



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

Analyse phénotypique et quantification de la formation de biofilm par les bactéries d'intérêt médical

Présenté et soutenu par : CHATANE Ines
ZIADI Chaima

Le : 14/06/2017

Jury d'évaluation :

Président du jury : BELMESSIKH Aicha (Maître Assistante «A» - UFM Constantine).

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

Examinatrice : ABDELAZIZ Wided (Maître Assistante «A» - UFM Constantine).

Année universitaire
2016 - 2017

Remerciement

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

*Les travaux présentés dans ce mémoire ont été effectués au laboratoire central, Unité de la
microbiologie d'établissement hospitalier Didouche mourad. et laboratoire de Microbiologie
générale, faculté de la science de la nature et de la vie.*

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

*Nous tenons à remercier notre chère médecin Mlle **Salhi** pour ces efforts toute la période de
stage*

*Notre vif remerciement pour les membres du jury à commencer par Mme **Belmessikh Aïcha**
maître assistante à l'UFM Constantine
Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.*

*A Mme **ABDELAZIZ Wided** maître assistante à l'UFM Constantine d'avoir accepté
d'examiner*

Ce modeste travail.

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

Dédicaces

Nous dédions ce travail à :

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

chères frères

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

A tous les membres de nos familles.

Et

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

Ines & Chaima

Sommaire

INTRODUCTION	1
Partie I : Synthèse bibliographique	3
Chapitre 1 : Généralités sur les biofilms	3
1. Historique	3
2. Définition d'un biofilm.....	3
3. Les étapes de formation d'un biofilm.....	3
3.1. Conditionnement de la surface	4
3.2. Adhésion	4
3.3. Formation de micro-colonies	5
3.4. Maturation de biofilm	5
3.5. Dispersion du biofilm	6
4. Composition et organisation	6
4.1. Composition	6
4.2. Organisation	7
5. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm	8
5.1. Les caractéristiques de la surface	8
5.2. Les caractéristiques du milieu	8
5.3. Les caractéristiques des microorganismes	8
6. Quorum Sensing	9
7. Domaines d'interventions des biofilms	10
7.1. Dans l'environnement et les industries	10
7.2. Dans le domaine médical	10
Chapitre 2 : Généralités sur les <i>Acinetobacter spp</i>	16
1. Définition.....	16
2. Habitat.....	16
3. Taxonomie.....	17
4. Caractères bactériologiques	18

4.1. Caractères morphologiques	18
4.2. Caractères biochimiques et métaboliques.....	19
4.3. Caractères cultureux.....	20
5. Diagnostic bactériologique.....	20
5.1. Diagnostic du genre.....	20
5.2. Diagnostic de l'espèce.....	21
6. Les infections causées par <i>Acinetobacter baumannii</i>	21
6.1. Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique.....	23
6.2. Les méningites.....	23
6.3. Les infections de la peau.....	23
6.4. Les infections des voies urinaires.....	23
7. Transmission.....	23
8. Pathogénicité d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	24
8.1. Le quorum-sensing.....	24
8.2. L'hydrophobicité.....	24
8.3. La régulation de fer.....	24
8.4. Les activités enzymatiques.....	24
8.5. La capacité de formation de biofilm.....	25
8.6. Le lipo-poyosaccharide (LPS).....	25
8.7. Les protéines membranaires.....	25
9. Mécanismes de résistance.....	25
10. Traitement.....	26
11. Prévention des infections à <i>A. baumannii</i>	26
Partie II : Matériel et Méthodes	27
1. Origine des souches bactériennes	27
2. Isolement et identifications des souches cliniques.....	27
2.1. Isolement et identification d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	27
2.2. Isolement et identification de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	31
4. Étude de la formation de biofilms chez <i>A. baumannii</i> et <i>S. aureus</i>	33
4.1. La méthode de Rouge Congo Agar (RCA).....	33
4.2. Formation de biofilms en microplaques.....	33
4.3. Cinétique de formation de biofilm.....	34

Partie III : Résultats et discussion	35
1. Isolement et identification d’<i>Acinetobacter baumannii</i> et de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	35
1.1. Isolement et identification d’<i>Acinetobacter baumannii</i>.....	35
1.2. Isolement et identification de <i>Staphylococcus aureus</i>.....	37
2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	38
3. Étude de la formation de biofilms chez <i>A. baumannii</i> et <i>S. aureus</i>.....	39
3.1. La détection de la formation de biofilms par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA).....	40
3.2. Formation de biofilms en microplaques.....	42
3.3 Formation de biofilms en tubes.....	43
3.4. Cinétique de formation des biofilms d’<i>A.baumannii</i> et de <i>S. aureus</i>.....	46
Conclusion	54
Références	
Annexes	
Résumés	

Liste des Abréviations

AI : Auto-Inducteurs

API20NE : Appareillage et Procédés d'Identification des Non Entérobactéries (galerie biochimique)

ATB : Antibiotiques

BN : Bouillon Nutritif

CC : Bouillon Cœur Cerveau

CV : Cristal Violet

CVC : Cathéters Veineux Centraux

DM : Dispositifs Médicaux

DO : Densité Optique

EDS : Eau Distillée Stérile

EPS : Exo polysaccharides

GN: Gélose Nutritive

IN: Infections Nosocomiales

LPS : Lipo-polysaccharides

MEB : Microscopie électronique à balayage

MH : Mueller-Hinton

PIA : Polysaccharide Intercellulaire Adhésine

QS : *Quorum Sensing*

RCA : Rouge Congo Agar

S : Souche

SFM : Société Française de Microbiologie

SPE : Substances Polymériques Extracellulaires

Liste des figures

Figure 1 : Les étapes de la formation d'un biofilm.....6

Figure 2 : Principales infections associées aux biofilms.....13

Figure 3 : Diagramme d'un biofilm médical.....15

Figure 4 : Croissance des colonies d'*A.baumannii* sur milieu Luria-Bertani.....16

Figure 5 : La morphologie des *Acinetobacter* sous microscopie électronique à balayage (MEB).....19

Figure 6 : Les infections causées par *A.baumannii*.....22

Figure 7 : Formation de biofilms d'*A.baumannii* (S1) en bouillons CC et BN.....44

Figure 8 : Croissance d'*A.baumannii* (S1) en bouillons CC et BN.....44

Figure 9 : Formation de biofilms par les souches S1, S2 et S3 après 24 heures d'incubation en BN.....45

Figure 10 : Cinétique de formation de biofilm d'*A.baumannii* (S1) en bouillon CC.....48

Figure 11 : Croissance d'*A.baumannii* (S1) en bouillon CC.....48

Figure 12 : Cinétique de formation de biofilm d'*A.baumannii* (S1) en BN.....49

Figure 13 : Croissance d'*A.baumannii* (S1) en BN.....50

Figure 14 : Cinétique de formation de biofilm d'*A.baumannii* (S2) en BN.....51

Figure 15 : Croissance d'*A.baumannii* (S2) en BN.....51

Figure 16 : Cinétique de formation de biofilm de *S. aureus* (S3) en BN.....52

Figure 17 : Croissance de *S. aureus* (S3) en BN.....53

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les importants variables intervenant dans la fixation des cellules microbiennes et la formation de biofilm.....	9
Tableau 2 : Liste partielle d'infections humaines qui impliquent des biofilms.....	11
Tableau 3 : Les principales espèces appartenant au genre <i>Acinetobacter</i>	18
Tableau 4 : Caractères des espèces d' <i>Acinetobacter</i> principalement rencontrés en clinique.....	21
Tableau 5 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude.....	27
Tableau 6 : Identification biochimique à l'aide de la galerie classique.....	29
Tableau 7 : Liste des antibiotiques testés.....	32
Tableau 8 : Résultats de l'identification biochimique à l'aide la galerie classique.....	36
Tableau 9 : Résultats de l'identification biochimique à l'aide de la galerie API 20 NE.....	36
Tableau 10 : Le profil de sensibilité aux ATB des souches S1 et S2	38
Tableau 11 : Le profil de sensibilité aux ATB de la souche S3	39
Tableau 12 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.....	40

Introduction

Introduction

Pendant longtemps, les bactéries ont été considérées comme vivantes préférentiellement en suspension, et étudiées dans cet état dit « planctonique ». Cependant, la majorité d'entre elles peuvent se trouver sous forme de biofilms. Ces derniers sont des communautés microbiennes fixées à une surface et maintenues par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice (**Ouchar mahamati et al., 2013**).

Les biofilms colonisent des surfaces très variées et sont particulièrement connus pour leurs effets négatifs sur la santé. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus, l'émergence des infections nosocomiales (IN). En effet, les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'homme (**Hall-Stoodley et al., 2004 ; Chalvet de Rochemonte, 2009 ; Ouchar mahamati et al., 2013**).

Au cours de ces dernières décennies, *Acinetobacter baumannii*, une bactérie opportuniste, est passée d'un groupe d'agents pathogènes à faible degré à celui des principaux responsables d'IN. Cette bactérie à Gram négatif, en particulier les souches multirésistantes, peut causer des infections sévères chez les patients hospitalisés avec un taux de mortalité important. Le traitement de ces infections peut être très difficile (**Babapour et al., 2016**). Parmi les facteurs de virulence les plus importants chez *A. baumannii*, est sa capacité à produire des biofilms et sa survie dans un milieu hospitalier ce qui augmente sa résistance aux antibiotiques (**Babapour et al., 2016**).

Staphylococcus aureus, l'un des bactéries à Gram positif, est fréquemment impliquée dans les IN liées aux dispositifs médicaux (DM). En outre, cette espèce possède la capacité d'adhérer aux cathéters et d'autres DM et de former des biofilms (**Zmantar et al., 2010**).

L'étude de ces bactéries productrices de biofilms suscite donc un grand intérêt, car elles pourraient servir de source de contamination microbienne ou de transmission de maladies (**Ouchar mahamati et al., 2013**).

Le présent travail a pour objectif, dans un premier temps, l'étude phénotypique de la formation de biofilms par des isolats cliniques d'*Acinetobacter baumannii* et de *Staphylococcus aureus*, selon deux méthodes, une effectuée en boîte de Pétri et l'autre en microplaque à 96 puits.

Dans un deuxième temps, l'évaluation quantitative de la production de biofilms en tubes suivant la technique standard de coloration au cristal violet ainsi que le suivi de la cinétique de la formation de biofilms par ces deux bactéries.

Synthèse bibliographique

Partie I : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les biofilms

1. Historique

La découverte des biofilms est attribuée à Leeuwenhoek (**1683**) qui observa la présence des communautés de microorganismes à la surface de ses propres dents.

Zobell (**1943**) montra que, dans le milieu marin, la quantité de bactéries fixées sur un substrat est largement supérieure à la quantité de bactéries libres dans la phase liquide.

Jones (**1969**), travaillant sur des filtres de station de traitement des eaux, confirma non seulement les agrégats mono ou poly-microbiens, mais aussi l'existence d'une matrice polyosidique.

Characklis (**1973**) démontre que des dépôts microbiens installés dans des conduites d'eau de systèmes industriels apparaissent résistants aux désinfectants.

Costerton (**1978**) et son équipe proposaient la théorie des biofilms en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté pour la plupart des microorganismes (**Rodney et al., 2002 ; Harold et al., 1997 ; Branger, 2007 ; Givskov et al., 2007**).

2. Définition d'un biofilm

Le biofilm est une communauté de microorganismes adhérente à une surface et caractérisée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice d'exopolymères. Les surfaces peuvent être biotiques ou abiotiques tels que les tissus vivants, les dispositifs médicaux, les conduites d'eau potable ou les systèmes aquatiques naturels (**Donlan, 2002 ; Branger, 2007 ; Philips et al., 2010 ; Tremblay et al., 2014**).

3. Les étapes de formation d'un biofilm

Les microorganismes semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, comme : l'indisponibilité en oxygène ou en nutriment (**Branger et al., 2007**).

L'observation directe des biofilms par microscopie, ainsi que les nombreuses études génétiques réalisées sur les biofilms, ont conduit à un modèle de développement en 05 étapes (**Agnès et al., 2006**) :

3.1. Conditionnement de la surface

La première étape est la formation du film primaire ou « film conditionnant » et transport des microorganismes à proximité de la surface (**Figure 1**). Ce film constitue une base sur lequel le biofilm pousse, par ce qu'il augmente la capacité des microorganismes à se fixer à une surface (**Branger, 2007 ; Garrett *et al.*, 2008 ; Percival *et al.*, 2011**).

Le film conditionnant est composé de plusieurs substances (protéines, glucides et minéraux) issus du milieu environnant. Ce film va modifier les propriétés physico-chimiques de surface ainsi que inhiber ou au contraire stimuler l'adhésion microbienne (**Branger, 2007 ; Garrett *et al.*, 2008 ; Percival *et al.*, 2011**).

Après le conditionnement très rapide de la surface, l'étape suivante correspond au transport des microorganismes à proximité de la surface. Ce transport est effectué grâce à des propriétés dynamiques du milieu ainsi qu'aux propriétés physicochimiques de la surface du support. Différents appendices bactériens tel que les flagelles et les cils sont également nécessaires (**Rodney *et al.*, 2002 ; Agnès *et al.*, 2006 ; Branger, 2007 ; Percival *et al.*, 2011**).

3.2. Adhésion

L'adhésion initiale aux surfaces mettant en jeu un certain nombre de mécanismes physico-chimiques et biologiques complexes. Elle est généralement divisée en deux phases : (**Baillif *et al.*, 2010**).

3.2.1. Adhésion réversible

Elle consiste dans un premier temps en l'interaction des charges en milieu liquide avec une surface solide (attraction correspondante aux forces de Van der Waals et des forces de répulsion électrostatique) (**Garrett *et al.*, 2008 ; Grderes *et al.*, 2014**).

Une fraction des cellules atteignant la surface s'adsorbe de manière réversible. Des facteurs tels que : l'énergie disponible, la fonctionnalité de surface, l'orientation bactérienne, la température et les conditions de pression sont des variables environnementales locales qui contribuent à l'adhésion bactérienne. Si les forces répulsives sont supérieures aux forces d'attraction, les bactéries se détacheront de la surface. Ceci est plus susceptible de se produire avant le conditionnement d'un substrat (**Garrett *et al.*, 2008**).

3.2.2. Adhésion irréversible

Un certain nombre de cellules adsorbées de manière réversible restent immobilisées et deviennent irréversiblement adsorbées. Au fur et à mesure que les bactéries se multiplient leur adhésion devient plus solide et elles se différencient, en modifiant leur schéma d'expression génique de manière à favoriser leur survie. Ce processus est habituellement le résultat d'un type de communication bactérienne appelée Quorum Sensing (QS) (**Garrett *et al.*, 2008 ; Philips *et al.*, 2011**).

3.3. Formation de micro-colonies

Une fois attachés, les microorganismes se divisent et forment des micro-colonies (**Agnès *et al.*, 2006 ; Philips *et al.*, 2011**).

3.4. Maturation de biofilm

A partir d'une concentration suffisamment dense d'individus, les micro-colonies commencent à sécréter une matrice environnante appelée substances polymériques extracellulaires (SPE). Il s'agit d'une matrice protectrice qui forment alors le biofilm initial (**Philips *et al.*, 2011 ; Tremblay *et al.*, 2014**).

Le biofilm grandit et mature, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique en conditions optimales. La maturation de biofilm caractérisé par une structure complexe et les bactéries de diverses régions du biofilm pourront exprimer des gènes différentes (**Branger, 2007 ; Tremblay *et al.*, 2014**).

3.5. Dispersion du biofilm

La dernière étape est la phase de dispersion, appelée aussi phase planctonique. Sous l'effet du vieillissement du biofilm, de certaines stresses ou carences, les cellules microbiennes vont se séparer du biofilm et se disperser pour adhérer à des nouvelles surfaces et former un nouveau biofilm (Branger, 2007 ; Tremblay *et al.*, 2014).

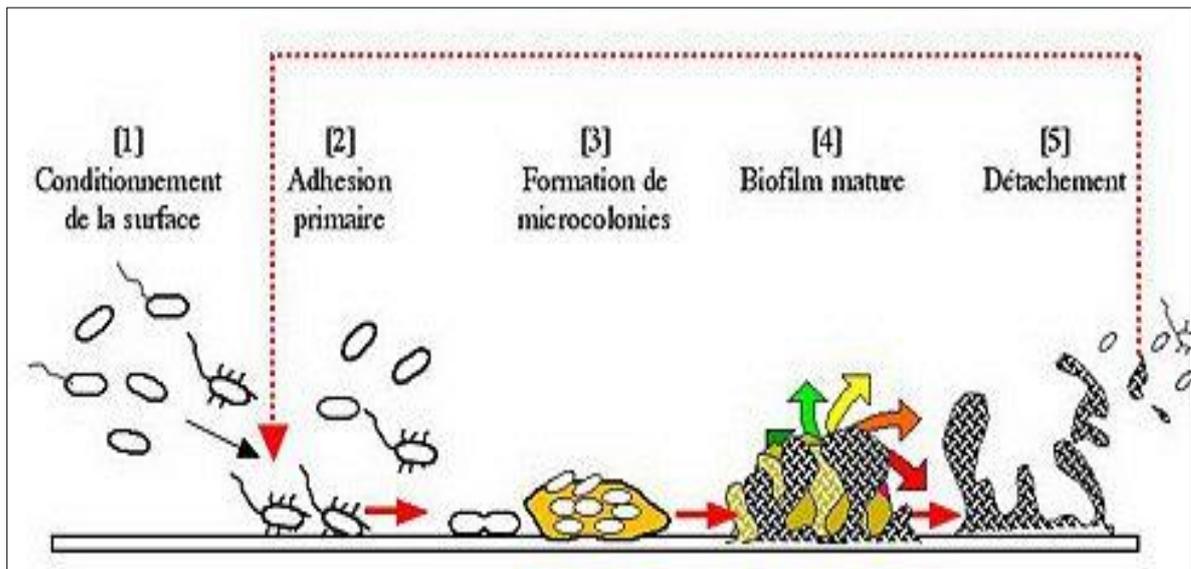


Figure 1. Les étapes de la formation d'un biofilm (Roux et Ghigo, 2006).

4. Composition et organisation

4.1. Composition

Dans la plupart des biofilms, les microorganismes représentent moins de 10 % de la masse sèche, alors que la matrice peut représenter jusqu'à plus de 90 %. (Branger, 2007 ; Muhsin *et al.*, 2015).

4.1.1. Les microorganismes

Les biofilms sont composés soit d'un seul type de microorganisme, soit de plusieurs types. De même, la composante microbienne peut être constituée d'une seule espèce ou d'espèces différentes. Ce phénomène est lié aux conditions environnantes, plus souvent qu'à la nature même des microorganismes (Branger, 2007).

4.1.2. La matrice

La matrice est un environnement dynamique dans lequel les cellules microbiennes et les composants sont organisés de manière à utiliser tous les éléments nutritifs disponibles. Elle exerce différents rôles :

- Elle assure la cohésion de chaque micro-colonie, les protège, absorbe l'eau et piège les petites particules circulantes.
- Elle fournit des nutriments dissous et élimine leurs déchets (**Branger, 2007**).

Elle est composée principalement de :

- L'eau : (jusqu'à 97%) est la majeure partie du biofilm qui est responsable de l'écoulement des nutriments à l'intérieur de la matrice du biofilm.
- Des exo-polysaccharides (EPS) : éléments structuraux majeur de biofilm.
- Des protéines, y compris des enzymes, l'ADN, les polysaccharides et de l'ARN.
- Débris issus des matières en contact avec les surfaces.

La composition de la matrice varie selon l'espèce et les condition de croissance (**Hatroubi et al., 2014 ; Muhsin et al., 2015**).

4.2. Organisation

Les microorganismes sont organisés à l'intérieur de la matrice sous forme de micro-colonies. Les micro-colonies au sein des biofilms sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et d'autre part d'évacuer les déchets (**Branger, 2007**).

Le matériel soluble peut diffuser à travers la matrice d'EPS et être utilisé par les bactéries.

Un gradient de nutriments et d'oxygène est observable depuis le sommet du biofilm jusqu'à sa base où l'on a un microenvironnement anaérobie. Cette observation conforte l'idée selon laquelle l'état métabolique d'une bactérie à l'intérieur d'un biofilm dépend de sa localisation au sein de la structure (**Filloux et al., 2003**).

Le biofilm n'est pas un environnement homogène car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments et qui présentent des valeurs de pH différentes. Les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en

nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (Agnès *et al.*, 2006).

5. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm

Le développement d'un biofilm est un processus séquentiel complexe qui fait intervenir de nombreux mécanismes physico-chimiques et biologiques. Ce développement est influencée par trois composants : la surface, le milieu, et les microorganismes ; ainsi que les interactions existantes entre ces composants (Branger, 2007), (Tableau 1).

5.1. Les caractéristiques de la surface

Le contact d'un matériau avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm :

- a) **La rugosité** : plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante.
- b) **Les propriétés chimiques d'une surface** : peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Téflon et le plastique.
- c) **La présence préalable de films protéiques** : comme le sang, les larmes, l'urine.....etc influencent l'attachement de bactéries à cette surface, et favorise la formation de biofilm (Bellifa, 2014).

5.2. Les caractéristiques du milieu

Le mode de culture est une caractéristique importante qui peut modifier fortement l'adhésion des organismes ainsi que les conditions environnement telle que :

- a) **La disponibilité de nutriments** : excès ou carence.
- b) **Les différents stress physicochimiques** : pH, température présence de composés bactéricidesetc.
- c) **Composition de milieu** : présence de calcium, magnésium, phosphate, glucose ...etc semble faciliter l'adhésion à un support (Marchal, 2010).

5.2. Les caractéristiques des microorganismes

Les pili, exprimés par les bactéries, sont impliqués dans l'adhésion bactéries- cellules et les EPS, synthétisés par les bactéries, facilitent aussi la fixation aux surfaces. L'adhésion est

également sous la dépendance de l'état physiologique de la bactérie, le caractère hydrophobe, de sa charge électrique globale et de l'énergie libre de la surface (Hygis, 2010).

