autres.

Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté (ex. gélose Trypcase Soja) selon les techniques usuelles de bactériologie.

-Principe

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

-Mode Opérateur

- **Test Oxydase**

Le test oxydase doit être réalisé selon les instructions du fabricant, il constitue le 21ème test d'identification à noter sur la fiche de résultats.

Notons que certaines espèces de bacilles à Gram négatif non entérobactéries qui sont oxydase négative (*S. maltophilia*, *Acinetobacter*...) sont parfaitement identifiées avec API 20 NE. On s'aidera du contexte clinique ou bactériologique pour utiliser cette galerie.

- **Préparation de la galerie**

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

- **Préparation de l'inoculum**

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml)
- A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

- **Inoculation de la galerie**

Remplir les tubes des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.



Figure 13 : Préparation et inoculation de la galerie.

- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.



Figure 14 : Remplissage des tubes

- Refermer la boîte d'incubation et incuber à $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures (± 2 heures).

IV-1-7-L'induction des mutants par ultra-violets (UV)

-Principe

Les radiations UV provoquent la dénaturation des molécules, en altérant leur structure et leur fonction par l'induction de mutations et de dommages chimiques cellulaires. Elles peuvent aussi, à forte dose inactiver les enzymes. Ces effets ont pour résultat de provoquer la mort cellulaire. Le principal effet létal des UV est dû à leur action sur les acides nucléiques qui résulte de la formation de dimères de pyrimidine, composés de deux bases pyrimidiques adjacentes liées par covalence, ce qui engendre une distorsion localisée de la double hélice d'ADN. L'ADN synthétisé est de ce fait dénaturé par rapport au brin original.

-Technique

- Préparation de la culture.

On prélève une colonie de *Pseudomonas aeruginosa* à l'aide d'une anse de platine stérile et on la dépose dans 5ml de bouillon nutritif puis on l'incube dans l'étuve à 28°C pendant 48 heures.

- Dilution

On utilise pour cette technique deux souches différentes de *Pseudomonas aeruginosa*

Première souche : On prépare 3 tubes à essai stériles, on met dans chacun 9ml d'eau distillée stérile. On prend 1ml de la suspension bactérienne et on la verse dans le premier tube. On agite délicatement pour homogénéiser la suspension, puis on prend 1ml de la suspension du tube 1 et on la met dans le deuxième tube et on agite. On reprend encore 1 ml de la suspension du deuxième tube et on la renverse dans le troisième tube. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on prend une goutte de la suspension du troisième tube et on réalise un ensemencement sur des boîtes de Pétri qui contiennent le milieu de culture hektoen. On refait le même protocole de la dilution pour la deuxième souche.

- Irradiation

On fait l'irradiation à l'aide d'une lampe à UV au contact direct avec les boites avec des temps d'exposition différents : 30 s, 50 s, 70 s, 90 s et 110 s, puis on recouvre les boites avec du papier aluminium pour les protéger de la lumière, on les incube dans l'étuve à 28 °C pendant 24 heures



Figure 15 : Lampe à UV

Chapitre III : Résultats et discussion

I-Caractères cultureux

I-1-Etat frais

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

I-2-Morphologie

A partir des cultures des différents prélèvements, plusieurs souches bactériennes d'aspect morphologique différent ont été isolées et purifiées. L'une des souches produit une pigmentation verte, diffusant dans toutes la boîte de Pétri. De plus, une odeur caractéristique de la fleur de « seringa » due à la production d'ortho-amino-acétophénone, provient de ces cultures. La forme des colonies isolées sont de grande taille avec un aspect bombé au centre présentant le reflet métallique et au contour irrégulier (colonies larges) (figure 19).(EYQUEM et MONTAGNIER, 2000).



Figure16 : Aspect des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* dans une boîte de Pétri.

I-3-Coloration de Gram

Après la coloration de Gram les souches purifiées sont apparues sous forme des bacilles roses. Elles possèdent des parois à Gram négatif. Chez les bactéries à Gram négatif, l'alcool mis au contact de cellules colorées, solubilise les lipides de leur paroi. Ces derniers sont alors perdus et la paroi devenue poreuse, puis la Fushine va occuper la place des phospholipides solubilisés et donne une couleur rose.(Figure 20)

