

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
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
Département de Biologie Animale

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse
de *Pseudomonas aeruginosa*

Présenté et soutenu par : Boudouda Rahma

Le : 16/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme SATTA. D Professeur- UFM Constantine 1.

Rapporteur : Mme BECHKRI. S MAA- UFM Constantine 1.

Examineur : Mme SAOUDI. M MAA- UFM Constantine 1.

Année universitaire
2014 - 2015

Remerciements

Monsieur **Benlabed K** qui m'a ouvert les portes de son laboratoire au niveau du CHU de Constantine, ce qui m'a aidé à réaliser la grande partie de mon travail, je tiens à vous exprimer toute ma gratitude.

Je tiens à remercier très sincèrement mon encadreur madame **Bechkri S** pour avoir accepté d'encadrer mon travail, pour sa rigueur scientifique, pour son assistance bien matérielle que morale, pour son aide et son soutien.

Mes remerciements s'adressent également à madame **Satta D** qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury.

Madame **Saoudi M** qui m'a fait l'honneur de participer à ce jury et d'examiner mon travail je la remercie profondément.

Un remerciement très particulier à Melle **Meziani D Y** qui ma Co-encadré et m'a beaucoup aidé pour réaliser ma partie pratique
je vous remercie de tous mon cœur

Il est aussi important pour moi de remercier Melle **Mehasni S** pour son support et son aide précieux

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

Dédicace

«A la mémoire de mes parents et mon sidou»

Je dédie ce modeste travaille a ma deuxième mère, ma chère grand-mère.

A mes frères : Abd El khalik et Ahmed.

Mes sœurs : Tessnim et Ilef et leur maman.

Mes oncles : Samir, Feth El din , Karim, Skander et leurs femme.

Ma chère tante Halima et son marie Djamel.

A mes cousines : Houwa et Hafssa.

Et mes cousins : Ayoub, Yakoub et Sem

A mes amies d'enfance : Hadjer, Lamia, Samira, Soumiya, Kenza.

A tous mes collègues.

Et en fin à la personne qui m'a beaucoup aider
pour son soutien moral et sa gentillesse sans égale, Walid.



Introduction

Pseudomonas aeruginosa est un bacille à Gram négatif non fermentant strictement aérobie non sporulée, très mobile et omniprésente dans l'environnement. Cette espèce, autrefois sensible à la quasi-totalité des antibiotiques est aujourd'hui responsable d'infections survenant par épidémies et impliquant des souches de plus en plus résistantes.

La séquence complète de son génome (STOVER CK *et al.*, 2000) a permis de rationaliser cette observation car 0.3 % des gènes sont directement impliqués dans les mécanismes de résistance. Il est capable d'acquérir des grands éléments mobiles (intégrons) codant pour des mécanismes de résistance provenant d'autres bactéries (KIPNIS E., SAWA T, 2006) (WOODS DE ,2004).

En outre, son maintien dans de nombreux habitats aquatiques potentiellement contaminés par des antibiotiques (d'origine naturelle ou artificielle) contribue à la formation de réservoirs de gènes de résistances.

Cette étude a pour principaux objectifs :

- Caractérisation biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Caractérisation microbiologique *Pseudomonas aeruginosa*.
- Une Mutagenèse *Pseudomonas aeruginosa* par U.V.

La partie pratique a été réalisée au niveau de service de bactériologie au CHU de Constantine pendant environ deux mois

Le mémoire est structuré de la manière suivante

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

Chapitre 1

Revue Bibliographique

I - Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*

La souche *Pseudomonas aeruginosa* a été isolée pour la première fois en 1882 par Charles Gessard comme agent de surinfection des plaies au cours de la 1^{ère} guerre mondiale (CHAKER H, 2012). C'est une bactérie redoutable car elle est considérée comme le paradigme des espèces environnementales pathogènes opportunistes de l'homme (PLESIAT P, 2011).

I-1- Nomenclature

P. aeruginosa est l'espèce-type du genre *Pseudomonas* la plus étudiée, plus communément appelé bacille *pyocyannique* "pus bleu" (LESNE R R, 2000). Cette nomenclature vient du Grec *Puon*= *pus*, *kuanos* = bleu foncé (*pyocyannique*) et du Latin *aeruginosus*= couvert de rouille (CHAKER H, 2012).

I-2-Taxonomie

Il s'agit d'une bactérie que l'on répertorie conventionnellement comme mentionné dans le tableau 1

Tableau 1: Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* (CHAKER H, 2012)

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

I-3- Phylogénie

Le genre *Pseudomonas aeruginosa* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries. La figure 1 représente les relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries.

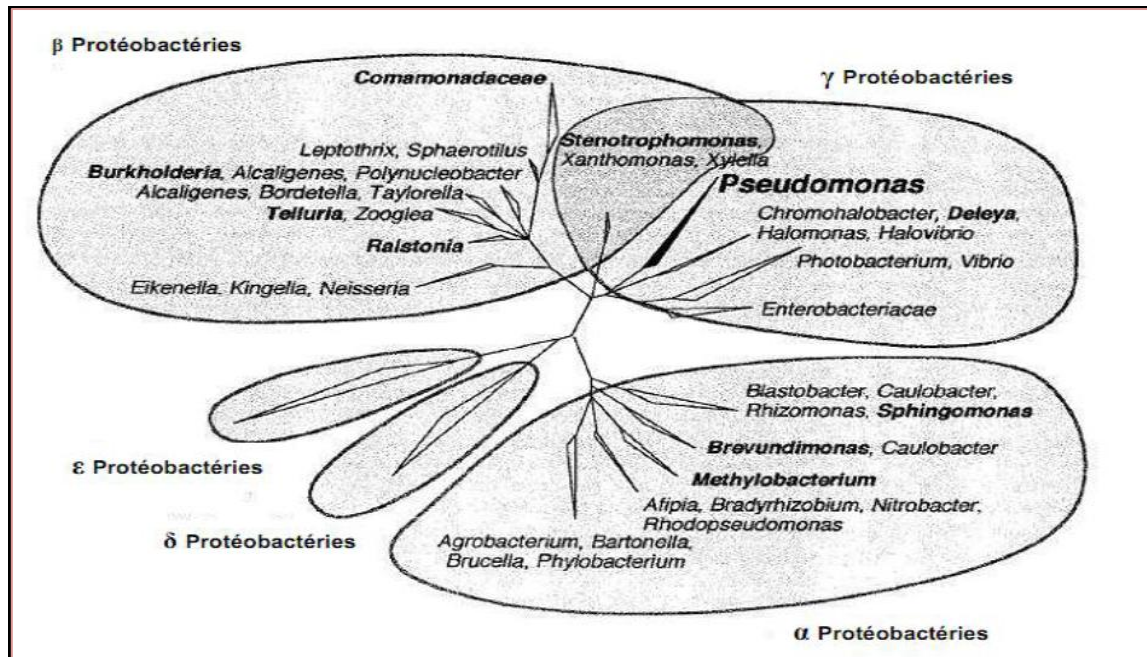


Figure 1. Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (BOSSIS et al., 2000).

I -4- Habitat

La bactérie *P. aeruginosa* est omniprésente dans l'environnement, on la trouve dans de très nombreux milieux : végétaux, poussières, aliments crus (particulièrement les légumes : tomates, carottes, céleris) et même parfois commensale du tube digestif de l'homme (LECLERC H, 2002). C'est une bactérie saprophyte d'eau, ubiquitaire de l'environnement humide, son réservoir naturel est le sol, les lacs, les rivières, l'eau polluée, les piscines et les jacuzzis...(FLORET, 2009) (GREEN et al., 1974).

P. aeruginosa est un germe aquicole qui se multiplie dans l'eau quel que soit son contenu en matières organiques (LECLERC H, 2002) et comme leur multiplication est favorisée par la température, on les trouve aussi dans les eaux chaudes sanitaires, dans les tours de refroidissement, et dans les piscines, les bains bouillonnants, ventilateurs, nébuliseurs, humidificateurs et malheureusement au milieu hospitalier [évier, siphons, vases, antiseptiques (dans les solutions de désinfectants)] incriminé dans les infections nosocomiales (LECLERC H, 2002) (GREEN et al., 1974).

I -5- Caractères généraux des *Pseudomonas aeruginosa*

I -5-1- Caractères morphologiques

Pseudomonas aeruginosa est un bacille fin sous forme de bâtonnet de 1 à 5 µm de longueur et 0,5 à 1 µm de largeur (CHAKER H, 2012). C'est une bactérie à Gram-, non sporulée, strictement aérobie (cytochrome oxydase), généralement non capsulée mais parfois entourée d'une pseudo-capsule, elle est très mobile grâce à la présence de plusieurs flagelles polaires. Elle est mésophile et capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C, mais il faut bien savoir que sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C (CLAVE D, 2011).

I -5-2- Caractères cultureux

Pseudomonas aeruginosa des aérobies à métabolisme strictement respiratoire, oxydase+ (CLAVE D, 2011) (utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons, mais en absence ou en carence de ce dernier, elle utilise les nitrates (VASIL, 1986), et chimio-organotrophes puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minéral ne contenant qu'une seule source de carbone. elles sont aussi catalase positive (MEZAACHE S, 2012).

Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4.5, ni métaboliser le lactose sur Mc Conkey, l'examen au rouge de méthyle et celui de Voges Proskauer (VP) sont négatifs (PALLERONI, 1984).

I -5-3- Caractéristiques métaboliques

Pseudomonas aeruginosa est Caractérisée par un métabolisme oxydatif et non fermentatif (MEZAACHE S, 2012). Ces bactéries ont la capacité de dégrader des composés complexes, tels que les protéines et les polysaccharides complexes comme l'amidon, la cellulose (PALLERONI, 1984),

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopoly- saccharide entourant leurs cellules, la protègent de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exo-polysaccharide (E.P.S) leur permet de former des bio films, grâce auxquels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (VISCA *et al.*, 2007). Ce genre produit beaucoup de poly hydroxy alcanates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (HOLLOWAY, 1992).

I -5-4- Caractères génomiques

Le génome de cette bactérie a été séquencé en 2000 et a été publiée et révélait le plus large génome bactérien séquencé à ce jour. Il possède 6.3 millions de paires de bases, codant 5570 cadres de lecture de la souche modèle PAO1 (STOVER et *al.*, 2000).

Ce génome contient un nombre important de gènes régulateurs impliqués dans le métabolisme, le transport, l'efflux de composés organiques et différents systèmes de sécrétion et de mobilité, (STOVER et *al.*,2000) mais il contient aussi une quantité très élevée de gènes codant pour des facteurs de virulence et des mécanismes de régulation, ce qui lui confère une grande capacité à s'adapter à divers environnements et la capacité d'infecter différents hôtes (FAILLE A, 2010).

La virulence de *P. aeruginosa* est multifactorielle (LAMONT I et *al.*, 2003), cette bactérie pouvant produire une multitude de métabolites secondaires dont des facteurs de virulence extracellulaires de faibles poids moléculaire, qui sont régulés en partie par la signalisation intercellulaire. De plus, de nombreux facteurs de virulence se retrouvant à la surface des cellules font de cette espèce un pathogène redoutable. Parmi ces facteurs, on retrouve le flagelle qui permet à la bactérie de nager, les pilis pour le déplacement et l'adhésion, et la couche de lipopolysaccharides (LPS) qui se situe à la surface externe de la membrane et qui est aussi nécessaire à l'adhésion (KIPNIS E., SAWA T., WIENER-KRONISH J, 2006).