Tableau 1. Les importants variables intervenant dans la fixation des cellules microbiennes et la formation de biofilm (Donlan, 2002).

Propriétés du substrat	Propriétés du milieu	Propriétés de la cellule
Texture ou rugosité	La vitesse d'écoulement	Hydrophobicité de la surface cellulaire
Hydrophobicité	pH	Fimbriae
Film de conditionnement	Température	Flagelles
	Cations	Substances polymériques extracellulaires
	Présence d'agents antimicrobiens	

6. Quorum Sensing

Un mode de régulation remarquable à été mis en évidence chez les microorganismes dit quorum sensing (QS). Le QS est un mécanisme de communication inter-microbienne, contrôlant l'expression de gène particulier au sien d'une population microbienne, en fonction de la densité cellulaire. Quand le signal atteint une certaine concentration critique, il active un régulateur transcriptionnel qui induit des gènes cibles spécifiques (comme la production d'EPS) (Jayaraman et Wood,2008 ; Ng et Basseler,2009).

Le QS aura une influence sur les différentes étapes de la formation du biofilm. Il implique la production, la sécrétion et la détection, par les bactéries, de petites molécules signal appelées auto-inducteurs (AI). Chez les bactéries à Gram négatifs, l'auto-inducteur est une homo-sérine lactone, alors que cher les bactéries à Gram positif, c'est un oligopeptide appelé phéromone (Roux *et al.*, 2006 ; Tremblay *et al.*, 2014).

7. Domaines d'interventions des biofilms

Les communautés microbiennes peuvent se développer sur une grande variété de surfaces, incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, les canalisations des systèmes d'eau potable ou industriels, ou sur tous autres supports retrouvés dans le sol ou dans les milieux aquatiques (**Donlan, 2002**).

6.1. Dans l'environnement et les industries

La croissance des microorganismes sous formes de biofilms prédominent tous les systèmes aquatiques faisant partie des écosystèmes naturels (**Costerton et al.,1995**). A plus large échelle, les biofilms sont nécessaire à la survie des bactéries sur la planète et la continuité de la chaine alimentaire (**Burin des Roziers et al., 2002**).

Les biofilms posent des problèmes dans de nombreux secteurs industriels. Dans l'industrie pétrolière par exemple, la colonisation des systèmes d'injection d'eau peut entraîner une acidification du pétrole qui devient alors inutilisable.

La formation de biofilms sur les coques des navires, appelée phénomène de « biofouling », conduit à une augmentation des forces de friction, une diminution de la vitesse des bateaux et des surcoûts énergétiques considérables (**Agnès et al., 2006**).

Toutefois, les biofilms peuvent être bénéfiques. C'est le cas lorsqu'ils sont utilisés dans les réacteurs de bioconversion appelés aussi réacteurs à bactéries fixées ou lorsqu'ils interviennent dans certains procédés de fermentation, de filtration et d'épuration (**Burin des Roziers et al., 2002**).

6.2. Dans le domaine médical

Dans la nature, les microorganismes ont une tendance naturelle à l'adhésion aux surfaces. Il en est de même dans le domaine médical (**Herard, 1998**).

6.2.1. Les infections associées aux biofilms

Les biofilms sont à l'origine d'infections chroniques et d'infections contractées en milieu hospitalier, le plus souvent en rapport avec le port de prothèses médicales, on parle donc d'infections nosocomiales (**Tableau 2**). Les infections à biofilms sont résistantes aux

traitements antibiotiques, et posent de sérieux problèmes en matière de santé publique. Certaines maladies peuvent même favoriser la formation de biofilms, comme l'exemple de la mucoviscidose (**Chalvet de Rochemonte ,2009**).

La formation de biofilms bactériens libère des bactéries planctoniques à l'origine d'infections systémiques. Même chez un individu immunocompétent, la réaction immunitaire ne permet pas de détruire la communauté bactérienne au sein du biofilm. Par ailleurs, si l'administration d'antibiotiques permet la disparition transitoire des symptômes en éradiquant les bactéries planctoniques, elle n'élimine pas le biofilm, qui pourra de nouveau constituer une source d'infection. Les biofilms constituent donc des réservoirs bactériens à l'origine d'infections chroniques ou récidivantes (**David et al., 2012**).

Tableau 2. Liste partielle d'infections humaines qui impliquent des biofilms
(**Costerton et al., 1999**).

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

6.2.2. Les biofilms sur dispositifs médicaux

Les biofilms ont la capacité de se développer sur divers instruments médicaux tels que les sondes urinaires, les cathéters veineux et les tubes endotrachéales (**Agnès *et al.*, 2006**).

La colonisation de dispositifs médicaux par des microorganismes est un événement fréquent, potentiellement à l'origine de la survenue ultérieure de pathologies infectieuses. Ces microorganismes proviennent essentiellement des flores des patients ou de leur environnement, et sont associés dans un certain nombre de cas à des épisodes infectieux (**Bakini *et al.*, 2014**). La **figure 2** montre l'ensemble des infections liées aux biofilms ainsi que celles associées aux dispositifs médicaux.

Les cathéters veineux centraux (CVC) sont de plus en plus utilisés dans les pratiques médicales. Cependant, l'incidence de colonisation sur cathéter (environ 13 %), le taux de bactériémie (environ 3 %) et le taux de septicémie (environ 4,4 %) ne sont pas négligeables. Ces infections, associées à une morbidité et une mortalité accrue, augmentent la durée et les coûts d'hospitalisation. La colonisation microbienne du cathéter se faisant par voie endoluminale ou extraluminale (**Bougel *et al.*, 2003**).

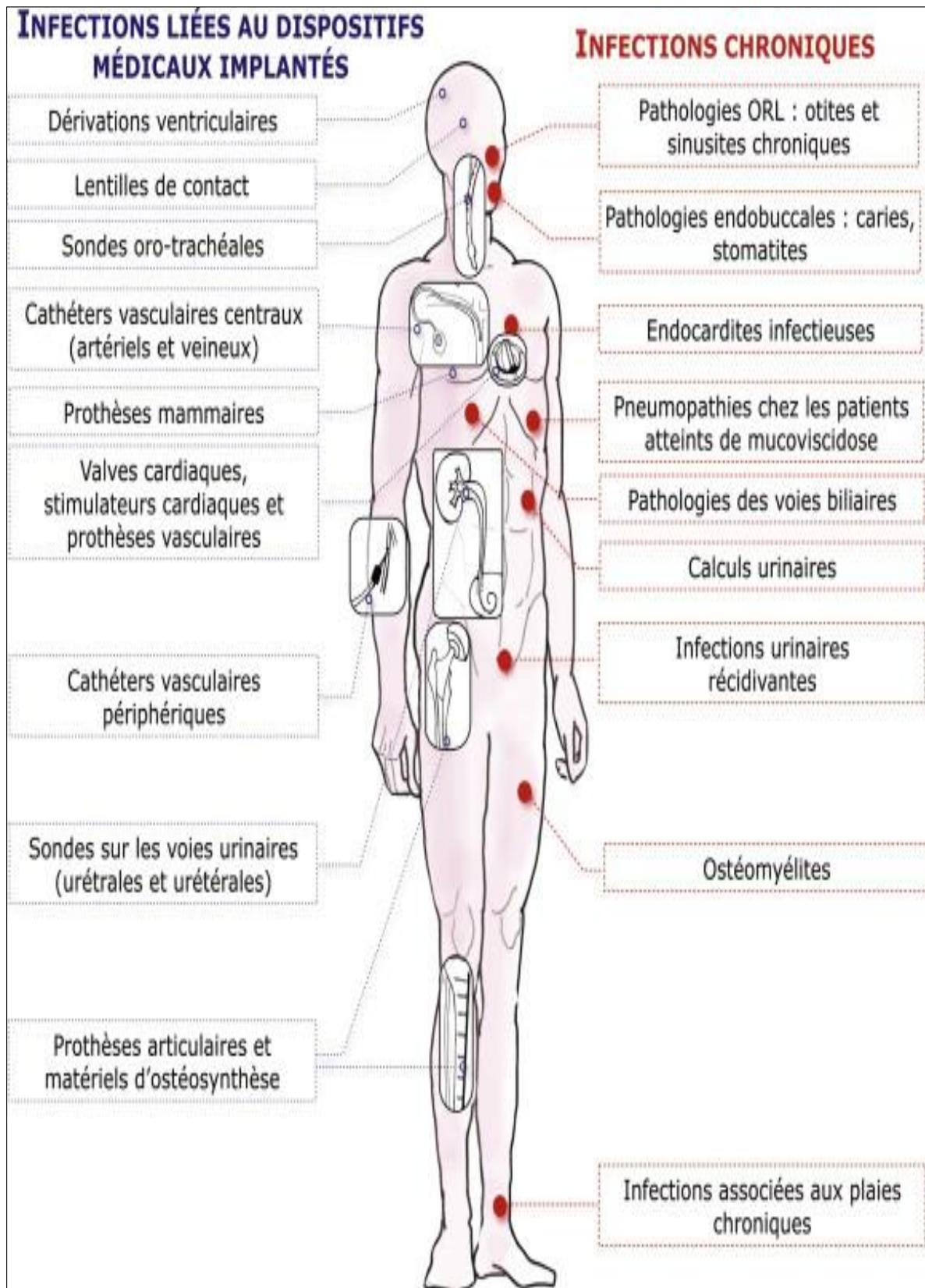


Figure 2. Principales infections associées aux biofilms (David *et al.*, 2012).

6.2.3. La résistance aux antibiotiques

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la plus grande résistance des biofilms aux agents antibiotiques. Un de ces facteurs est la matrice polymérique qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens. La proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise probablement le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques (**Yanik *et al.*, 2014**).

De même, les bactéries au sein des micro-colonies, du fait d'un appauvrissement environnemental en nutriments, ont un métabolisme ralenti. Or les antibiotiques agissent en phase de croissance bactérienne (**Cloby, 2007**).

6.2.4. La résistance à l'immunité

En plus de leur résistance accrue aux antibiotiques, les biofilms sont protégés vis-à-vis du système immunitaire des hôtes infectés. La taille des biofilms est tout d'abord un frein important au processus de phagocytose (**Agnès *et al.*, 2006**).

Contrairement aux bactéries planctoniques, qui peuvent être neutralisées par le système immunitaire, les bactéries sessiles du biofilm sont protégées par ce dernier contre l'immunité naturelle (**Figure 3**). Cependant, si l'action directe des cellules phagocytaires est mise en difficulté, leurs enzymes peuvent entraîner des lésions des tissus environnant le biofilm et favoriser la dissémination de l'infection par contiguïté voire à distance (**Cloby, 2007**).

La matrice extracellulaire est également une barrière au système immunitaire de l'hôte car elle empêche la reconnaissance des antigènes bactériens par les anticorps (**Agnès *et al.*, 2006**).

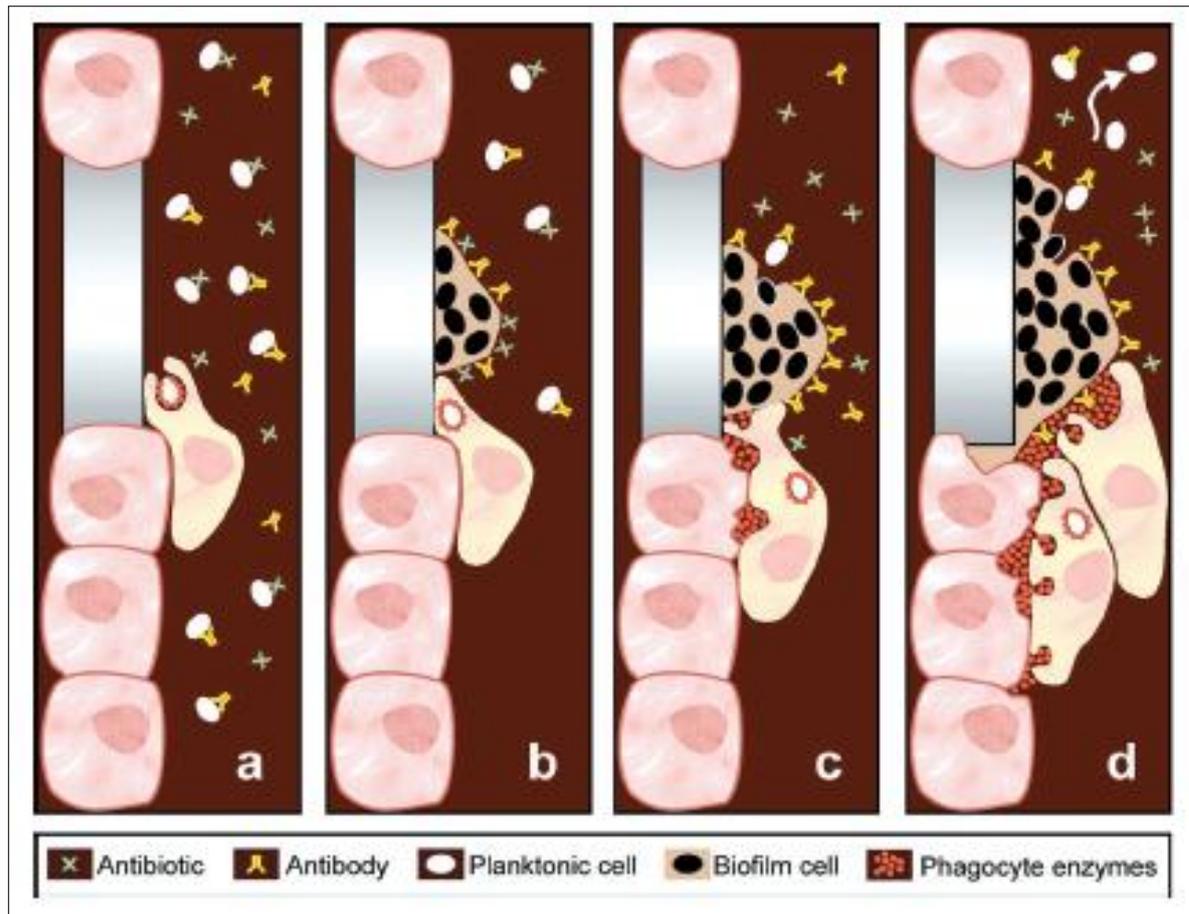


Figure 3. Diagramme d'un biofilm médical (Costerton *et al.*, 1999).

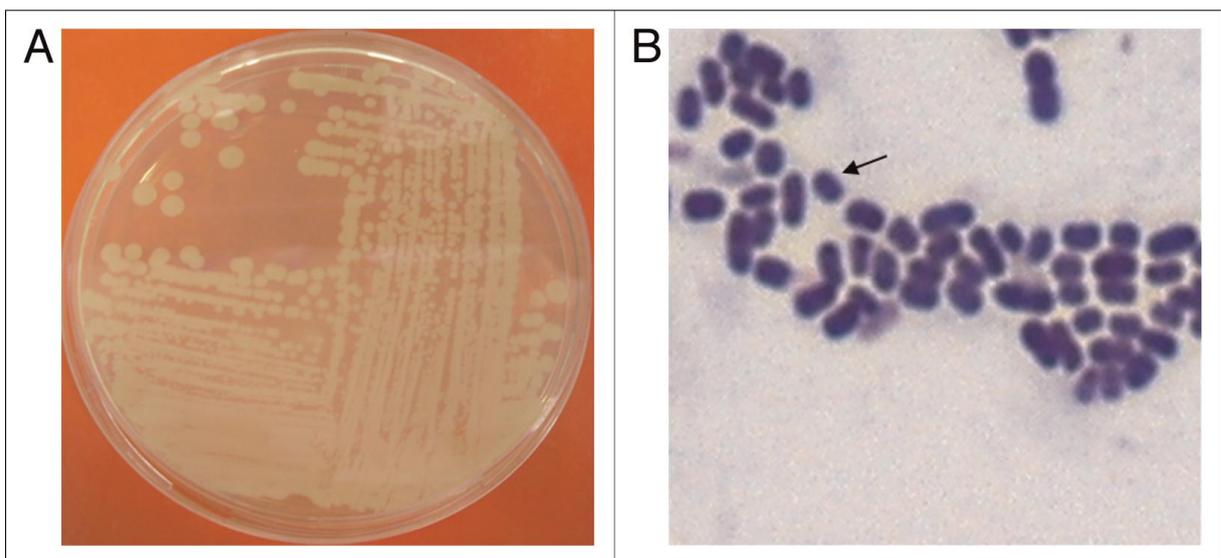
- a) Les bactéries planctoniques peuvent être éliminées par les mécanismes de défense naturels (Anticorps, phagocytes...) et elles sont sensibles aux antibiotiques.
- b) Les bactéries peuvent adhérer entre elles pour former un biofilm notamment sur une surface inerte; cette communauté, sessile, est résistante aux anticorps, aux phagocytes et aux antibiotiques.
- c) Les phagocytes sont attirés par les biofilms. La phagocytose est inopérante mais les enzymes phagocytaires sont libérées localement.
- d) Les enzymes phagocytaires vont endommager les tissus autour du biofilm et des bactéries planctoniques vont essaimer du biofilm. Cette libération peut être la cause d'une dissémination de l'infection et d'une infection aiguë dans un tissu voisin.

Chapitre 2 : Généralités sur les *Acinetobacter spp*

1. Définition

Les bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* sont des coccobacilles à Gram négatif, aérobies strictes, et non fermentaires (**Figure 4**). *Acinetobacter baumannii* est une bactérie pathogène d'infection opportuniste chez l'homme (**Kopronov et al., 2001 ; Howard et al., 2012**).

Cette bactérie multirésistante a une forte incidence chez les individus immunodéprimés et elle est à l'origine d'infections nosocomiales (IN) (**Kopronov et al., 2001 ; Hellen et al., 2008 ; Stilianos et al., 2008 ; Howard et al., 2012**).



Figur4. (A) : Croissance des colonies d'*A.baumannii* sur milieu Luria-Bertani.
(B) : Observation microscopique de d'*A. baumannii* après coloration de Gram (La flèche indique une cellule individuelle d'*A. baumannii*) (**Howard et al., 2012**).

2. Habitat

Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont considérées comme des bactéries ubiquistes. Elles sont capables d'utiliser une grande variété de substrats comme source d'énergie, ce qui leurs permet d'avoir un habitat très large et de persister dans un environnement hostile.

Elles sont très répandues dans la nature ainsi que chez l'animal et dans l'alimentation (produits laitiers, viandes...) et elles font également partie de la flore résidente normale de la peau saine ; c'est à la fois un commensal et un opportuniste.

En pratique médicale, *A. baumannii* a été longtemps assimilée à un contaminant. Actuellement, elle est impliquée dans de nombreuses IN (**Joly-Guillou, 2005 ; Pierrick, 2015**).

3. Taxonomie

La taxonomie des isolats constituant le genre *Acinetobacter* a été largement modifiée par Bouvet et Griment. Ces chercheurs ont déterminé que l'espèce *A. baumannii* est l'espèce la plus responsable d'IN (**Walter, 1989**).

L'histoire taxonomique des *Acinetobacter spp.* Apparaît confuse puisqu'ils ont été classés de diverses manières. De la famille *Neisseriaceae* à la famille des *Moraxellaceae* sous les noms de *Moraxella*, *Herellea*, *Mima*, *Achromobacter* et *Alcaligenes*. L'hybridation ADN/ADN a entraîné une diminution de 32 espèces génomiques et l'application de méthodes d'identification traditionnelles n'est en général pas très satisfaisante (**Giamarellou et al., 2008**).

A. baumannii, *Acinetobacter calcoaceticus* et les espèces génomiques 3 et 13 non identifiées Sensu Tjernberg et Ursing (13TU) sont difficiles à les distinguer phénotypiquement et, par conséquent, elles sont tenus au nom du complexe *A. baumannii/A. calcoaceticus* (**Forste et al., 1998**). Ce dernier représente les souches d'*Acinetobacter* les plus souvent associées à une infection acquise dans les hôpitaux représentant 75 % des *Acinetobacter spp.* isolés à partir de spécimens cliniques (**Giamarellou et al., 2008**).

Le genre *Acinetobacter* est actuellement inclus dans :

- Le domaine des *Bacteria*
- Le phylum des *Proteobacteria*
- La classe des *Gammaproteobacteria*
- L'ordre des *Pseudomonadales*
- La famille des *Moraxellaceae* (**Marti, 2008**).

Le **tableau 3** ci-dessous récapitule certaines espèces génomiques apparentant au genre *Acinetobacter*.

Tableau 3. Les principales espèces appartenant au genre *Acinetobacter* (Marti, 2008).

Espèce	Souche de Référence	Lieu d'identification
<i>A. calcoaceticus</i>	ATCC 23055	Environnement
<i>A. baumannii</i>	ATCC 19606	Environnement / homme
<i>A. baylyi</i>	DSM 14961	Environnement
<i>A. bouvetii</i>	DSM 14964	Environnement
<i>A. lowffi</i>	ACTC15309	Homme
<i>A. gernerii</i>	DSM 14967	Environnement
<i>A. grimontii</i>	DSM 14968	Environnement
<i>A. haemolyticus</i>	ATCC 17906	Environnement / homme
<i>A. johnsonii</i>	ATCC 17909	Environnement / homme
<i>A. junii</i>	ATCC 17908	Homme
<i>A. parvus</i>	NIPH384	Homme / chien
<i>A. radioresistens</i>	IAM 13186	Environnement / homme
<i>A. schindleri</i>	NIPH1034	Homme
<i>A. tandoii</i>	DSM 14970	Environnement
<i>A. tjernbergiae</i>	DSM 14971	Environnement
<i>A. townneri</i>	DSM 14962	Environnement
<i>A. ursingii</i>	NIPH137	Homme

4. Caractères bactériologiques

4.1. Caractères morphologiques

A l'examen direct, les cellules d'*Acinetobacter* se présentent comme des bacilles courts de 0,9 à 1,6 nm et leur longueur de 1,5 à 2,5 µm mais souvent deviennent plus coccoïdes dans la phase stationnaire (**Figure 5**). La structure de la paroi cellulaire est en général typique des bactéries à Gram négatif, cependant les cellules peuvent résister à la décoloration (**Bergogne-Berezin and Towner, 1996; Towner, 2006 ; Montefour et al., 2008 ; Bendadi, 2012**).

