

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLAB -Blida 1

Faculté des sciences de la nature et de la vie



Département de biologie

Faculté des sciences de la nature et de la vie Département de biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de master dans le domaine SNV filières sciences biologiques

Option : Microbiologie

Thème

Activité anti biofilm des *Acinetobacter baumannii* vis-à-visles *Staphylococcus aureus*

Soutenu le Dimanche 16 juillet 2023

Présenté par

M^{lle} Djaoui Sihem

M^{lle} Mazouzi Chahinez

Devant le jury :

Mme Hmaidi -Chergui.F

Professeur / USDB1

Présidente

Mme Lounaci .L

MCB / USDB1

Examinatrice

Mme Ait saadi .N

MCA / USDB1

Promotrice

Mr Abidi . M

Co promoteur

Doctorant

Promotion 2022-2023

Remerciement

Tout d'abord, nous souhaitons exprimer notre gratitude envers le Tout-Puissant « Allah », pour nous avoir donné la force, le courage, la volonté et la patience nécessaire à l'accomplissement de ce travail et de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous tenons à remercier tout d'abord Mme Ait Saadi. N d'avoir accepté notre encadrement. Votre dévouement, professionnalisme et passion ont été remarquable tout au long du projet, et nous sommes extrêmement reconnaissantes de vous avoir eu comme partenaire dans ce projet. Votre capacité à anticiper les défis et à trouver des solutions créatives étaient remarquables et ont grandement contribué à la réussite de ce projet. Nous désirons exprimer notre profonde gratitude et souligner, votre excellente communication et votre disponibilité tout au long du processus. Enfin votre souci du détail et votre recherche constante de l'excellence ont permis de livrer un mémoire de haute qualité qui répond pleinement à nos attentes.

Nos vifs remerciements s'adressent également à notre Co promoteur Mr Abidi.M pour le suivi assidu de ce travail et l'apport inestimable de ses efforts. Votre précieuse contribution a permis d'améliorer la qualité de notre travail et de garantir son aboutissement dans les meilleures conditions.

Par ailleurs nous remercions le membre de jury Mme Hmaidi F pour avoir bien voulu accepter de présider le jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines

Nos sincères remerciements s'adressent à Mme Lounaci.L d'avoir consacré un temps pour lire et examiner ce mémoire. Je tiens à exprimer ma sincère gratitude envers vous en tant qu'examinatrice pour votre précieuse contribution et votre évaluation attentive lors de mon examen.

Nos remerciements les plus chaleureuses s'adressent à toute l'équipe du laboratoire central de l'hôpital de Koléa qui ont aidé à la réalisation de ce travail ainsi que le laboratoire biologique de recherche protection et valorisation des ressources microbiologiques à l'université de Saad Dahlab Blida 1 particulièrement Mme Selma pour sa précieuse participation et sa patiente lors de la réalisation de ce projet .

Dédicace



Tout d'abord je tiens à remercier le bon dieu de m'avoir donné la force et la capacité de terminer ce modeste travail que Je dédie à

Mon papa **Mourad** et ma maman **Wahiba**

Pour tous les sacrifices que vous avez faits, pour tout ce que vous m'avez donné. Pour tout votre amour et préoccupation, pour toutes les fois que vous m'avez soutenu et encouragé durant ces longues années d'études.

Aujourd'hui, je veux vous remercier pour les parents que vous êtes, Merci. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mes profondes reconnaissances.

À l'ame de mon grand père

A ma seconde maman, ma tante **Meriem**

A mes frères, **Nacim** et **Mehdi**

Ma meilleur amie **Hiba** qui a rendu mes cinq ans de fac mémorables, Tu es la meilleure chose qui ne me soit jamais arrivée. Merci.

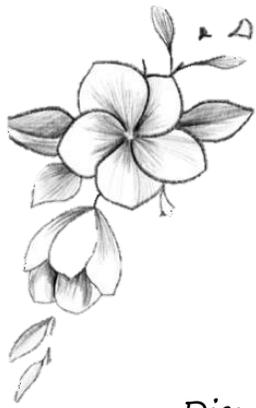
Et à ma chère binôme **Chahinez** qui a partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail.

A ma famille, mes proches amis de ma promotion microbiologie 2023 qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ceux que j'aime



Sihem



Dédicace

En tout premier lieu, je souhaite exprimer ma gratitude envers le Bon Dieu, qui m'a accordé la volonté et m'a guidé tout au long de mon parcours afin d'atteindre mon objectif

Je prie pour que ce travail puisse être utilisé pour apporter du bien et de la valeur à ceux qui le découvriront, et que cela puisse contribuer à Sa gloire

*Je dédie ce modeste travail à mon cher père **Abdelkader** et ma chère mère **Nabila** qui ont consacré leurs vie à me soutenir et à m'encourager dans mes études. Leurs amour inconditionnel, leurs sagesse et Leurs patience ont été une source d'inspiration constante pour moi.*

*A ma meilleur amie, ma sœur **Meriem***

*A mes frères **Ibrahim** et **Islem***

*A ma binôme **Sihem**, ta présence a été une source d'inspiration et de motivation. Ensemble, nous avons formé une équipe solide, nourrie par la confiance mutuelle et la communication efficace. Tu as su apporter des idées inovatrices, des compétences complémentaires et un esprit de collaboration qui ont contribué à notre succès.*

*A toutes ma famille, mes amis particulièrement **Raounak** et **Imane** à mes chères cousines **Amina** et **Rabéa***

Chahinez



Résumé

Les infections nosocomiales causées par le biofilm de *Staphylococcus aureus* représentent un problème majeur au sein des établissements hospitaliers. Notre travail vise à l'étude de l'activité anti biofilm des extraits de deux souches formatrices de biofilm d'*A.baumannii* vis-à-vis de *S.aureus* .Les résultats obtenus montrent que parmi les prélèvements positifs, nous avons isolé à partir des patients hospitalisés 32 (17%) souches d'*A. baumannii*, et 46 (24%) souches de *S. aureus* .

L'évaluation de la sensibilité de quarante-six souches de *S.aureus* isolées vis-à-vis les antibiotiques a montré que 26 (56.5%) souches sont résistantes à la méthiciline .

La capacité de toutes les souches isolées à former le biofilm a été confirmé par la méthode qualitatif Rouge Congo Agar (RCA) et par la méthode quantitative Tissue Culture Plate (TCP) , Parmi 32 souches de *S.aureus* nous avons enregistré 20(63.15%) souches de *S.aureus* sont productrices de biofilm par les deux méthodes .

Le test de l'activité anti biofilm des extraits bruts des souches (ACTG et P1) a été effectué par la méthode de coloration par le cristal violet sur microplaque. Les résultats ont permis de marquer une variabilité en termes d'activité anti biofilm des extraits de deux souches d'*A.baumannii* sur les dix souches cibles de *S.aureus* (MRSA) .Le meilleur taux d'inhibition (62%) a été marqué par l'extrait éthyle acétate de la souche ACTG avec une concentration de 50 mg/ml vis-à-vis de la souche 139S de *S.aureus* . Le dosage des polyphénols totaux l'extrait ACTGEA (2,955 ± 0,01 mg EAG/mg d'acide ascorbique) et l'évaluation de l'activité anti oxydante de cette extrait pourrait expliqué la réduction de la formation de biofilm chez *S.aureus* .