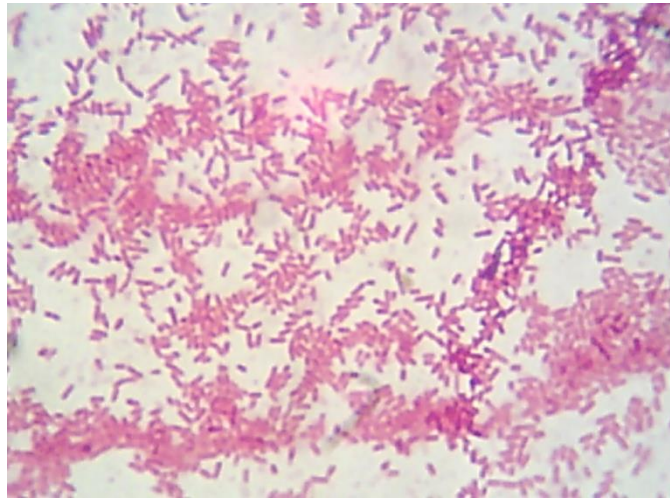


Figure 17: Les bacilles Gram négatif de *Pseudomonas aeruginosa* à objectif 100X

II-Caractères biochimiques

II-1-Recherche d'oxydase

La zone réactionnelle sur la bandelette d'oxydase est colorée en bleu ou bleu-violet, ce qui suggère la présence du cytochrome oxydase.

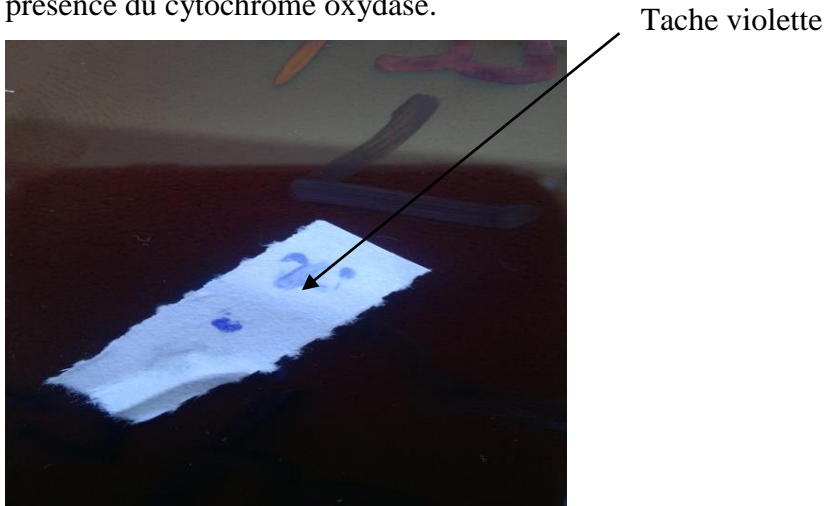
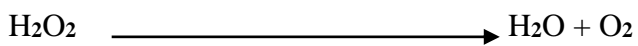


Figure 18: Résultat positif de l'oxydase chez *Pseudomonas aeruginosa*.

II-2-Recherche de catalase

Le dégagement de bulles de gaz signifie qu'il y a une production de l'enzyme catalase et que le test est positif (figure 22), la catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène(H_2O_2) en eau(H_2O) et oxygène(O_2)



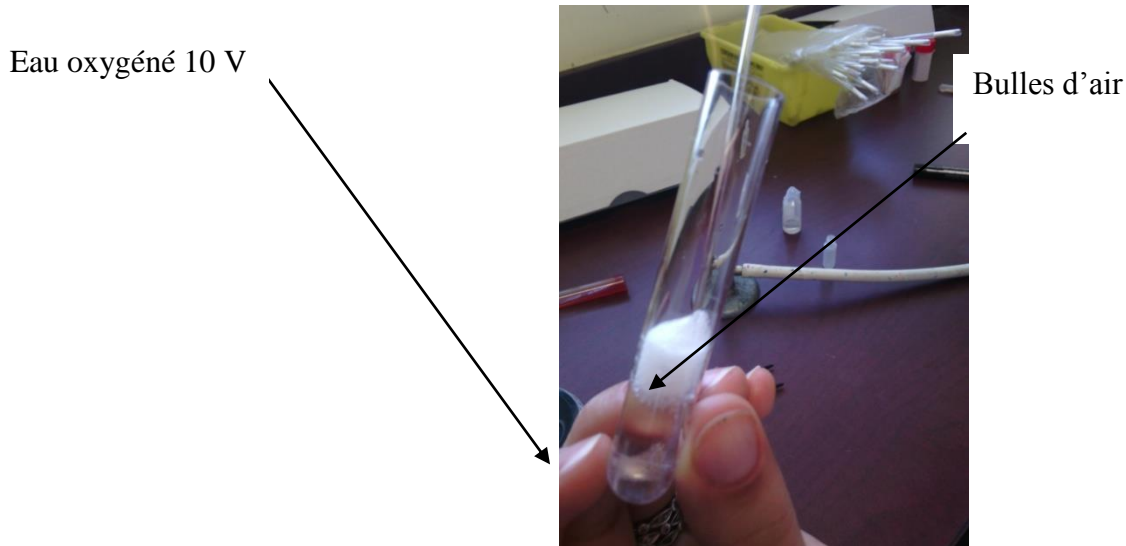


Figure 19 : Résultat positif pour la recherche de catalase.