Les cellules se présentent en paire, ou parfois en chaînes de longueurs variables. Parfois entourées d'une capsule, non sporulées et les flagelles sont absents. Dans les cultures âgées, des formes sphériques ou filamenteuses peuvent être observées (**Towner, 2006 ; Bendadi, 2012**).

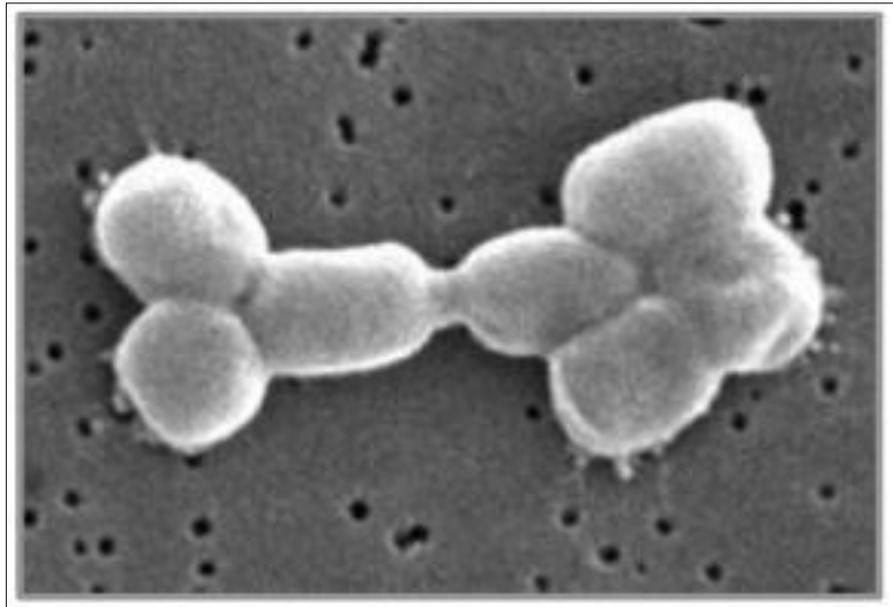


Figure 5. La morphologie des *Acinetobacter* sous microscopie électronique à balayage (MEB) (Marti, 2008).

4.2. Caractères biochimiques et métaboliques

Tous les membres du genre *Acinetobacter* sont des aérobies stricts, oxydase négatif, catalase positive, à métabolisme respiratoire strict et non fermentaires (Snellman *et al.*, 2004). La réaction négative de l'oxydase sert pour distinguer le genre d'autres genres apparentés. La plupart de souches sont généralement incapables de réduire les nitrates en nitrites (Towner, 2006).

Une réponse négative est obtenue pour les tests LDC (Lysine décarboxylase), ODC (L'ornithine décarboxylase), ADH (L'arginine dihydrolase), production d'hydrogène sulfuré, production d'indole et de la bêta-galactosidase. Une réponse variable est obtenue pour l'hydrolyse de la gélatine. Quelques souches produisent une uréase (Giamarellou *et al.*, 2008 ; Bendadi, 2012).

Le complexe *A. baumannii/A. calcoaceticus* contient les isolats qui acidifient le glucose. *A. baumannii* se développe à des températures et des pH variables et utilise une large variété de substrats pour la croissance (Towner, 2006 ; Montefour *et al.*, 2008).

4.3. Caractères cultureux

L'isolement des *Acinetobacter spp.* peut être obtenue après incubation à des températures comprises entre 30°C et 37°C sur des milieux conventionnels tels que la gélose au sang, la gélose au chocolat, la gélose trypticase soja, le bouillon nutritif, ou sur les milieux dédiés aux bacilles à Gram négatif comme la gélose de Mac Conkey.

Les colonies apparaissent en générale lactose négatif sur les milieux lactosés (**Lambert, 2007**).

L'espèce *A. baumannii* au sein des *Acinetobacter* peut croître à diverses températures et différentes valeurs de pH et utilise une grande variété de substrats pour la croissance (**Montefour et al., 2008**). Elle se cultive facilement sur les milieux usuels à une température de 37°C. Cependant, elle possède également la faculté de se cultiver à 44°C, ce qui permet de la distinguer d'autres espèces du genre *Acinetobacter* (**Lahiri et al., 2004**).

Cette bactérie peut présenter deux aspects de colonies différents. En effet, les souches capsulées vont former des colonies muqueuses de couleur blanche-grise (elles sont dites « Smooth » ou lisses), alors que les souches non capsulées présenteront des colonies non muqueuses, d'aspect rugueux lisse, de couleur blanche-grise et de taille plus petite (elles sont dites « Rough » ou rugueuses). (**Paillories, 2017**) (**Desouky, 2003**).

Si une activité hémolytique peut être observée pour certains membres du genre *Acinetobacter* (comme *A. haemolyticus*), ce n'est pas le cas pour *A. baumannii* (**Paillories, 2017**).

5. Diagnostic bactériologique

5.1 Diagnostic du genre

Il est en général aisé d'identifier un bacille à Gram négatif au niveau du genre *Acinetobacter* par le cumul des caractères aérobie stricte, l'absence de nitrate réductase, la réaction à l'oxydase négative et l'absence de mobilité (**Lambert, 2007**).

5.2. Diagnostic de l'espèce

L'identification de diverses espèces est difficile. En pratique l'identification repose sur la capacité de :

- Développement à 37, 41 et 44°C en bouillon trypticase soja après 48 heures.
- L'hydrolyse de la gélatine et les galeries d'identifications commercialisées (API 20 NE) (**Tableau 4**) (**Lambert, 2007**).

Tableau 4. Caractères des espèces d'*Acinetobacter* principalement rencontrés en clinique (**Lambert, 2007**).

	1	2	3	4	5	6	7	8
Croissance à 37°C	+	+	+	+	+	-	+	+
Croissance à 41°C	-	+	+	-	+	-	-	+
Croissance à 44°C	-	+	-	-	-	-	-	±
Hydrolyse de la gélatine	-	-	-	+	-	-	-	-
Hémolyse	-	-	-	+	-	-	-	-

1 : *A. calcoaceticus*, **2** : *A. baumannii*, **3** : *Acinetobacter* spp. 3, **4** : *A. haemolyticus*, **5** : *A. junii*, **6** : *A. johnsonii*, **7** : *A. lwoffii*, **8** : *Acinetobacter* spp.13 TU,(+ : présence, - absence, ± variable).

L'identification précise requiert les testes d'assimilation de divers sources de carbones ou le recours à différentes techniques reposant sur l'analyse électrophorétique des protéines d'enveloppe ou d'isoenzymes, l'analyse du polymorphisme de gènes amplifiés ou des région intergéniques. Au sien d'*A.baumannii*, 19 biotypes ont été distingués par les testes d'assimilation et 34 sérovars ont été proposés (**Joly-Guillou, 2004 ; Lambert, 2007**).

6. Les infections causées par *Acinetobacter baumannii*

A. baumannii est un pathogène opportuniste qui émerge ces dernières décennies comme agent responsable d'un large spectre d'IN multi-résistantes, difficile à traiter et souvent associées à une létalité élevée (**Bergogne-Berezin, 1996 ; Poirel et al., 2003 ; Marti et al., 2011 ; Larry et al., 2016**).

Les infections à *A. baumannii* se produisent habituellement chez les patients hospitalisés en réanimation. La mortalité brute associée à l'infection par *A. baumannii* est de 19 à 54 % (Poirel *et al.*, 2003).

Les principales infections dues à *A. baumannii* sont les septicémies, les méningites, les infections du tractus respiratoire, les pneumonies, les infections de la peau et de plaies (Figure 6). D'autres infections de moindre importance sont l'endocardite et les infections du tractus urinaire (Bergogne-Berezin, 1996 ; Marti *et al.*, 2011 ; Larry *et al.*, 2016).

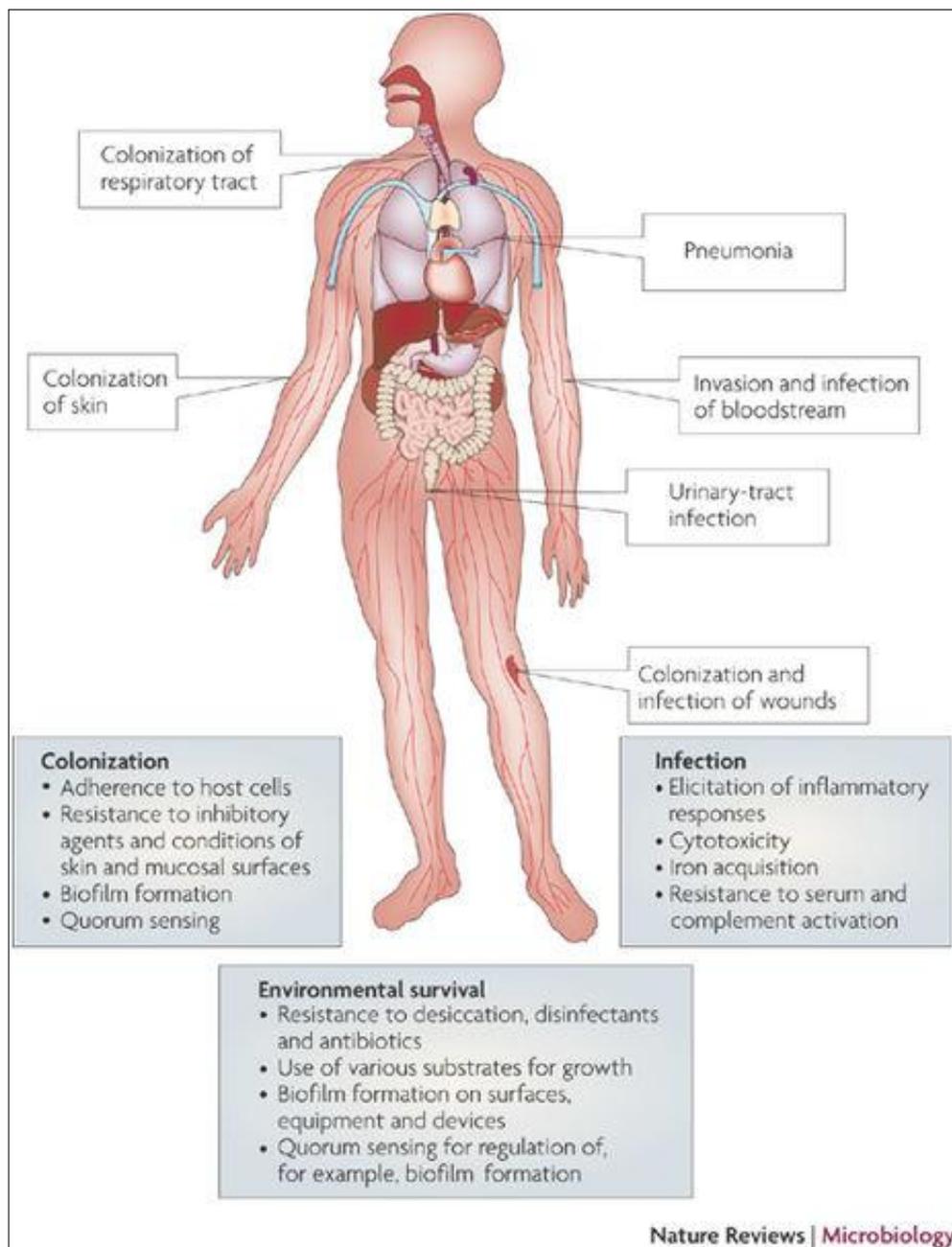


Figure 6. Les infections causées par *A. baumannii* (Consulo ibanez Marti, 2008).

6.1. Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique

A. baumannii est responsable de 15 à 24 % des pneumopathies chez les patients à ventilation mécanique (Gomez *et al.*, 1999). A ce jour, cette infection demeure la plus courante des infections causées par ce pathogène (Joly-Guillou, 2005).

6.2. Les méningites

Les cas de méningites à *A. baumannii* surviennent, pratiquement exclusivement, sous une forme secondaire après un traumatisme crânio-cérébral ou après intervention neurochirurgicale. L'infection est souvent associée à la présence de shunts ventriculaires et notamment de dérivation externe du liquide céphalo-rachidien (Metan *et al.*, 2007).

6.3. Les infections de la peau

A. baumannii peut également provoquer des infections de la peau et des tissus mous, notamment chez les grands brûlés et au niveau des plaies chez les blessés de guerre (Johnson *et al.*, 2007).

6.4. Les infections des voies urinaires

L'infection du tractus urinaire nosocomiale est rarement causée par *Acinetobacter spp.* Elle se présente d'une manière générale chez les patients âgés et affaiblis, chez les patients admis dans la réanimation, et également chez les patients porteurs des cathéters urinaires à demeure (Bergogne-Berezin and Towner, 1996).

7. Transmission

La capacité de persistance prolongée d'*A. baumannii* sur les surfaces sèches ou humides fait de cette bactérie l'une des bactéries à haut risque de transmission et de dissémination en milieu hospitalier. La transmission peut se faire par contact direct ou indirect, notamment par les mains et lors de l'émission de gouttelettes en cas de colonisation des voies respiratoires (Chraïti *et al.*, 2011).

8. Pathogénicité d'*Acinetobacter baumannii*

Bien que les *Acinetobacter spp.* sont considérées comme des bactéries faiblement pathogènes (**Bergogne-Bérézin et al., 1996 ; Figueiredo, 2011**), certaines caractéristiques peuvent augmenter la virulence des souches impliquées dans les infections.

Ces caractéristiques comprennent (**Bergogne-bérézin et al., 1996**) :

8.1. Le quorum-sensing

Le Quorum Sensing (QS) est un mécanisme de régulation largement répandu chez les bactéries à Gram négatif. Quatre molécules signales différentes du QS, sont capables d'activer les biosenseurs, ont été trouvées chez les souches cliniques d'*Acinetobacter*. Le QS peut être un mécanisme central pour l'auto-induction de multiples facteurs de virulence chez l'*Acinetobacter* (**Braun, 2008 ; Figueiredo, 2011**).

8.2. L'hydrophobicité

L'hydrophobicité de surface d'*Acinetobacter* le protège d'être phagocyté et semble jouer un rôle important dans son attachement à divers polymères. Elle est étroitement liée à son adhérence aux surfaces des dispositifs médicaux tels que les cathéters et les prothèses (**Braun, 2008 ; Figueiredo, 2011**).

8.3. La régulation de fer

Un autre facteur associé à la virulence d'*Acinetobacter* est la synthèse de Sidérophores. Ces derniers sont des protéines capables de convertir des polymères ferriques en chélates de fer solubles, élaborés par des bactéries se développant sous stress en fer. C'est un mécanisme de défense contre les infections permettant la captation du fer de l'hôte au profit de la bactérie, ou la diminution de la concentration en fer extracellulaire (**Braun, 2008 ; Figueiredo, 2011**).

8.4. Les activités enzymatiques

Les activités enzymatiques des estérases, certains amino-peptidases, l'uréase, et la phosphatase peuvent également être liées à la virulence d'*A. baumannii*. En plus, les activités estérases peuvent contribuer à sa capacité à endommager les tissus lipidiques (**Braun, 2008 ; Figueiredo, 2011**).

8.5. La capacité de formation de biofilm

La capacité de former des biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques lui permet de croître dans des conditions environnementales défavorables (**Figueiredo, 2011**).

8.6. Le lipo-polysaccharide (LPS)

A. baumannii produit un polysaccharide responsable de la toxicité mortelle chez la souris, et cette endotoxine est détectée lors de bactériémies à *Acinetobacter*. Le LPS peut altérer aussi l'action bactéricide du complément dans le sérum humain en agissant de façon synergique avec la capsule polysaccharidique (**Bergogne-Bérézin et al., 1996**).

8.7. Les protéines membranaires

La protéine de membranes externe à l'origine de réponse inflammatoire, comme la protéine (Omp A) est un porin à bêta hautement conservé parmi les espèces bactériennes et dans *A.baumannii* a été associé à une variété de propriétés biologiques intéressantes dans les modèles *in vitro*, capable d'induire l'apoptose de cellules épithéliales de l'hôte, et un rôle clair dans la résistance aux antimicrobiens. (**Figueiredo, 2011 ; Smani et al., 2014**).

9. Mécanismes de résistance

Au début, les isolats cliniques d'*Acinetobacter spp.* étaient généralement sensibles à de nombreux antibiotiques (ATB) tels que la gentamicine, minocycline, ampécilline, et la carbénicilline, mais à l'heure actuelle *A. baumannii* est considérée comme l'une des bacilles à Gram négatif les plus résistantes à de nombreux ATB disponibles y compris les aminoglycosides, les quinolones et les β -lactamines (**Manchanada et al., 2010 ; Konaté et al., 2016**).

Le terme « pan-résistance » a été utilisé pour décrire les souches d'*Acinetobacter* résistantes à tous les ATB à l'exception de la colistine. Cette résistance est d'origine génétique, elle peut être soit naturelle, soit acquise (**Helmich et al., 2008 ; Weinstein et al., 2008**).

L'émergence récente de souches d'*A.baumannii* multi-résistantes à de nombreuses classes d'ATB a été attribuée à sa capacité rapide d'accumuler des mécanismes de résistance ainsi que d'être bien adapté pour l'échange génétique. Par conséquent, *Acinetobacter* appartient à une classe unique de bactéries à Gram négatif qui se caractérisent par « naturellement transformables » (**Giamarellou et al., 2008**).

Les mécanismes de résistance chez les *A. baumannii* se répartissent généralement en trois grandes catégories :

- les enzymes antimicrobiennes inactivantes.
- l'accès réduit à des cibles bactériennes (en raison de la diminution de la perméabilité de la membrane externe causée par la perte ou l'expression réduite des porines, la surexpression des pompes à effluents multi-drogue).
- des mutations qui changent de cible ou de fonctions cellulaires (altération dans la protéine de liaison à la pénicilline) (**Manchanada et al., 2010**).

10. Traitement

Les carbapénèms ont longtemps été considérés comme le traitement de choix des infections à *Acinetobacter*. Aujourd'hui l'utilité clinique de cette classe est menacée par l'émergence de résistances. Actuellement, les associations de molécules et/ou l'utilisation d'ATB anciens comme la colistine et sulbactam sont souvent les seules possibilités. (**Weinstein et al., 2008**).

La durée du traitement est généralement similaire à celle des infections causées par d'autres bacilles à Gram négatif et dépend principalement du site d'infection. Pour les infections causées par des isolats multirésistants, les choix d'ATB peuvent être assez limités. (**Weinstein et al., 2008 ; Towner, 2009 ; Delbos, 2012**).

11. Prévention des infections à *A. baumannii*

L'éradication des espèces d'*Acinetobacter* nécessite l'adhésion de bonnes pratiques de lutte contre les infections, une utilisation prudente des ATB et une thérapie antimicrobienne efficace (**Kanafani et al., 2011 ; Al-Anazi et al., 2014**).

La propagation de souches d'*A.baumannii* multirésistantes peut être limitée par:

- a) l'application de mesures agressives de lutte contre les infections,
- b) l'élaboration de stratégies de contrôle innovantes,
- c) l'éducation du personnel, des patients et des visiteurs,
- d) le lavage des mains et l'utilisation d'antiseptiques,
- e) cultures de surveillance des patients, du personnel et de l'environnement,
- f) nettoyage et désinfection du matériel hospitalier (**Al-Anazi et al., 2014**).

Matériel et méthodes

Partie II : Matériel et Méthodes

1. Origine des souches bactériennes

Cette étude a porté sur trois souches cliniques à savoir deux souches appartenant à l'espèce *Acinetobacter baumannii* et une autre souche de *Staphylococcus aureus*. Ces souches ont été préalablement isolées de divers prélèvements de patients hospitalisés au niveau de l'Établissement Hospitalier Didouche-Mourad, durant la période allant de 1 Février jusqu'à 30 Avril 2017 (Tableau 5).

Les souches ont été identifiées au laboratoire central (unité de la microbiologie) par les méthodes conventionnelles.

Tableau 5. Souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Souches	Espèce	Prélèvement pathologique	Patient		
			Sexe	Age	Pathologie
S1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hémoculture	Masculin	82	KC du Pancréas
S2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Pus	Masculin	12	Dermatomyosite compliquée d'une calcinose
S3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Écoulement Séro-muqueux	Féminin	47	Diabétique

2. Isolement et identifications des souches cliniques

2.1. Isolement et identification d'*Acinetobacter baumannii*

2.1.1. Isolement du genre *Acinetobacter*

Deux milieux de culture sont utilisés pour l'isolement des bactéries du genre *Acinetobacter* à partir de divers prélèvements cliniques à savoir la gélose au sang cuite (gélose au chocolat) et le milieu Hektoen. La gélose nutritive (GN) a également servi pour la purification et le repiquage de souches.

Ces milieux, préalablement coulés en boîtes de Pétri, sontensemencés, en stries serrées sur la surface, de façon à obtenir des colonies bien isolées après une incubation. Les boîtes ainsiensemencées sont incubées à 37 °C pendant 24 heures.

Après incubation, les colonies susceptibles d'être des *Acinetobacter* sont repiquées sur les milieux de culture d'origine afin de confirmer la pureté des souches pour entamer l'étape d'identification.