Mots-clés : *A.baumannii* , Anti biofilm , infection nosocomiale , *Staphylococcus aureus*

Abstract

Nosocomial infections caused by *Staphylococcus aureus* biofilm are a major problem in hospitals. Our work aims at studying the anti-biofilm activity of the extracts of two biofilm forming strains of *A.baumannii* against *S.aureus*. The results obtained show that among the positive samples, we isolated 32 (17%) *A. baumannii* strains and 46 (24%) *S. aureus* strains from hospitalized patients.

The evaluation of the sensitivity of forty-six strains of *S. aureus* isolated to antibiotics showed that 26 (56.5%) strains are resistant to methicillin(MRSA).

The ability of all isolated strains to form the biofilm has been confirmed by the qualitative method Red Congo Agar (RCA) and the quantitative method Tissue Culture Plate (TCP). Among 32 strains of *S.aureus* , we have recorded 20 (63.15%) strains of *S.aureus* are biofilm producers by both methods.

The test of the anti-biofilm activity of the raw extracts of the strains (ACTG and P1) was carried out by the method of staining by crystal violet on microplate. The results showed a variability in the anti-biofilm activity of the extracts of two *A.baumannii* strains on the ten target *S.aureus* (MRSA) strains. The best inhibition rate (62%) was marked by the ethyl acetate extract of the ACTG strain with a concentration of 50 mg/ml against the 139S strain of *S.aureus* .The determination of total polyphenols($2,955 \pm 0,01$ mg EAG/mg acide ascorbique)and the evaluation of the antioxidant activity of this extract could explain the reduction of biofilm formation by *S.aureus* .

Keywords: *A.baumannii*, Anti biofilm, nosocomial infection, *Staphylococcus aureus*

الملخص:

تعد العدوى المكتسبة في المستشفيات التي تسببها الأغشية الحيوية للمكورات العنقودية الذهبية مشكلة كبيرة في المستشفيات يهدف عملنا إلى دراسة النشاط المضاد للغشاء الحيوي لمستخلصات الأغشية الحيوية لسلاطين اسينتوبكتر بوماني المكونة للأغشية الحيوية ضد سلالات ستافيلوكوكس اوريوس (س ا م م). تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أنه من بين العينات الإيجابية، قمنا بعزل 32 (17%) سلالات اسينتوبكتر بوماني و 46 (24%) من سلالات ستافيلوكوكس اوريوس من المرضى في المستشفى. تقييم حساسية ستة وأربعون سلالة ستافيلوكوكس اوريوس المعزولة للمضادات الحيوية أظهرت أن 26 (56%) سلالة مقاومة (MRSA) (للمتيسيلين). تم تأكيد قدرة جميع السلالات المعزولة على تكوين الأغشية الحيوية من خلال الطريقة النوعية لأجار الكونغو الأحمر (ا ك ا) وطريقة الكمية لصفحة القشرية للأنسجة (ص ق ا). من بين 32 سلالة من ستافيلوكوكس اوريوس، سجلنا 20 سلالة 15.63% (من ستافيلوكوكس اوريوس منتجة للأغشية الحيوية بكلتا الطريقتين). اختبار نشاط المضاد الغشاء الحيوي للمستخلصات الخام للسلالات اسينتوبكتر بوماني (ب 1 و ا س ت ج) تم بطريقة تليخ البلورة البنفسجية على الصفيحة الدقيقة. أظهرت النتائج تباينا من حيث فعالية المضاد الغشاء الحيوي لمستخلصات سلالات اسينتوبكتر بوماني على السلالات العشرة ل ستافيلوكوكس اوريوس (س ا م م). تم تمييز أفضل معدل تثبيط (62%) من خلال مستخلص أسيتات الإيثيل من سلالة (ا س ت ج) بتركيز 50 ملغم/مل مقابل سلالة ستافيلوكوكس اوريوس س. 139 تحديد البوليفينول الكلي (مغ/ مكافئ ايتيل اسيتات مغ 2.955 ± 0.01) و تقييم نشاط المضاد للأكسدة لهذا المستخلص يمكن تفسيره بتقليل تكوين الأغشية الحيوية لستافيلوكوكس اوريوس.

الكلمات الرئيسية: ستافيلوكوكس اوريوس , العدوى المكتسبة في المستشفيات , المضاد للغشاء الحيوي

Liste de abréviations

ADNe: Acide désoxyribonucléique extracellulaire

AH: antioxydant donneur d'hydrogène

AHL : N-Acyl-homoserine lactones

CIT: trisodium citrate

DMSO: solvant diméthylsulfoxyde

DOT: densité optique du Témoin

EAG: extrait ACTG EA

EDS: eau distillée stérile

ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterobacter spp*

EXS: extrait sec

GEL: gélatine

GLU: D-glucose

IP: pourcentage d'inhibition

KESC: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* et *Citrobacter*

MMP : métalloprotéinases matricielles

Nuc1: nucléase majeure

PAC: acide phényacétique

PAVM: pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM)

PIA: polysaccharide adhésine intercellulaire

PLP: Protéines de liaison aux Pénicilline

ROS: espèces réactives d'oxygène

SFM: Société Française de Microbiologie

VCE: l'équivalence en vitamine C

Liste des figures

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Développement et structure d'un biofilm bactérien | 5 |
| Figure 2 : Visualisation de <i>S. aureus</i> en microscopie à balayage à différents grossissements (x3000 à x40 000) | 6 |
| Figure 3 : Effet de ROS et les antioxydants sur la régulation des gènes impliqué dans la formation de biofilm..... | 14 |
| Figure 4 : La structure générale de la molécule N-acyl homoserine lactone (AHL)..... | 17 |
| Figure 5 : Schéma du mécanisme du "quorum sensing" chez <i>A. baumannii</i> | 17 |
| Figure 6 : Les étapes d'identifications bactérienne..... | 19 |
| Figure 7 : Les étapes de la méthode quantitative de biofilm (TCP) | 19 |
| Figure 8 : Schéma qui résume les étapes de la préculture des souches <i>d'A.baumannii</i> | 30 |
| Figure 9 : La pré culture d' <i>A.baumannii</i> | 31 |
| Figure 10 : Centrifugation et filtration..... | 31 |
| Figure 11 : Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des biomolécules <i>d'A.baumannii</i> | 32 |
| Figure 12 : Les étapes de l'extraction | 33 |
| Figure 13 : Schéma représentant le test d'activité anti biofilm des extraits bruts d' <i>A.baumannii</i> vis à vis des <i>S.aureus</i> par la technique de microplaque..... | 34 |
| Figure 14 : Taux de positivité des prélèvements..... | 36 |
| Figure 15 : Répartition des souches cliniques..... | 37 |
| Figure 16 : Répartition des souches d' <i>A.baumannii</i> et de <i>S.aureus</i> selon la nature des prélèvements | 37 |
| Figure 17 : Répartition des souches de <i>S.aureus</i> et <i>d'A.baumannii</i> selon les services..... | 38 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 18 : Aspect macroscopique des <i>S.aureus</i> | 39 |
| Figure 19 : Aspect de colonies de <i>S.aureus</i> sur milieu Baird-Parker | 40 |
| Figure 20 : Aspect microscopique des <i>S.aureus</i> sous microscope optique(grossissement) x 100), après coloration de Gram | 40 |
| Figure 21 : Aspect de la réaction du test de la catalase..... | 41 |
| Figure 22 : Résultat de test coagulase libre | 41 |
| Figure 23 : Résultat de test coagulase liée | 41 |
| Figure 24 : Résultats de l'identification par Galerie API 20 Staph | 42 |
| Figure 25 : Aspect macroscopique des colonies d' <i>A.baumannii</i> | 42 |
| Figure 26 : l'aspect d' <i>A.baumannii</i> sur Uri Select..... | 43 |
| Figure 27 : Aspect microscopique des cellules d' <i>A.baumannii</i> sous microscope optique (Grossissement x100)..... | 43 |
| Figure 28 : Aspect de Test d'oxydase chez l' <i>A.baumannii</i> | 44 |
| Figure 29 : Résultats de l'identification d' <i>A.baumannii</i> par la galerie miniaturisée | 44 |
| Figure 30 : Diagramme des taux de souche SARM..... | 45 |
| Figure 31 : Le taux de résistance et de sensibilité de <i>S.aureus</i> vis à vis quelques antibiotiques..... | 46 |
| Figure 32 : Zones d'inhibition vis-à-vis <i>S.aureus</i> | 46 |
| Figure 33 : Le taux de résistance et de sensibilité des <i>A.baumannii</i> vis à vis quelques antibiotiques..... | 47 |
| Figure 34 : : Zones d'inhibition vis-à-vis <i>A.baumannii</i> | 47 |
| Figure 35 La production de Slime chez les souches <i>S.aureus</i> sur Rouge Congo | 48 |
| Figure 36 : L'aspect des colonies d' <i>A.baumannii</i> sur Rouge Congo..... | 49 |
| Figure 37 : Résultat de la production de biofilm par la méthode TCP | 50 |
| Figure 38 : Les résultats de la production de biofilm chez les souches de <i>S.aureus</i> et <i>A.baumannii</i> | 50 |
| Figure 39 : Les taux d'inhibition des extraits bruts des <i>A.baumannii</i> (P1EA, ACTGEA) sur la formation du biofilm des <i>S. aureus</i> | 52 |
| Figure 40 : Les taux d'inhibition des extraits bruts des <i>A.baumannii</i> (P1HEX, ACTGHEX) sur la | |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| formation d40u biofilm des <i>S. aureus</i> | 53 |
| Figure 41 : Effet de l'extraits ACTGEA sur la formation du biofilm des <i>S.aureus</i> | 54 |
| Figure 42 : Résultat des dilutions de l'acide gallique après 5min d'incubation | 55 |
| Figure 43 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique..... | 56 |
| Figure 44 : Le résultat de virage de couleur de notre échantillon..... | 56 |
| Figure 45 : Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique | 57 |
| Figure 46 : Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH* de l'extrait ACTG EA | 57 |