I -6- Identification

L'identification de cette espèce se fait en recherchant le pigment pyocyanine soluble dans le chloroforme et la capacité du germe à se développer à 41°C. Ces deux tests sont largement suffisants pour diagnostiquer *Pseudomonas aeruginosa* (LECLERC H, 2002).

- En contraste de phase le déplacement des bacilles s'effectue plutôt en ligne droite (CLAVE D, 2011).
- Elle a une capacité d'hydrolyser la gélatine et la lécithine.
- Elle se caractérise par la production des pigments de pyocyanine en bleu dans le milieu King A, et en revanche, de la Pyoverdine de couleur vert fluorescent en milieu King B
- Pourvue aussi d'une odeur de seringa qui est une fleur de la famille des Philadelphacées encore appelée "jasmin des poètes".

I -7- Typage

L'étude des antigènes O a été initiée par Habs H (HABS H et *al.*, 1968). Cette bactériologiste a construit un schéma de typage en 12 groupes sérologiques (schéma IATS, International Antigenic Typing System) qui a été maintenant étendu à 20 groupes.

Le typage est réalisé à l'aide d'une technique d'agglutination sur lame utilisant une culture de 16 à 18 heures.

En pratique courante, on ne dispose que de 16 antisérums spécifiques (O:1 à O:16) qui sont également commercialisés sous forme de mélanges contenant chacun quatre antisérums.

Les septicémies sont souvent dues aux sérovars 1, 2, 5, 6, 8, 10 et 11. Les souches du sérovar O:12 sont généralement très résistantes aux antibiotiques et elles sont souvent isolées dans les services de réanimation et d'hématologie clinique. (TOUATI M, 2013)

II - Pathogénicité

II -1- Infection par *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est classé parmi les bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement particulièrement *P. aeruginosa*, reconnu comme pathogène opportuniste et causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique (MAVRODI et *al.*, 2001).

II -2- Facteurs favorisant l'implantation de *P. aeruginosa*

Cette bactérie peut devenir pathogène pour l'homme à condition que :

- Son implantation soit favorisée :
 - Une fois il y'a une rupture de la barrière cutanée, le pourcentage d'être contaminé par *Pseudomonas* augmente : C'est ce qu'on rencontre chez les brûlés, ou les porteurs d'ulcères cutanés, plaies ou dermatose, ou d'intertrigos.
 - Modification de la flore cutanée commensale et donc altération de la muqueuse digestive souvent secondaire à une modification de la flore digestive par une antibiothérapie non active sur *P. aeruginosa*.
 - L'implantation d'un matériel étranger : lentilles de contact, sonde urinaire, cathéter, sonde endotrachéale favorisent grandement l'implantation de *P. aeruginosa*.
- Le patient soit « fragilisé » : cancéreux, soins intensifs, immunodéprimé.
- Les souches possèdent des particularités « mutées ».

- Les souches deviennent multirésistantes aux antibiotiques (NAIL S., AKERS M, 2002)

II -3- Dose infectieuse

La dose infectieuse varie selon les souches et les modes de transmission, donc elle est difficile à établir

- Par voie orale : elle serait de l'ordre de 10^8 UFC (Unité formant colonie) chez la souris et 10^{10} UFC chez l'homme ;
- Par inhalation : la DL50 (Dose infectieuse 50) chez la souris est estimée à $2,7.10^7$ UFC, ce qui suggère une dose infectieuse chez l'homme relativement élevée ;
- Par voie cutanée : celle-ci n'est pas connue (MENA., GERBA, 2009).

II -4- Mode de contamination

Parmi les bactéries du genre *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* est l'espèce la plus communément associée à des pathologies humaines. Elle représente 10% des infections nosocomiales avec une mortalité très élevée dont la transmission est en général manuportée surtout par le personnel soignant (MENA., GERBA, 2009) mais peut être par contact direct par les instruments ou encore par inhalation:

- Jusqu'à 50-70 % au cours des pneumopathies ;
- Jusqu'à 30-50 % au cours des septicémies

Ces infections pourront avoir une origine endogène ou exogène.

II -4-1- Infection exogène

- Contact direct avec un sujet infecté à partir de réservoirs environnementaux, du matériel contaminé et par le personnel soignant (mains)
- Contact indirect par le biais de l'eau, les surfaces ou les objets contaminés.
- Et rarement une contamination par ingestion d'eau ou par voie aérienne qu'elle se limite généralement aux patients fragilisés, immunodéprimés ou atteints de mucoviscidose (ZINI S., LAGRIFFOUL A, 2006).

II -4-2- Infection endogène à partir d'un site colonisé (tube digestif, urines, peau).

II -5- Forme clinique et gravité

II -5-1- Chez l'être humain

P. aeruginosa est une espèce classée dans les pathogènes opportunistes responsable d'épidémies graves chez les patients fragiles. Les maladies liées à *Pseudomonas aeruginosa* sont (CHAKER H, 2012)

a- La mucoviscidose

C'est la maladie qui reste la plus fréquente des maladies génétiques mortelles dans les populations blanches dans laquelle un biofilm se forme au niveau des poumons produisant les symptômes de la pneumonie .Elle touche environ 5500 malades en France et la grande cause de morbidité et mortalité chez ces patients sont les infections pulmonaires due à *Pseudomonas aeruginosa* (PIER G., RAMPHAL R ,2005).

b- Infections cutanées

Cette infection s'observe chez les brûlés, sur les plaies chirurgicales, ulcères, escarres ; le risque majeur est la septicémie brutale dont le taux de mortalité est très élevé ;

c- Infections auriculaires

Otites externes, otites moyennes chez le nourrisson avec un écoulement purulent ;

d- Infections urinaires

En particulier chez les sondés ; ils sont très fréquentes, jamais primitives mais toujours nosocomiales ;

e- Infections broncho-pulmonaires

Colonisation trachéobronchique quasi constante ou bien une infection parenchymateuse pulmonaire ;

f- Infections oculaires

Colonisation plus importante chez les porteurs de lentilles de contact (10,3%).Ces infections sont rares mais très graves. Cette bactérie est responsable de 15 à 20% des surinfections bactériennes d'ulcérations cornéennes car elle est capable de gagner très rapidement l'ensemble du globe oculaire (WILLCOX M D, 2007) (ALFANDARI S, 2014) ;

g- Infections méningées

Elles sont rares environ 2% des méningites dans leur totalités, surviennent chez les patients fragilisés : néoplasiques, neutropénie, brûlés infectés par le VIH;

h- Infections ORL

Cette bactérie est présente chez 45 à 65% des sujets atteints d'une otite externe banale ;

i- Les endocardites

Environ 1% des endocardites peuvent être dus au *P.aeruginosa* elles peuvent être secondaire a un geste chirurgical cardio-vasculaire (KRAMER A et al., 2006).

II -5-2- Dans l'industrie agroalimentaire

P. aeruginosa peut parfois entraîner des altérations des aliments soit par :

- **Protéolyse** : dégradation des amines volatiles et de l'ammoniac qui confèrent une odeur désagréable au produit ;
- **Lipolyse** : modifier les propriétés technologiques et gustatives des graisses (CRISTIAN C, 2008)

II -6- Types d'infections

II -6-1- L'infection aiguë

P. aeruginosa est capable de provoquer des infections aiguës des poumons, du système digestif, des voies urinaires et de la cornée (BERTHELOT et al., 2005) (LYCZAK et al., 2000).

L'infection est caractérisée par sa rapidité et, elle est associée au mode de vie dit « planctonique » en opposition au mode de vie en biofilm. La bactérie est invasive et cytotoxique. Elle produit une grande quantité de facteurs de virulence tels que le LPS, les adhésines, le flagelle, les protéases dont les élastases, les phospholipases et l'exotoxine A. Cette étape d'infection est caractérisée par un système de sécrétion de type trois fortement actif (HOGARD T., HEESEMAN N, 2010) (VENTRE et al., 2006).

II -6-2- L'infection chronique

Plusieurs définitions ont été proposées pour définir l'infection chronique (BALLMANN et al., 1998) (HOIBY.1977) (LEE et al., 2003) (PROESMANS et al., 2006).

En effet, elle peut être définie comme une infection qui persiste malgré les thérapies de lutte d'un côté, les défenses immunitaires et la réponse inflammatoire de l'hôte de l'autre côté. Comme dans le cas de la mucoviscidose, une infection chronique est caractérisée par la persistance de la pathologie et des réponses immunitaires (PRESSLER et al., 2011).

La bactérie est non invasive et non cytotoxique. Elle produit moins de facteurs de virulence extracellulaires.

En outre, la bactérie perd certains facteurs de virulence les plus immunogènes comme les pili et le flagelle. Par conséquent, elle devient non mobile mais elle échappe à la clairance et aux réponses immunitaires de l'hôte.

Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'installation de la bactérie sous forme de biofilm est à l'origine d'épisodes d'exacerbations aiguës qui entretiennent un cercle vicieux Pro-inflammatoire. L'élimination totale du pathogène des voies bronchiques devient impossible et l'infection évolue vers une détérioration progressive définitive des fonctions

respiratoires (AEBI *et al.*, 1995) (PIER, 2000) (PIER, 2002).

II -7- Mécanismes impliqué

Le modèle de microcolonie que constitue la formation de biofilms est la première étape pour avoir une infection à *P. aeruginosa*. Les deux autres mécanismes impliqués dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*, sont les phénomènes du *Quorum sensing* et de la sécrétion des exoenzymes S, T, U. (JEAN M, 2004)

II -8- Facteurs de virulence

La virulence de la bactérie dépend d'un grand nombre de facteurs associés aux cellules membranaires et extracellulaires, ces facteurs jouent un rôle important dans la colonisation, la survie de la bactérie et l'invasion des tissus (BEN HAJ KHALIFA A *et al.*, 2011).

Tableau 2 : Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* : leurs modes d'action et leurs conséquences cliniques (BEN HAJ KHALIFA A *et al.*, 2011).

Facteurs de virulence	Mécanisme de virulence	Effet pathogène induit
LPS	Stimulation de la production de cytokines	Choc
Pili	Adhésion aux cellules épithéliales respiratoires	Pathogénicité respiratoire
Flagelle	-Adhésion aux mucines -Mobilité : rôle dans l'internalisation	Diffusion bactérienne
Alginate	-Provoque le phénotype muqueux -Adhésion aux cellules trachéales -Inhibition de la phagocytose, de l'action des antibiotiques et de la réponse immunitaire	-Pathogénicité respiratoire. -Résistance aux défenses de l'hôte (phagocytose) et aux antibiotiques. -Responsable du caractère mucoïde des souches
Exotoxine A	Inhibition des synthèses protéiques des cellules cible	-Mort cellulaire : nécrose tissulaire -Rôle important dans la virulence

Tableau 2 : Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* : leurs modes d'action et leurs conséquences cliniques (suite et fin)

Exoenzyme S	-Effet cytotoxique -Prolifération des LT	-Nécrose tissulaire -Entraîne des lésions du glycopeptide, de la vimentine et des IgG et IgA
Exoenzyme U	Rôle antiphagocytaire	-Lésions des cellules épithéliales -Responsable de bactériémie voire de choc septique
Rhamnolipide	Effet détergent	Hydrolyse du surfactant
Elastase (LasA+LasB)	Dégradation de l'élastine, de la fibrine, de l'interféron, du complément et du collagène	-Destruction des tissus contenant de l'élastine -Rôle important dans la virulence
Protéase alcaline	Protéolyse	Rôle dans les infections cornéennes
Pyocyanine + Pyoverdine	-Action bactéricide sur les autres bactéries Augmentation de la libération d'élastase -Inhibition des battements des cils -Captage du fer -Induisent la synthèse de radicaux libres	-Favorise l'émergence du bacille pyocyanique -Diminution de la clairance des bacilles -Rôle dans la survenue de vascularite d'artères pulmonaires.
Lectines solubles	Inhibition des battements ciliaires des cellules pulmonaires	-Pathogénicité respiratoire -Rôle dans l'infection chronique
Phospholipase C	Effet cytolytique local	-Lyse des cellules cibles (atélectasie pulmonaire) -Rôle dans l'infection aiguë et chronique.