II-3-Mise en évidence des pigments

Le milieu King A est coloré en jaune, ce qui signifie la présence de pyoverdine dans le King B.

II-4-Antibiogramme

Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaire correspondant à une absence de culture. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe (figure 24). La lecture de l'antibiogramme consiste à déduire à partir de la mesure de ces diamètres, le caractère sensible, résistant ou intermédiaire. Les résultats de l'antibiogramme réalisés sont résumés dans le tableau 4

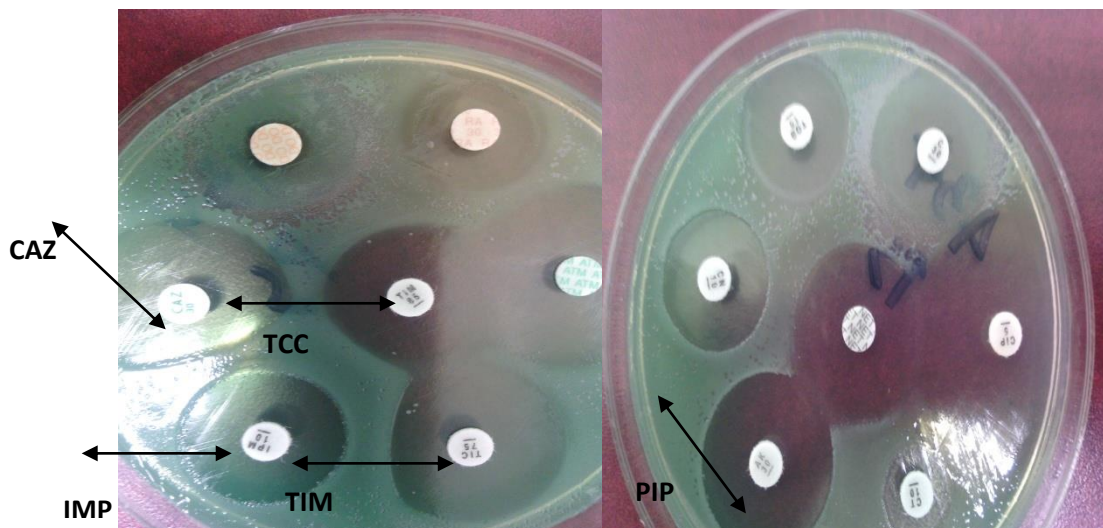


Figure 20: Les zones d'inhibition des antibiotiques testés.

Tableau 5 : Pourcentage de résistance des antibiotiques

ATB/ %	TIC	PIP	CAZ	TCC ou TIM	IMP
S	85%	85%	95%	85%	80%
R	15%	15%	5%	15%	20%

Dans cette étude, les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une sensibilité élevée à tous les antibiotiques testés, Une seule souche parmi ces souches présent un profil de résistance à haut niveau correspond à la production de Céphalosporinase. (Résistance à la céphalosporine de troisième génération (Caz)

II-5-Recherche de Bêta-lactamase à spectre élargi

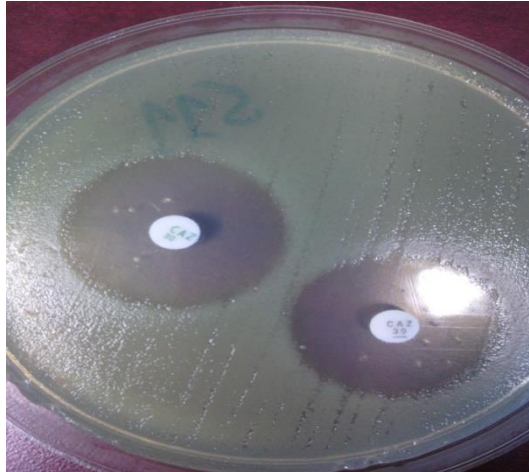


Figure 21 : Résultat de test BLSE

II-6- Galerie Api 20 NE

II-6-1-Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.
- Noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
- La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air ; pour cela, placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests, pendant la période de révélation des tests NO₃ et TRP.

- **Test NO₃**

- Ajouter une goutte de réactifs NIT 1 et NIT 2 dans la cupule NO₃.
- Après 5 mn, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche de résultats.
- Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles) ; ajouter 2-3 mg de réactif Zn dans la cupule NO₃.
- Après 5 mn, une cupule restée incolore indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative car les nitrates encore présents dans le tube ont alors été réduits en nitrites par le zinc. La réaction utilisée pour l'identification de la bactérie est la réduction des nitrates ; elle est positive si l'une ou l'autre des deux réactions précédentes (production de NO₂ ou de N₂) est positive.