Liste des tableaux

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Tableau I : Les facteurs de virulence chez <i>S.aureus</i> | 7 et 8 |
| Tableau II : Les maladies liée au biofilm de <i>S.aureus</i> | 11 |
| Tableau III : Origine des prélèvements biologiques et services concernés | 18 |
| Tableau IV : Résultats de l'identification biochimiques des souches isolées par la galerie Api Staph | Annexe III |
| Tableau V : Résultats de l'identification biochimique des souches isolées par a galerie Api 20 E et Api 20NE d' <i>A.baumannii</i> | Annexe III |
| Tableau VI : Les antibiotiques isolés vis-à-vis des souches d' <i>A.baumannii</i> | Annexe III |
| Tableau VII : Les antibiotiques isolés vis-à-vis des souches de <i>S.aureus</i> | Annexe III |
| Tableau VIII : Résistance et sensibilité des souches <i>A.baumannii</i> vis-à-vis des antibiotiques..... | Annexe III |
| Tableau IX : Résistance et sensibilité des souches <i>S.aureus</i> vis-à-vis des antibiotiques..... | Annexe III |
| Tableau X : Résultats de la détection de la formation de biofilm par <i>S.aureus</i> par la méthode RCA et par la technique TCP..... | Annexe III |
| Tableau XI : Résultats de la détection de la formation de biofilm par <i>A.baumannii</i> par la méthode RCA et par la technique TCP..... | Annexe III |
| Tableau XII : Résultats de l'activité anti biofilm des extraits (50mg/ml) des souches ACTG et P1 par l'hexane et l'éthyle acétate vis-à-vis des souches de <i>S.aureus</i> | Annexe III |
| Tableau XIII : Résultats de l'activité anti biofilm des extraits (10mg/ml) des souches ACTG et P1 par l'hexane et l'éthyle acétate vis-à-vis des souches de <i>S.aureus</i> | Annexe III |

Table des Matières

Remerciements

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

Chapitre I : synthèse bibliographique

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.1 Généralités sur les biofilms microbiens | 3 |
| 1.Le transport des cellules vers les surfaces | 3 |
| 2.Adhésion... .. | 3 |
| 3.Croissance | 4 |
| 4.Maturation... .. | 4 |
| 5.Dispersion... .. | 5 |
| I.2. <i>Staphylococcus aureus</i> et Biofilm | 5 |
| I.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 5 |
| I.2.2. La formation de biofilm chez <i>S.aureus</i> | 9 |
| I.2.3 La régulation de la formation du biofilm staphylococcique par le système "quorum sensing " | 9 |
| I.2.4. Les composants de la matrice du biofilm de <i>S.aureus</i> | 9 |
| I.2.5. Résistance de biofilm de <i>S.aureus</i> aux antibiotiques..... | 10 |
| I.2.6.les maladies liées au biofilm de <i>S.aureus</i> | 11 |
| I.3.Traitements actuels et nouvelles approches thérapeutiques | 12 |
| I.3.1. Bactériophage | 12 |
| I.3.2. Molécules déclenchant la dispersion des biofilms..... | 12 |
| I.3.3. Les nanoparticules | 12 |
| I.3.4. Les peptides antimicrobiens (AMP) | 13 |
| I.3.5 Antioxydants comme source alternative pour le contrôle des biofilms..... | 13 |
| I.3.6. Inhibiteurs du biofilm d'origine bactérien..... | 14 |
| I.4. <i>Acinetobacter baumannii</i> | 15 |
| I.4.1. Généralités sur <i>Acinetobacter baumannii</i> | 15 |

| | |
|----------------------------------------------------------------|----|
| I.4.2. Formation de biofilm chez <i>A.baumannii</i> | 16 |
| I.4.3. Molécules du Quorum sensing de <i>A.baumannii</i> | 16 |

Chapitre II : Matériel et méthodes

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| II.1. Matériel..... | 18 |
| II.1. 1. Matériel non biologique | 18 |
| II.1. 2. Matériel biologique | 18 |
| II.2. Méthodes..... | 19 |
| II.2. 1. Isolement des souches à partir des prélèvements biologiques..... | 19 |
| 1. Mise en culture des prélèvements... .. | 19 |
| A. Mise en culture des prélèvements sur milieu Baird-Parker... .. | 20 |
| B. Mise en culture des prélèvements sur milieu UriSelect... .. | 20 |
| II.1.2. Purification des souches... .. | 21 |
| II.1.3. Identification des souches cliniques... .. | 21 |
| A. Examen macroscopique..... | 21 |
| B. Examen microscopique | 21 |
| C. Identification biochimique des <i>S.aureus</i> | 21 |
| D. Identifications biochimiques des <i>Acinetobacter baumannii</i> | 24 |
| II.1.4. Détermination de la sensibilité des <i>S.aureus</i> et des <i>A.baumannii</i> aux antibiotiques..... | 26 |
| II.1.5. Conservation des souches isolées..... | 27 |
| II.2. Etude de l'activité anti biofilm de l'extrait des <i>A.baumannii</i> vis-à-vis les <i>S.aureus</i> | 27 |
| II.2.1. Sélection des souches formatrices de biofilm... .. | 27 |
| A) La méthode de Rouge Congo Agar (RCA)..... | 27 |
| B) Formation de biofilms de tissus culture plate (TCP)... .. | 28 |
| II.2.2. Extraction des métabolites secondaires à partir de souches formatrices de biofilm <i>d'A.baumannii</i> | 29 |
| A. Préparation de la pré culture des deux souches <i>d'A.baumannii</i> | 30 |
| B. Centrifugation et Filtration... .. | 31 |
| C. Extraction à partir de surnageant..... | 31 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.2.3. Evaluation de l'activité anti biofilm des extraits bruts des <i>A.baumannii</i> vis-à-vis de <i>S.aureus</i> | 33 |
| A. Dosage des polyphénols totaux dans l'extrait de la souche ACTG par acétate d'éthyle (ACTGEA)..... | 35 |
| B. Evaluation de l'activité anti oxydante in Vitro de l'extrait ACTG | 36 |