III - Résistance aux antibiotiques

Particulièrement à l'hôpital, cette bactérie pose beaucoup de problèmes de traitement parce qu'elle devient facilement résistante aux antibiotiques (ATB).

Au cours du 20ème siècle, les antibiotiques ont permis de faire considérablement reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses. Mais, malheureusement la mauvaise utilisation massive et répétée des antibiotiques a conduit à l'apparition de bactéries résistantes à ces médicaments.

Actuellement, la résistance des bactéries aux antibiotiques est devenue l'une des grandes menaces de santé publique à l'échelle mondiale.

A chaque fois les chercheurs trouvent de nouveaux antibiotiques, les bactéries développent des mécanismes de résistances, et avant de chercher la solution il faut d'abord savoir pourquoi et comment ces bactéries peuvent s'adapter en présence des antibactériens?

III -1- Mécanismes de resistance

D'après le Dr Monique Chomarat ; Il existe quatre grands mécanismes de résistances aux antibiotiques dont chacun pouvant être lié aux caractéristiques génétiques d'une espèce bactérienne donnée (résistance naturelle) ou être acquis suite à des modifications génétiques (résistance acquise)

-Diminution de la perméabilité (impermeabilité)

La diminution de la perméabilité se fait par :

- Altération des porines.
- Inhibition de la pénétration active.
- Inhibition de la pénétration à travers le peptidoglycane.
- Modification des LPS.

Ce mécanisme n'affecte que les "Gram négatifs", car les antibiotiques diffusent librement à travers le peptidoglycane qui constitue la paroi de ces bactéries.

-Sécrétion d'enzymes d'inactivation : Ce mécanisme est basé sur la production des enzymes pour hydrolyser les antibiotiques.

-Modifications de la cible : L'antibiotique a besoin d'une cible pour se fixer à une bactérie, et sa fonction sera donc altérée s'il n'arrive pas à trouver sa cible. La bactérie utilise ce mécanisme comme moyen de défense pour résister en présence des antibiotiques dans le milieu.

-Phénomènes d'efflux actif (la pompe à efflux) : C'est l'excrétion de l'antibiotique à l'extérieur de la cellule bactérienne à travers la membrane cytoplasmique, par une pompe à efflux construite d'une protéine produite par la bactérie. Le fonctionnement de cette pompe nécessite de l'énergie.

III -1-1- Les Bêta-lactamines

a- La résistance naturelle

P. aeruginosa est naturellement résistant à de très nombreuses B-lactamines :

- Par une mauvaise perméabilité membranaire ;
- L'existence de mécanismes d'efflux actif ;
- Et par une production d'une céphalosporinase chromosomique inductible ;

Ainsi les B-lactamines restant actives sont les carboxypénicillines (ticarcilline), les uréidopénicillines (pipéracilline), certaines céphalosporines (ceftazidime, cefépime), les carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème), les monobactams (aztréonam).

Il est très important de noter qu'il n'y a pas de zone intermédiaire pour de nombreuses b-lactamines ce qui rend difficile l'interprétation des résultats (CLAVE D, 2011).

b- La résistance acquise

P.aeruginosa peut acquérir des mécanismes de résistance variés qui sont classés en mécanismes enzymatiques (b-lactamases) et non enzymatiques :

✓ Mécanismes enzymatiques

- Résistance par hyperproduction de la céphalosporinase Amp C

Peut impliquer la surexpression constitutive du gène Amp C codant la bêta-lactamases

C'est Le mécanisme enzymatique le plus fréquent, il s'effectue par une mutation chromosomique de gènes régulateurs Amp C et la surexpression constitutive du gène affect principalement l'activité de la ticarcilline -tazobactame, ceftazidime

Habituellement l'enzyme est produit en petite quantité, toutefois la production d'Amp C peut augmenter de 100 à 1000 fois (BAGGE N et al., 2002).

Cette hyperproduction de céphalosporinase de type Amp C permet à *P.aeruginosa* de résister à toutes les betas lactamines à l'exception des carbapénèmes, le niveau de résistance sera donc en relation et variable Selon la quantité d'Amp C produit (LIVERMORE DM, 1995).

Les bêta-lactamases chromosomiques sont codée par le gène Amp C et la régulation de ce gène est sous la dépendance d'un système de régulation avec en particulier les gènes Amp R, Amp D, Amp G

-Amp R : qui joue le rôle d'activateur transcriptionnelle du gène Amp C qui est inductible en présence de b-lactamines et réprimé par la protéine code par le gène Amp D

-Amp G : code une protéine transmembranaire qui agit comme une perméase pour les 1,6-anhydromurapeptides qui sont considérés comme molécules de signal impliquer dans l'induction de Amp C ;

-Récemment il a été démontré que deux autres gènes interviennent dans la surexpression d'Amp C et qui sont AmpDh2 et AmpDh3 ;

Contrairement aux entérobactéries, il n'a pas encore été trouvé chez les *Pseudomonas* de céphalosporinase plasmidique ;

- **Résistance par production de pénicillinases**

Il existe plusieurs types de pénicillinases PSE-1 ou encore dénommé CARB-2, PSE-4 (CARB-1), PSE-3, CARB-3, CARB-4 (BERT F et *al.*, 2002) mais d'après les études du GERPB (groupe d'étude de la résistance de *P.aeruginosa* aux b-lactamines), La pénicillinase majoritaire est PSE-1 (représente 90% des cas)

Ces pénicillinases ont la capacité d'hydrolyse les carboxypénicillines, uréidopénicillines, céf sulodines et Inactives sur les : ceftazidime et les carbapénèmes

Les pénicillinases d'origine plasmidique appartiennent à trois groupes :

- groupe PSE ou CARB (PSE-1, PSE-2, PSE-3, PSE-4)

- groupe OXA (OXA 1 à 10)

- groupe TEM (variants de TEM1 et 2) (CLAVE D, 2011)

- **Résistance par production de bêta-lactamases a spectre étendue : BLSE**

La diffusion des gènes de de classe A de BLSE joue un rôle important dans la diffusion de la résistance aux ATB et peut limiter ainsi les possibilistes de traitement des infections causées par *P.aeruginosa*

Il existe plusieurs types de BLSE :

- PER-1,VEB (1a,1b,2) ,GES (1,2,5,8,9), BEL-1,KPC
- Entre 1992 et 1998 : l'apparition des *P.aeruginosa* productrice de TEM en France : TEM-42 (MUGNIER P et *al.*, 1996), TEM-4 (POIREL L et *al.*,1999), TEM-21 (DUBOIS V et *al.*, 2002), TEM-24 (MARCHANDIN H, 2000)
- En 1995 : la détection des *P.aeruginosa* productrice de SHV-2a en France (NAAS, 1999) et plus tard en Thaïlande et en Pologne (CHANAWONG A et *al.*, 2001)

Elles ont la capacité d'hydrolyser les carboxypénicillines, uréidopénicillines, céphalosporines (ceftazidime et cefépime)

- Résistance par production de carbapénémase

Aujourd'hui les métallo-bêta-lactamases (MBL) (carbapénémase) sont décrites non seulement chez les entérobactéries mais également chez *P. aeruginosa* et La détection et la confirmation de ces carbapénémase sont réalisées par biologie moléculaire.

Elles appartiennent aux différentes classes :

- Classe B : métalloenzymes ML Bs Plusieurs types de métalloenzymes sont décrits mais les plus connues sont les IMP (de 1 à 18) et les VIM (de 1 à 12)
- Classe A : KPC
- Classe C : oxacillines

Sont capable d'hydrolyse les carbapénèmes et autres b-lactamines sauf aztréonam (CLAVE D, 2011).

✓ Mécanismes non enzymatiques

Soit par L'acquisition d'une bêta-lactamases intrinsèque ou bien par La surproduction d'un système d'efflux actif ou un déficit en porine Opr D qui permet le passage des carbapénèmes à travers la membrane externe. C'est un mécanisme connu depuis longtemps et touche l'ensemble des carbapénèmes

Plusieurs protéines agissent en tant que composant actifs des systèmes d'efflux Opr M, Opr J, Opr N et sans oublier le système Mex AB-Opr M (CLAVE D, 2011).

III -1-2- Aminosides

- Modification enzymatique

S'effectue par la modification enzymatique de certains groupements chimiques de ces ATB

- N-amino-acétyltransférases (AAC) qui catalysent l'acétylation des fonctions –NH₂ et leur modification participe à la résistance de ces espèces a la plupart des aminosides utilisé en thérapeutiques gentamycine et Amikacine (EDELSTEIN M et *al.*, 2003) (KETTNER M et *al.*,1995)
- Les O-phosphotransférases (APH) qui permettent la phosphorylation des fonctions –OH leur changement augmente le niveau de résistance pour l kanamycine et la néomycine (EDELSTEIN M et *al.*, 2003)
- Le changement des O-nucléotidyltransférases (ANT) qui joue un rôle dans la nucléotidylation des fonctions –OH rend la bactérie résistante à la streptomycine et gentamycine (MILLER GH et *al.*, 1997) (MACLEOD DL et *al.*, 2000)

- **Modification de la perméabilité membranaire**

Chez les souches cliniques, l'altération des différentes gènes impliquées dans la biosynthèse des lipopolysaccharides (des composants de la membrane extérieure de la bactérie) comme le locus *rfb* conduit au phénotype rough (aspect sec et rugueux) s'accompagnant des fois d'une baisse modérée de la sensibilité à l'ensemble des aminosides

- **Résistance par efflux actif**

Seul le système Mex XY-Opr M est capable d'excréter les aminosides à l'extérieur

- **Résistance par modification de la cible ribosomale**

La méthylation de l'ARNr 16s a récemment émergé comme un nouveau mécanisme de résistance aux aminosides.

Le gène *rmt A* qui code une méthylase de l'ARNr 16s procure à la bactérie une résistance de haut niveau à l'Amikacine.

- **Rôle de l'opéron *oprH-phoP-phoQ* dans la résistance aux Aminosides**

Le gène *oprH* se trouve associée dans un même opéron au gène *phoP* et *phoQ* qui codent un système de transduction de signal

La surexpression de la protéine *oprH* a été observée chez les souches mutantes de *P.aeruginosa* présentant une résistance élevée à la polymyxine et modérée à la gentamycine

Ainsi il a été observé au niveau de différents mutants affectés dans les gènes *phoP* ou *phoQ* une légère augmentation de la résistance à l'Amikacine

III -1-3- Fluoroquinolones

- **Par altération de la cible**

La résistance est due à la présence des mutations dans les quinolones resistance determining regions (QRDR) des gènes *GyrA*, *GyrB*, *ParC*, *ParE* codant les cibles qui sont les topoisomérases (ADN gyrase, Topoisomérases IV) [enzymes qui interviennent dans le maintien de la bonne conformation de l'ADN].