La production de N₂ peut cependant être utilisée seule comme test complémentaire dans le Catalogue Analytique.

- **Test TRP**

Ajouter une goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

- **Tests d'assimilation**

Observer la pousse bactérienne. Une cupule trouble indique une réaction positive.

Des pousses d'intensité intermédiaire peuvent être observées et notées —+ ou +—.

Une fois cette lecture effectuée, l'identification doit être pratiquée comme indiqué au paragraphe "Interprétation". Cependant, dans deux cas, une réincubation est nécessaire :

- si le profil n'est pas trouvé dans le Catalogue Analytique API 20 NE.
- si la note suivante est indiquée pour le profil obtenu.

L'identification nonvalide avant 48h d'incubation.

Alors, éliminer, à l'aide d'une pipette, les réactifs NIT 1, NIT 2 et JAMES par aspiration, recouvrir immédiatement les tests NO₃ et TRP d'huile de paraffine en formant un ménisque convexe, incuber à nouveau à 29°C ± 2°C puis lire 24 h plus tard, sauf les trois premiers tests NO₃, Trp, Glu qui doivent être lus uniquement à 24 h.

II-6-2-Interprétation

L'identification est obtenue à partir du profil numérique.

-Détermination du profil numérique : Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par

Groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^o test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

-Identification : Elle est réalisée à partir de la base de données (V 6.0)



Figure 22 : Résultat de galerie API 20 NE

On n'a pas obtenus des résultats positifs probablement a cause de la galerie périmée.

II-7- L'induction des mutants par ultra-violets (UV)

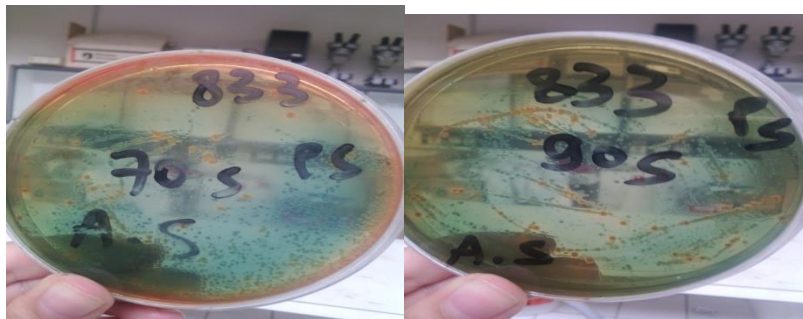
Après l'exposition des souches aux UV et après incubation à l'étuve pendant 24 heures à 37°C, les résultats sont présentés dans la figure 26



Boite témoin

Boite irradiée pendant 30s

Boite irradiée pendant 50s



Boite irradiée pendant 70s

Boite irradiée pendant 90s

Figure 23 : Résultat de l'induction des mutants par Ultra-violets

En comparant les boites irradiées avec la boite témoin on remarque que la boite irradiée pendant 30 secondes contient des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* mais le nombre est réduit par rapport au nombre sur la boite témoin alors que la boite irradiée pendant 110 secondes contient très peu de colonies. On a remarqué aussi l'apparition des colonies de couleur orangé, cet aspect orangé peut être causait par une mutation qui change le génome du *Pseudomonas aeruginosa* lac⁺ en lac⁻.

Conclusion

Conclusion

Pseudomonas aeruginosa est une espèce classée dans les pathogènes opportunistes non fermentant et versatile responsable des infections nosocomiales.

Sa pathogénicité repose sur un arsenal complexe constitué de facteurs solubles (toxines, enzymes, exopolysaccharides...) et d'attributs cellulaires (pili, systèmes de sécrétion...) dont les rôles sont complémentaires,

L'usage abusif des antibiotiques permet d'accumuler et de développer de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques spécialement les bêta-lactamines.

L'une des règles admises pour l'antibiothérapie dans le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa* est d'utiliser une association incluant une bêta-lactamine et un autre antibiotique.

L'identification biochimique à montrer que ces bacilles sont des oxydases +, lactose -, glucose+, urée-, ADH+.