Chapitre III : Résultats et discussion

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.1. Résultats | 36 |
| III.1. 1.Résultats de la répartition..... | 37 |
| 1. Taux de positivité des prélèvements | 37 |
| 2.Répartition des souches cliniques | 38 |
| 3. Répartition des souches d' <i>A.baumannii</i> et de <i>S.aureus</i> selon la nature des prélèvements..... | 38 |
| 4. Répartition des souches d' <i>A.baumannii</i> et de <i>S.aureus</i> selon les services..... | 39 |
| III.1.2. Isolement et identification des souches cliniques | 40 |
| 1. Identification des <i>S.aureus</i> | 40 |
| A. Examen macroscopique | 40 |
| A.1 Examen macroscopique sur gélose Chapman et GSC | 40 |
| A.2 Examen macroscopique des <i>S.aureus</i> sur milieu sélectif Baird-Parker | 40 |
| B. Examen microscopique | 41 |
| C. Identification biochimique | 41 |
| C.1. La recherche de la catalase | 41 |
| C.2. Recherche de la coagulase en tube..... | 42 |
| C.3. Test de la coagulase liée (pastorex)..... | 42 |
| C.4. Identification biochimique par Galrie API Staph..... | 42 |
| 2. Isolement des <i>Acinetobacter baumannii</i> | 43 |
| A. Examen macroscopique | 43 |
| A.1. Examen macroscopique sur gélose Hektoen, GSC et GSF..... | 43 |
| A.2.Examen macroscopique sur milieu Uri Select | 44 |
| B. Examen microscopique | 44 |
| C. Identification biochimique des <i>A.baumannii</i> | 44 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| C.1. Test d'oxydase..... | 44 |
| C.2 Identification biochimique par la galerie Api 20 E et Api 20NE | 45 |
| 2. Détermination de la sensibilité des <i>S.aureus</i> et des <i>A.baumannii</i> aux antibiotiques | 46 |
| A. <i>S. aureus</i> | 46 |
| B. <i>A.baumannii</i> | 48 |
| III.1.3. Etude de l'activité anti biofilm de l'extrait des <i>A.baumannii</i> vis-à-vis les <i>S.aureus</i> | 49 |
| 1. Sélection des souches formatrices de biofilm | 49 |
| A) Sélection des souches formatrices de biofilm par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA).49 | |
| B) Sélection des souches formatrices de biofilm par la technique Tissue culture plate (TCP)..... | 50 |
| III.1.4. Evaluation de l'activité anti biofilm des extraits bruts des <i>A.baumannii</i> vis-à-vis de <i>S.aureus</i> | 52 |
| 1. Evaluation de l'activité anti biofilm des extraits bruts des deux souches (ACTG et P1) (50 mg /ml) vis-à-vis les souches de <i>S.aureus</i> | 52 |
| 1. Extrait brut par acétate d'éthyle..... | 52 |
| 2. Extrait brut par Hexane | 54 |
| 2. Evaluation de l'activité anti biofilm de l'extrait brut ACTG EA (10 mg /ml) vis-à-vis les souches de <i>S.aureus</i> | 55 |
| A. Dosage des polyphénols totaux de l'extrait ACTG..... | 56 |
| B. Evaluation de l'activité anti oxydante de l'extrait ACTG EA par DPPH | 57 |
| III.2 Discussion | 59 |
| Conclusion | 70 |

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

La formation de biofilm par les bactéries est un phénomène qui n'est étudié que depuis relativement peu de temps ; avant, elles ont été considérées comme vivantes en mode libre dit « planctonique ». Cependant, la majorité d'entre elles peuvent se trouver sous forme de biofilms (**Bjarnsholt et al., 2013**). Ces derniers sont des communautés microbiennes fixées à une surface, caractérisées par une architecture complexe et englobés dans une matrice adhésive constituée d'exopolysaccharides (**Rather et al., 2021**).

Les biofilms sont largement répandus et se développent dans tous types d'environnements (**Flemming et Wuertz, 2019; Schulze et al., 2021**). Dans certains secteurs, ils jouent un rôle écologique majeur et contribuent au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes comme leurs implications dans la colonisation du tractus gastro-intestinal. Cependant, dans d'autres secteurs, ils sont identifiés comme une source de lourds problèmes. En effet, leur développement a conduit à l'émergence des infections nosocomiales (IN). Les Instituts nationales de santé ont révélé que parmi 65 % des infections microbiennes et 80 % des infections chroniques, sont associées à des biofilms bactériens (**Jamal et al., 2018 ; Yan et Bassler, 2019**).

Les biofilms bactériens sont devenus un contributeur essentiel aux problèmes de santé mondiaux en raison de la résistance aux antibiotiques, au système de défense immunitaire de l'hôte et d'autres pressions externes (**Zhao et al., 2023**).

L'une des bactéries à Gram positif la plus impliquée dans les infections nosocomiales et communautaires est *Staphylococcus aureus* ; cela revient à leurs capacités d'adhérer aux implants médicaux et aux tissus de l'hôte (**Oliveira et al., 2018 ; Suresh et al., 2018**).

Les biofilms de *S. aureus*, une fois établis, réduisent la sensibilité aux antimicrobiens et aux défenses immunitaires de l'hôte, ce qui rend ces infections plus difficiles à éradiquer. Même si un certain nombre de mécanismes de formation du biofilm de *S. aureus* ont été compris, il est toujours impératif d'en savoir plus et de développer de nouvelles stratégies afin de prévenir et de traiter ces biofilms staphylococciques (**Suresh et al., 2018**).

De nombreuses recherches actuelles s'intéressent à l'utilisation des molécules sécrétées par des bactéries, ayant un effet anti microbien ou anti biofilm, inspirée par la

découverte des mécanismes de compétition au sein d'un biofilm entre différentes bactéries. Des études actuelles ont montrés que l'agent pathogène *Acinetobacter baumannii* limite la croissance et la formation de biofilm des *Staphylococcus aureus*, par sa molécule de communication cellulaire "quorum sensing", N acyl homoserine lactone (James et al., 2016 ; Qazi et al., 2006) et par la synthèse de plusieurs métabolites secondaires (Muslim et al., 2016; Tiwari et al., 2018; Binbin et al., 2022).

Il est intéressant de noter que *S. aureus* et *A. baumannii* sont tous les deux connus pour être à l'origine d'infections nosocomiales, et font partie du groupe « ESKAPE », publié par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), à savoir : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Enterobacter spp* ; constituent actuellement un danger pour la santé humaine, étant donné leur degré de résistances aux antibiotiques (Lee et al., 2017).