Chez les souches cliniques des *P.aeruginosa* l'altération des QRDR des sous-unités *GyrB* et *ParC* est peu fréquente et conduit à une résistance modérée, par contre la mutation dans les gènes *GyrA* sont plus fréquentes et sont responsables d'une augmentation plus forte de CMI de la ciprofloxacine (CMI de 1 à 64 mg/l). Toutefois les mutations de *ParC* sont rares. L'association de mutation à la fois dans *GyrA* et *ParC* conduit à un très haut niveau de résistance (CMI 128 mg/l) (YOSHIDA H et al., 1990).

- Efflux actif

La surexpression de la pompe Mex AB-oprM et la dérégulation des systèmes Mex CD-oprJ, Mex EF-oprN, Mex XY-oprM provoquent une augmentation des CMI de la ciprofloxacine. Les souches cliniques résistantes aux fluoroquinolones (CMI de Cip dépasse le 2mg/l) associées à une surexpression d'un ou de plusieurs systèmes d'efflux avec des mutations cibles.

III -2- Les *Pseudomonas* et les biofilms

Les espèces du genre *Pseudomonas* produisent une couche d'exopolysaccharide entourant leurs cellules, la protégeant de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'exopolysaccharide (E.P.S) leur permet de former des biofilms, grâce auxquels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (VISCA *et al.*, 2007). Ce genre produit beaucoup de polyhydroxyalcanoates et d'alginate ainsi que d'autres substances métaboliques. Ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique (HOLLOWAY, 1992).

IV - Les *Pseudomonas* et les antifongiques

Les *Pseudomonas* produisent notamment, de nombreux métabolites antifongiques (WELLER *et al.*, 2007).

En effet, la plupart des *Pseudomonas* produisent des antifongiques tels que des phénazines, la pyolutéorine, la pyrrolnitrine et le DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) qui sont les antifongiques les plus fréquemment détectés (HAAS., DEFAGO, 2005). Ces bactéries sont également capables de synthétiser des sidérophores appelés pyoverdines ou pseudobactines. Ces molécules sont impliquées dans l'amélioration de la croissance et de la santé des plantes (LEMANCEAU *et al.*, 2009) et contribuent à l'acquisition du fer par les végétaux.

Elles élicitent les réactions de défenses des plantes et, de par leur forte affinité pour le fer, elles limitent la croissance saprophyte de certains microorganismes phytopathogènes (LEMANCEAU *et al.*, 2009).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

I - Lieu et durée du stage

Ce travail a duré environ deux mois. Il a été réalisé au niveau du service de bactériologie au centre hospitalier universitaire de Constantine Abd El Hamid Ben Badis (CHU)

II - Objectif du travail

Ce travail se déroule en trois étapes successives :

- **Caractérisation biochimique** : basée sur l'identification des caractères biochimiques des souches ;
- **Caractérisation microbiologique** : basée sur la découverte du profil de résistance des *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques ;
- **Une mutagénèse** : basée sur l'induction des mutants par UV afin de savoir si les mutations sont capables d'altérer la survie bactérienne ;

III-Matériel biologique (origine des souches)**Tableau 3 : Origine des souches utilisées.**

N° du prélèvement	N° de référence	Sexe	Age	Nature du prélèvement	service
P1	1701	H	64		Réanimation
P2	2391	H	49	Urine	Réanimation
P3	2532	F	48	Urine	Traitement ambulatoire
P4	2461	F		Plaie	Chirurgie
P5	2548	F	53		Ortho
P6	1955	H	29	Pus De Plaie D'une Pied Diabétique Infecté	Réanimation
P7	1953	H		Plaie Purulente	Traitement Ambulatoire
P8	1830	F	71	Urine	Réanimation
P9	2129	F	54	Plaie	Chirurgie

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

P10	2138	F	46	Pus D'une Plaie Infecte	Réanimation
P11	2136	F	73		Orl
P12	2137	F	25	Plaie	Réanimation
P13	2139	F			Endocrinologie
P14	2142	H	37	Urine	
P15	2149	H	46	Pus	Chirurgie

H : homme

F : femme

IV- Matériel et méthodes utilisés pour chaque étape de l'étude microbiologique

IV- 1- Etudes des caractères cultureux et morphologiques

IV-1-1- Méthodes

a. Préparation des souches

✓ Re-isolement

Consiste à faire l'ensemencement d'une seule colonie prélevée à partir d'une culture mère contenant différents germes

- Technique

- De la boîte mère contenant plusieurs germes, on prélève une seule colonie de la souche qu'on veut étudier en se basant sur les caractères morphologiques de notre bactérie pour la différencier des autres ;
- Décharger la colonie dans 5 ml d'eau physiologique ;
- Homogénéiser la suspension à l'aide d'un agitateur vortex ;
- Prendre une goutte de suspension et la mettre dans un coin sur une nouvelle boîte de pétrie contenant l'héctoéne ;
- À l'aide d'une pipette Pasteur ou une anse de platine stérilisée, on réalise des stries en utilisant la méthode de trois cadrons.
- Incubation dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures ;

- Lecture

Mettre en évidence les caractères cultureux et morphologiques des colonies comme : la couleur, aspect, forme, taille et même l'odeur

b. Repiquage

Consiste à faire l'ensemencement d'une colonie à partir d'une culture pure contenant un seul type de germe

- Technique

On utilise la technique précédente.

Incubation à l'étuve pendant 24 heures à 37°C.

IV-2- Recherche des caractères biochimiques**IV-2-1- Méthodes**

Après l'isolement et l'identification des caractères cultureux de *Pseudomonas*, on a réalisé la mini galerie biochimique classique pour mettre en évidence les caractères biochimiques de cette bactérie. Pour chaque souche, préparer d'abord la suspension en mettant une colonie prélevée de la boîte de pétrie après repiquage dans 5 ml d'eau physiologique ou bien bouillon nutritif.



Figure 2. Souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau physiologique.

Les milieux de culture suivants ont été utilisés :

a- Milieu Clark et Lubs**- But**

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

- Technique

Ajouter quelques gouttes de la suspension dans le tube contenant le milieu Clark et Lubs, incubation à 37°C dans l'étuve pendant 48 heures

Après 48 heures, verser le contenu dans deux tubes d'hémolyse.

Tube 1 : ajouter quelques gouttes de rouge de méthyle.

Tube 2 : ajouter quelques gouttes de VP1 .Attendre quelques secondes et rajouter deux ou trois gouttes de VP2

Mettre les deux tubes dans une position inclinée pour bien observer le virage de couleur

b- Milieu citrate de Simmons

- **But**

Ce milieu permet l'étude de l'utilisation, par la bactérie, du citrate (acide organique) comme seule source de carbone.

- **Technique**

A l'aide d'une anse de platine stérile, on prend une goutte de la suspension bactérienne et on la dépose sur le milieu citrate de Simmons incliné en faisant des stries et en montant d'en bas jusque en haut

c- Milieu Triple Sugar Iron (TSI)

- **But**

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

- **Technique**

A l'aide d'une anse de platine stérile, on prend une goutte de la suspension bactérienne et on effectue des stries à la surface du milieu TSI incliné puis on fait une pique centrale par une pipette Pasteur après avoir pris quelques gouttes de la suspension bactérienne. Laisser dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

d- Milieu mannitol mobilité

- **But**

Ce milieu solide permet l'étude de la fermentation du mannitol et la mobilité de la souche ainsi que la recherche de la nitrate réductase

- **Technique**

A l'aide d'une pipette Pasteur contenant quelques gouttes de la suspension bactérienne, on réalise une pique centrale à travers le milieu, incubé à l'étuve à 37°C durant 24 heures

e- Milieu urée indole

- **But**

Ce milieu permet de mettre en évidence les caractères suivants:

- Présence d'une uréase
- Présence d'une tryptophanase
- Présence d'une tryptophane désaminase (TDA)

f- Test d'oxydase

- But

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

- Technique

Ce test est réalisé en ajoutant un disque d'oxydase à une suspension bactérienne épaisse en eau physiologique. (GUILLAUME, 2004)

IV-3- Réalisation de l'antibiogramme

IV-3-1- Méthode

- Ensemencement

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

- Application des disques d'antibiotiques

- Ramener le coffret du distributeur à température ambiante ;
- Sortir le distributeur du coffret ;
- Positionner le distributeur sur la boîte de pétri ;
- Appuyer franchement et verticalement sur la poignée, puis relâcher ;
- A la fin de l'utilisation, remettre le distributeur dans son coffret avec la capsule de déshydratant puis stocker le coffret fermé entre +2 et +8°C

Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24mm, centre à centre.

Une fois appliquée le disque ne doit pas être déplacé.

- Incubation pendant 24 heures dans l'étuve à 37°C

- Lecture

- Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique, à l'extérieur de la boîte fermée.
- Comparer ces résultats aux valeurs critiques
- Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

IV-4- Galerie biochimique après antibiogramme**IV-4-1- Méthode**

- Re-isolément : Consiste à faire l'ensemencement d'une seule colonie mais cette fois si, prélever à partir de la boîte de l'antibiogramme.
- Repiquage sur milieu héktoéne.
- Incuber a 37°C pendant 24 heures à l'étuve.
- Refaire la galerie biochimique en suivant le même protocole précédant.

IV-5- L'induction des mutants par Ultra-Violets (UV)**IV-5-1- But**

L'irradiation par les rayons ultraviolets (UV) provoque la formation de nombreuses modifications de l'ADN

Cette expérience permet d'illustrer clairement les effets néfastes des UV sur la survie des *Pseudomonas aeruginosa*

IV-5-2- Méthode et techniques**- Préparation de la culture**

On prélève une colonie de *Pseudomonas* à l'aide d'une pipette Pasteur fermée et stérilisée et on la dépose dans 5ml de bouillon nutritif puis l'incuber dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

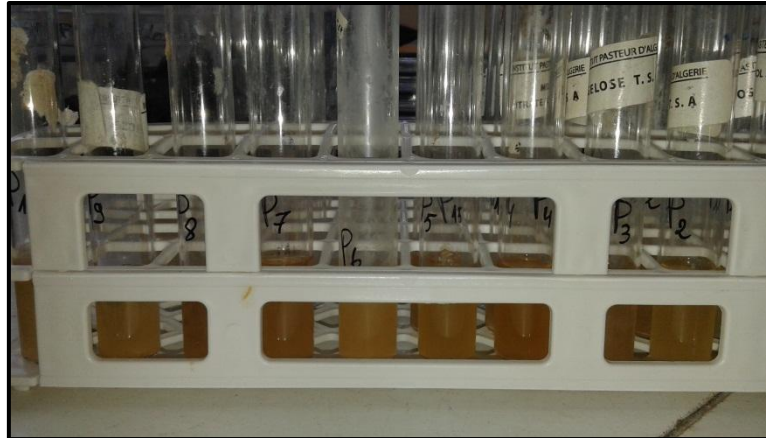


Figure 3.souches dans le bouillon nutritif

- La centrifugation

- Diviser la suspension(milieu de culture) dans deux tubes de centrifugation.
- Recouvrir les tubes avec du Parafilm.
- Centrifuger pendant 10 minutes (4000) à 4°C
- Récupérer le culot en vidant délicatement le surnageant.
- Ajouter 6ml de KCl au culot.
- Remettre le culot en suspension en agitant au vortex.
- Transférer le contenu dans deux tubes à essai stériles.
- Compléter le volume jusqu'à 20ml par du KCl .
- Incuber au frigo a 4°C pendant 10 minutes, laisser les cellules se reposer dans la solution pour inhiber la croissance bactérienne.