Références bibliographiques

- ALLEWET M., COLEMAN FT., GROUT M., PRIEBE GP., PIER GB.**2000. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* exocytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemicspread. *Infect Immun*2000 ; 68 : 3998-4004.
- ADAMO R., SOKEL S., SOONG G., GOMEZ MI.**2004.*Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialo GM1 and toll-likereceptor 2 as well as toll-likereceptor 5. *Am J RespirCell Mol Biol*; 30 : 627-34.
- BARBIERI JT.**2000. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin. *Int J Med Microbiol*; 290 : 381-7.
- BELL CE., EISENBERG D., CRYSTA.**1996. Structure of diphtheriatoxin bound to nicotinamide adeninedinucleotide. *Biochemistry*; 35 : 1137-49.
- BENABID D.**2009. Rôle de l'élastase du neutrophile dans les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*. Université de Reim Champagne-Ardenne. Thèse de doctorat en Immunologie. P161.
- BRADFORD D PA.**2001.Extended-spectrum bêta-lactamasesinthe21stcentury:characterization, epidemiology,and detection of thisimportant resistance threat.*Clin MicrobiolRev*.Oct;14(4):933-51,tableofcontents.
- BUSH K., JAKOBY GA., MEDEIROS A.**2010.A functional classification scheme for bêta- lactamases and its correlation with molecular structure.*Antimicrob Agents Chemother*.
- BUSTANY P-D., CHAUMET-RIFFAND.**1993. Internet heure DE.FRANCE. P.84.
- BEARE PA., FOR RJ., MARTIN LW., LAMONT IL.** 2003.Siderophore-mediated cell signalling in *Pseudomonas aeruginosa* : divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Mol Microbiol* ; 47 : 195-207.
- BERTELOT P., ATTREE I., PLESIATI P., CHABERT J., DE BENTZMANN S., POZZETTOB,** .2003.Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates : evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. *J Infect Dis*; 188 : 512-8.
- BARDY SL., JARREL KF.** 2003.Prokaryoticmotility structures. *Microbiology*; 149 : 295-304.
- bioMérieaux SA API® 20 NE.**2003. Système d'identification non fastidieux, non entérique des Gram négatif.
- CRYZ SJ., PITT TL., FURER E., GERMANIER R.**1984.Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* ; 44 : 508-13
- CARPENTIER JP., MORILLON M., PETROGNANI R., CAVALLO JD.**2003. Infections à bacille pyocyanique. *EMC* 8-025-B-50, 23p.

- CALFEE MW., COLEMAN JP., PESCI EC.** 2001. Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA ; 98 : 11633-7.
- CASAMAJOR P., V DSCROIX.** 2009. La prescription ciblée en odontologie. FRANCE. P31-33.
- CAVALLO J D., FABRE F., JEHT C., RAPPO., GARRABE E.** 2004. bêta-lactamines .Encyclopédie Médico-chirurgicale. 8-004-C-10.
- DASGUPTA T., KIEVIT TR., MASOUD H., ALTMAN E., RICHARDS JC., SADOVSKAYA I.** 1994. Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes O3, O5, and O6. Infect Immun 1994 ; 62 : 809-17.
- DAVEY ME., CAIZZA NC., O'TOOLE GA.** 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol ; 185 : 1027-36
- DELARRAS C.** 2007. **Microbiologie** pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Lavoisier, Paris .P476
- DENIS F., M-C POLY., C MARTIN., E BINGEN., RQUENTIN.** 2007. Bactériologie médicale, techniques usuelles .MASSON, Cedex. P333-335.
- D'ARGENIO DA., GALLAGHER LA., BERG CA., MANOIL C., DROSOPHILA .** 2001. as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. J Bacteriol; 183 : 1466-71.
- EPAULARD O., TOUSSAINT B.** 2003. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system : consequences of pyruvate dehydrogenase gene mutations. Med Mal Infect; 33 : 114-8.
- EPELMAN S., STACK D., BELL C., WONG E., NEELY GG., KRUTZI S.** 2004. Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme s activate distinct TLRs. J Immunol ; 173 : 2031 40
- EYQUEM A., L.MONTGNIER .** 2000. Traité de microbiologie clinique: deuxièmes mises à jour et compléments. PICCIN, Itali, 238p.
- FAURES.** 2009. Transfert d'un gène de résistance aux bêta-lactamine bla CTX-M-9 entre Salmonella et les entérobactéries de la flore intestinale humaine : impact d'une antibiothérapie. Université de RENNES : thèse de doctorat. P190.
- FLANDROIS J-P.** 1997. Bactériologie médicale. Presse universitaire de Lyon, Lyon. P207.
- FELDMAN M., BRYAN R., RAJAN S., SCHEFFLER L., BRUNNERT S., TANG H.** 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. Infect Immun ; 66 : 43-51.
- FINCK-BARBANCON V., GORANSON J., ZHU L., SAWA T., WIENER-KRONISH JP.** 1997. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. Mol Microbiol; 25 : 547-57.
- GAUDY C., JBUXERAUD.** 2005. Antibiotique, pharmacologie et thérapeutique, MASSON, P16-17.
- GUEREY B., E KIPNIS., G BERAUD., K FAURE.** 2009 Pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* aspects thérapeutiques. MAPAR. P206-215.