Notre présent travail a pour objectif dans un premier temps, d'isoler et d'identifier les souches d'*Acinetobacter baumannii* et de *Staphylococcus aureus* de différents prélèvements de patients hospitalisés dans l'EPH de Koléa et l'évaluation de leur capacité à former un biofilm, selon les deux méthodes qualitative et quantitative.

Dans un deuxième temps, sélectionner parmi les *Acinetobacter baumannii*, les souches formatrices d'un fort biofilm, afin d'extraire de ces derniers les métabolites extracellulaires et enfin d'évaluer son activité anti biofilm vis à vis des *Staphylococcus aureus* formatrices de biofilm isolées de l'hôpital de Koléa.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1 Généralités sur les biofilms microbiens

C'est en 1684 que Antonie van Leeuwenhoek découvrit pour la première fois les biofilms, en observant la présence de micro-organismes agrégés dans le dépôt retrouvé sur ses dents (**Bjarnsholt et al., 2013**).

Mais ce n'est que vers 1978 que le terme "biofilm" a été proposé pour la première fois par Costerton et son équipe, et est défini comme un mode d'existence constituant un élément majeur de la biomasse bactérienne dans différents environnements, de puis la définition n'a pas cessé d'évoluer (**Costerton et al., 1978**).

Le développement du biofilm est une réponse à des signaux extracellulaires, soit présents dans l'environnement ou produits par les cellules bactériennes. Ce mode de vie est d'un grand intérêt pour la bactérie puisqu'il joue le rôle d'agent protecteur face au système immunitaire de l'hôte, la dessiccation et les biocides et semble également faciliter la communication intercellulaire ("quorum sensing") (**Hall-Stoodle et al., 2004 ; Rumbaugh et Sauer, 2020**).

Parmi les facteurs qui influence la formation de biofilm le changement de pH, l'osmolarité, la compétition perpétuelle pour l'accès aux nutriments, la variations chimiques, environnementales lors d'une infection (**Chalotte, 2022**) et le stress oxydatif (**Ong et al., 2018**).

La constitution d'un biofilm mature nécessite cinq grandes étapes (**Figure 01**) (**Guilhem et al., 2016**).

1. Le transport des cellules vers les surfaces

Le transport des bactéries vers le support, peut être réalisé grâce à des propriétés dynamiques du milieu, des propriétés physicochimiques de la surface du support, ainsi qu'à la mobilité chez certaines bactéries par différents appendices tels que les flagelles (**Donlan, 2001 ; Palmer et al., 2007**).

2. Adhésion

L'adhésion initiale bactérienne est une étape primordiale pour la mise en place d'un biofilm aux surfaces, elle est généralement divisée en deux phases, un attachement réversible devenant par la suite irréversible.

- **Adhésion réversible**

Lorsque les bactéries sont suffisamment proches de la surface à coloniser, des forces d'attraction physico-chimiques interviennent (interactions hydrophobes, liaisons de Van der Waals, forces hydrodynamiques et interactions répulsives électrostatiques) et conduisent à une interaction réversible (**Palmer et al., 2007 ; Carniello et al., 2018**).

- **Adhésion irréversible**

Il s'agit de l'adhésion secondaire qui se met en place par un contact plus stable et de courte distance entre la bactérie et le support, et fait intervenir de nombreuses structures d'adhésion selon le type du microorganisme. Ces molécules d'adhésion permettant aux bactéries de s'adhérer à la surface de manière irréversible (**Palmer et al., 2007 ; Li et al., 2021 ; Ruhul et Kataria, 2021**).

3. Croissance

Après avoir adhéré, les bactéries se multiplient pour former des microcolonies composées à la fois des bactéries initiales qui se divisent et d'autres bactéries qui s'attachent sur le biofilm en formation, qui vont continuer de se développer jusqu'à former des macrocolonies (**Roux et Ghigo, 2006 ; Muhsin et al., 2018**).

4. Maturation

Le stade de maturation correspond à la structuration du biofilm. Cette étape est également corrélée à la production d'exopolymères par les bactéries afin de former la matrice extracellulaire, elle serait le principal réservoir de nutriments aux microorganismes grâce aux molécules, qui la constitue, et contribuent aussi à leur survie et leur croissance. Un rôle de protection des microorganismes a été décrit pour la matrice extracellulaire (**Pallaval, 2018 ; Muhsin et al., 2018**). Une structure en trois dimensions émerge et les espaces entre les macrocolonies se réduisent, devenant ainsi des canaux aqueux du biofilm forment un réseau de circulation, permettant le transport des nutriments, de l'oxygène et d'évacuer les déchets bactériens (**Roux et Ghigo, 2006 ; Muhsin et al., 2018**). Au sein du biofilm les bactéries communiquent entre elles par un mécanisme de signalisation cellulaire connu sous le nom de "quorum sensing" pour contrôler leur densité de population à l'aide de molécules de signalisation appelées auto-inducteurs, elles facilitent également la transmission des mutations favorables dans la colonie de biofilm, améliorent l'accès aux ressources, la production de toxines et contribuent à la tolérance aux antibiotiques (**Muhsin et al., 2018 ; Pallaval, 2018 ; Alemu et al., 2021**).

5. Dispersion

Enfin, la dispersion du biofilm permettant aux bactéries libérées de coloniser d'autres surfaces et former de nouveaux biofilms. Ce détachement peut s'effectuer selon un phénomène passif ou actif. Lorsque le phénomène est passif, les bactéries se décrochent sous l'influence des forces d'érosion ou lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (manque d'oxygène et de nutriments). Concernant le phénomène actif le détachement des micro-organismes de la communauté microbienne est mise en place grâce à la mobilité bactérienne, la dégradation de la matrice ou la communication cellulaire "quorum sensing" (Pallaval, 2018 ; Muhsin et al., 2018 ; Rumbaugh et Sauer, 2020).

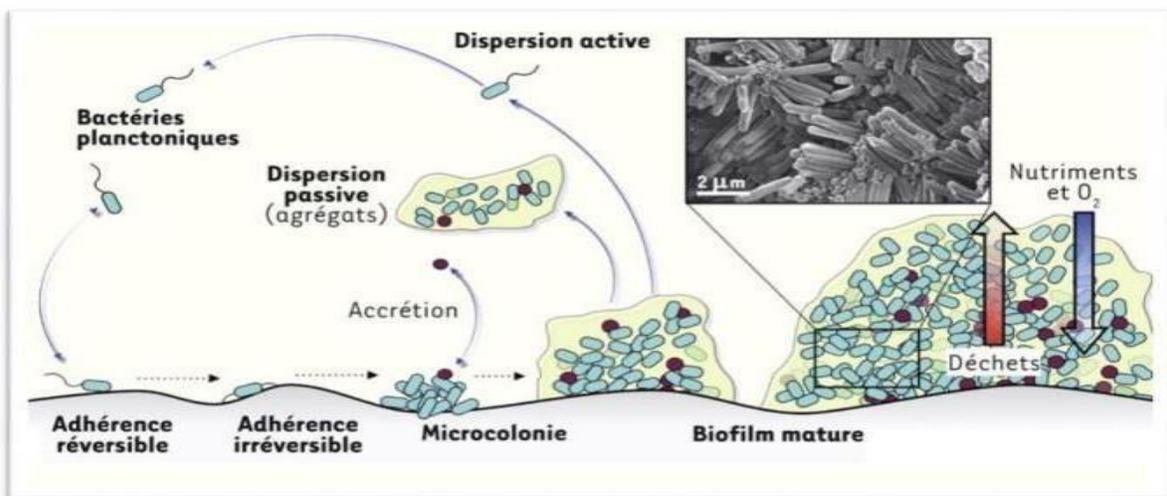


Figure 01 : Développement et structure d'un biofilm bactérien (Lebeaux et Ghigo, 2012).