- Irradiation

- Verser le milieu de culture sur des boîtes de pétries sachant que la suspension doit remplir la surface de la boîte.
- Irradiation à l'aide d'une lampe a UV en laissant une distance de 30 cm entre les boîtes et la lampe.
- On fait cette étape en deux temps : exposition de la première boîte pendant 10 secondes et 60 secondes pour la deuxième.

- Les dilutions

La boîte témoin

- On prépare 3 tubes à essai stériles, on met dans chacun 9ml de NaCl ;
- Prendre 1ml de la suspension bactérienne et la verser dans le premier tube ;
- Agiter délicatement pour homogénéiser la suspension ;

- Prendre 1ml de la suspension de tube 1 et la mettre dans le deuxième tube, agiter ;
- Reprendre 1ml de la suspension du deuxième tube et la renverser dans le troisième tube ;
- A l'aide d'une pipette Pasteur, on prend une goutte de la suspension du troisième tube et on réalise l'ensemencement sur héctoéne ;

La boîte irradiée

- On refait le même protocole de préparation de la boîte témoin mais dans ce cas la suspension à diluer et celle qu'on a déjà exposé aux UV ;
- Ensemencer la boîte contenant l'héktoéne à partir du troisième tube ;
- Incubation des boîtes dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures ;

Chapitre 3

Résultats et discussions

I - Les caractères cultureux

I-1- Résultats

Les résultats de re-isolement et de repiquages des 15 souches étudiées (après incubation à l'étuve pendant 24 heures à 37°C), montrent l'apparition des souches de *Pseudomonas* sur milieu héктоéne en présentant les caractères morphologiques suivants :

On a observé trois types de colonies de *Pseudomonas aeruginosa* :

- Des colonies grandes de couleur vert foncé, rugueuses avec un centre plus bombé a bord dentelé (irrégulier) avec une odeur aromatique spécifique.
- Des colonies petites de couleur vert foncé rondes, convexes et lisses avec une odeur aromatique spécifique.
- Des colonies opaques visqueuses, de couleur vert foncé, bombées, filantes, ou parfois coulantes avec une odeur aromatique spécifique.

I-2- Discussion

- Les colonies grandes, rugueuses avec un centre bombé (colonies en œufs sur le plat) et un bord irrégulier sont appelés des colonies **large (la)** et elles sont généralement isolées de prélèvement cliniques. Très souvent, ces colonies présentent de petites plages d'autolyse donnant un reflet irisé ou métallique caractéristique.
- Les petites colonies rondes, convexes et lisses sont appelées des colonies **small (sm)**. Ces souches sont très souvent isolées de l'environnement.
- Les colonies bombées, opaques visqueuses, filantes, ou parfois coulantes sont appelées des colonies **muqueuses**. Elles possèdent une pseudo-capsule constituée d'alginate. Ce sont les types de *Pseudomonas aeruginosa* les plus rares. Elles sont formées par des souches isolées chez l'homme de l'appareil respiratoire (patients atteints de mucoviscidose) ou du tractus urinaire.

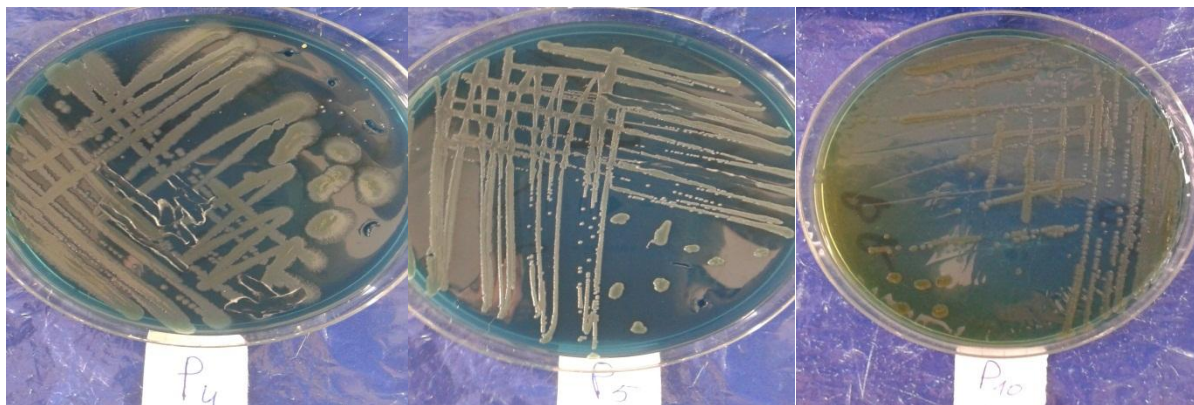


Figure 4. Photographies des résultats de repiquage des souches sur héктоéne.

II - Les caractères biochimiques

La mini galerie biochimique nous a permis d'identifier quelques caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa*. Le tableau 3 montre l'aspect et la couleur des milieux de cultures avant la manipulation par les souches.

Tableau 4: Couleur d'origine des milieux de la galerie biochimique

Milieu Clark & Lubs	Citrate de Simmons	TSI	Mannitol mobilité	Urée indole
Jaune pale	Vert	Rouge orange	Rouge	Orange

II -1- Résultats

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4 :

Tableau 5: Résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour les 15 souches étudiées de *Pseudomonas aeruginosa*

Milieu et Numéros de prélèvement	Clark & Lubs		Urée indole		Milieu TSI	Citrate de Simmons	Mannitol mobilité	
	RM	VP	Avant Kovac	Après Kovac			Mannitol	Mobilité
P1	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P2	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P3	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P4	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P5	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P6	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P7	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P8	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P9	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+

Tableau 5: Résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour les 15 souches étudiées de *Pseudomonas aeruginosa* (suite et fin)

P10	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P11	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P12	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P13	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P14	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+
P15	-	+	-	Annaux orange	-	+	-	+

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

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

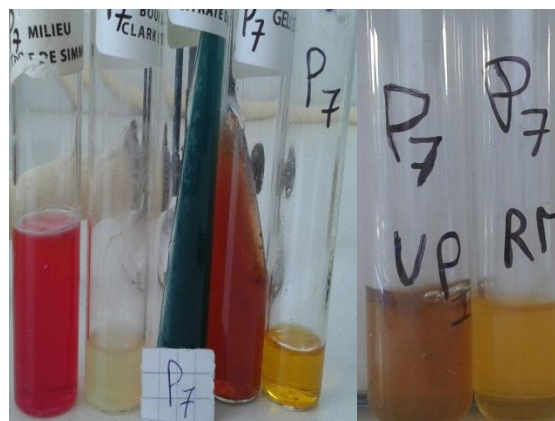


Figure 5. Echantillon de résultats de la galerie biochimique.

II -2- Discussion

II -2-1- La gélose TSI

Dans la littérature, l'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification (virage au jaune du rouge de phénol). La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux :

- Fermentation de glucose

Si le culot est de couleur rouge orange (couleur inchangé), cela veut dire que la bactérie n'a pas fermenté le glucose et si la couleur du culot devient jaune on comprend donc que le glucose a été fermenté par la bactérie

- Fermentation du lactose et/ou du saccharose

-Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés

-Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermenté(s)

- Production de gaz

Apparition de gaz dans le culot.

- Formation d'H₂S

Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre.

II -2-2- Mannitol mobilité**- Fermentation du mannitol**

-Milieu jaune : Acidification du milieu révélée par un virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide, la bactérie fermente le mannitol donc elle est dite mannitol+

-Milieu rouge : Absence d'acidification du milieu, la bactérie ne fermente pas le mannitol, elle est dite bactéries mannitol-

- Mobilité

-Diffusion des bactéries dans la gélose : Déplacement des bactéries dans le milieu (gélose semi-molle), les bactéries sont mobiles Mobilité +

-Culture uniquement au niveau de la piqûre centrale : Pas de déplacement des bactéries dans le milieu, les bactéries sont probablement immobiles

II -2-3- Milieu urée indole**- Uréase**

-Milieu rouge : Alcalinisation du milieu due à la dégradation de l'urée, la bactérie possède l'uréase elle est dite uréase +

-Milieu orangé (inchangé) : Pas d'alcalinisation du milieu, la bactérie ne possède pas l'uréase elle est dite uréase -

- Recherche de la production d'indole:

Après l'ajout de 3 gouttes du réactif de Kovac et sans agiter le milieu

-S'il y'a apparition d'un anneau rouge : Présence d'indole. Le tryptophane a donc été hydrolysé, La bactérie a produit de l'indole elle est dite indole +

-Si l'anneau reste orangé : Absence d'indole, La bactérie n'a pas produit d'indole elle est dite indole -

- **Recherche du tryptophane désaminase (TDA)**

Ajouter 3 gouttes du réactif (= chlorure de fer III en solution acide) et effectuer la lecture

-Coloration marron foncé : Présence d'acide indole pyruvique. Le tryptophane a été désaminé. La bactérie possède le tryptophane désaminase. Elle est dite TDA +

-Coloration inchangé : Absence d'acide indole pyruvique La bactérie ne possède pas le tryptophane désaminase. Elle est dite TDA –

II -2-4- Citrate de Simmons

- Présence de culture bactérienne [Milieu bleu] : Les bactéries utilisent le citrate comme seule source de carbone avec alcalinisation du milieu, Les bactéries possèdent un citrate perméase elles sont dites citrate +
- Présence de culture bactérienne [Milieu inchangé (vert)] : Les bactéries utilisent le citrate comme seule source de carbone sans alcalinisation du milieu, Les bactéries possèdent un citrate perméase elles sont dites citrate +
- Absence de culture bactérienne [Milieu inchangé (vert)] : Les bactéries n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone , Les bactéries ne possèdent pas de citrate perméase elles sont dites citrate –

II -2-5- Milieu Clark et Lubs

Ce milieu permet d'étudier une voie de fermentation du glucose.

- Rouge de méthyle : Il permet de détecter la production d'acides plus ou moins forts et plus ou moins volatiles au cours de la fermentation.

- Si les bactéries produisent des acides forts au cours de la fermentation. Le milieu reste acide et donc en rouge.
- Si les bactéries produisent des acides faibles le milieu s'est acidifié, puis ré-alcalinisé. Le milieu est donc jaune.