- GALLOWAY DR.** 1991.*Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited : recent developments. Mol Microbiol ; 5 : 2315-21.
- GANESAN AK., FRANK DW., MISRA RP., SCHMIDT G., BARBIERI J.**1998. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites. *J BiolChem*1998 ; 273 : 7332-7.
- GUZZO J., PAGES JM., DUONG F., LAZDUNSKI A., MURGIER M.**
1991.*Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease : evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. J Bacteriol ; 173 : 5290-7.
- HAHN HP.** 1997. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*. Gene; 192 : 99-108.
- HOBBS M., COLLIE ES., FREE PD., LIVINGSTON SP., MATTICK JS.**1993.pilS and pilR, a two-component transcriptional regulatory system controlling expression of type 4 *fimbriae* in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol; 7 : 669-82.
- JEHTM., M CHOMARAT., MWEBER., AGERARD.**2003.De l'antibiotique à la prescription. Biomérieux. P136.
- KOHLER T., C V DELDEN.**2009.La recherche translationnelle : l'exemple des infections à *Pseudomonas aeruginosa* .Rev Med SUISSE P732-734.
- KRALL R., SUN J., PEDERSON KJ., BARBIERI JT.** 2002. *In vivo* rho GTPase-activating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. Infect Immun; 70 : 360-7.
- KIPNIS E., GUERY BP., TOURNOYS A., LEROYT X., ROBRIQUE L., FIALDES P.**2004. Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa* induced acute lung injury. Shock ; 21 : 444-51.
- KIPNIS J., WIENER-KRONICH.**2006.Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Medecine et Maladies Infectieuses Med Mal Infect 36: 78-91
- KOHLER T., CURTY LK., BARJA F., VAN DELDEN C., PECHERE JC.** 2000.Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J Bacteriol; 182 : 5990-6.
- LAZDUNSKI A.** 2003.*Pseudomonas aeruginosa* : a model of choice for the study of opportunistic pathogen. *Ann Fr Anesth Reanim* ; 22 : 523-6.
- LYNN WA., GOLENBOCK DT.**1992.Lipopolysaccharide antagonists. Immunol Today; 13 : 271-6.
- LAM MY., MCGROARTY EJ., KROPINSKI AM., MACDONALD LA., PEDERSON SS., HOIBY N.**1989.Occurrence of a common lipopolysaccharide antigen in standard and clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol1989 ; 27 : 962-7.
- LANG AB., HORN MP., IMBODEN MA., ZUERCHER AW.**2004.Prophylaxis and therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and immunocompromised patients. Vaccine ; 22 : S44-8.

- LEDGHAM F., VENTRE I., SOSCIA C., FOGLINO M., STURGIS JN., LAZDUNSKI A.** 2003. Interactions of the quorum sensing regulator QscR : interaction with it self and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol*; 48 : 199-210.
- LAU GW., HASSETT DJ., RAN H., KONG F.** 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 2004 ; 10 : 599-606.
- LEE VT., SMITH RS., TUMMLER B., LORY S.** 2005. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system *in vitro* and during infection. *Infect Immun*; 73 : 1695-705.
- MONTIE TC., DOYLE-HUNTZINGER D., CRAVAN RC., HOLDER IA.** 1982. Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infect Immun*; 38 : 1296-8
- MADIGAN M., J MARTIONKO.** 2007. *Biologie des micro-organismes*, PEARSON, FRANCE, P279.
- MESAROS N., NORDMAN P., PLESIAT P.** 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 2007 ;13(6):560-78.
- MESAROS N., P NORDMANN., P PLESIAT., M ROUSSEL-DELVALLEZ., J VAN ELDERE., Y GLUPEZYNSKI., Y VAN LAETHEM., F JACOBS., P LEBECQUE., A MALFROOT., P M TULKENS., F VAN BAMBEKE.** 2007. *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutique à l'aube du deuxième millénaire. *ANTIBIOTIQUES*. P.189-198.
- MIRIAM KRAMER,** July 8, 2013 Bacteria In Space Grows in Strange Ways Space.com Staff Writer. <http://www.space.com>
- MOULIN M., A COQUEREL.** 2002. *Parmalocologie* .MASSON, PARIS. P184.
- MULVEY M R., A E SIMOR.** 2009. Antimicrobial resistance in hospitals : How concerned should we be ? *CMAJ* 180(4) :408-415.
- NIKAIDO D., S HARAYAMA.** 1991. Identification and caractérisation of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *The journal of biological chemistry* P770-779.
- O'TOOLE GA., KOLTER R.** 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signal ling pathways : a genetic analysis. *Mol Microbiol*; 28 : 449-61
- PAGES J M.** 2004. Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Médecine/Sciences* P.51-346.
- PERRONNE C.** 1999. *Maladies infectieuses*. DION.CEDEX .P.406.
- PIER G., RAMPHAL R.** 2005. *Pseudomonas aeruginosa*, in *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandell G, Bennett J and Dolin R eds): pp 2587-2615, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.
- PITOUT J D., D B GREGSON., L POIREL., J A MECLURE., D L CHREH.** 2005. Direction of *Pseudomonas aeruginosa* Producing metallo- β -lactamases in a large Centralized Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 43(7) :3129-3135.
- POOLE K.** 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Jan; 10(1):126.
- POURRIAT J I., C MARTIN.** 2005. *Principes de réanimation chirurgicale*. Arnette. CEDEX .P296.