I.2. *Staphylococcus aureus* et Biofilm

I.2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie qui a été décrite pour la première fois en 1880 en tant qu'agent étiologique d'abcès purulents par le chirurgien Alexander Ogston (Ogston, 1881). Elle peut causer de nombreuses maladies telles que des infections cutanées, des abcès, de l'impétigo, une pneumonie nécrosante, une septicémie et une athérosclérose. En particulier, les infections opportunistes dans les hôpitaux sont extrêmement graves (Zhou et al., 2018).

S. aureus appartient au règne Bacteria, au phylum de firmicutes, à la classe de Bacilli, ordre

Bacillales et à la famille des Staphylococcaceae . Cette espèce est commensale de la peau et les muqueuses, sa principale niche étant la fosse nasale (**Clotilde, 2015**).

Les staphylocoques sont des Cocci Gram positif, immobiles, isolés ou groupés en diplocoques, mais le plus souvent en amas plans de plusieurs éléments (le terme "staphylo" signifiant grappe de raisin en grec) (**Figure 02**). La grande majorité des souches de *S. aureus* possède une capsule (**Bouchard, 2013**).

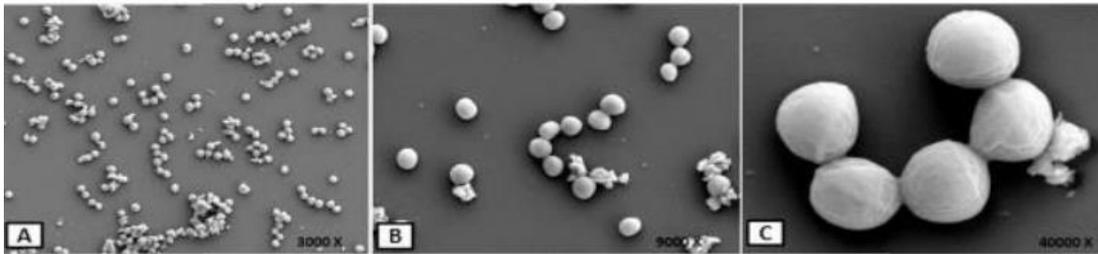


Figure 02 : Visualisation de *S. aureus* en microscopie à balayage à différents grossissements (x3000 à x40 000) (**Merghni et al., 2017**)

S.aureus manifeste un métabolisme aéro-anaérobie facultatif. Elle est halotolérante (croissance sur des milieux à 7% NaCl voire au-delà), ce caractère est utilisé pour son isolement et l'élaboration de milieux sélectifs (milieu Chapman). Cette bactérie présente une croissance robuste sur les milieux de culture de laboratoire courants en 18 à 24 heures à 37 °C (**Bouchard, 2013**).

Toutes les souches produisent une catalase , sont indole -, acétone +, uréase +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisant de l'ammoniaque à partir de l'arginine. De plus, la plupart des souches de *S. aureus* produisent de l'hémolyse bêta (**Touaitia, 2016**).

S.aureus fermente la plupart des sucres (glucose, saccharose, lévulose, lactose et mannitol). Le glucose est utilisé en anaérobiose et aérobie ainsi que le mannitol. L'utilisation du mannitol est une indication importante parce que ce polyalcool est fermenté par *S. aureus*. Ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylocoagulase. Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus* (**Touaitia, 2016**).

La pathogénie de *Staphylococcus aureus* repose principalement sur la production d'une gamme de facteurs de virulence. Les facteurs les plus étudiés sont consignés dans le **tableau I**.

Tableau I : Les facteurs de virulence chez *S.aureus*

| | Facteurs de virulence | | La cible | L'impact néfaste dans l'organisme (Hôte) | Les références |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Protéines de surface (Colonisation) | La protéine A | | l'immunoglobuline (Ig) (1) | influence à la fois les réponses innées et adaptatives (1) | (1)De Oliveira et al., 2020). |
| | La staphylocoagulase (Coa , Sak, vWBP) | | prothrombinee (1) | la coagulation sanguine | (1)De Oliveira et al., 2020). |
| Facteurs protégeant la bactérie de la phagocytose | La paroi | | Le système immunitaire (2) | Les acides téichoïques stimulent la sécrétion de cytokines par les cellules lymphomonocytaires, activent le complément et induisent l'agrégation plaquettaire (2) | (2)(Baggett et al., 2004). |
| | La capsule | | Le système immunitaire (3) | masquant la surface bactérienne et les protéines associées à la surface, (opsonines). (3) | (3)Kuipers et al., 2016; Lei et Lee, 2018). |
| Facteurs conduisant à l'extension de l'infection | Les toxines | Les hémolysines (α -, β -, γ - et δ)(4) | Erythrocytes (4) | lisent les erythrocytes en créant des pores dans les membranes des cellules hôtes(4) | (4)(Ahmad-Mansour et al., 2021) |
| | | PVL(Leucocidine de Panton - Valentine) | Neutrophile (5) | cytotoxine puissante qui une fois active elle provoque la lyse des neutrophiles en formant un pore sur leur membrane(5) | (5)(Shettigari et Murali, 2020) |
| | | Toxines exfoliatives (ETs) | Cellule de la peau (4) | syndrome de la peau écaillée staphylococcique | (4)(Ahmad-Mansour et al., 2021) |

| | | | | | |
|--------------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Facteurs conduisant à l'extension de l'infection | | | | (SSSS), connu sous le nom de maladie de Ritter(4) | |
| | | Superantigènes | Les lymphocytes B , les regions fc Fab des immunoglobulines VH3+ (Ig).(6) | Infection communautaire et hospitalière (6) | (Hu et al.,2020) |
| | | Les PSM (Phenol soluble Modulins) | les cellules hôtes (1) | À des concentrations élevées, ces petits peptides déstabilisent les bicouches lipidiques en raison de leur nature amphiphile (1) | (1) (De Oliveira et al.,2020) |
| | Les enzymes | Nucléase (DNase) Thermo nucléase | ADN cellulaire (7) | La nucléase staphylococcique fonctionne à la fois comme une endonucléase et une exonucléase (7) | (7)(Tam et Torres ,2019) |
| | | Staphylokinase (sak) | plasmine de l'hôte (8) | Activer plasminogène et dégrader les caillots de fibrine, favorisant ainsi la dissémination bactérienne (8) | (8)(De Haas et al ., 2004 ;Tam et Torres ,2019) |
| | | Hyaluronidase (hyaluronate lyase) | Acide hyaluronique (9) | Déstabilisation cellulaire et immunitaire (9) | (9)Ibersson et al .,2014) |

La résistance croissante constitue un autre obstacle dans le traitement de l'infection à *S. aureus*. Cette résistance à plusieurs antibiotiques leur confère la capacité d'échapper à l'action pharmacologique des antibiotiques. *S. aureus* était résistante aux β -lactames, mais des rapports récents ont indiqué que *S. aureus* est déjà résistant à la daptomycine et aux antibiotiques glycopeptides (teicoplanine et vancomycine), qui ont été utilisés pour traiter le SARM, en particulier dans les infections graves.