- Vp1 et VP2 : Il permet de détecter la production d'acétoïne, de diacétyl et de butane-diol à partir de la fermentation du glucose. Le réactif ajouté (l'alpha naphthol) permet dans le cas d'un milieu basique et en présence de dioxygène, d'obtenir une coloration rosé ou rouge

II -3- Test d'oxydase

Les résultats sont illustrés dans la figure 6

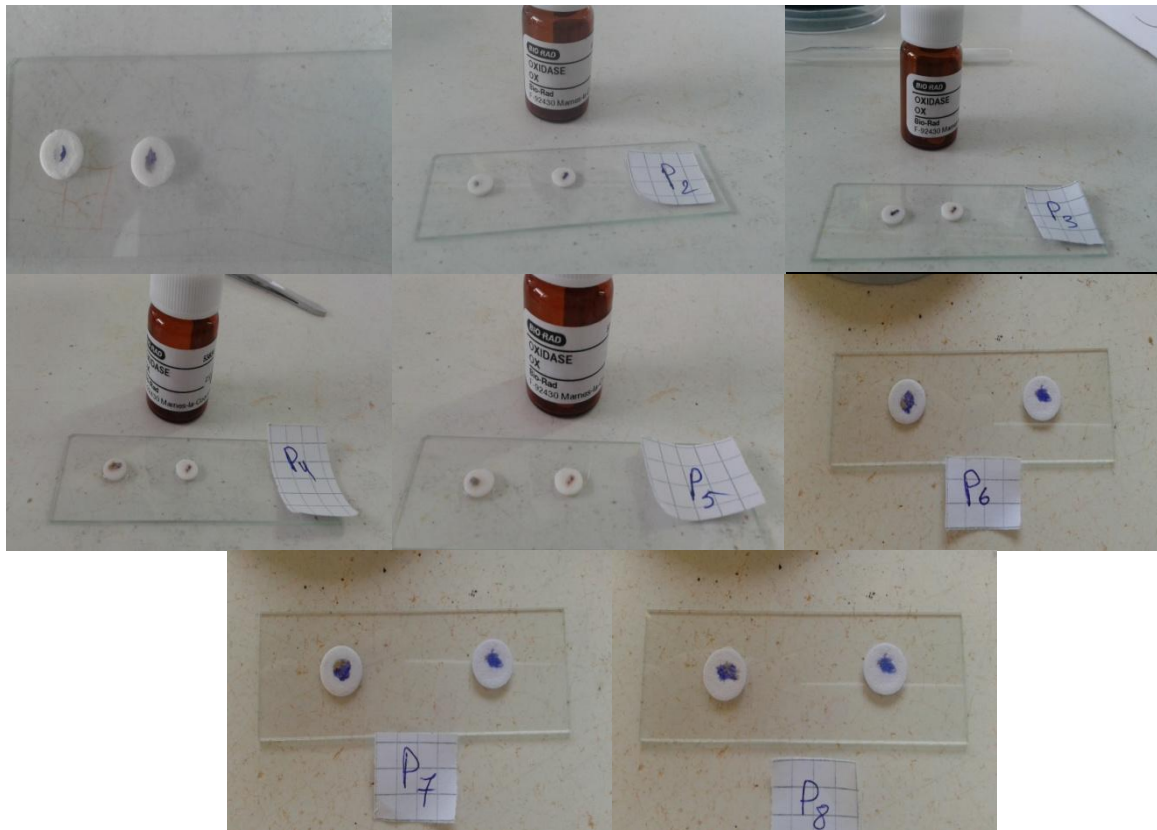


Figure 6 : Résultats du test d'oxydase

Discussion

Une réaction positive se traduit par une coloration violette en environ deux minutes.

Les résultats finaux de la galerie biochimique classique sont présentés dans le tableau 6

Tableau 6 : Caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa*.

Oxy	Glu	Lac	Sach	Man	Urée	Indol	Cit	RM	VP	H2S	Gaz	Mobilité
+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+

Nos résultats sont identiques des résultats citées par Oulymata (2007).

III- L'antibiogramme

III-1- Résultats

Les résultats de l'antibiogramme obtenu pour chacune de nos 15 souches sont présentés dans le tableau 7

Tableau 7 : Résultats obtenus de l'antibiogramme pour les 15 souches de *P.aeruginosa* et leurs interprétations

	PRL 100µg	CAZ 30µg	CN 15µg	TIC 75µg	IPM 10µg	CIP 5µg	AK 30µg
P1 (1701)	32	25	23	21	25	40	28
	S	S	S	I	S	S	S
P2 (2391)	32	26	23	24	34	36	36
	S	S	S	S	S	S	S
P3 (2532)	28	26	18	22	25	32	22
	S	S	S	I	S	S	S
P4(2461)	27	25	21	18	26	34	24
	S	S	S	I	S	S	S
P5 (2548)	26	20	21	18	29	34	24
	S	S	S	I	S	S	S
P6 (1955)	30	24	21	18	24	36	23
	S	S	S	I	S	S	S
P7(1953)	32	26	20	22	28	36	26
	S	S	S	I	S	S	S
P8 (1830)	3	2	22	20	28	38	30
	S	S	S	I	S	S	S
P9(2129)	32	28	24	24	26	39	24
	S	S	S	S	S	S	S
P10 (2138)	26	26	18	12	24	38	22
	S	S	S	R	S	S	S
P11 (2136)	28	28	18	22	24	40	22
	S	S	S	I	S	S	S

Tableau 7 : Résultats obtenus de l'antibiogramme pour les 15 souches de *P.aeruginosa* et leurs interprétations (suite et fin)

P12 (2137)	24	24	16	22	24	32	20
	S	S	S	I	S	S	S
P13 (2139)	28	26	19	21	26	35	22
	S	S	S	I	S	S	S
P14(2142)	contaminé						
P15(2149)	contaminé						

S : souche sensible

R : souche résistante

I : souche a resistance intermédiaire

III-2- Discussion

Cette étude a été effectuée sur un collectif de 15 souches de bacilles à Gram négatif non fermentant *Pseudomonas aeruginosa* isolées au niveau de CHU de Constantine.

Dans la majorité des cas, *P. aeruginosa* a été isolé surtout chez des malades hospitalisés dans les services de réanimation, de chirurgie et d'ORL

Dans cette étude, les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une sensibilité élevée à tous les antibiotiques testés à l'exception de la ticarcilline dont 76,92% des souches sont à résistance intermédiaire et 7,69% sont résistantes.

La résistance à la ticarcilline est due probablement à un mécanisme non enzymatique, qui semble liée à l'association d'une faible perméabilité de la membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* et une hyper expression du phénomène d'efflux.

Cette résistance peut être expliquée par la forte consommation de la ticarcilline dans l'hôpital de Constantine, où ce composé est prescrit pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*

En ce qui concerne les Aminoglycosides, on remarque que l'Amikacine et la gentamicine restent toujours actifs. Cette constatation est aussi évoquée dans l'étude de Hamze et Dabboussi en 2004 qui ont trouvé que la sensibilité de *P. aeruginosa* est de 71,5% à l'Amikacine, 65,6 % à la gentamicine et 65,6 % à la tobramycine.

Le taux de résistance à la ciprofloxacine dans nos résultats (0%) est différent de celui observé dans une étude réalisée dans le laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques » de l'université Abou Bekr Belkaïd à Tlemcen durant la période 2005-2006 qui était 4,7% (DRISSI et al., 2011).

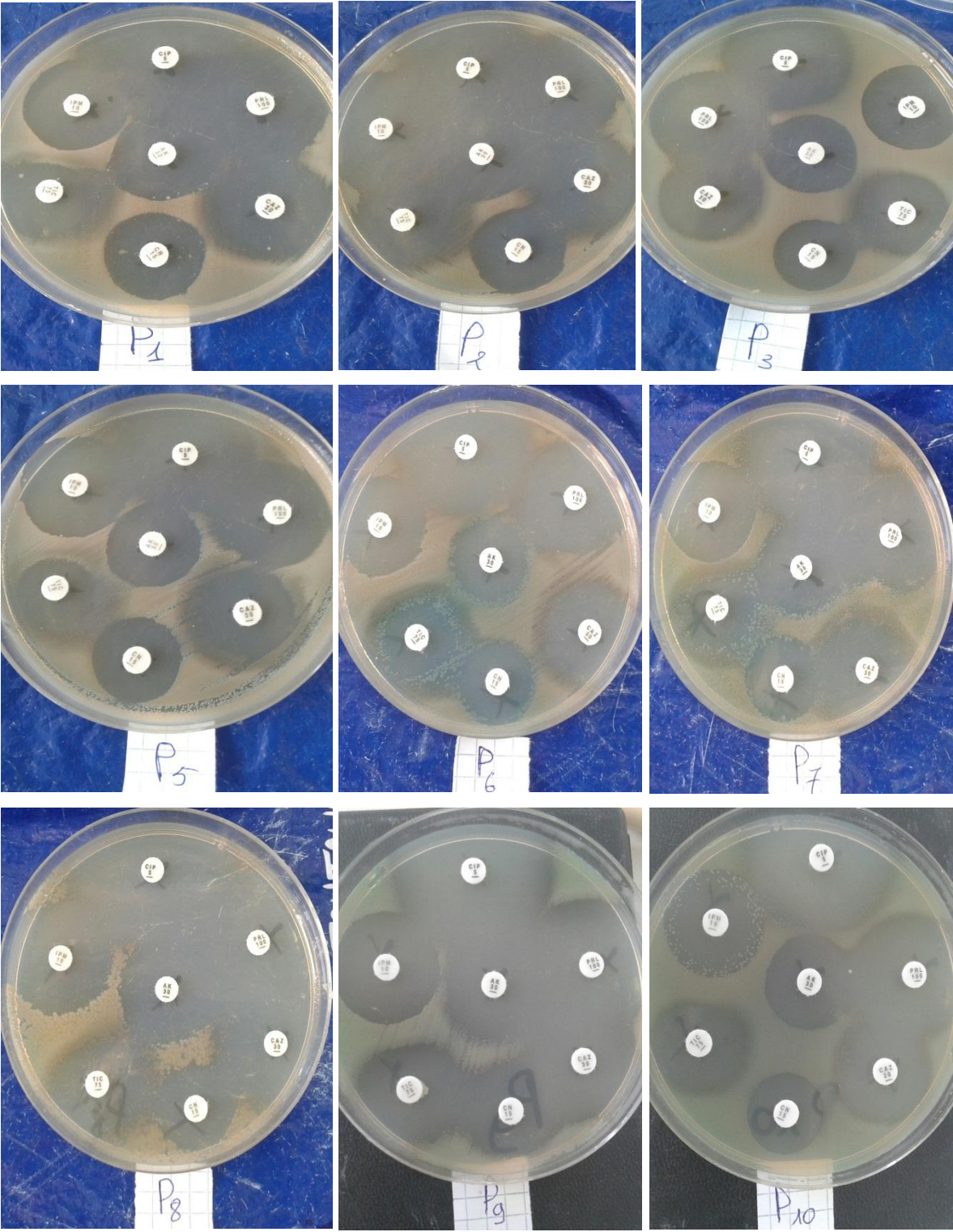


Figure 7. Résultats de l'antibiogramme

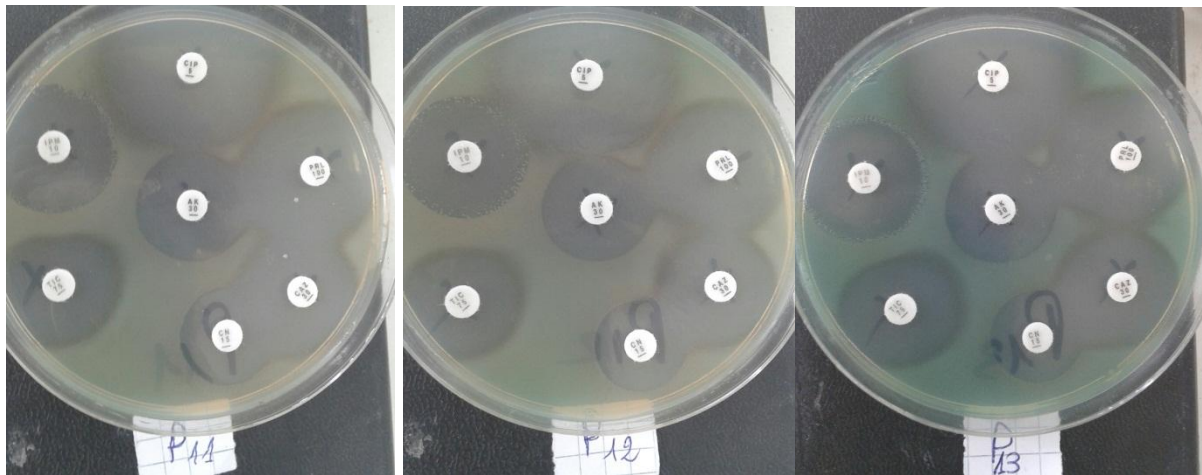


Figure 7. Résultats de l'antibiogramme (suite et fin)

IV- Galerie biochimique après antibiogramme

IV-1- Résultats

On a réalisé cette étape pour voir l'effet des antibiotiques sur les caractères cultureux et morphologique de *Pseudomonas*. Nous n'avons pas grand-chose à signaler sauf qu'il y a des souches (P2, P5, P6, P8, P9, P11, P12, P13) qui ont perdues leur pouvoir de mobilité et qu'elles sont devenues immobiles.