2.1.2. Identification du genre *Acinetobacter*

L'identification du genre *Acinetobacter* est réalisée après :

2.1.2.1. Examen macroscopique

Cet examen, appliqué principalement sur la gélose Hektoen, est basé sur la recherche essentiellement des caractéristiques suivantes : la couleur, pigmentation, la forme, l'aspect de surface, l'aspect des bords de colonies, la consistance, l'opacité et la fermentation du lactose.

2.1.2.2. Examen microscopiques

- **Examen direct à l'état frais :** Il permet principalement de noter la présence de bactéries et leur éventuelle mobilité.
- **Examen après coloration de Gram :** L'examen microscopique après coloration de Gram, permet non seulement d'observer la morphologie des cellules et leurs modes de regroupement, mais aussi de différencier ces bactéries à Gram négatif des bactéries à Gram positif. La coloration elle est effectuée en plusieurs étapes :
 - La préparation du frottis mince.
 - La coloration (coloration primaire, mordantage, décoloration et coloration secondaire).
 - Observation microscopique (à immersion X 100).

2.1.2.3. La recherche de l'oxydase et de la catalase

- **La recherche de l'oxydase :** À l'aide d'une pipette Pasteur boutonné, une partie de la colonie est étalée sur un disque oxydase. La réaction est considérée comme étant positif après apparition d'une couleur violette.
- **La recherche de la catalase :**
 - Dans un tube à hémolyse propre et sèche déposer 2ml d'eau oxygénée.
 - à l'aide d'une pipette Pasteur, ajouter l'inoculum bactérien dans le tube,
 - observer immédiatement.
 - Le résultat positif confirmé par la formation des bulles d'air

2.1.2.4. Identification des caractères biochimique à l'aide de la galerie classique

L'identification, à l'aide de la galerie biochimique classique en tube, permet de déterminer le genre *Acinetobacter*. Les milieux utilisés sont détaillés dans le **tableau 6**.

Tableau 6. Identification biochimique à l'aide de la galerie classique.

Milieu de culture	Principe	Technique d'ensemencement
Mannitol mobilité	Permet l'étude de la fermentation du mannitol et la mobilité des bactéries	Ensemencement par piqure centrale à l'aide d'une pipette Pasteur. Incubation à 37°C pendant 24 h.
Citrate de Simmons	Permet l'étude de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone	Ensemencement par des stries le long de la pente à l'aide de la pipette Pasteur. Incubation à 37°C pendant 24 h.
TSI (Triple Sugar Iron Agar)	Permet l'étude de la fermentation du lactose, glucose (avec ou sans production du gaz), du saccharose et la production d'H ₂ S.	Ensemencement du culot par piqure centrale et la pente par des stries serrées. Incubation à 37°C pendant 24 h.

2.1.3. Identification de l'espèce *A. baumannii*

2.1.3.1. Identification des caractères biochimique à l'aide de la galerie API 20 NE

La galerie API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (**BioMérieux, REF 20 050**).

Cette galerie permet de confirmer l'existence du complexe *Acinetobacter baumannii* /*calcoaceticus* (Abc), au sein du genre *Acinetobacter*.

➤ 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 (**Annexe 1**) et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou logiciels d'identifications.

2.1.3.2. Les tests de croissances à 44°C

Brièvement, deux tubes à essai contenant 3 ml de bouillon nutritif (BN), sontensemencés à partir d'une culture de 24 heures d'*Acinetobacter* (S1 et S2). Les tubes sont ensuite incubés à 44 °C pendant 48 heures.

Seule l'espèce *A. baumannii* présente au sein du complexe Abc est capable de se développer à 44 °C en plus de 37 °C.

2.2. Isolement et identification de *Staphylococcus aureus*

L'isolement, des staphylocoques, est réalisé sur milieu Chapman préalablement coulé en boîte de pétri. L'ensemencement, en stries serrées, est effectué en surface. Les boîtes sont par la suite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les colonies ainsi obtenues sont examinées macroscopiquement et sous microscope (à l'état frais et après coloration de Gram).

2.2.1. La recherche de la catalase

La recherche de la catalase a été aussi effectuée. La mise en évidence de cette enzyme permet de distinguer parmi les cocci à Gram positif les staphylocoques et les streptocoques.

2.2.2. Recherche de la coagulase en tube

L'identification de *Staphylococcus aureus* est réalisée par la mise en évidence de la coagulase. Cette dernière est la seule espèce au sein du genre *Staphylococcus* possédant une coagulase.

Une suspension homogène est préparée à partir des colonies isolées et identiques sur milieu Chapman. 1 ml de cette suspension sont alors mélangés, dans un tube à hémolyse, avec 1 ml de plasma humain. Le tube est incubé à 37°C et observé après 2 heures.

La coagulation se manifeste par la prise en masse du plasma. Ce test permet de différencier entre *S. aureus* (*S. doré*) à coagulase positive, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus epidermidis* (*S. blanc*) à coagulase négative.

3. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques (ATB) d'*A.baumannii* et *S. aureus* a été réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM) 2014 (**Annexe 1**).

- **Préparation de l'inoculum** : L'inoculum est préparé à partir d'une culture jeune de 18 heures. Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine, et déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %.
- **Ensemencement** : Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension, essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum, puis frotté sur la totalité de la surface de milieu Mueller-Hinton (MH), de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui même. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- **Dépôt des disques d'antibiotiques** : Les disques d'ATB sont appliqués à l'aide d'une pince stérile. Une fois appliqué, le disque ne doit pas être déplacé.
- **Incubation** : Les boîtes sont, ensuite, incubées en position retournée pendant 18 heures à 37°C.
- **Lecture et interprétation** : Les différents diamètres des zones d'inhibition, obtenus autour des disques d'ATB, sont mesurés. L'interprétation en sensible (S) intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par les recommandations SFM (Société Française de Microbiologie) (**Annexe 2**).

Les antibiotiques testés sont définies selon la bactérie recherchée. Ainsi, les ATB testés pour chaque bactérie sont rapportés dans le **Tableau 7**.

Tableau 7. Liste des antibiotiques testés

Bactérie	N°	ATB	Abréviation	Charge (µg)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	01	Ticarcilline	TIC	75
	02	Piperacilline	PRL	100
	03	Ceftazidime	CAZ	30
	04	Imipeneme	IMP	10
	05	Amikacine	AK	30
	06	Tobramycine	TOB	10
	07	Gentamicine	HLG	120
	08	Ciprofloxacine	CIP	5
	09	Colistine	CT	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	01	Pénicilline	P	10
	02	Oxaciline	OX	1
	03	Cefazoline	CZ	30
	04	Cefoxitine	FOX	30
	05	Tobramycine	TOB	10
	06	Gentamycine	HLG	120
	07	Fosfomycine	Ff	200
	08	Erythromycine	E	15
	09	Spiramycine	SP	100
	10	Pristinamycine	PT	15
	11	Tetracycline	TE	30
	12	Lincomycine	L	15
	13	Vancomycine	VA	30

4. Étude de la formation de biofilms chez *A. baumannii* et *S. aureus*

4.1. La méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

Le Rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime est donnant des colonies noires sur milieu Rouge Congo Agar (RCA) (**Annexe 3.1**) contrairement aux colonies non productrices qui restent rouges (**Rewatkar et Wadher, 2013 ; Kara Terki, 2014**).

Le milieu est ensuiteensemencé par des stries serrées à l'aide d'une anse de platine, à partir des cultures de 24 heures sur GN, puis incubé à 37°C pendant 24 heures (**Handke et al., 2004**).

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

4.2. Formation de biofilms en microplaques

L'étude de la formation de biofilms est réalisée par coloration au cristal violet (CV). Cette technique permet une évaluation quantitative de la formation de biofilms puisque la coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé (**Musk et al., 2005**).

La formation du biofilm a été réalisée dans des microplaques à 96 puits selon le protocole d'**O'Toole et al. (2000)**.

Une suspension bactérienne est préparée dans un tube de BN à partir d'une culture de 24 heures sur GN. Cette suspension est ajustée à une densité optique (DO) à 600 nm de 0,02 à l'aide d'un spectrophotomètre (**Modèle Shimadzu**).

Un volume de 200 µl de chaque suspension bactérienne est déposé dans les puits d'une microplaque à 96 puits. Par la suite, la microplaque est incubée à 37°C pendant 24 h et sans agitation.

Après incubation, le contenu de chaque puits est enlevé délicatement. Les puits sont lavés successivement à l'eau distillée stérile (EDS).

Le biofilm formé est ensuite coloré à l'aide d'une solution aqueuse de CV à 1 % (**Annexes 3.2**) pendant 45 min à température ambiante puis solubilisé avec une solution d'éthanol/acétone à une concentration de 75:25 (**Annexe 3.3**) pendant 1 heure (**Afreenish et al., 2011**).

4.3. Cinétique de formation de biofilm

Les cinétiques de formation des biofilm d'*A. baumannii* et de *S. aureus* sur tubes en polystyrène ont été suivies à l'aide de la méthode standard de coloration au CV (**Djordjevic et al., 2002**).

Une suspension bactérienne est préparée dans le milieu BN à partir des cultures jeunes d'*A. baumannii* et de *S. aureus*. Uniquement pour la souche S1, deux milieux de culture ont été utilisés à savoir le BN et le milieu cœur cerveau (CC).

La DO de la suspension est ajustée, à l'aide de dilutions, jusqu'à l'obtention d'une valeur de DO₆₀₀ = 0,20. Puis la suspension est répartie dans des tubes en polystyrène de 5 ml à raison de 3 ml par tube. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant des périodes allant de 24 à 168 heures.

A l'issus de chaque période d'incubation, l'absorbance de la culture bactérienne résultante est mesurée à 600 nm. De même, chaque tube correspondant est soigneusement vidé de la culture bactérienne et les parois sont rincées successivement à l'EDS.

La biomasse fixée sur les parois du tube (formation de biofilm) est révélée après coloration au CV à 1 %. Après un temps de contact de 45 minutes, l'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'EDS. Les tubes sont enfin égouttés et mis à sécher à l'air libre.

Le CV fixé est finalement solubilisé à l'aide du mélange éthanol-acétone. Puis l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm (**Afreenish et al., 2011**).

Résultats et discussion

Partie III : Résultats et Discussion

1. Isolement et identification d'*Acinetobacter baumannii* et de *Staphylococcus aureus*

L'ensemble des manipulations a été réalisé avec trois isolats cliniques à savoir deux souches appartenant à l'espèce *Acinetobacter baumannii*, et une autre souche de *Staphylococcus aureus*.

L'isolement, l'identification et la caractérisation de ces souches ont été réalisés selon les méthodes conventionnelles. Ces souches (**S1**, **S2**, et **S3**) proviennent respectivement d'une variété de produits pathologiques ; hémoculture, pus et écoulement Séro-muqueux.

1.1. Isolement et identification d'*Acinetobacter baumannii*

La mise en culture de divers échantillons cliniques sur les milieux solides (Hektoen et gélose au Chocolat) a décelé une croissance bactérienne. Les repiquages successifs sur les deux milieux utilisés, effectués à partir de différentes colonies bactériennes ont révélé la présence de plusieurs espèces bactériennes parmi les quelles les *Acinetobacter*. La culture de ces derniers est aisée. Elle peut se faire sur milieux usuels ou même sur les milieux sélectifs pour les entérobactéries.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies suspectes d'*Acinetobacter* apparaissent lisses, circulaires et convexes. Elles sont bleu vertes sur Hektoen (lactose négatif) (**Annexe 4.1.**), et assez petites et beiges sur gélose au Chocolat (**Annexe 4.2.**).

L'examen microscopique direct entre lame et lamelle, à partir d'une culture jeune, a révélé la présence de coccobacilles immobiles. Par ailleurs, l'examen microscopique effectué après coloration différentielle de Gram a révélé la présence de coccobacilles à extrémités arrondies, roses (à Gram négatif) pouvant être isolés, regroupés par deux ou bien en courtes chainettes (**Annexe 4.3.**).

Ces caractéristiques morphologiques observés au microscope sont tout à fait similaires à celles des bactéries du genre *Acinetobacter* et permettent de les distinguer des autres bacilles à

Résultats et Discussion

Gram négatif (notamment les entérobactéries). Donc, elles permettent l'orientation du diagnostic vers le genre *Acinetobacter*.

Les tests enzymatiques réalisés sur les colonies d'*Acinetobacter* ont révélé une réaction négative de l'oxydase (**Annexe 4.4.**) et une présence de la catalase (**Annexe 4.5.**). *Acinetobacter* est aérobie stricte (métabolisme respiratoire) à oxydase négative et à catalase positive.

D'autre part, les résultats de la galerie biochimique classique en tube (**Tableau 8**) après 24 heures d'incubation ont montré que ces bactéries font partie du genre *Acinetobacter*.

Tableau 8. Résultats de l'identification biochimique à l'aide la galerie classique.

Milieu de culture	Caractères biochimiques				
Mannitol mobilité (Annexe 4.6)	Mannitol		Mobilité		
	-		-		
Citrate de Simmons (Annexe 4.7)	Citrate				
	+				
TSI (Triple Sugar Iron Agar) (Annexe 4.8)	Glucose	Lactose	Saccharose	Gaz	H ₂ S
	-	-	-	-	-

En revanche, les tests biochimiques effectués à l'aide de la galerie API 20 NE (Biomérieux, France) ont permis d'identifier la présence du complexe « *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* » (**Acb**) (**Tableau 9 et Annexe 4.9.**).

Tableau 9. Résultats de l'identification biochimique à l'aide de la galerie API 20 NE.

NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA
-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CT	PAC
+	+	-	+	-/+	+	+	+	+	+

((-) = teste négative, (+) = teste positive)

Dans le but d'identifier l'espèce *A. baumannii* faisant partie du complexe (**Acb**), un ensemencement de BN, à partir des cultures de deux souches **S1** et **S2** sur GN, ont été réalisés et incubés à une température de 44 °C.

Seule *A. baumannii*, présente au sein de ce complexe, est susceptible de donner des croissances optimales aux températures de 37°C et 44 °C. En effet, cette dernière, permet une sélection et une confirmation de l'espèce.

Après 24 heures d'incubation, les observations visuelles ont révélé la présence de troubles bactériens aux niveaux de cultures (**Annexe 4.10.**). Ainsi, la capacité de souches **S1** et **S2** à croître à cette température, permet de les distinguer, en tant que des espèces d'*A.baumannii*, d'autres espèces du genre *Acinetobacter*.

1.2. Isolement et identification de *Staphylococcus aureus*

La mise en culture sur milieu Chapman a permis d'isoler les bactéries du genre *Staphylococcus*. L'identification a été effectuée par les méthodes conventionnelles (examen à l'état frais, coloration de Gram, test de la catalase et la mise en évidence de la coagulase en tube).

Sur Chapman, les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent pigmentées et entourées d'une aréole jaune due à la fermentation du mannitol. Ces colonies sont arrondies à bords réguliers de 1 à 2 mm de diamètre après 24 heures d'incubation à 37°C (**Annexe 5.1.**).

L'examen microscopique à l'état frais a décelé la présence des cellules sphériques immobiles (**Annexe 5.2.**). D'autre coté, l'examen microscopique après coloration différentielle de Gram a montré la présence des cocci sphériques isolés, regroupés en diplocoques ou en amas ayant la forme de *grappes* de raisin, colorés en violet (à Gram positif). Les amas sont caractéristiques du genre *Staphylococcus* (**Annexe 5.3.**).

La souche **S3** isolée, testée pour la production d'une catalase, a décomposé l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage. Ce qui se traduit par une effervescence (à catalase positive). Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques (**Annexe 5.4.**).

La mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. En effet, seule l'espèce *S. aureus* peut posséder cette enzyme qui joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de la bactérie. Ainsi, la recherche de la coagulase (utilisation du plasma humain) a été également effectuée à fin de compléter l'identification de la souche **S3**.

Après 2 heures d'incubation à 37°C, l'observation visuelle du tube en position inclinée à 90°C a révélé l'apparition d'un caillot (la prise en masse du mélange au point où le tube peut être retourné) due à la présence de l'enzyme coagulase ou staphylocoagulase, indiquant une réaction positive (coagulase positive) (**Annexe 5.5.**).

En effet, l'isolat **S3** appartient à l'espèce *Staphylococcus aureus* vue qu'elle répond aux caractéristiques macroscopiques et microscopiques du genre *Staphylococcus* et possède une catalase et une Staphylocoagulase.

2. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme a été effectué selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique sur gélose et selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (SFM) (2014) (**Annexe 1.**).

En effet, les profils de résistances déterminés montrent que les deux souches d'*A.baumannii* (**S1** et **S2**) présentent un comportement similaire vis-à-vis les ATB testés. Effectivement, elles apparaissent sensibles à l'ensemble des ATB testés (**Annexe 6.1.**).

Le **tableau 10.** Ci-dessous détaille le profil de sensibilités des souches **S1** et **S2**.

Tableau 10. Le profil de sensibilité aux ATB des souches **S1** et **S2** (**S:** sensible).

ATB	TIC	PRL	CAZ	IMP	AK	TOB	HLG	CIP	CT
S1 et S2	S	S	S	S	S	S	S	S	S

En outre, la souche de *S. aureus* (**S3**) apparaît également sensible aux ATB testés à l'exception de la Pénicilline, Oxacilline, Cefazoline et Cefoxitine ou elle montre une résistance face à ces quatre ATB (**Annexes 6.2.**).

Le **tableau 11** montre les profils de résistances de la souche **S3**.

Tableau 11. Le profil de sensibilité aux ATB de la souche **S3** (**R**: Résistant / **S**: Sensible).

ATB	P	OX	CZ	FOX	TOB	HLG	FF	E	SP	PT	TE	L	VA
S3	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S

3. Étude de la formation de biofilms chez *A. baumannii* et *S. aureus*

Actuellement, les bactéries ont réussi à développer divers mécanismes pour survivre dans l'environnement hospitalier ce qui engendre des infections sévères et difficiles à traiter. Parmi ces stratégies, la production de slime et le développement de biofilms à fin de coloniser les surfaces biotiques et abiotiques. Effectivement, ces biofilms, les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et les systèmes immunitaires de l'hôte (**Saitou, 2009 ; Hrv et al., 2016**).

Il existe plusieurs techniques permettant la détection et la quantification des biofilms parmi les quelles la méthode de RCA ainsi que la méthode standard de coloration au CV des biomasses fixées aux puits des microplaques ou les parois des tubes (**Freeman et al., 1989 ; Stepanovic et al., 2007**).

Dans le présent travail, deux souches cliniques d'*A.baumannii* (**S1 et S2**) (coccobacille à Gram négatif) et une souche de *S. aureus* (**S3**) (cocci à Gram positif), préalablement isolées à partir d'échantillons cliniques multiples, ont été caractérisées. Ces deux bactéries ont été choisies à fin d'étudier et de comparer leurs capacités à produire des biofilms dans le but de comprendre leurs persistances dans l'environnement hospitalier. Cette étude est nécessaire pour développer des stratégies de contrôle des biofilms indésirables.

L'étude phénotypique de la production de biofilms, par ces souches, a été effectuée par deux méthodes qualitatives à savoir la méthode utilisant la gélose Rouge Congo et la méthode de formation sur microplaques à 96 puits (**Freeman et al., 1989 ; Mathur et al., 2006**). Par ailleurs, la méthode standard de coloration au CV, des biofilms formés en tube, a permis une évaluation quantitative de la production de biofilm ainsi que le suivi de la cinétique de la formation de biofilms par ces bactéries (**Djordjevic et al., 2002**).

3.1. La détection de la formation de biofilms par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

La production de slime, par certaines bactéries, est considérée comme l'un des facteurs les plus importants qui favorisent l'adhérence bactérienne aux surfaces médicales, ce qui leur confère une protection vis à vis la phagocytose et l'action antimicrobienne des ATB. Ainsi, le slime permet aux bactéries de former des biofilms. En effet, la détection de production de slime peut être utilisée comme un bon indicateur pour déterminer le potentiel pathogénique des bactéries (Hrv *et al.*, 2016).

La caractérisation phénotypique de la production de biofilm par production de slime a été réalisée par culture des isolats sur un milieu solide additionné du colorant le Rouge Congo.

La méthode RCA permet l'analyse directe et visuelle des colonies et l'identification des souches productrices de slime (qui donnent des colonies noires sur la gélose rouge) et des souches non productrices (qui donnent des colonies de couleur rouge).

De ce fait, cette méthode ne permet pas un dosage quantitatif de biofilm puisqu'elle est basée seulement sur un changement de couleur de rouge Congo qui va interagir directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime (Freeman *et al.*, 1989).

En définitive, l'étude de Hrv *et al.* (2016), et après comparaison de plusieurs méthodes phénotypiques, ont montré que la méthode RCA apparait comme une méthode efficace, simple, économique, sensible et spécifique qui peut être appliquée par les laboratoires de microbiologie clinique pour le screening de souches productrices de slime.

Les trois souches **S1**, **S2** et **S3** ont été testées pour mettre en évidence leurs capacités à former des biofilms par la méthode RCA dont les résultats sont montrés dans le **tableau 12**.

Tableau 12. Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

Souches	Couleur de colonies	Phénotype (Slime)
S 1	Rouges	Négative (-)
S 2	Rouges	Négative (-)
S 3	Noires foncé	Positive (+)

La recherche de la production de slime sur RCA a révélé, qu'après 24 heures d'incubation, les 2 souches d'*A.baumannii* (**S1** et **S2**) ont donné naissance à des colonies rouges et sont donc considérées comme non productrices de slime. Seule la souche de *S. aureus* (**S1**), exprimant des colonies noires, est productrice de slime (**Annexe 7.1.**) et (**Annexe 7.2.**).