Le développement de gènes de résistance est l'un des mécanismes clé de résistance. La résistance à la méticilline ou aux céphalosporines est conférée par le gène *mecA* et ses gènes homologues *mecB* et *mecC* (Zhao et al., 2023).

I.2.2. La formation de biofilm chez *S.aureus*

La formation de biofilm chez *S. aureus* est un processus qui suit les mêmes étapes mentionnées précédemment.

Les phases d'exode, qui se déroulent pendant la phase de croissance est déclenchée par l'expression de la nucléase majeure Nuc1, ce qui entraîne la dégradation de l'ADNe contenue dans la matrice, permettant la libération d'une sous-population de cellules du biofilm. Les cellules restant dans le biofilm subissent ensuite une croissance rapide, ce qui conduit à la formation de la structure caractéristique en forme de tour des biofilms staphylococciques

(Figure 2) (Schilcher et Horswill, 2020).

I.2.3 La régulation de la formation du biofilm staphylococcique par le système "quorum sensing"

L'un des principaux régulateurs du développement du biofilm est le système QS. Chez *S. aureus*, il est responsable du passage de la formation du biofilm à son désassemblage (kong et al., 2006). Outre le système QS, un grand nombre d'indices environnementaux (par exemple, le pH, la disponibilité des nutriments et le stress oxydatif) ainsi que des systèmes de régulation (par exemple, Sae, SarA, Rot) sont impliqués dans la régulation de la formation du biofilm (Wolska et al., 2016 ; Ong et al., 2018). *S. aureus* utilise le système QS avec des peptides autoinducteurs (AIP) comme molécules de signalisation pour réguler l'expression de plusieurs facteurs de virulence ainsi que la biosynthèse des AIP en fonction de la densité de la population cellulaire. Le système QS staphylococcique est également connu sous le nom de système Agr. (Schilcher et Horswill, 2020).

I.2.4. Les composants de la matrice du biofilm de *S.aureus*

La matrice extracellulaire du biofilm de *S. aureus* est composée de diverses molécules et protéines. Parmi celles-ci, la poly-N-acétyl- β -(1-6)-glucosamine (PNAG), également connue sous le nom de polysaccharide adhésine intercellulaire (PIA), favorise la formation du biofilm et permet aux bactéries de se protéger contre le système immunitaire de l'hôte. L'adhésion à la surface et l'initiation de la formation du biofilm sont influencées par l'expression de plusieurs protéines, telles que les protéines ancrées à la paroi cellulaire (CWA), les modulines solubles dans le phénol (PSM)

et les modulines solubles dans l'eau (PIA), ainsi que des protéines cytoplasmiques recyclées présentes à la fois chez les souches sensibles et résistantes à la méthicilline (**Schilcher et Horswill, 2020**). Un troisième composant important est l'ADN extracellulaire (ADNe), libéré par les cellules par autolyse contrôlée, et considéré comme essentiel pour la stabilisation de la structure des biofilms de *S. aureus* (**Figure3**) (**Liu, 2021**).

I.2.5. Résistance de biofilm de *S.aureus* aux antibiotiques

En raison de la matrice extracellulaire, les antibiotiques ont du mal à atteindre les cellules les plus profondes, ce qui entraîne une distribution hétérogène des antibiotiques dans le biofilm. Parmi les facteurs qui affectent la pénétration des agents antibactériens dans les biofilms l'épaisseur du biofilm, les concentrations, la durée d'exposition et le taux de diffusion efficace à la réactivité des antibiotiques ainsi que la capacité d'adsorption du biofilm.

Les concentrations des antibiotiques autour des bactéries des couches profondes augmentent progressivement et l'exposition précoce à des concentrations sub-inhibitrices. Cette exposition peut favoriser l'entrée dans l'état persister, permettant ainsi aux bactéries de survivre aux concentrations létales ultérieures.

L'accumulation d'enzyme β -lactamase dans la matrice du biofilm est suffisante pour empêcher toute pénétration d'antibiotique de la famille de la pénicilline. L'eDNA dans la matrice du biofilm peut également modifier l'environnement extracellulaire. Par exemple, la réduction de Mg^{2+} favorise la protection des bactéries en réduisant la perméabilité des aminoglycosides et d'autres agents antibactériens positivement chargés (**Liu, 2021**).

Les bactéries en profondeur dans le biofilm se trouvent principalement dans un état dormant ou semi-dormant avec un métabolisme lent, car elles se trouvent dans un microenvironnement caractérisé par une carence en nutriments, un faible taux d'oxygène et une grande quantité de déchets métaboliques. Comme le taux de croissance est un facteur critique dans la susceptibilité des bactéries à de nombreux agents antimicrobiens, la division bactérienne inactive des bactéries en profondeur peut être la raison de l'efficacité limitée de certains antibiotiques, appelée "indifférence médicamenteuse". Des études ont montré que le métabolisme des cellules de *S. aureus* enfouis dans la couche profonde du biofilm est lent, ce qui augmente leur tolérance aux médicaments bactéricide (**Liu, 2021**).

I.2.6.les maladies liées au biofilm de *S.aureus*

Les maladies associées à la formation de biofilm par *Staphylococcus aureus* sont nombreuses. Parmi celles-ci, on peut citer quelques problèmes causés par le biofilm de cette espèce (**Tableau II**)

Tableau II : Les maladies liée au biofilm de *S.aureus*

| Les maladies liées à la formation de biofilm de <i>S.aureus</i> | Conséquences de la formation de biofilm par <i>S.aureus</i> | Références |
|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| L'ostéomyélite | <i>S. aureus</i> est le principal agent pathogène associé à l'ostéomyélite (1). Après la formation initiale du biofilm, le système immunitaire de l'hôte attaque les bactéries envahissantes, ce qui entraîne des lésions des tissus de l'hôte qui favorisent encore le développement du biofilm (2) | (1)(Lew et al., 2004., Muthukrishnan et al., 2019) (2)(Archer et al., 2011 ;Schilcher et Horswill, 2020). |
| Les infections liées aux matériels implants | La formation de biofilm sur les dispositifs médicaux à demeure (cathéter et implant) constitue un autre problème courant mais grave (3). En général, le dispositif ou l'implant à demeure est facilement recouvert par la matrice de l'hôte, ce qui permet l'attachement initial et la formation ultérieure d'un biofilm par <i>S. aureus</i> et d'autres staphylocoques(4) | (3)(Donlan, 2001 ;Trautner et Darouiche, 2004) (4)(Herrmann et al.,1988 ; Schilcher et Horswill, 2020) |
| Endocardite | Selon des études récentes, <i>S. aureus</i> est également devenu la principale cause d'endocardite infectieuse (EI) dans le monde (5) .Alors que le rôle des biofilms dans l'EI est évident lorsque l'EI est associée à un dispositif cardiaque implant (6) | (5)(Fowler et al., 2005 .,Cresti et al., 2017) (6)(Holland et al., 2016 ; Schilcher et Horswill, 2020) |
| Plaies chroniques | Les plaies chroniques comprennent les plaies associées au site chirurgical, les plaies traumatiques, les ulcères du pied diabétique, les ulcères de pression et les ulcères du pied veineux. <i>S. aureus</i> est souvent présent en tant que commensal à la surface de la peau, les bactéries des plaies chroniques sont souvent présentes sous forme de biofilms. il n'est pas surprenant qu'il s'agisse de l'agent pathogène le plus courant associé aux infections de plaies (93,5 % des ulcères) en Europe et aux États-Unis. En outre, 20 à 50 % des infections de plaies sont dues au SARM (7) | (7) (Bhattacharya et al., 2015) |

I.3. Traitements actuels et nouvelles approches thérapeutiques

La résistance décrite des cellules staphylococciques au sein d'un biofilm fait qu'il est très difficile d'éradiquer efficacement un biofilm une fois qu'il est formé (**Schilcher et Horswill, 2020**). Plusieurs recherches ont été entreprises ces derniers temps. Parmi les nouvelles approches thérapeutiques récemment découvertes, il convient de mentionner :

I.3.1. Bactériophage

Une autre stratégie pour lutter contre les infections associées aux biofilms consiste à utiliser des bactériophages, des virus qui infectent spécifiquement les cellules bactériennes (**Harper et al., 2014**). Les bactériophages produisent des endolysines, qui sont capables de dégrader le peptidoglycane bactérien, ce qui entraîne la lyse cellulaire et l'élimination du biofilm (**Becker et al., 2016**). Il existe trois approches possibles pour éradiquer les biofilms à l'aide de bactériophages : l'application d'un seul phage, l'application mixte de deux phages ou plus, et les combinaisons phage-antibiotique (**Schilcher et Horswill, 2020**).