PRESCOTT I M., J P HARLEY., D A KLEIN.2003.Microbiologie de Boeck, BRUXELLES .P137

PARK PW., BIEDERMANN K., MECHAM L., BIESSETT DL., MECHAM RP. 1996.Lysozyme binds to elastin and protects elastin from elastase-mediated degradation. *J Invest Dermatol*; 106 : 1075-80.

ROCHETTA HL., BURROWS LL., LAM JS.1999.Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*; 63 : 523-53.

RATLEDGE C., DOOVER LG.2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria.*AnnRev Microbiol* ; 54 : 881-941.

RABIN SD., HAUSER AR. 2005. Functional regions of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU. *Infect Immun* ; 1 : 573-82.

READ RC., ROBERTS P., MUNRO N., RUTMAN A., HASTIE A., SHRYOCK T.1992.Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliarybeating. *J ApplPhysiol*; 72 : 2271-7.

RUIMY R., A ANDREMONT.2004.Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* mécanisme moléculaire, impact clinique et inhibition .*Réanimation* .P176-184.

SATO H., FEIX JB., HILLARD CJ., FRANK DW. 2005. Characterization of phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxin, ExoU.*J Bacteriol*; 187 : 1192-5.

SATO H., FRANK DW., HILLARD CJ., FEIX JB., PANKHANIYA RR., MORIYAMA K.2003. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J*; 22 : 2959-69.

SADOFF J C., M S ARTENSTEIN .1974 . The outer cell-wall membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *The journal of infectious diseases* P81-93.

SCHULDINER S.2006. Structural biology : the ins and outs of drug transport. *Nature* 2006 ;443:156-7.

SAYNER SL., FRANK DW., KING J., CHEN H., VANDE WAA J., STEVENST.2004.ParadoxicalcAMP-inducedlungendothelialhyperpermeabilityrevealedby *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *CircRes* ; 95 : 196-203.

SCHWEIZER HP.2003. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria : un answered questions. *Genet Mol Res* 2003 ;2:48-62.

SOULEY LIE MOUSTAPHA F S. 2002. Sensibilité et évolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du point G .Université de BAMAKO Thèse présenté pour obtenir le grade de docteur en pharmacie. P95.

STOVER C K., X Q PHAM., A L ERWIN., S D MIZOGUCHI., P WARRENER., M J HICKEY., F S L BRINKMAN., W O HUFNAGLE., D J KOWALIK., M LAGROU., R L GARBER., L GOLTRY., E TOLENTINO., S WESTBROCK-WADMA., Y YUAN., L L BRODY., S N CONLTER., K R FOLGER., AKAS., K LARBIG., R LIM., K SMITH ., D SPENCER., G K S WONG., Z WU., I T PAUSENK., J REIZER., M H SAIER., R E W HANEOCK., S LORY., M V