Par conséquent, selon cette méthode, la bactérie à Gram négatif *A. baumannii* est incapable de produire des biofilms en comparaison avec la bactérie à Gram positif *S. aureus* qui a produit des biofilms importants.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les recherches de **Freeman et al. (1989)** et **Babapour et al. (2016)** qui indiquent que seulement 10 % de souches d'*A.baumannii* sont productrices de biofilms selon cette méthode. De même, l'étude de **Zmantar et al. (2010)** traitant la caractérisation phénotypique de la production de biofilm de *S. aureus* a révélé que 56,5 % de souches sont productrices de slime. Alors que l'étude de **Bose et al. (2009)** a rapporté que exclusivement 32,96 % de *S. aureus* sont productrices de slime.

Ces résultats, à l'issue de la méthode RCA, concordent aussi avec ceux obtenus par **Kara-Terki (2014)**, pour confirmer une fois de plus que la capacité de formation de biofilms par les isolats cliniques de Staphylocoques augmente dans un milieu de culture contenant des sucres (saccharose).

S. aureus est l'espèce la plus pathogène au sein du genre *Staphylococcus*. Il fait partie des bactéries les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine. En plus, *S. aureus* possède la capacité d'adhérer aux cathéters et autres dispositifs médicaux et de former des biofilms sur surfaces polymériques (**Fowler et al., 2001**). La survie de *S. aureus* dans l'environnement hospitalier est au moins en partie à cause de sa capacité de produire des biofilms. Cette capacité dépend de la production de Polysaccharide Intercellulaire Adhésine (PIA) (**Cramton et al., 1999**).

Le PIA est sans doute un élément important dans la formation du biofilm mais il n'est cependant pas indispensable. *S. aureus* est capable de produire du biofilm selon des voies indépendantes du PIA. En l'absence de ce dernier, l'adhésion cellulaire se fait essentiellement par le biais de protéines dont la nature varie d'une souche à l'autre.

3.2. Formation de biofilms en microplaques

Afin de quantifier les capacités de production de biofilms par les souches étudiées, l'essai de coloration au CV est souvent préféré en raison de sa simplicité et sa fiabilité. Cette méthode permet une culture et une quantification *in vitro* de biofilms bactériens.

Le CV est un colorant qui se fixe sur les polysaccharides du peptidoglycane et colore sans spécifier toutes les biomasses, toutes sortes de cellules vivantes ou mortes, aussi bien que la matrice (composée de substances polymériques extracellulaires) du biofilm bactérien. Ce colorant fait de ce test utile pour estimer la réponse global en mode biofilm d'un isolat.

À travers cette méthode, une souche peut être classée comme ; non formatrice, faiblement formatrice, moyennement formatrice ou fortement formatrice de biofilm (**Metzler, 2016**).

La bactérie va initialement adhérer sur une surface de polystyrène (plaque à 96 puits), se multiplier et produire un biofilm bactérien. Le CV colore les structures polysaccharidiques des bactéries incluses dans le biofilm et des bactéries sous forme planctonique. Un lavage à l'eau distillée permet d'éliminer l'excès de colorant ainsi que les bactéries planctoniques. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de biofilm produite. Une mesure de la DO permet d'avoir une approche quantitative sur la capacité d'une bactérie à produire un biofilm (**Vieu, 2014**).

Les résultats obtenus, suivant une approche qualitative, ont permis de mettre en évidence la capacité de toutes les souches isolées à former des biofilms en microplaques à 96 puits après culture en BN. Toutefois, et sur la base des intensités de coloration de CV, la souche **S2** est caractérisée par une forte production de biofilm suivie par une production moyenne par la souche **S1** et enfin une production faible par la souche **S3** (**Annexe7.4**). Par conséquent, selon cette technique, *A. baumannii*, jugée précédemment négative par le test RCA, forme plus de biofilms en comparaison avec *S. aureus*.

Ces observations sont aussi en accord avec ceux rapportés par **Dheepa et al. (2011)** et **Babapour et al. (2016)** ou la majorité des souches d'*A.baumannii* sont productrices de biofilms évidemment avec des niveaux différents. Par ailleurs, les résultats mentionnés par l'étude de **Badave et al. (2015)** indiquent que 62,5 % d'isolats d'*A.baumannii* sont

productrices de biofilms. D'autre part, **Abdi-Ali et al. (2014)** ont conclu que les majorités des souches d'*A.baumannii* peuvent former des biofilms en microplaques ou sur tubes.

De même, selon l'étude de **Rewatkar et al. (2013)**, les isolats cliniques à Gram négatif et à Gram positif sont les deux producteurs de biofilms. Les deux bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *S. aureus* viennent en tête de liste.

Les isolats cliniques d'*A.baumannii* ont la capacité de survivre sur surfaces abiotiques sous conditions défavorables telles que la dessiccation. La capacité de former des biofilms par cette bactérie, sur surfaces abiotiques, est considérée comme une propre caractéristique des souches cliniques d'*A. baumannii* (**Badave et al., 2015**).

Les isolats multi résistants d'*A. baumannii* peuvent former des biofilms, ou inversement, cette bactérie peut acquérir des multiples résistances aux ATB à partir des communautés bactériennes au sein des biofilms (**Abdi-Ali et al., 2014**).

Globalement et d'après les résultats phénotypiques obtenus, la technique en microplaque a permis de détecter la formation de biofilm chez les trois souches par contre celle de RCA chez une souche seulement. Ces observations sont similaires à celles rapportés par **Mathur et al. (2006)**, qui ont démontré que le test en microplaque a été très satisfaisant en termes de détection de phénotype biofilm-positif et à celles d'**Oli et al. (2012)**, qui ont montré que cette technique est la plus fiable pour la détection de la formation de biofilm chez des souches cliniques.

D'ailleurs, les travaux de **Taj et al. (2012)** ont décelé que le dépistage par la technique RCA n'est pas recommandé pour l'étude de la formation de biofilm et l'étude de **Poliana de castro melo et al. (2013)** a montré que la méthode RCA devrait être utilisée comme un test complémentaire à la méthode de la microplaque.

3.3. Formation de biofilms en tubes

3.3.1. Effet de milieu de culture sur la formation de biofilm d'*A. baumannii*

Selon la **figure 7**, une considérable différence au niveau de la formation de biofilm, après 24 heures d'incubation en tubes de polystyrène, a été remarquée en fonction de milieu de culture utilisé. En effet, la formation la plus importante, chez *A. baumannii* (**S1**), a été enregistrée dans le milieu BN (DO 570 = 0,298) en comparaison avec le milieu CC (DO 570 =0,1).

Le BN constitue un milieu d'utilisation générale pour un grand nombre de microorganismes ne présentant pas d'exigences particulières cependant le CC, un milieu riche, permet la croissance d'une grande variété de microorganismes fastidieux ou non fastidieux. La **figure 8** confirme ces informations vue que la croissance la plus importante de la **S1** a été enregistrée en bouillon CC (DO 600 = 0,466) en comparaison avec le BN (DO 600 = 0,373).

Cette différence au niveau de la production de biofilm, entre les deux milieux, pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité en termes de besoins en éléments nutritifs caractérisant les deux modes sessiles et planctoniques.

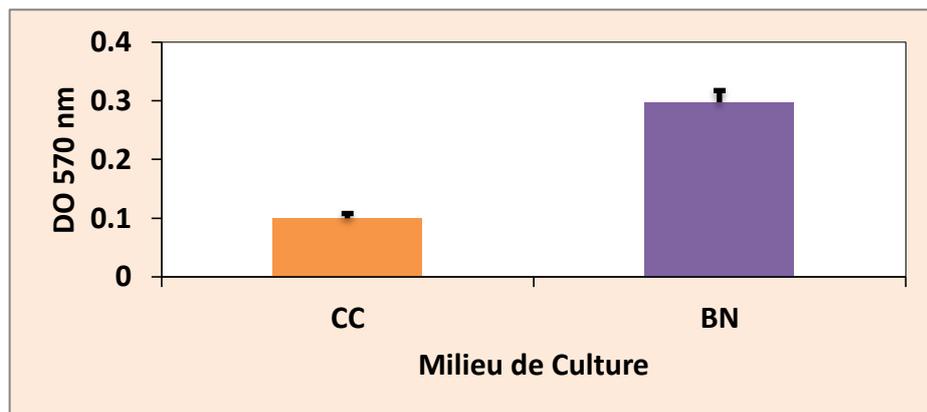


Figure 7. Formation de biofilms d'*A.baumannii* (S1) en bouillons CC et BN.

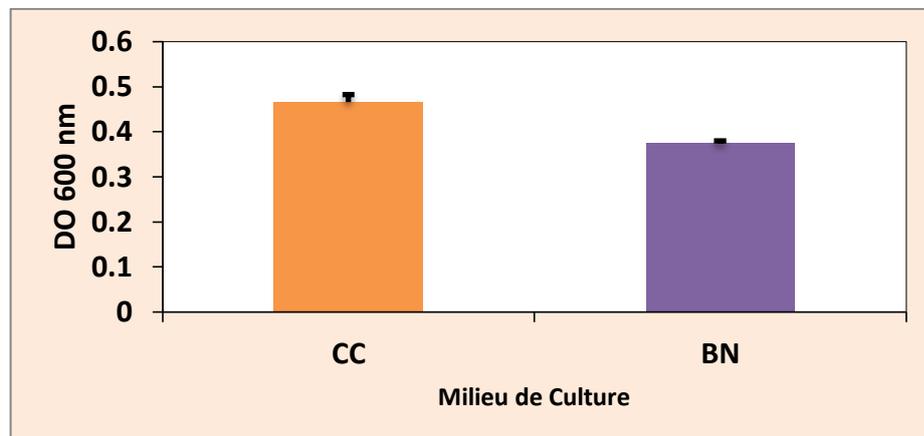


Figure 8. Croissance d'*A.baumannii* (S1) en bouillons CC et BN.

A la lumière de ces résultats, le milieu BN qui a donnée des productions importantes a été choisi pour le suivie de la cinétique de formation de biofilms chez les trois souches étudiées.

3.3.2. Formation de biofilms par *A. baumannii* et *S. aureus*

Après 24 heures d'incubation et en fonction des DO 570 enregistrées, les trois souches ont été localisées dans l'une des catégories suivantes:

- 1) → DO 570 : 0 absence de production.
- 2) → DO 570 : 0 – 0,05 faiblement producteur.
- 3) → DO 570 : 0,05 – 0,15 producteur intermédiaire.
- 4) → DO 570 : > 0,15 fortement producteur (**Vieu, 2014**).

Par conséquent, suivant les résultats obtenus à l'issus de la technique de coloration au CV, les biofilms formés par les deux souches d'*A.baumannii* appartiennent tous les deux à la catégorie 4 (DO 570 = 0,29), donc elles sont fortement productrices tandis que le biofilm formé par *S. aureus* appartient à la catégorie 3 (DO 570 = 0,11), donc elle est une productrice intermédiaire (**Figure 9**).

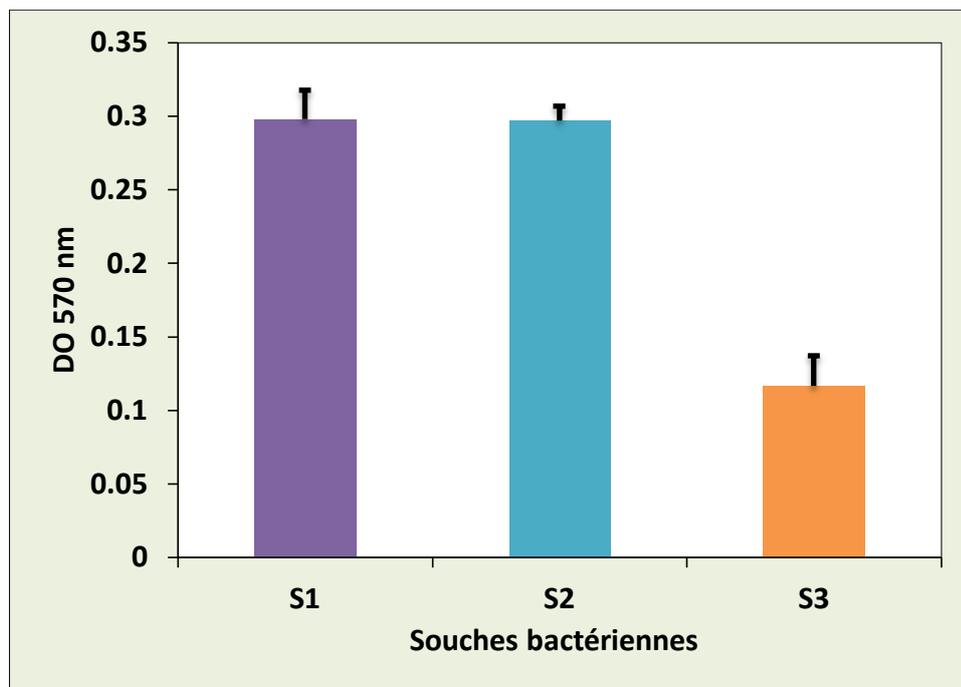


Figure 9. Formation de biofilms par les souches **S1**, **S2** et **S3** après 24 heures d'incubation en BN.

En outre, l'analyse des résultats obtenus, montre que les productions des biofilms en microplaques sont proches de ceux obtenus en tubes. Par contre, les résultats obtenus par la

technique de coloration au CV, soit en microplaques ou en tubes, sont largement différents de ceux obtenus par la méthode RCA.

La diversité de formation entre les deux bactéries, à Gram négatif et positif, pourrait être expliquée d'un part par la composition du milieu qui a influencé énormément cette formation chez *S. aureus*. En plus, **Johannes et al. (2002)** ont également montré dans leurs étude que lors de l'utilisation d'un milieu de base, 4 souches seulement des 128 *S. aureus* isolées formaient un biofilm.

D'autre part, ces résultats sont semblables à ceux rapportés par plusieurs travaux traitant les biofilms et qui ont déjà démontré la formation importante de biofilms chez les isolats cliniques d'*A. baumannii* comparativement à d'autres espèces bactériennes (**Dahdouh et al., 2015**). Non seulement, les travaux de **Despinal et al. (2012)**, ont montré l'existence d'une relation directe entre la formation du biofilm et la survie d'*A. baumannii*. Ce qui confirme que les bactéries formatrices de biofilms survivent plus longtemps que leurs homologues non formateurs sur des surfaces sèches.

3.4. Cinétique de formation des biofilms d'*A. baumannii* et de *S. aureus*

Les cinétiques de la formation de biofilms, par *A. baumannii* et *S. aureus* sur tubes en polystyrène, ont été suivies durant une semaine suivant la méthode de coloration au CV. Les croissances bactériennes à l'état planctonique ont également été suivies par mesure d'absorbance à 600 nm à fin de confirmer la croissance non défectueuse des bactéries.

Des suspensions bactériennes ont été préparées dans le milieu BN à partir des cultures jeunes d'*A. baumannii* et de *S. aureus*, réparties par la suite dans des tubes en polystyrène et incubées à 37°C. Uniquement pour la souche **S1**, deux milieux de culture ont été utilisés à savoir le bouillon CC et le BN.

3.4.1. Les cinétiques de formation de biofilms de la souche S1

Deux cinétiques de formation de biofilm ont été déterminées pour la souche **S1**. Une après culture en bouillon CC (**Annexe 7.5.1**) et l'autre après croissance en BN (**Annexe 7.5.2**).

En milieu CC, cinq phases distinctes ont été mises en évidence au cours de l'adhésion de la bactérie (conditionnant de la surface, adhésion réversible et irréversible formation des micro-colonies, maturation, dispersion) (**Figures 10 et 11**).

La première phase s'étend de 24 à 48 h ou une légère diminution de la formation de biofilm a été remarquée (DO 570 = 0,078). Cette dernière représente la plus faible formation de biofilm pour cette souche dans ce milieu. Cette diminution a été également détectée chez les cellules non fixées (planctoniques). Cela peut être expliquée par les diverses interactions existantes entre la bactérie et support ainsi qu'une adaptation permettant à la bactérie de s'installer, de se multiplier pour rentrer en mode biofilm.

La deuxième phase s'étend de 48 à 96 h. Une augmentation significative de la formation de biofilm a été observée après les 48 heures qui suivent l'incubation pour atteindre une DO 570 maximale de 0,616. Elle correspond à la croissance des cellules formant le biofilm suivie d'une maturation de la structure de biofilm.

La troisième phase s'étend de 96 à 120 h. Une chute considérable de la production de biofilm a été détectée après les 96 h d'incubation non seulement la valeur de DO 570 enregistrée (0,151) est le double de la valeur remarquée lors de la première diminution. Après maturation et selon les conditions résultantes après formation de biofilms, certaines cellules peuvent passer à l'état planctonique après détachement.

La quatrième phase s'étend de 120 à 144 h. Cette période est caractérisée Une nouvelle formation de biofilm a été remarquée pour atteindre une DO 570 de 0,294. Néanmoins, la formation dans ce cas est moins importante par rapport à la formation précédente.

La cinquième phase s'étend de 144 à 196 h. Au cours de cette phase, un nouveau détachement de cellules a été survenu.

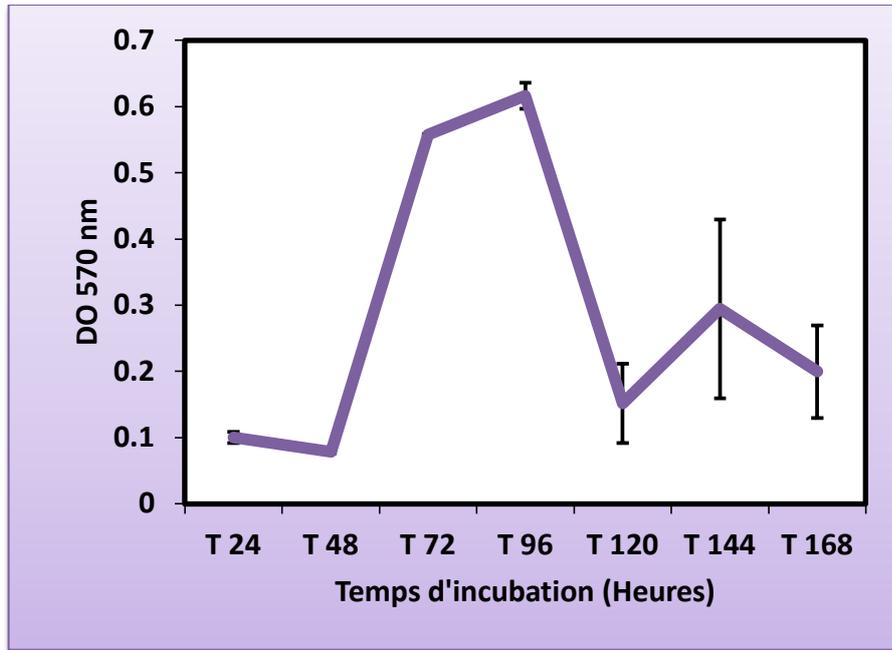


Figure 10. Cinétique de formation de biofilm d'*A.baumannii* (S1) en bouillon CC.

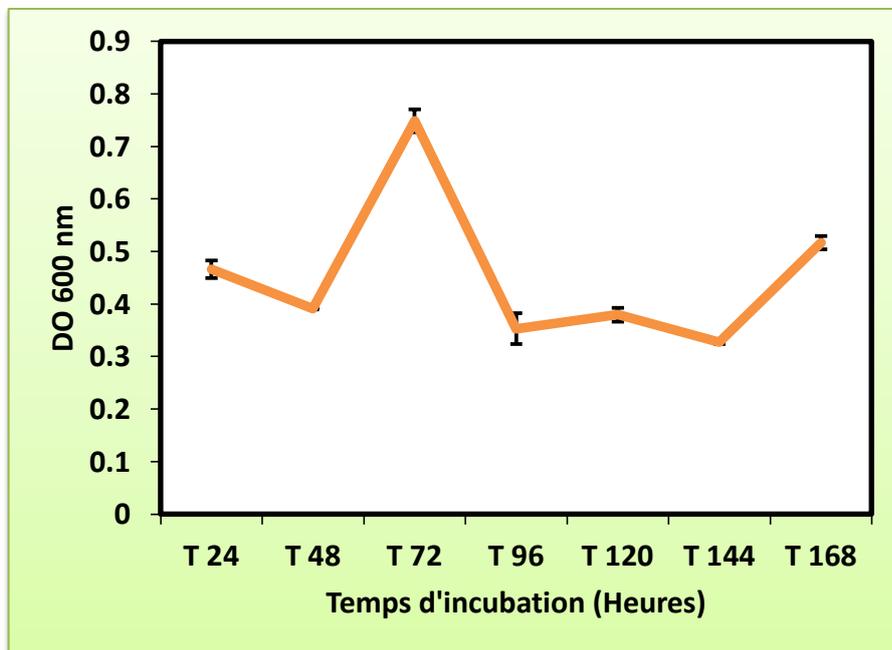


Figure 11. Croissance d'*A.baumannii* (S1) en bouillon CC.

Le profil cinétique dans le cas de BN est visiblement différent de celui obtenu avec le CC (Figures 12 et 13).

Après 24 heures d'incubation, la fixation a été importante en BN (DO 570 = 0,298) par rapport au CC (DO 570 = 0,1). Une valeur maximale de la DO a été atteinte après seulement

Résultats et Discussion

72 h d'incubation (DO 570 = 0,351), correspondant à la multiplication de cellules et la sécrétion des substances polymériques extracellulaires. Cette différence d'adhésion peut être expliquée par la nature du milieu et son influence sur le mode biofilm. Au-delà, on assiste à une diminution de la densité du biofilm formé.

Après 96 heures d'incubation, une reprise de la formation a été observée mais elle est de moindre importance.

Après 120 h, on assiste à un décrochage des cellules dans le milieu qui correspond à la valeur de DO 570 la plus faible détectée pour cette souche dans ce milieu (0,087).

Une petite reprise de production de biomasses fixées a été également décelée après 168 h d'incubation.