Parmi ces souches on distingue des souches sensibles et des souches qui ont devenus immobiles mais qu'elle reste toujours résistant

V- Induction des mutants par Ultra-Violets

V-1- Résultats

Après l'exposition des souches aux UV et après incubation à l'étuve pendant 24 heures à 37°C, les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 3

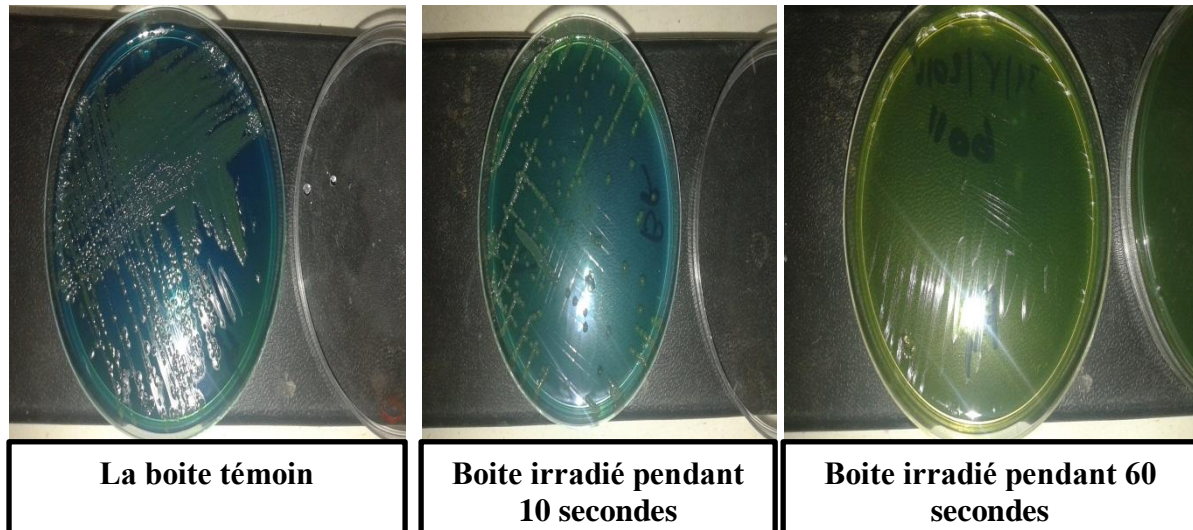


Figure 8. Les colonies de *Pseudomonas* après irradiation

V-2- Discussion

En comparant les boîtes irradiées avec la boîte témoin, on remarque que la boîte irradiée pendant 10 secondes contient des colonies de *Pseudomonas* mais le nombre est réduit par rapport au nombre sur la boîte témoin alors que la boîte irradiée pendant 60 secondes ne contient aucune colonie

On peut dire donc que les *Pseudomonas* sont sensibles aux UV et que leur survie après irradiation dépend du temps d'exposition aux rayons.

Conclusion

Conclusion

Les bacilles à Gram négatif non fermentants sont des germes responsables de pathologies variées, fréquentes et parfois redoutables. Ce caractère redoutable est dû en grande partie, au pouvoir toxique de ces agents infectieux et à leur grande capacité de résistance aux antibiotiques.

L'usage abusif des antibiotiques exerce une pression sur les micro-organismes, qui développent de la résistance par plusieurs mécanismes et donc le développement de nouvelles stratégies, et la découverte de cibles nouvelles constituent une nécessité évidente.

D'après les résultats de ce travail, l'analyse bactériologique des prélèvements cliniques émanant des différents services de CHU de Constantine a permis l'isolement des bactéries comportant des souches de *Pseudomonas aeruginosa* qui ont montré un profil de résistances à la ticarcilline.

L'analyse biochimique a montré que ces bactéries sont des oxydase+, lactose-, saccharose-, glucose-, H₂S-, gaz-, Citrate+, urée-, Indole-

La mutagenèse a montré que la survie bactérienne des *Pseudomonas aeruginosa* est en relation avec le temps d'irradiation et qu'ils sont donc sensibles aux UV.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

ALFANDARI S. 2014. Antibiothérapie curative-centre hospitalier de tourcoing - 155, rue du president coty - b.p. 619 - 59208 tourcoing cedex

AEBI C., BRACHER R., LIECHTI G S., TSCHAPPELER H., RUDEBERG A., KRAEMER R. 1995.The age at onset of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis prognostic significance. Eur J Pediatr .154, S69-73.

B

BALLMANN M., RABSCH P., VON DER HARDT H .1998. Long-term follow up of changes in FEV1and treatment intensity during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis.*Thorax* .53, 732–737.

BEN HAJ KHALIFA A., MOISSENET D., HOANG VU TH., KHEDHER M. 2011.Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. Ann Biol Clin

BERT F., BRANGER C., LAMBERT-ZECHOVSKY N. 2002.Identification of PSE and OXA bêta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. J Antimicrob Chemother.50: 11-8.

BOSSIS E., LEMANCEAU P., LATOUR X., GARDAN L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agronomie .20: 51-63.

BERTHELOT P., GRATARD F., MALLAVAL F O., ROS A., LUCHT F., POZZETTO. B.2005.Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia* . Pathol Biol Paris 53, 341-348.

BAGGE N., CIOFU O., HENTZER M. et al., 2002.Constitutive high expression of chromosomal betalactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. Antimicrob Agents Chemother;46: 3406-11.

C

CHAKER H. 2012 .Regulation de l'adaptation de la bacterie *Pseudomonas aeruginosa* a son hote : implication des metabolites du tryptophane.

CLAVE D. 2011. Fiche technique bactériologie *Pseudomonas aeruginosa* centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique.

Références bibliographiques

CRISTIAN C. 2008. Microbiologie hygiène bases microbiologique de la diététique. Tec et Doc Médicales internationales bossée f-94234 Cachan cedex.

CHANAWONG A., M'ZALI FH., HERITAGE J., LULITANOND A., HAWKEY PM. 2001.extended-spectrum bêta-lactamases in Gram-negative bacteria isolated in a university hospital in Thailand. J Antimicrob Chemother;48: 839-52.

D

DELARRAS C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.Tec & Doc Lavoisier. 476 pages

DRISSI M., BABA AHMED Z., BAKOUR R. 2011.Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques au niveau du service de neurochirurgie du C.H.U. de Tlemcen Algérie Phénotypes de résistance aux bêta-lactamines. Médecine du Maghreb. 184: 23-27.

DUBOIS V., ARPIN C., NOURY P., QUENTIN C. 2002.Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a bla (TEM-21) gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon.Antimicrob Agents Chemother;46: 3624-6.

E

EDELSTEIN M., PIMKIN M., PALAGIN I., EDELSTEIN I., STRATCHOUNSKI L.2003.Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum bêta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother;47:3724-32.

F

FAILLE A . 2010.Identification de composés naturels contre *Saprolegnia* sp un champignon pathogène en Aquaculture.arianne faille

FLORET D. 2009. Immunization: process of elaborating guidelines and their evolution in France.Ann Pharm Fr 67, 219-223.

G

GREEN S K., SCHROTH M N., CHO J., KOMINOS S K., VITANZA-JACK V B. 1974.Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol 28, 987-991.

GUILLAUME P.2004.La microbiologie Les tests enzymatiques antibiotiques et immunologiques.

H

HAAS D., DEFAGO G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat Rev Microbiol. 3: 307–319.

Références bibliographiques

HAMZE M., DABBOUSSI F., IZARD D. 2004. Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques : étude sur quatre ans (1998–2001) au nord du Liban. Médecine et maladies infectieuses.34 (7) : 321-324.

HOGARDT M., HEESEMANN J. 2010. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. Int J Med Microbiol 300, 557-562.

HOLLOWAY B. 1992. *Pseudomonas* in the late twentieth century In: *Pseudomonas, Molecular Biology and Biotechnology* .

HOIBY N. 1977. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl 262, 1–96.

HABS H., HABS M. 1968. Thermostable antigens of melanin producing *P. aeruginosa* strains. Zentralbl Bakteriol Orig;208: 283-8.

J

JEAN M.2004. evaluation et gestion des risques liés à *Pseudomonas aeruginosa* dans les établissements de thermalisme, L'Ecole Nationale de la Santé Publique (ENSP)

K

KRAMER A., SCHWEBKE I., KAMPF G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces A systematic review. BMC Infectious Diseases, 6 , 130. doi: 10.1186/1471-2334-6-130

KIPNIS E., SAWA T., WIENER-KRONISH J.2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Médecine et maladies infectieuses 36:78-91.

KETTNER M., MILOSOVIC P., HLETKOVA M., KALLOVA J. 1995. Incidence and mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O11 isolates. Infection ;23: 380-3.

L

LIVERMORE D M. 1995. bêta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev;8: 557-84.

LECLERC H. 2002. Presse therm climat bacteriologie de *pseudomonas aeruginosa*, Société française d'hydrologie et de climatologie médicales

LESNE R R.2002. presse therm climat pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* En dehors de la mucoviscidose

LAMONT I L., MARTIN L W. 2003. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 149:833-842.

Références bibliographiques

LEMANCEAU P., EXPERT D., GAYMARD F., BAKKER P., BRIAT J. 2009. Role of iron in plant–microbe interactions. *Adv. Bot. Res.* 51: 491-549.

LYCZAK J., CANNON C., PIER G. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 15, 194-222.

LEE T W., BROWNLEE K G., CONWAY S P., DENTON M., LITTLEWOOD J M. 2003. Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2, 29–34.

M

MAVRODI O., MCSPADDEN GARDENER B., MAVRODI D., BONSALE R., WELLER D., THOMASHOW L. 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* species. *Phytopathol.* 91: 35–43.

MUGNIER P., DUBROUS P., CASIN I., ARLET G., COLLATZ E. 1996. A TEM-derived extended-spectrum betalactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*;40: 2488-93.

MENA K., GERBA C. 2009. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environmental Contamination and Toxicology* 201:71-115.