- OLSON.**2000. Complete genome sequence of *Pseudomonasaeruginosa*PAO1, an opportunistic pathogen.Nature. P959-964.
- STONEHOUSE MJ., COTA-GOMEZ A., PARKER SK., MARTIN WE., HANKIN JA., MURPHY RC.**2002. A novel class of microbial phosphocholine specific phospholipases C. Mol Microbiol; 46 : 661-76.
- SUN J., BARBIERI JT.**2003.*Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. J BiolChem; 278 : 32794- 800.
- TANAZ., ALIPOUR., NOURKHODA., SADEGHIFARD., NOUR., AMIRMOZAFARI., SOBHAN., GHAFURIAN., ABDULAMIR., A S REZA., MOHEBI., FATIMAH., ABU BAKAR.,REFTARI** .2010.Incidence of Extended Spectrum Beta-lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* and Frequency of OXA-2 and OXA-10 Genes . Australian Journal of Basic and Applied Sciences 4(8) :3202-3207.
- THOMSON J M., R BONOMO.**2005. The thread of antibiotic resistance in Gram-negative phatogenic bacteria. β -lactamin peril .Current Opiniunin Microbiology 8 :518-524.
- VAN BAMBEKE F., PAGES JM., LEE VJ.**2010.Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibacterial therapy and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. Frontiers in Anti Infective Drug Discovery2010;1:138–175.
- VALLET I., OLSON JW., LORY S., LAZDUNSKI A., FILLOUX A.** 2001.The chaperone/ ushe rpathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. Proc NatlAcadSci USA ; 98 : 6911-6.
- VALLIS AJ., FINCK-BARBANCON V., YAHR TL., FRANK DW.**1999.Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells.Infect Immun ; 67 : 2040-4.
- WEISS C** .2002.La résistance bactérienne : nouvelle guerre froide. Le médecin du Québec 37, (3) :41-49.
- WALL D., KAISER D.**1999. Type IV pili, cellmotility. Mol Microbiol; 32 : 1-10.
- YERNAULT J C., M DEMEDTS.**1997.Infection respiratoire pour le spécialiste. Garant, Lonvain.P455.
- YETERIAN E.**2010.Base moléculaire de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*.Université Strasboug Thèse de doctorat p.11.
- ZUCKERT WR., MARQUIS H., GOLDFINE H.** 1998.Modulation of enzymatic activity and biological function of *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase C by aminoacid substitutions and by replacement with the *Bacillus cereus*ortholog. Infect Immun; 66 : 4823-31.
- ZAHAR J-R., E BILLE., D SCHNELL., F LANTERNIER., F MECHAL., V MASSE., X NASSIF., O LORTHOLARY.**2009. Diffusion communautaire des entérobactéries sécrétrices de b-lactamase à spectre élargi (BLSE).Medecine/sciences 25 :939-44.

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est une espèce classée dans les pathogènes opportunistes non fermentant et versatile responsable des infections nosocomiales.

L'identification biochimique à montrer que ces bacilles sont des oxydases +, lactose -, glucose+, urée-, ADH+.

La mutagénèse au rayon UV réduit le nombre des colonies à chaque fois en augmentant le temps d'irradiation. Et provoque aussi des mutations au niveau de la séquence génomique qui a changé le profil lactose – de *Pseudomonas aeruginosa* à un profil lactose +

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a species classified as opportunistic pathogen and non-fermenting versatile responsible of nosocomial infections.

Biochemical identification showed that the bacilli are oxidases + lactose - + glucose, urea-, ADH +.

UV mutagenesis radius minimizes the number of colonies each time by increasing the irradiation time and also causes a mutation at the genomic sequence which has changed lactose - profile of *Pseudomonas aeruginosa* in a lactose + profile

ملخص

بسودوموناس ايريجينوزا ، هي نوع من الطفيليات تصنف على أنها من مسببات الأمراض الانتهازية التي تنتقل بواسطة عدوى المستشفيات. أظهرت نتائج الاختبارات البيوكيميائية أن هذه البكتيريا هي عبارة عن عصيات اوكسيزاز + اللاكتوز - + الجلوكوز، و اليوريا - ، ADH + . كما أن تعريضها للأشعة فوق البنفسجية أدت إلى ظهور طفرات تسببت في تقليل عدد المستعمرات و ذلك عن طريق زيادة زمن الإشعاع في كل مرة كما ان هذه الطفرات تسببت في تغيير التسلسل الجيني الذي قد غير نمط اللاكتوز – للبسودوموناس ايريجينوزا إلى لاكتوز + .

**CARACTÉRISATION MORPHOLOGIQUE, BIOCHIMIQUE ET MUTAGÉNÈSE
DES SOUCHES DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DANS LA RÉGION DE
CONSTANTINE.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique moléculaire.

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est une espèce classée dans les pathogènes opportunistes non fermentant et versatile responsable des infections nosocomiales.

L'identification biochimique à montrer que ces bacilles sont des oxydases +, lactose -, glucose+, urée-, ADH+.

La mutagénèse au rayon UV réduit le nombre des colonies à chaque fois en augmentant le temps d'irradiation. Et provoque aussi des mutations au niveau de la séquence génomique qui a changé le profil lactose – de *Pseudomonas aeruginosa* à un profil lactose +.

Mots clés :

Pseudomonas aeruginosa, Galerie biochimique, Antibiogramme, Mutagénèse

Laboratoire de recherche :

Laboratoire de microbiologie et bactériologie de l'hôpital militaire de Constantine et le laboratoire des biotechnologies de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des frères Mentouri Constantine 1.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme *SATTA Dalila* (Professeur - UFM Constantine),

Rapporteur : Mme *BECHKRI Sarah* (MAA - UFM Constantine),

Co-encadreur : *RAMDANI Hakim* (Dr spécialiste en microbiologie médicale HMRUC)

Examineur : Mme *SAOUDI Mouna* (MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 21/06/2016