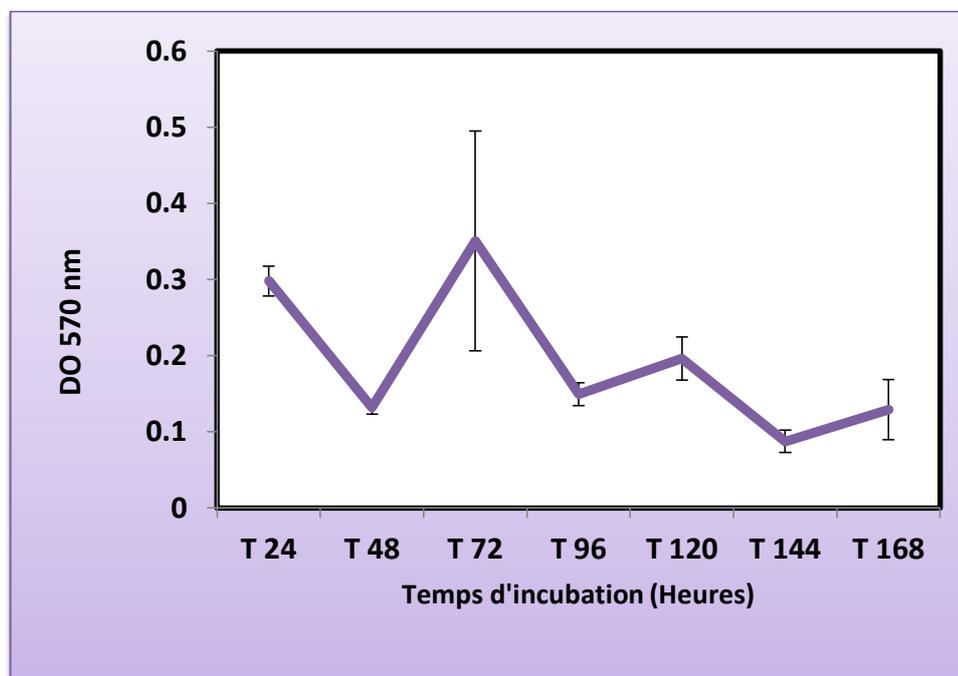


Figure 12. Cinétique de formation de biofilm d'*A.baumannii* (S1) en BN.

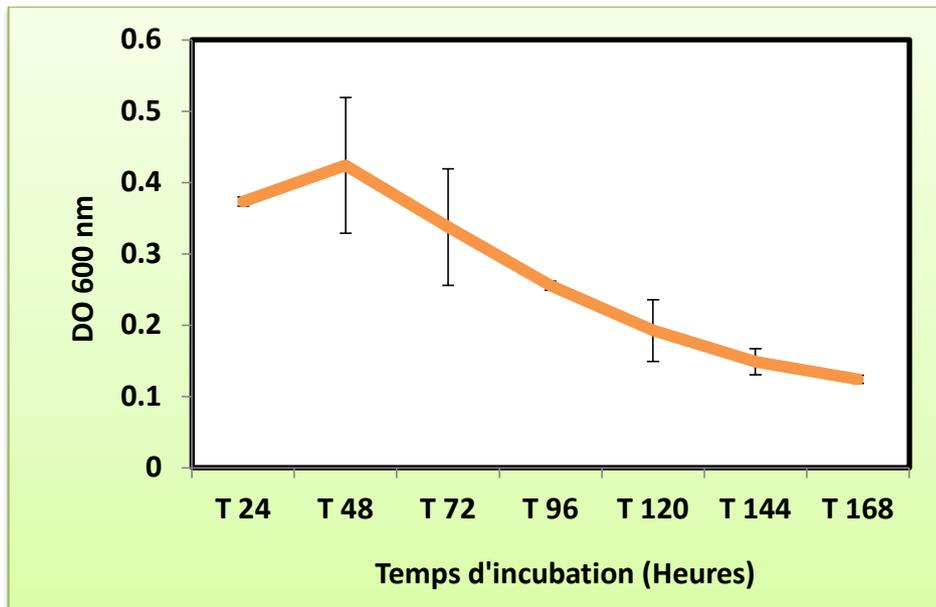


Figure 13. Croissance d'*A.baumannii* (S1) en BN.

3.4.2. La cinétique de formation de biofilm de la souche S2

Le profil cinétique de la souche **S2**, en BN, est évidemment proche de celui obtenu avec la souche **S1** vu que les courbes ont la même allure général mais les valeurs dans ce cas sont plus importantes (**Figures 14 et 15**). Eventuellement, l'aspect des tubes, après formation de biofilm et coloration au CV, diffère d'un jour à l'autre (**Annexe 7.5.3**).

Pareillement, les résultats obtenus pour la souche **S2**, durant une semaine, semblent mettre en évidence un comportement transitoire de la souche entre l'état fixé et l'état libre. La valeur maximale est atteinte après 72 heures d'incubation (DO 570 = 0,543) tandis que la plus faible après 144 h (DO 570 = 0,146).

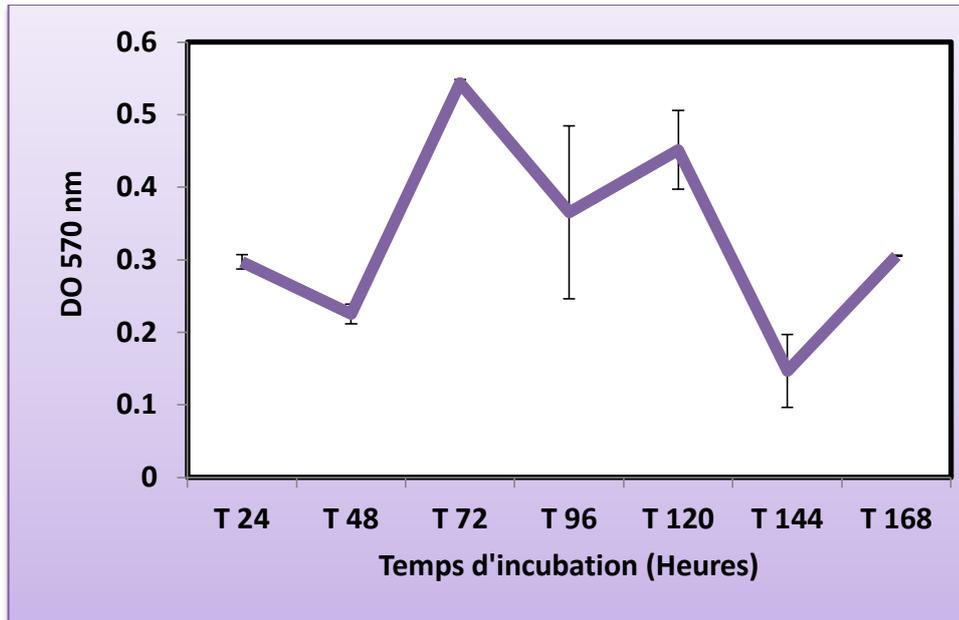


Figure 14. Cinétique de formation de biofilm d'*A.baumannii* (S2) en BN.

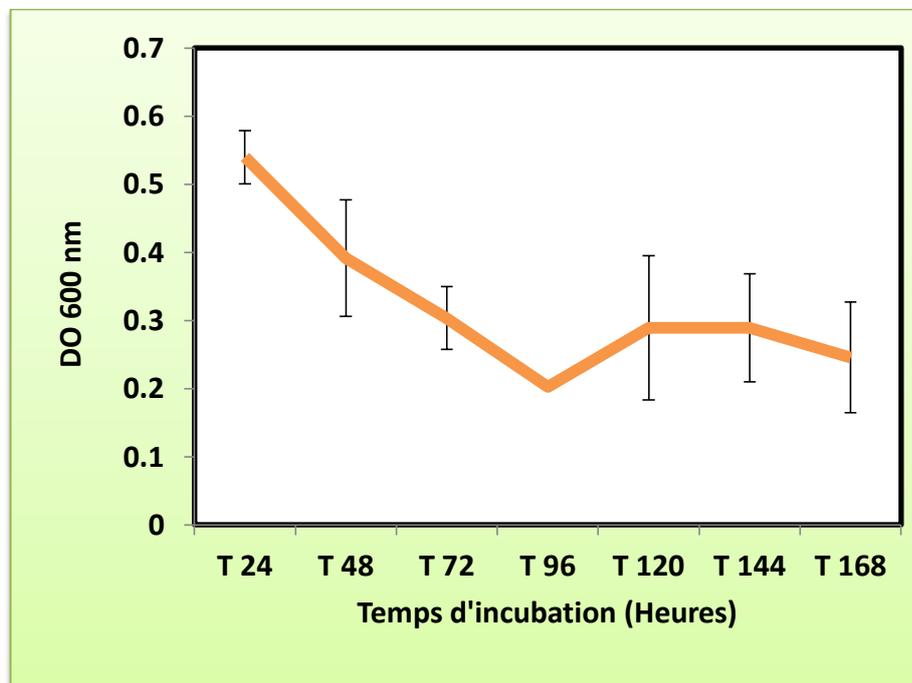


Figure 15. Croissance d'*A.baumannii* (S2) en BN.

3.4.3. La cinétique de formation de biofilm de la souche S3

L'adhésion de la souche de *S. aureus* (S3) pendant une semaine a été caractérisée par quatre périodes différentes (Figures 16 et 17). L'observation visuelle des tubes a montré les différences des intensités de colorations CV après chaque jour d'incubation (Annexe 7.5.4.).

Résultats et Discussion

La première période s'étale de 24 à 48 h. Elle est caractérisée par une réduction de la formation de biofilm qui a passé d'une DO 570 de 0,116 jusqu'à une DO570 de 0,078.

La deuxième période s'étale de 48 à 72 h. Une augmentation de l'adhésion a été observée après 48 h d'incubation pour toucher le maximum avec une valeur de DO 570 de 0,197. Ce qui correspond certainement à la maturation de biofilm après multiplication de cellules et la formation de la matrice extracellulaire.

La troisième période s'étale de 72 h à 144 h. La fixation a diminué progressivement jusqu'à une valeur de DO 570 de 0,054. Cette dernière représente la plus faible valeur de formation de biofilm enregistrée pour cette souche.

La quatrième période s'étale de 144 à 168 h. Une faible reprise de la formation de biofilm a été décelée après 168 h d'incubation.

En définitive, ces résultats ont également montré un comportement transitoire de cette bactérie entre l'état sessile et l'état planctonique.

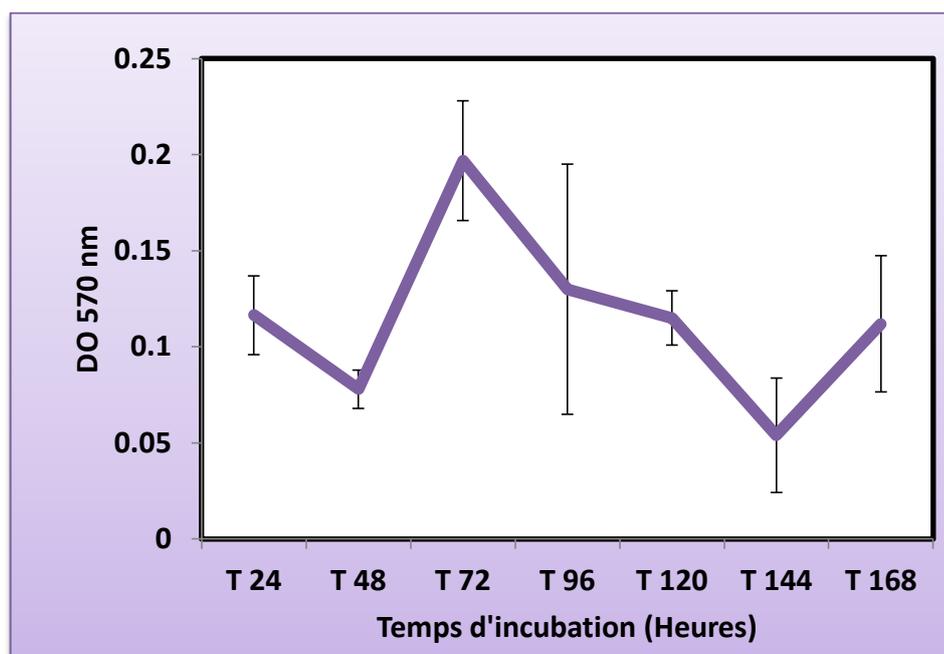


Figure 16. Cinétique de formation de biofilm de *S. aureus* (S3) en BN.

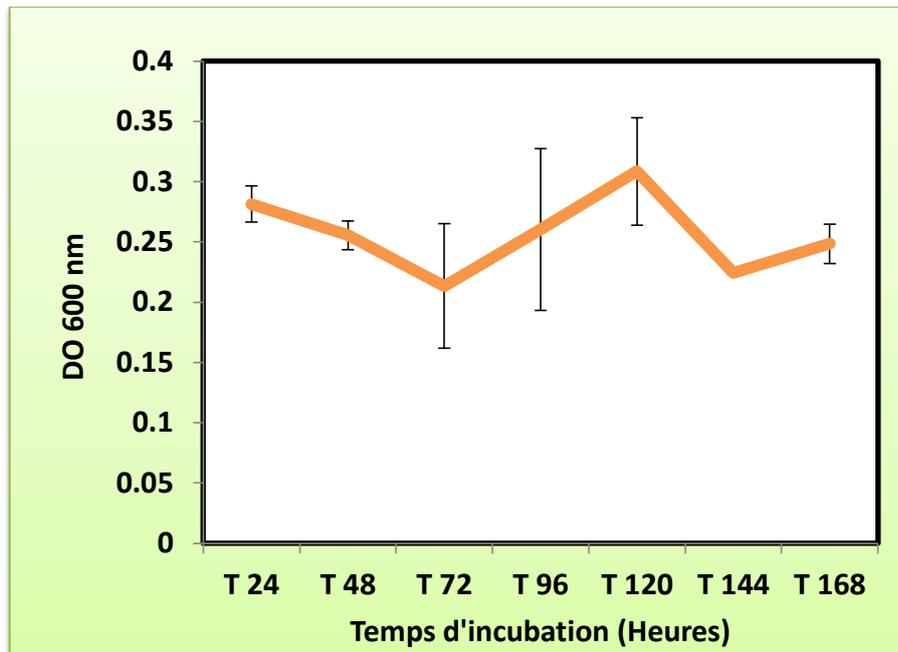


Figure 17. Croissance de *S. aureus* (S3) en BN.

Globalement, la transition entre les deux modes a caractérisé presque toutes les souches étudiées avec certaines différences. Ce phénomène pourrait être expliqué par la régulation interne de la formation de biofilm à travers les diverses étapes de formation ainsi que l'impact de différentes conditions environnementales.

Les travaux de **Djeribi et al. (2012)** ont aussi montré qu'une souche urinaire d'*A.baumannii* a exprimé un comportement transitoire entre l'état sessile et l'état planctonique. Ce comportement indique que les espèces bactériennes sont capables de passer d'un état à l'autre en fonction des conditions de l'environnement.

Conclusion

Conclusion

La plupart des bactéries médicales favorisent un mode de vie où la population bactérienne se trouve fixée sur un support (état sessile) plutôt que libre dans le milieu environnemental (état planctonique).

L'attachement sur une surface est une « stratégie de survie » qui permet à la bactérie de s'installer et de coloniser les surfaces biotiques et abiotiques. Après attachement sur un support, les bactéries vont mettre en place et développer un biofilm. Ce dernier est responsable de nombreuses infections récalcitrantes et extrêmement difficile à l'éradiquer.

Au terme de cette étude, portant sur l'étude phénotypique qualitative et quantitative de la formation de biofilms ainsi que le suivi de la cinétique de cette formation par des souches cliniques, préalablement isolées à partir de différents types de prélèvements cliniques, les deux souches d'*A. baumannii* (coccobacille à Gram négatif) sont incapables de produire le slime favorisant la formation de biofilms par rapport à la souche de *S. aureus* (cocci à Gram positif) qui a exprimé une forte production de slime selon la technique RCA.

Par ailleurs, la méthode standard de coloration au CV, appliquée en microplaque à 96 puits, a permis de mettre en évidence la capacité de toutes les souches isolées à former des biofilms après 24 heures d'incubation mais avec différentes intensités de colorations de CV. En effet, la souche **S2** était fortement productrice, la souche **S1** était une productrice moyenne alors que la souche **S3** était faiblement formatrice de biofilm.

L'évaluation quantitative de la production de biofilms par la méthode CV, en tubes et après 24 heures d'incubation, a révélé que les proportions plus importantes des cellules fixées de la souche **S1** ont été enregistrées dans le BN en comparaison avec le bouillon CC. En plus, et suivant les quatre catégories de référence, les deux souches d'*A. baumannii* ont été considérées comme fortement productrices de biomasses fixées en BN tandis que la souche de *S. aureus* était une productrice intermédiaire.

D'une manière générale, les profils cinétiques déterminés, pour les trois souches, après suivi de la croissance en mode biofilm en appliquant la méthode CV durant sept jours ont permis de mettre en évidence un phénomène d'alternance entre le mode planctonique et le mode biofilm toutefois des différences ont été remarquées entre les profils déterminés.

La lutte contre les biofilms bactériens pose énormément de problèmes en terme de santé publique, car l'antibiothérapie active habituellement sur les bactéries à l'état planctonique se révèle bien souvent moins efficace sur les structures organisées en biofilms.

L'amélioration de nos connaissances sur les mécanismes impliquées dans la formation de biofilms ainsi que l'évaluation de la dynamique de cette formation permettent de trouver de nouveaux moyens à fin de prévenir leur formation ou de traiter les infections associées à ces biofilms.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- **Abdi-Ali Ahya, Saghar Hendiani, Parisa Mohammadi, Sara Gharavi. (2014).** Assessment of Biofilm Formation and Resistance to Imipenem and Ciprofloxacin among Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Tehran. *Jundishapur J Microbiol. January* ; 7(1):8606.
- **Afreenish H., Javaid U., Kaleem F., Omair M., Muhammad Iqba A.K. (2011).** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis* ; 15(4):305-311.
- **Ahmed Al-Anazi K., Al-Jasser A.M. (2014).** Infections caused by *Acinetobacter baumannii* in recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Frontiers in Oncology Hematology Oncology* ; 4(184):1-10.
- **Arciola C.R., Campoccia D., Baldassarri L., Donati M.E., Pirini V., Gamberini S., Montanaro L. (2005).** Détection de la formation de biofilm chez *Staphylococcus epidermidis* à partir d'infections implantaires. Comparaison d'une méthode de PCR qui reconnaît la présence de gènes *Ica* avec deux méthodes phénotypiques classiques. *J Biomed Mat Res* ; 76:425-430.

B

- **Babapour E., Haddadi A., Mirnejad R., Angaji S.A., Amirmozafari N. (2016).** Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* ; 6(6):528-533.
- **Badave Gitanjali Kailas ,Kulkarni Dhananjay. (2015).** Biofilm Producing Multidrug Resistant *Acinetobacter Baumannii*: An Emerging Challenge. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* ; 9(1):08-10.
- **Bellifa S. (20014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de klebsiella pneumoniae isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat.Université de la rochelle de France.
- **Bellifa S., Hassaine H., M'hamedi I., Kara Terki I., Lachachi M. (2012).** Evaluation de la formation du biofilm de Klebsiella pneumoniae isolée des dispositifs médicaux au niveau du CHU Tlemcen.5ème journée national d'hygiène hospitalière et de lutte contre les infections.
- **Bellifa S., Hassaine H., M'hamedi I., Kara Terki I., Lachachi M., Didi W. (2013).** Détection des pili de type 3 de Klebsiella pneumoniae isolée des sondes urinaires CHU Tlemcen. *Journée Virus et Cancer. Tlemcen. Algérie nosocomiales. Alger.*

Références Bibliographiques

- **Bendadi A. (2012).** Profil épidémiologique de l'Acinetobacter baumannii. These de doctorat *Rayaume du Maroc Université SidiMouhamed ben Abdelah, Facult de medcine et de pharmacie FES* ; 1-71.
- **Bergogne-Bérézin E., Towner K.J. (1996).** Acinetobacter spp.as Nosocomial pathogens : Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *American Society for Microbiology* ; 9(2):148-165.
- BioMérieu REF 20 050.
- **Bose S., Khodke M., Basak S., Mallick S.K. (2009).** Detection of Biofilm Producing Staphylococci: Need Of The Hour *Journal of Clinical and Diagnostic. Research. 1915 Dec* ; (3):1915-1920.
- **Bougle C., Lcroyer R. (2003).** Les cathéters vinaux centraux imprégnés de substances anti-infectieuses: Aspects techniques et études cliniques. *Journal de pharmacie clinique* ; 22(3):159-167.
- **Branger A. (2007).** Microbiochimie et alimentation ; 345-343.
- **Burin des Roziers M., Marc, Patric ,Claude. (2002).** Les biofilms. *these de doctorat vétérinaire ,présenté et soutenue publiquement devant la faculté de médecine de créteil.*

C

- **Castro Melo P., Menezes Ferreira L., Nader Filho A., Francisco Zafalon L., Isa Godoy Vicente H., et Viviane de Souza. (2013).** Comparaison des méthodes de détection de la formation de biofilm par *Staphylococcus aureus* isolé de la mastite subclinique bovine. *Braz J Microbiol* ; 44 (1):119-124.
- **Chalvet de Rochemonte A. (2009).** Les biofilms et la peau. *these de doctorat veterinaire, Faculte de medcine de creteil. Paris.*
- **Chraïti ISC., Huttner B., Iten A. (2011).** Procédure interdisciplinaire prévention et contrôle de l'infection ; 3(1):1.
- **Christensen BE. (1989).** Le rôle des polysaccharides extracellulaires dans les biofilms. *J Biotechnol* ; 10:181-202.
- **Christensen GD., Simpson WA., Yonger JJ., Baddor LM., Barrett FF., Melton DM., Beachey EH. (1985).** Adhésion des Staphylocoques à la coagulase négative aux plaques de culture de tissus plastiques : un modèle quantitatif pour l'adhérence des Staphylocoques aux dispositifs médicaux. *J Clin Microbiol* ; 22:996-1006.
- **Cloby P. (2007).** Forum de la comite d'infectiologie de l'AFU (CIAF).
- **Constantiniu S., Romantiniuc A. and Iancu L.S. (2004).** The biochemical characteristics of Acinetobacter spp. strains isolated from hospital units ; 12(3-4):35-42.
- **Costerton J.W. (1999).** Introduction to biofilm. *International journal of Antimicrobial Agents* ; 217-221.
- **Costerton J.W., Philips, Stiwart E.P. (1999).** Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Microbes , immunity. And disease* ; 284:1318-1322.