MEZAACHE S. 2012. localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *pseudomonas* isolées de la rhizosphère de la pomme de terre.

MARCHANDIN H., JEAN-PIERRE H., DE CC., et al., 2000. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum bêta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*;44: 213-6.

MACLEOD D., NELSON L., SHAWAR R., et al. 2000. Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J Infect Dis*;181: 1180-4.

MILLER G., SABATELLI F., HARE R., et al. 1997. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis*;24 Suppl 1: S46-S62.

N

NAIL S., AKERS M. 2002. *Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals*. New York, NY, USA : Kluwer Academic / Plenum Publishers.

NAAS T., PHILIPPON L., POIREL L., RONCO E., NORDMANN P. 1999. An SHV-derived extended-spectrum bêta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*;43:

1281-4.

P

PALLERONI N. 1984. Manual of Systematic Bacteriology. USA, pp. 141–171.

PLESIAT P. 2011. GDR pseudomonas centre national de la recherche scientifique

PIER G., RAMPHAL R. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* In: Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA. pp 2587-2615,

PROESMANS M., BALINSKA-MISKIEWICZ W., DUPONT L., BOSSUYT X., VERHAEGEN J., HØIBY N., BOECK K. 2006. Evaluating the “Leeds criteria” for *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis centre. *Eur Respir J* 27, 937–943.

PRESSLER T., BOHMOVA C., CONWAY S., DUMCIUS S., HJELTE L., HØIBY N., KOLLBERG H., TÜMMLER B., VAVROVA V. 2011. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition: EuroCareCF Working Group report. *J Cyst Fibros* 10, S75-78.

PIER G B. 2002. CFTR mutations and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Curr Opin Microbiol* 5, 81-86.

POIREL L., et al. 1999. Extended-spectrum bêta-lactamase-producing strain of *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient in France. *J Antimicrob Chemother* ;43: 157-8.

PIER G B. 2000. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8822-8828.

S

STOVER CK., PHAM XQ., ERWIN AL., MIZOGUCHI SD., WARRENER P., HICKEY MJ et al., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*;406(6799) : 959-64.

T

TOUATI M. 2013. Antibio-résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba

V

VASIL M L.1986. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *JPediatr* 108, 800-805.

VENTRE I., GOODMAN A L., VALLET-GELY I., VASSEUR P., SOSCIA C., MOLIN S., BLEVES S., LAZDUNSKI A., LORY S., FILLOUX A.2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 171-176.

Références bibliographiques

VISCA P., IMPERI F., LAMONT I L.2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. Trends Microbiol. 15: 22–30.

W

WELLER D M., LANDA B., MAVRODI O V., SCHROEDER K L., DE LA FUENTE L., BLOUIN-BANKHEAD S B., ALLENDE-MOLAR R., BONSALL R F., MAVRODI D V., THOMASHOW L S.2007. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. Plant Biol. 9: 4-20.

WILLCOX M D. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* infection and inflammation during contact lens wear : a review. Optometry and Vision Science : Official Publication of the American Academy of Optometry, 84 (4), 273-278. doi :10.1097/OPX.0b013e3180439c3e

WOODS D E. 2004.Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Trends Microbiol.; 12: 437-439.

Y

YOSHIDA H, NAKAMURA M, BOGAKI M, NAKAMURA S. 1990.Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother;34: 1273-5.

Z

ZINI S., LAGRIFFOUL A.2006.Note complémentaire au rapport « Risques sanitaires liés aux baignades artificielles » se rapportant à la valeur limite en *Pseudomonas aeruginosa*, Agence nationale de sécurité sanitaire Alimentation, Environnement, Travail

ANNEXS

-Composition des différents milieux

- Bouillon nutritif

Composition(grammes/litre)

Extrait de levure	4,0
Tryptone	5,0
Glucose.....	50,0
Dihydrogénophosphate de potassium	0,55
Chlorure de potassium.....	0,425
Chlorure de calcium.....	0,125
Sulfate de magnésium	0,125
Chlorure ferrique	0,0025
Sulfate de manganèse.....	0,0025
Vert de bromocrésol	0,022
pH 5,5 ± 0,2	

- Muller Hinton

Milieu relativement riche, mais qui reste un milieu de base qui permet la culture des bactéries non exigeantes.

Composition(grammes/litre)

Infusion de viande de bœuf....	300 mL
Peptone de caséine.....	17,5
Amidon de maïs.....	1,5
Agar.....	17
pH final = 7,4	

- Héктоéne

Milieu sélectif pour l'isolement des bactéries à Gram négatif

Composition(grammes/litre)

Peptone.....	12
Extrait de levure.....	3
NaCl.....	5
Sels biliaries.....	9
Thiosulfate de sodium.....	5
Citrate de fer ammoniacal.....	1,5
Lactose.....	12
Salicine.....	2
Saccharose.....	12
BBT.....	0,002
Fuchsine acide.....	0,1
Agar.....	14

pH final = 7,5

- Citrate de Simmons

Composition(grammes/litre)

Sulfate de Mg.....	0,2
Phosphate monoammoniaqué.....	1
Phosphate bipotassique.....	1
Citrate de sodium.....	2
NaCl.....	5
BBT.....	0,08
Agar.....	15

pH=6,8

- **TSI**

Composition (grammes/litre)

peptone.....	15,0 g
extrait de viande.....	3,0 g
extrait de levure.....	3,0 g
peptonepepsique de viande.....	5,0 g
glucose.....	1,0 g
lactose.....	10,0 g
saccharos.....	10,0 g
rouge de phénol.....	0,024 g
chlorure de sodium.....	5,0 g
sulfate de fer II (Pasteur).....	0,2 g
thiosulfate de sodium.....	0,3 g
agar.....	11,0 g

pH = 7,5

- **Mannitol mobilité**

Composition (grammes/litre)

Peptone trypsique de viande.....	20
Mannitol.....	2
RP 1%.....	4mL
Nitrate K.....	1
Agar.....	4

pH = 7,6-7,8

- **Urée indole**

Composition (grammes/litre)

Tryptophane.....	3
Urée.....	20
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
NaCl.....	5

Alcool à 95°10 mL

Rouge de phénol.....2,5 mL

- **Mc Conkey**

Milieu sélectif pour l'isolement des bactéries à Gram négatif

Composition (grammes/litre)

Peptone de caséine.....17

Peptone de viande.....3

Sels biliaires.....1,5

Cristal violet.....0,001

Lactose.....10

Rouge neutre.....0,03

NaCl.....5

Agar.....13,5

pH final = 7,1

Tableau1 : Liste des antibiotiques et leur famille

Antibiotique	Famille
Ciprofloxacine (CIP 5 μ g)	Fluoroquinolones/ quinolones de deuxième génération
Gentamicine (CN 15 μ g)	Aminosides/ Les déoxystreptamines bisubstituées 4-6
Amikacine (AK 30 μ g)	Aminosides/ Les déoxystreptamines bisubstituées 4-6
Imipenème (IPM 10 μ g)	β -lactamines/Carbapénèmes
Ticarcilline (TIC 75 μ g)	β -lactamines/ Pénames/ Carboxypénicillines
Pipéracilline (PRL 100 μ g)	β -lactamines/ Pénames/ Uréidopénicillines
Ceftazidime (CAZ 30 μ g)	B-lactamines / Céphèmes/ Les céphalosporines de Troisième génération

-Tableau2 : Référence pour la lecture de l'antibiogramme

Table de lecture 2' : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Ticaracilline	75 µg	≤ 15	16 - 23	≥ 24	≥ 128	32 - 64	≤ 16	<p>Les valeurs critiques pour la pipéracilline et la ticaracilline (avec ou sans ac.clavulanique), sont basées sur une posologie inférieure à 3g toutes les 6 heures.</p> <p>Détecter une BLSE en plaçant le disque de TCC entre le disque de CAZ et le disque d'AZM (voir chapitre tests complémentaires).</p> <p>L'application des breakpoints pour les céphalosporines dépend du respect de posologies précises.</p> <p>Ceftazidime et Aztréonam : 1 g toutes les 6h ou 2g toutes les 8h.</p> <p>Il est recommandé d'informer les infectiologues, pharmaciens, comité</p> <p>Valeurs critiques basées sur une posologie de 1g toutes les 8heures ou 500mg toutes les 6heures.</p>
Ticaracilline + ac.clavulanique	75/10	≤ 15	16 - 23	≥ 24	≥ 128/2	32/2- 64/2	≤ 16/2	
Pipéracilline	100	≤ 14	15 - 20	≥ 21	≥ 128	32 - 64	≤ 16	
Ceftazidime	30 µg	≤ 14	15 - 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	
Aztréonam	30 µg	≤ 15	16 - 21	≥ 22	≥ 32	16	≤ 8	
Impipénème	10 µg	≤ 15	16 - 18	≥ 19	≥ 8	4	≤ 2	
Amikacine	30 µg	≤ 14	15 - 16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16	
Gentamicine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4	
Nétilmicine	30 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 32	16	≤ 8	
Tobramycine	10 µg	≤ 12	13 - 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4	
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 - 20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1	
Lévofloxacine	5µg	≤ 13	14 - 16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2	
Fosfomycine **	50µg + 50µg G6P	< 14	-----	≥ 14	> 32	----	≤ 32	<p>Tester avec un inoculum 0,5MF dilué au 1/10^{ème} - ne pas prendre en compte la présence de colonies dans la zone d'inhibition</p>
Rifampicine **	30 µg	< 14	14 - 18	≥ 19	> 16	16-8	≤ 4	<p>Tester avec un inoculum 0,5MF dilué au 1/10^{ème}</p>
Colistine	10µg	≤ 10	-----	≥ 11	≥ 8	4	≤ 2	

Nom : Boudouda

Prénom : Rahma

**Thème : Caractérisations biochimique, microbiologique et mutagenèse
de *Pseudomonas aeruginosa***

Résumé :

Pseudomonas aeruginosa est l'un des pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales graves, d'infections potentiellement mortelles chez les personnes immunodéprimées et d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose.

La présente étude réalisée sur 15 souches de *P.aeruginosa* a révélé que ces souches sont résistantes à la ticarcilline

La caractérisation biochimique a montré que ces bactéries sont des oxydase+, lactose-, saccharose-, glucose-, H₂S-, gaz-, Citrate+, urée-, Indole-

La mutagenèse par UV a révélé la sensibilités et la mort des souches en exposant au UV a une longue durée

Mots clés :

P. aeruginosa - AntibioGramme - Mutagenèse

Soutenu le : 16.06.2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme SATTI. D

Professeur- UFM Constantine 1.

Rapporteur : Mme BECHKRI. S

MAA- UFM Constantine 1.

Examineur : Mme SAOUDI. M

MAA- UFM Constantine 1.

Résumé :

Pseudomonas aeruginosa est l'un des pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales graves, d'infections potentiellement mortelles chez les personnes immunodéprimées et d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose.

La présente étude réalisée sur 15 souches de *P.aeruginosa* a révélé que ces souches sont résistantes à la ticarcilline

La caractérisation biochimique a montré que ces bactéries sont des oxydase+, lactose-, saccharose-, glucose-, H₂S-, gaz-, Citrate+, urée-, Indole-

La mutagenèse par UV a révélé la sensibilité et la mort des souches en exposant au UV a une longue durée

Mots clés :

P. aeruginosa - Antibiogramme - Mutagenèse