Références Bibliographiques

- Costerton JW., Lewandowski Z., Caldwell DE., Korber DR ,Lappin-Scott HM. (1995) .Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* ; 49:711-745.
- Cramton S.E., Gerke C., Schnell N.F., Nichols W.W., Götz F. (1999). The intercellular adhesion (Ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infect. Immun* ; 67:5427-5433.

D

- Dahdouh E., Orgaz B., Gómez-Gil R., Mingorance J., Daoud Z., Suarez M., San Joseb M. (2015). Patterns of biofilm structure and formation kinetics among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates with different antibiotic resistance profiles. *This journal is © The Royal Society of Chemistry, Med. Chem. Commun.*
- David L., Jean M.G (2012). Infection associées aux biofilms.*médecine/science* ; 28:727-739.
- Delbos. (2012). Manifestation cliniques et traitement des infections à *Acinetobacter baumannii* ; 42-441.
- Desouky A.E.H. (2003). *Acinetobacter* enviromental and biotechnological application. *African journalof biotechnologie* ; 2(4):71-74.
- Dheepa M., Rashme VL., Appalaraju B. (2011). Comparison of biofilm production and multiple drug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumanii* from a tertiary care hospital in South India. *Int J Pharm Biomed Sci* ; 2(4):103-7.
- Dijkshoorn L., Nemec A., Seifert H. (2007). An increasing threat in hospital : Multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Natur reviews microbiologie* ; 5:939-951.
- Djordjevic D., Wiedmann M., Mclandsborough L.A. (2002). Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied And Environnemental Microbiology* ; 68(6):2950-2958.
- Donlan RM. (2002). Biofilm: Microbial life on Surfaces.*Centers for Disease Control and prevention, Atlanta, Georgia, USA* ; 8(9):881-890.
- Donlan RM., Costerton JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews* ; 15:167-193.
- Donlan Rodney M. (2002). Biofilms: microbial life on surfacs.*Emerging infections diseases* ; 8(9):881-8.

E

- Elouennass M., Bajjou T., Baaja J. (2001). Infection à *Acinetobacter* en milieu hospitalier.Service de microbiologie, hopitale militaire d'instruction Mouhemed V. Rabat,*biologie infectiologie* ; 2(1).
- Erick A., Snellman Rita R. (2004). *Acinetobacter* lipases molecular biology, biochemical proprieties and biotechnological potencil. *journal microbiol biotechnol* ; 31:391-400.

Références Bibliographiques

- **Espinasse F., Pageb.B., Cottard-Boullea B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue francophone des laboratoires* ; 426:51-63.

F

- **Ferry T., Richard J.C. (2013).** Traitement systématique des infections à bacilles Gram négatif producteurs de carbapénémase ; (3):142-149.
- **Filloux A., Vallet I. (2003).** Biofilm:mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *M/S : médecine sciences* ; 19(1):77-83.
- **Forester DH., Daschner F.D. (1998).** Acinetobacter species as nosocomial pathogens. *Eur j clin microbiol infect* ; 17:613-617.
- **Fowler V.G., Fey P.D., Reller L.B., Chamis A.L., Corey G.R., Rupp M.E. (2001).** The intercellular adhesion locus *Ica* is present in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from bacteremic patients with infected and uninfected prosthetic joints. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* ;189:127-131.
- **Freeman DJ., Falkiner FR., Keane CT. (1989).** Nouvelle méthode pour détecter la production de boues par des staphylocoques à coagulase négative. *J Clin Pathol* ; 42:872-874.

G

- **Garret TR. (2008).** Bacterial adhesion and biofilm on surface. *Science direct*.
 - **Giamarellou H., Antoniadou A., Kopoulou K.K. (2008)** .Acinetobacter baumannii : a universal threat to public health. *International journal of antimicrobial agents* 32:106-119.
 - **Givskov M., Kjelleberg S. (2007).** The biofilm mode of life : Mechanisms and adaptation ; 300.
 - **Gomez J., Simarro E., Banos V., Requena L., Ruiz J., Garcia F., Canteras M., Valdés M. (1999).** Six-year prospective study of risk and prognostic factors in patients with nosocomial sepsis caused by *Acinetobacter baumannii*. *Eur. J.Clin. Microbiol. Infec. Dis* ; 18:358-361.
 - **H**
-

- **Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. (2004).** Bacterial biofilms : from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol* ; 2(2):95-108.

Références Bibliographiques

- **Handke L.D., Conlon K.M., Slater S.R. (2004).** Genetic and phenotypic analysis of biofilm phenotypic variation in multiple *Staphylococcus epidermidis* isolates. *journal of medical microbiology* ; 53:367-374.
- **Harold C., Slavkin D.D. (1997).** Biofilms, Microbial ecology and Antoni Van Leeuwenhoek. *National institute of dental research* ; 128(4) :492-495.
- **Haward A., O'Donoghue M., Audrey F. and Roy D. Sleator. (2012).** *Acinetobacter baumannii* an emerging opportunistic pathogen ; 3(3):243-250.
- **Herard A. (1998).** Rôle du biofilm en urologie. Service d'urologie hospitalier Univercitaire de Reims, France ; 8:413-414.
- **Hygis N. (2010).** hygiène hospitalière ; 513.

J

- **Jamal Muhsin, Ufaq T., Tahir H., Andleeb S. (2015).** Bacterial biofilm : its composition,formation and role in human infections. *Jornal of microbiology and biotechnology* ; 4(3):1-14.
- **Jayaraman A., Wood TK. (2008).** Bacterial quorum sensing : signals, circuits, and implications for biofilms and disease. *Annual review of biomedical engineering* ; 10:145-167.
- **Johannes K.M., Knobloch M.A., Horstkotte H., Dietrich M. (2002).** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology* ; 191:101-106.
- **Johnson E.N., Burns T.C., Hayda R.A., Hospenhal D.R. and Murray C.K. (2007).** Infectious complications of open type III tibial fractures among combat casualties. *Clin Infect Dis* ; 45:409-15.
- **Joly-Guillou M.L. (2005).** Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* ; 11:868-73.

K

- **Kara Terki I. (2014).** Caracterisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Telemcen.Thèse de doctorat .Université Abou Bakr Belkaid, Telemcen.
- **Katsaragakis S. (2008).** *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care Unit : predictors of multi-drug resistance ; 32:1194-1202.
- **Koprnova J., Svetlansky I., Bilikova E. (2001).** *Acinetobacter baumannii* in cancer patients. *support care cancer* ; 9 :558-559.

L

- **Lahiri, Mani, Paurai. (2004).** Acinetobacter spp as nosocomial pathogen : clinical significance and antimicrobial sensitivity. *MJAFI* ; 60(1):7-10.
- **Lambert ET. (2007).** *Acinetobacter. Livre Bactériologie médicale : techniques usuelles, Identification et Systématique Bactérienne.*
- **Larry M., Bush., MD Charles E., Maria T., Perez MD. (2017).** *Acinetobacter infections. MSD manual* ; 1-5.
- **Lewis k. (2010).** *Ann Rev Microbiol* ; 64:357.
- **Looveren V., Goossens H., ARPAC steering group. (2004).** Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. *The european society of clinical microbiology and infectious diseases* ; 684-704.

M

- **Marchal M. (2010).** Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. *thèse de doctorat. Université de strasbourg, France.*
- **Marti C.I. (2008).** Infections nosocomiales : *Acinetobacter baumannii* ; 1-10.
- **Marti S. (2008).** Molecular bases of antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp clinical isolates. *Doctorat thesis ; University of bareclona* ; 281.
- **Martí S., Rodríguez-Baño J., Catel-Ferreira M., Jouenne T., Vila J., Seifert H., Dé E. (2011).** Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC research notes* ; 4:5.
- **Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci : an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* ; 24:25-29.
- **Metan G., Alp E., Aygen B., Sumerkan B. (2007).** *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients : clinical outcome and impact of carbapenem resistance. *J Antimicrob Chemother* ; 60:197-9.
- **Metzler Antoinette. (2016).** Developing a Crystal Violet Assay to Quantify Biofilm Production Capabilities of *Staphylococcus aureus*. *Honors Research Thesis. Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for Graduation with Honors Research Distinction. Department of Animal Sciences. The Ohio State University.*
- **Montefour K., Frieden J. (2008).** *Acinetobacter baumannii* : An emerging multidrug resistant pathogene in critical care ; 28(1):15-25.
- **Musk DG., Banko DA., Hergenrother PJ. (2005).** Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry and biology* ; 12:789-796.

N

- **Ng WL., Bassler BL. (2009).** Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* ; 43:197-222.

O

- **O'Toole G.A., Kaplan HB., Kolter R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *The Annual Review of Microbiology* ; 54:49- 79.
- **Oli A.K., Raju S., Nagaveni S., Kelmani Chandrakanth R. (2012).** Biofilm formation by Multidrug resistant *Enterococcus faecalis* (MDEF) originated from clinical samples. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*.
- **Ouchar mahamat O., Tidjani A., Savadogo A., Abakabir mahamat A., Somda MK., Traore A.S. (2013).** Isolement et caractérisation des bactéries productrices des biofilms issues des produits alimentaires. *Microbiol. Ind. San et Environn* ; 7(2) :187-210.

P

- **Paillories H. (2017).** Réservoir extra-hospitaliers est non humains d'*Acinetobacter baumannii* sur l'île de la réunion. *Médecine humaine et pathologie université d'Angers. français* ; 1-160.
- **Philips PL., Wolcott RD., Fletcher J., Schultz GS. (2011).** Biofilms made easy ; 1(3):1-6.
- **Pierrick. (2015).** *Acinetobacter baumannii*. réalisé en collaboration avec les professionnels de la santé et de la médecine. *Santé médecine .net*.
- **Rajkumar H.R.V., Ramakrishna Devaki., Venkataramana Kandi. (2016).** Evaluation of Different Phenotypic Techniques for the Detection of Slime Produced by Bacteria Isolated from Clinical Specimens. *Cureus* ; 8(2):505.

R

- **Rewatkar A.R., Dr. Wadher B.J. (2013)** *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*- Biofilm formation Methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)* ; 8(5):36-40.

Références Bibliographiques

- **Rewatkar A.R., Wadher B.J. (2013).** *Staphylococcus aureus* and *pseudomonas aeruginosa*-Biofilm formation méthodes. *IORS Journal of pharmacy and biologicalscience* ; 8(5):36-40.
- **Roux A., Ghigo J.M. (2006).** Bacterial biofilms, *Académie-veterinaire- de France* ; 159(3):261-268.

S

- **Saitou K., Furuhashi K., Kawakami Y., Fukuyama M. (2009).** Biofilm formation abilities and disinfectant resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol Science* ; 14:65-68.
- **Sharon Goh H.M., Scott A. Beatson , Makrina Totsika , Danilo Moriel G., Minh-Duy Phan, Jan Szubert, Naomi Runnegar, Hanna Sidjabat E., David Paterson L., Graeme Nimmo R., Jeffrey Lipmand , Mark Schembria A. (2013).** Molecular Analysis of the *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated protein. *Applied and Environmental Microbiology* ; 79(21):6535–6543
- **Sihorkar V., Vyas S.P. (2001).** Biofilm consortia on biomédical and biological surfaces de livery and targeting strategies. *Pharmaceutical research* ; 18(9):1247-1254.
- **Smani Y., Fabrega A., Vila Jordi. (2014).** Rôle de OmpA dans le phénotype de résistance multiderogue d'*Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob agents chemother* ; 58(3) :1806-1808.
- **Stepanovic S., Vukovic D., Daki I., Savic B., Vlahovic-Svabic M. (2000).** Un test de plaque de microtitrage modifié pour la quantification de la formation de biofilm staphylococcique. *J Microbiol Methods* ; 40:175-179.
- **Stepanovic Srdjan, Dragana Vukovic, Veronika Hola, Giovanni Di Bonaventura, Slobodanka Djukic, Ivana Irkovic C. And Filip Ruzicka. (2007).** Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. *APMIS* ; 115:891-9.
- **Steven Percival L., Sladjana M., Cruz H., David Williams W. (2011).** Introduction to Biofilms. *Biofilms and Veterinary Medicine* ; P41-68.
- **Svjetlana Marić, Vranes J. (2007).** Characteristics and significance of microbial biofilm formation, *period biol* ; 109(2):1-6.

T

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

Références Bibliographiques

- **Tremblay Yannick D.N., Hathroubi S., Jacques M. (2014).** Les biofilms Bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *The canadian Journal of Veterinary Reaserch* ; 78:110-116.

V

- **Vieu G. (2014).** Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Étude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants. *Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Toulouse iii – Paul Sabatier. Faculté des sciences pharmaceutiques.*

W

- **Walter H. (1989).** Acinetobacter baumannii serotyping for delineation of outbreaks of nosocomials Cross-Infection. *journal of chimical of microbiologie* ; 2713-2716.
- **Weinstein M.D., Munoz-Price L. Silvia, Robert A. (2008).** *Acinetobacter infection. the new england journal of medicine* ; 1271-1281.

Z

- **Zmantar T., Kouidhi B., Miladi H., Mahdouani K., Bakhrouf A. (2010).** A Microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New microbiologica* ; 33:137-145.

Annexes

Annexes

Annexe 1. Tableau de lecture de la galerie API 20 NE					
Tests	Composants actifs	QTE Mg/cup	Réaction /enzyme	Résultats	
				négatif	positif
No3	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
			réduction des Nitrates en azote	incolore	rose-rouge
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (Tryptophane)	Zn / 5 min	
				rose	incolore
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (Glucose)	JAMES / immédiat	
				bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine Di-Hydrolase	jaune	orange / rose /rouge
				jaune	orange / rose /rouge
URE	Urée	0,76	Uréase	jaune	orange / rose /rouge
				jaune	orange / rose /rouge
ESC	Esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β -glucosides) (Esculine)	jaune	gris / marron / noir
				jaune	gris / marron / noir
GEL	Gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (Gélatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
				pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- β Dgalactopyranoside	0,22	β -galactosidase (Para-Nitrophényl- β DGalactopyranosidase)	incolore	jaune
				incolore	jaune
GLU	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
ARA	L-arabinose	1,4	assimilation (ARABinose)	transparence	trouble
MNE	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
MAN	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
MAL	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
CAP	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
ADI	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
MLT	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
CT	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
PAC	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

Annexes 2. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition

Annexe 2.1. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *A. baumannii*

ATB testés	Charge des disques	Diamètres Critiques (mm)		
		R	I	S
Ticarsilline	75 µg	≤ 14	15-19	≥ 20
Ticarcilline+ac clavulanique	75/10 µg	≤ 14	15-19	≥ 20
Piperacilline	100 µg	≤ 17	19-20	≥ 21
Ceftazidine	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Imipénème	10 µg	≤ 18	19-21	≥ 22
Amilcacine	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Gentamycine	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Tobramycine	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Nétilnicine	CMI
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
Lévofloxacine	5 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
Doxycycline	30 µg	≤ 9	10-12	≥ 13
Triméthoprine-sulfaméthoxazole	1.25/23.75 µg	≤ 10	11-15	≥ 16
Colistine	CMI

Annexe 2.2. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *S. aureus*

ATB testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)		
		R	I	S
Pénicilline	10	≤ 28	...	≥ 29
Oxacilline (<i>S.aureus</i> et <i>S.lugdunensis</i>)
Cefoxitine (<i>S.aureus</i>)	30	≤ 21	...	≥ 22
Oxacilline (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i>)
Cefoxitine (S.C.N. sauf <i>S.lugdunensis</i>)	30	≤ 24	...	≥ 25
Gentamicine	10	≤ 12	13-14	≥ 15
Kanamycine	30	≤ 13	14-17	≥ 18
Amikacine	30	≤ 14	15-16	≥ 17

Erythromycine	15	≤13	14-22	≥23
Clindamycine	2	≤14	15-20	≥21
Vancomycine (<i>S. aureus</i>)	
Vancomycine (S.C.N)	
Teicoplanine	30	≤10	11-13	≥14
Ofloxacine	5	≤14	15-17	≥18
Ciorofloxacine	5	≤15	16-20	≥21
Lévofloxacine	5	≤15	16-20	≥21
Trimethoprime+ Sulfamitoxazole	1.25/23.75	≤10	11-15	≥16
Rifamoicine	5	≤16	17-19	≥20
Tétracycline	30	≤14	15-18	≥19
Cloramobénicol	30	≤12	13-17	≥18
Quinupristine – dalphopristine	15	≤15	16-18	≥19
Acide fusidique**	10	≤24	...	≥24
Fosfomycine IV**	

Annexes 3. Préparation de solutions et milieu de culture

Annexe 3.1. Préparation de la gélose au Rouge Congo

	Cœur cerveau.....	37 g
Rouge Congo Agar (RCA)	Agar.....	15 g
	Saccharose.....	36 g
	Rouge Congo.....	0.8 g

Annexe 3.2. Préparation de la solution du Cristal violet

Cristal Violet (1%)	Cristal violet.....	1 g
	Eau distillée.....	100 ml

Annexe 3.3. Préparation de la solution Éthanol-Acétone

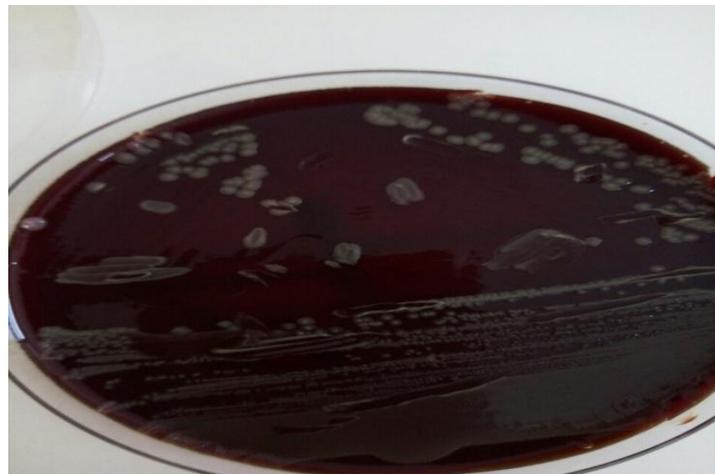
Solution Ethanol- Acétone (75 :25)	Ethanol.....	75 ml
	Acétone.....	25 ml

Annexes 4. Résultats de l'isolement et l'identification d'*A. baumannii*

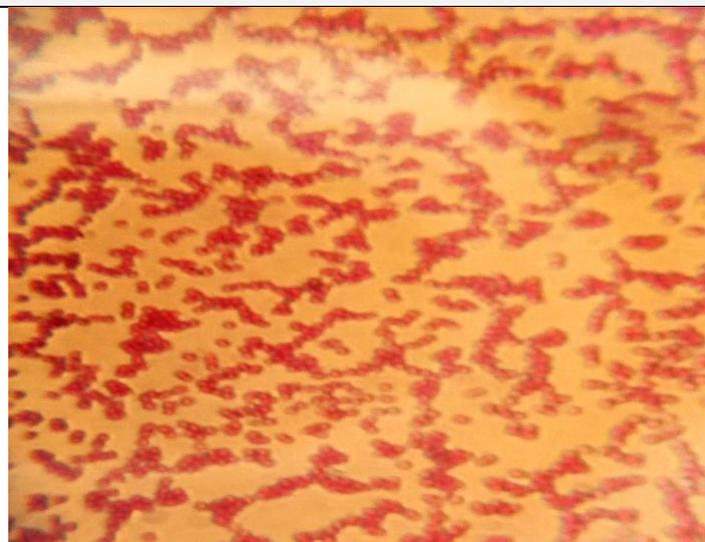
Annexe 4.1. Culture d'*A. baumannii* sur Hektoen



Annexe 4.2. Culture d'*A. baumannii* sur Gélose au Chocolat



Annexe 4.3. Aspect microscopique des cellules d'*A.baumannii* (Grossissement 10× 100)



Annexe 4.4. Résultat de test d'oxydase chez *A.baumannii*



Annexe 4.5. Résultat de test de catalase chez *A.baumannii*



Annexe 4.6. Culture d'*A. baumannii* sur milieu mannitol mobilité



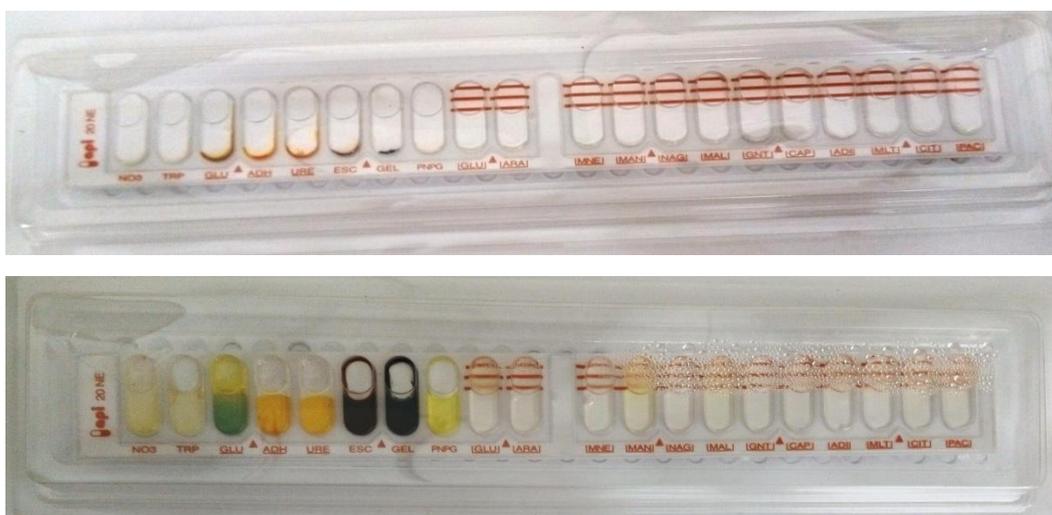
Annexe 4.7. Culture d'*A. baumannii* sur milieu Citrate de Simmons



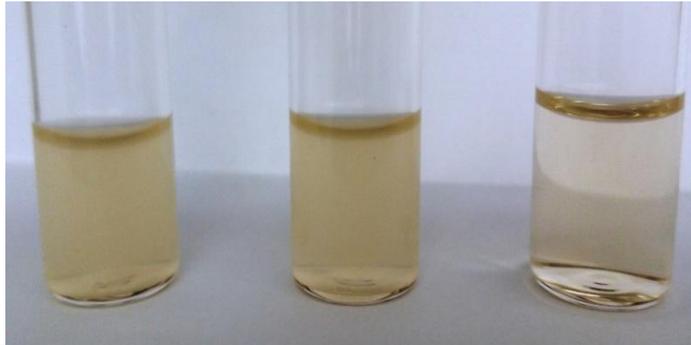
Annexe 4.8. Culture d'*A. baumannii* sur milieu TSI



Annexe 4.9. Résultats de l'API 20 NE



Annexe 4.10. Croissance d'*A. baumannii* à la température de 44°C

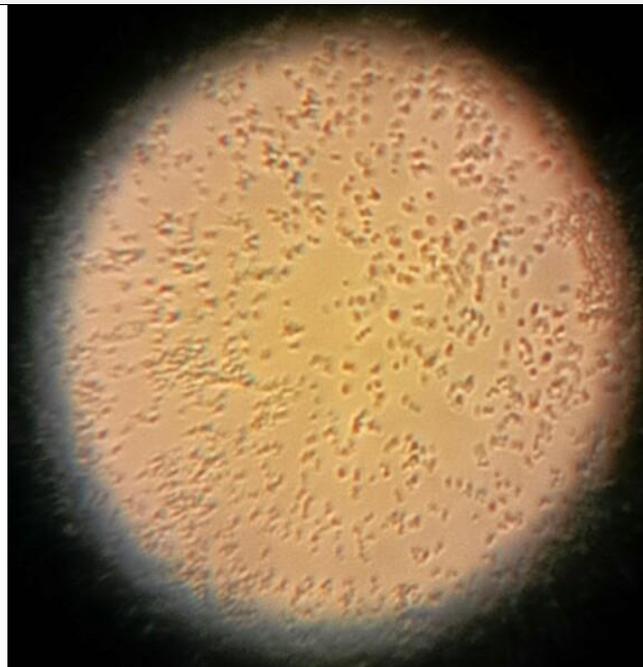


Annexes 5. Résultats de l'isolement et l'identification de *S. aureus*

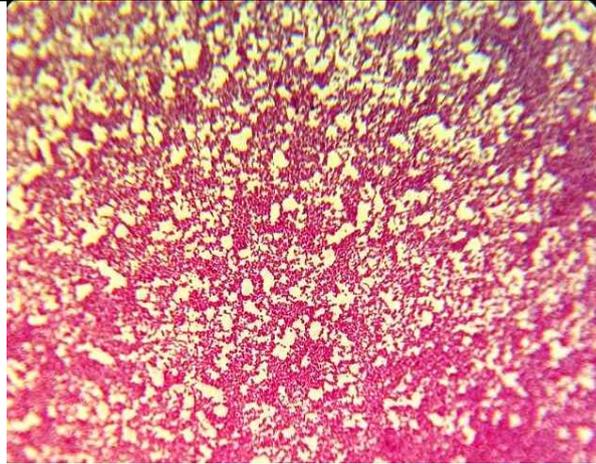
Annexe 5.1. Culture de *S.aureus* sur milieu Chapman



Annexe 5.2. Aspect microscopique des cellules de *S.aureus* à l'état frais



Annexe 5.3. Aspect microscopique des cellules de *S.aureus* après coloration de Gram
(Grossissement 10× 100)



Annexe 5.4. Résultat de test de catalase chez *S.aureus*



Annexe 5.5. Résultat de test de la coagulase chez *S.aureus*

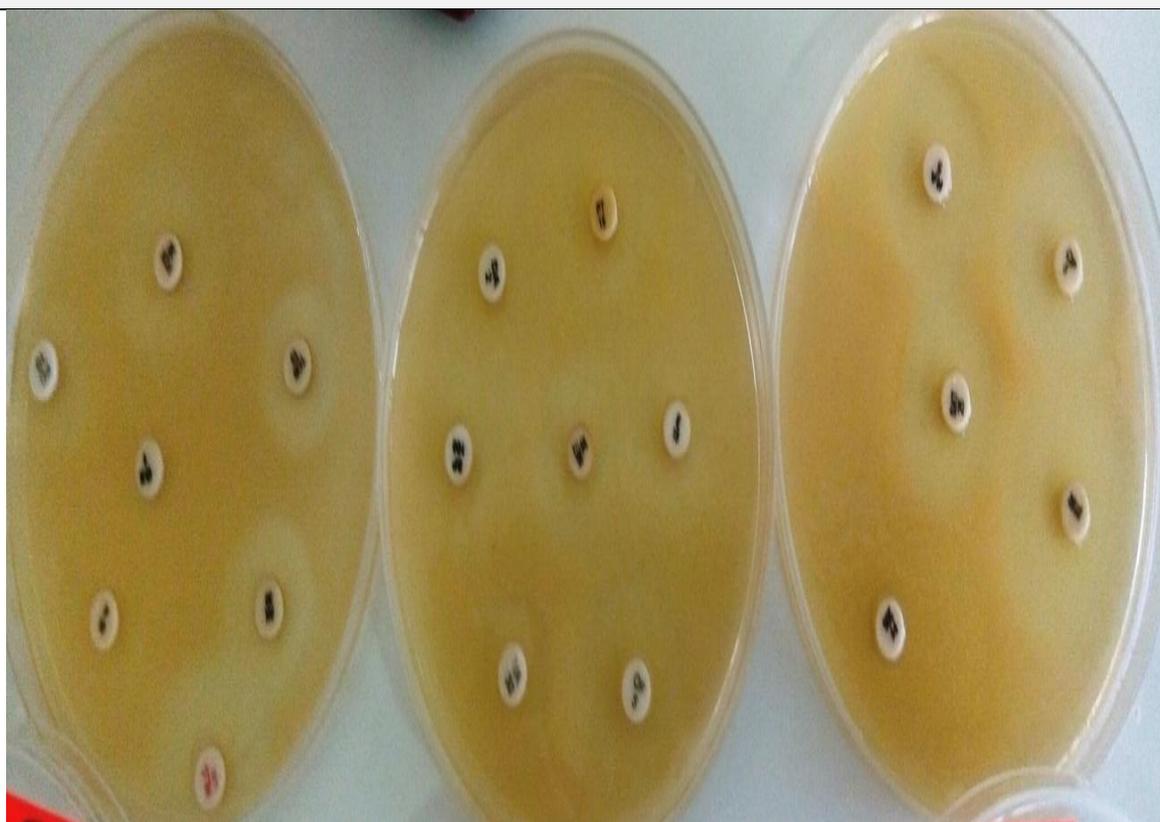


Annexes 6. Résultats de l'antibiogramme

Annexe 6.1. Résultats de l'antibiogramme d'*A. baumannii*



Annexe 6.2. Résultats de l'antibiogramme de *S. aureus*

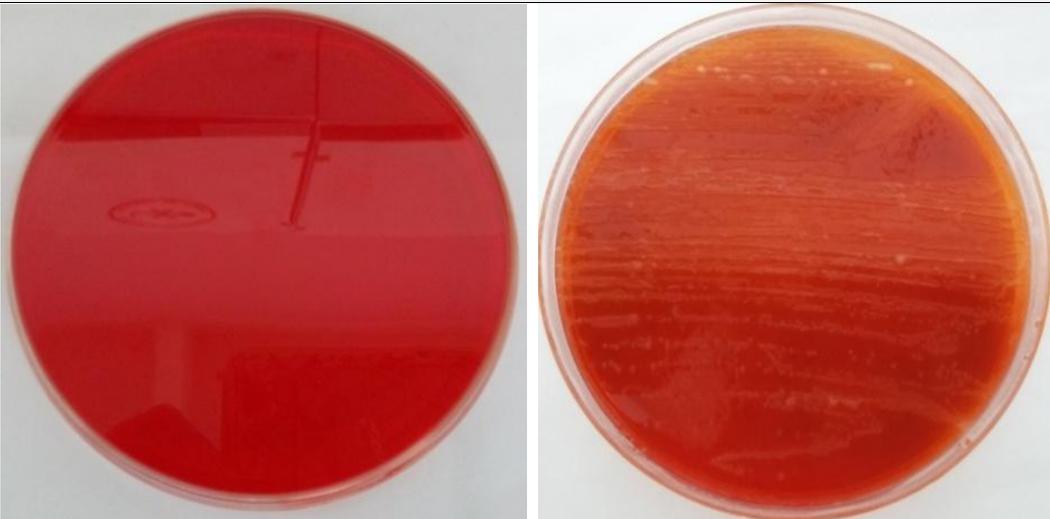


Annexes 7. Résultats de la formation de biofilms chez *A. baumannii* et *S. aureus*

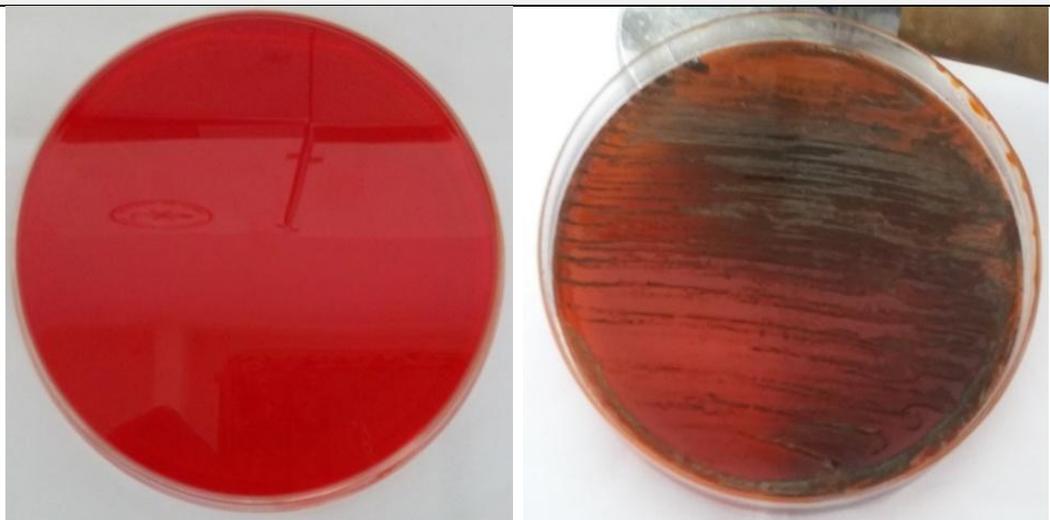
Annexe 7.1. Culture d'*A. baumannii* (S1) sur RCA



Annexe 7.2. Culture d'*A. baumannii* (S2) sur RCA



Annexe 7.3. Culture d'*S. aureus* (S3) sur RCA

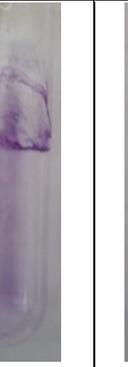
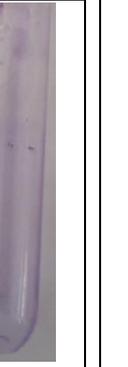
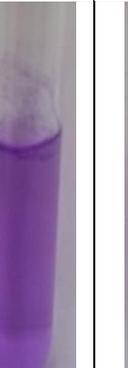


Annexe 7.4. Résultats de la formation de biofilms en microplaque

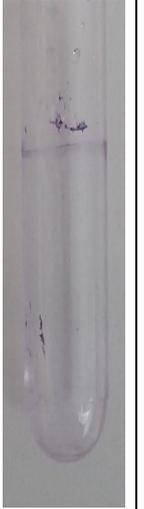
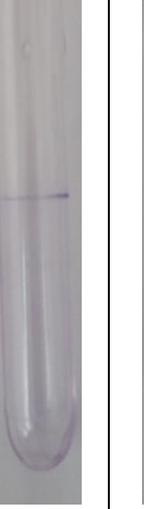
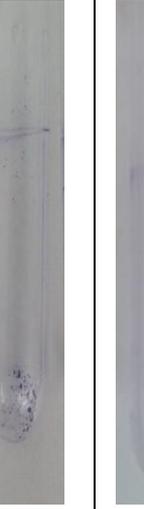
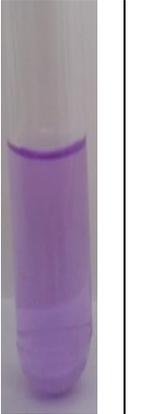
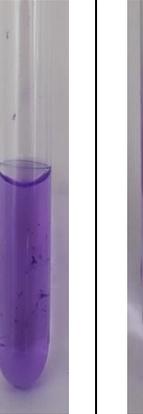
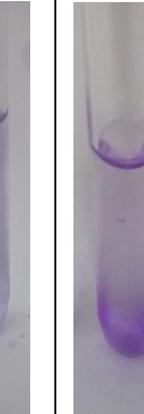


Annexe 7.5. Résultats de la cinétique de formation de biofilms

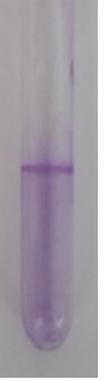
Annexe 7.5.1. Cinétique de formation de biofilms d'*A. baumannii* (S1) en bouillon CC

Jours (heures)	24	48	72	96	120	144	168
CV							
Ethanol/ acétone							

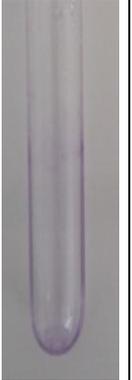
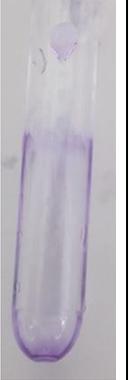
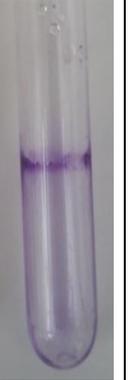
Annexe 7.5.2. Cinétique de formation de biofilms d'*A. baumannii* (S1) en bouillon BN

Jours (heures)	24	48	72	96	120	144	168
CV							
Ethanol/ acétone							

Annexe 7.5.3. Cinétique de formation de biofilms d'*A. baumannii* (S2) en bouillon BN

Jours (heures)	24	48	72	96	120	144	168
CV							
Ethanol /acétone							

Annexe 7.5.4. Cinétique de formation de biofilms de *S. aureus* (S3) en bouillon BN

Jours (heures)	24	48	72	96	120	144	168
CV							
Ethanol/ acétone							

Résumés

Résumé

Les biofilms bactériens sont à l'origine de nombreuses infections nosocomiales (IN) et sont extrêmement difficiles à éradiquer. Les capacités potentielles, d'*Acinetobacter baumannii* et de *Staphylococcus aureus* à former des biofilms, peuvent expliquer l'augmentation de leurs résistances aux antibiotiques ainsi que leurs survies dans l'environnement hospitalier. De ce fait, l'éradication de ces biofilms reste un sérieux problème de santé publique.

L'objectif de ce travail vise à étudier, par des méthodes phénotypiques qualitatives et quantitatives, l'adhésion de deux souches cliniques d'*A. baumannii* et une souche de *S. aureus*, à une microplaque à 96 puits et aux tubes en polystyrène et d'évaluer la cinétique de formation de leurs biofilms.

Les résultats obtenus ont montré, d'une part, une diversité dans la capacité des souches à former des biofilms. Par ailleurs, cette étude montre également une variabilité de production de biofilm en fonction du milieu de culture utilisé ainsi que entre les deux méthodes ; la méthode de rouge Congo agar (CRA) et la méthode de coloration au cristal violet (CV). D'autre part, un phénomène dominant de transition entre l'état planctonique et l'état sessile a été constatée pour l'ensemble des souches étudiées.

Les meilleures connaissances sur les mécanismes impliqués dans la formation de biofilms dynamiques permettent de trouver de nouveaux moyens à fin de lutter contre ces biofilms indésirables.

Mots-clés : biofilms, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, phénotypique, quantification, cinétiques.

Abstract

Bacterial biofilms are the source of many nosocomial infections (NI) and are extremely difficult to eradicate. The potential abilities of *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* to form biofilms may explain their increase antibiotic resistance and their survival in the hospital environment. As a result, the eradication of these biofilms remains a serious public health problem.

The aim of this work is to study, by qualitative phenotypic and quantitative methods, the adhesion of two clinical strains of *A. baumannii* and one strain of *S. aureus*, on a 96-well microtiter plate and polystyrene tubes, and to evaluate their biofilms kinetics formation.

The results obtained showed, on the one hand, diversity in the strains capacity to form biofilms. Moreover, this study also shows biofilm production variability as a function of culture medium and between the two methods; the red Congo agar (RCA) method and the crystal violet (CV) staining method. On the other hand, a transition dominant phenomenon between the planktonic state and the sessile state was observed for all the studied strains.

The best knowledge of the mechanisms involved in the dynamic biofilm formation allows us to find new ways to eradicate these undesirable biofilms.

Keywords : biofilms, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, phenotypic, quantification, kinetics.

ملخص

الأغشية الحيوية البكتيرية هي المسؤولة عن العديد من العدوى المكتسبة من المستشفيات وصعبة للغاية للقضاء عليها. القدرة المحتملة لـ *Staphylococcus aureus* و *Acinetobacter baumannii* لتشكيل الأغشية الحيوية قد يفسر زيادة مقاومتها للمضادات الحيوية وبقائهم على قيد الحياة في بيئة المستشفى. لذلك القضاء على الأغشية الحيوية لا يزال يمثل مشكلة صحية عامة خطيرة.

والهدف من هذا العمل هو دراسة، من خلال وسائل المظهرية الكمية والنوعية قابلية التصاق السلالتين ، *Staphylococcus aureus* و *Acinetobacter baumannii* في صفيحة ستة و تسعون و في انابيب البولستيرين و تقييم حركية على تشكيل بيوفلم.

أظهرت النتائج من ناحية، والتنوع في قدرة السلالات لتشكيل الأغشية الحيوية. وعلاوة على ذلك، يظهر هذه الدراسة أيضا تقلب الإنتاج بيوفيلم اعتمادا على مستنبت المستخدمة وكذلك بين الطريقتين. طريقة الكونغو أجار الأحمر (CRA) والكرستال البنفسجي (CV) و من ناحية أخرى، لوحظ وجود ظاهرة الانتقال من وضعية العوالق واطنة لجميع السلالات المدروسة.

أفضل معرفة الآليات التي تشارك في تكوين الأغشية الحيوية تمكين وسائل جديدة ديناميكية لوضع حد للقتال ضد هذه الأغشية الحيوية غير المرغوب فيها.

الكلمات المفتاحية: الأغشية الحيوية، *Staphylococcus aureus*، *Acinetobacter baumannii*، المظهرية، الكميات، حركية.

Thème : **Analyse phénotypique et quantification de la formation de biofilm par les bactéries d'intérêt médical**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en : Microbiologie Générale et biologie Moléculaire des Microorganismes

Résumé

Les biofilms bactériens sont à l'origine de nombreuses infections nosocomiales (IN) et sont extrêmement difficiles à éradiquer. Les capacités potentielles, d'*Acinetobacter baumannii* et de *Staphylococcus aureus* à former des biofilms, peuvent expliquer l'augmentation de leurs résistances aux antibiotiques ainsi que leurs survies dans l'environnement hospitalier. De ce fait, l'éradication de ces biofilms reste un sérieux problème de santé publique.

L'objectif de ce travail vise à étudier, par des méthodes phénotypiques qualitatives et quantitatives, l'adhésion de deux souches cliniques d'*A. baumannii* et une souche de *S. aureus*, à une microplaque à 96 puits et aux tubes en polystyrène et d'évaluer la cinétique de formation de leurs biofilms.

Les résultats obtenus ont montré, d'une part, une diversité dans la capacité des souches à former des biofilms. Par ailleurs, cette étude montre également une variabilité de production de biofilm en fonction du milieu de culture utilisé ainsi que entre les deux méthodes ; la méthode de rouge Congo agar (CRA) et la méthode de coloration au cristal violet (CV). D'autre part, un phénomène dominant de transition entre l'état planctonique et l'état sessile a été constatée pour l'ensemble des souches étudiées.

Les meilleures connaissances sur les mécanismes impliquées dans la formation de biofilms dynamiques permettent de trouver de nouveaux moyens à fin de lutter contre ces biofilms indésirables.

Mots clés : biofilms, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, phénotypique, quantification, cinétiques.

Laboratoire de recherche : Laboratoire Centrale, Unité de la Microbiologie d' Etablissement Hospitalier Didouche Mourad. Laboratoire de la Microbiologie Générale, Faculte de Science de la Nature et de la Vie.

Jury d'évaluation :

Président du jury : BELMESSIKH Aicha (Maître Assistante «A» - UFM Constantine),
Rapporteur : BOUCHLOUKH Warda (Maître Assistante «A» - UFM Constantine),
Examineur : ABDELAZIZ Wided (Maître Assistante «A» - UFM Constantine).

Date de soutenance : 14/06/2016