I.3.2. Molécules déclenchant la dispersion des biofilms

En médecine clinique, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) peut moduler les métalloprotéinases matricielles (MMP) et a été ajouté aux pansements pour traiter les infections des plaies. L'EDTA a également un effet additif avec la gentamicine et lorsque l'EDTA est associé à Trométhamine (Tris), il peut augmenter la pénétration du médicament dans les micro-organismes en détruisant la paroi cellulaire bactérienne (**Liu, 2021**).

I.3.3. Les nanoparticules

Les nanotechnologies ont une importance considérable. Ces derniers jours en tant que véhicules d'administration d'antibiotiques. Le succès des nanoparticules en tant qu'agents thérapeutiques est attribué à leur petite taille (moins de 1 micromètre) et à leur rapport surface/masse plus élevé, qui facilitent les interactions efficaces avec les systèmes biologiques. Le domaine des nanotechnologies offre de nouvelles approches pour lutter contre les infections associées au biofilm de *S. aureus* (**Suresh et al., 2018**).

I.3.4. Les peptides antimicrobiens (AMP)

Les peptides antimicrobiens (AMP) sont des composants clés de l'immunité innée chez l'homme et d'autres organismes supérieurs. La plupart des PGA sont chargés positivement, de nature amphipathique et d'une longueur inférieure à 50 acides aminés. Les AMP peuvent se lier et perturber les membranes bactériennes. À ce jour, plus de 5000 AMP ont été découverts ou synthétisés. En plus de leur activité antimicrobienne, certains de ces AMP possèdent également une activité anti-biofilm contre *S.aureus* (Suresh et al., 2018).

I.3.5 Antioxydants comme source alternative pour le contrôle des biofilms

Les chercheurs sont intéressés à explorer d'autres méthodes pour éradiquer les biofilms, l'un de ces méthodes est la modulation des espèces réactives d'oxygène (ROS) dans les biofilms. Les ROS, comme le peroxyde d'hydrogène sont des sous-produits chimiquement réactifs de la respiration aérobie et sont des molécules de signalisation importantes non seulement dans les cellules humaines, mais aussi dans les micro-organismes. Une perturbation dans le cycle redox peut conduire à une accumulation de ROS, entraînant un phénomène reconnu comme stress oxydatif (Gambino et Cappitelli, 2016).

Le stress oxydatif peut également se produire lorsque les microorganismes sont exposés à des agents antimicrobiens ou à des facteurs de stress environnementaux. La formation des biofilms microbiens est souvent influencée par ces stress oxydatifs comme une forme de protection et de résistance pour la survie de la population microbiennes (Figure 03) (Ong et al., 2018).

Les antioxydants sont généralement définis comme des composés ayant des propriétés de neutralisation des radicaux libres. Leurs capacités à réagir avec les radicaux libres est attribuée à la présence de groupes fonctionnels phénoliques et poly-phénoliques. Ces composés peuvent facilement donner des électrons ou transférer des atomes d'hydrogène pour stabiliser les ROS qui sert de signaux réglementaires pour de nombreuses bactéries dans l'établissement du biofilm (Figure 03) (Carocho et Ferreira, 2013). Par conséquent, les composés qui pourraient cibler les régulateurs du stress oxydatif, tels que les antioxydants, pourraient potentiellement être exploités comme une nouvelle stratégie efficace pour inhiber la formation de biofilms et perturber les biofilms pré-formés et pour traiter les infections associées au biofilm à l'avenir (Ong et al., 2018).

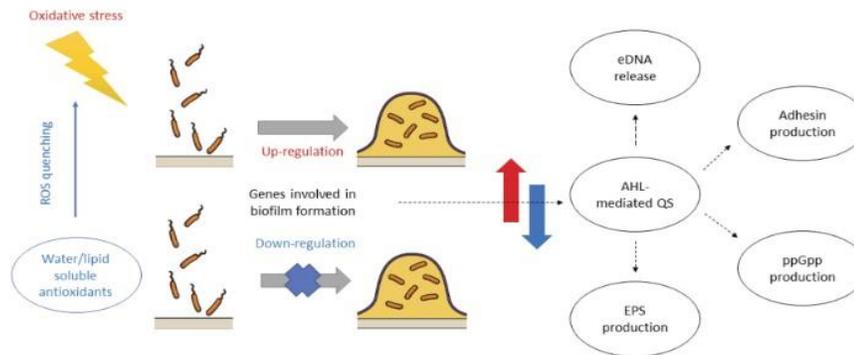


Figure 03 : Effet de ROS et les antioxydants sur la régulation des gènes impliqué dans la formation de biofilm (Ong *et al.*, 2018).

I.3.6. Inhibiteurs du biofilm d'origine bactérien

Les biofilms sont des communautés très compétitives à cause de l'espace et ressources limités, et certains micro-organismes présentent des capacités anti-biofilm, qui leur permettent de devenir dominants (Nadell *et al.*, 2016). Les différentes interactions bactériennes entre les membres des communautés des biofilms, comme la coopération et la concurrence, ont déjà inspiré la recherche d'alternatives d'antibiotiques anti biofilm contre les micro-organismes pathogènes. (Miquel *et al.*, 2016).

Les interférences bactériennes sont présentes à différents niveaux de développement du biofilm. Elles peuvent affecter l'adhésion primaire par la synthèse des bio surfactants ou des bio émulsifiants, ou la maturation par des phénomènes de compétition par la modification de leurs communication cellulaire QS ou leurs propriétés physiques des surfaces bactériennes impliqués dans les processus d'agrégation des cellules bactériennes, et enfin modifier la composition de la matrice ou induire la dispersion (Miquel *et al.*, 2016).

Le "quorum sensing" (QS) des bactéries à gram négative intervient dans la régulation de QS des bactéries gram positive en bloquant la communication entre ces bactéries. Cette méthode d'inhibition du QS est appelée "quorum quenching" (QQ). Permet ainsi d'intervenir au niveau des cellules bactériennes pour inhiber la production des auto inducteurs. Donc c'est une stratégie qui consiste à brouiller la communication des bactéries pour les empêcher de se synchroniser, en dégradant les molécules de QS, entraînant une diminution de la formation de biofilm (Sonia *et al.*,

2019).

Les activités anti-biofilm bactérienne peuvent être par des bactéries commensales, pathogènes ou probiotiques (Miquel et al., 2016). Les pathogènes humains associés au développement du biofilm comprennent les espèces du groupe « ESKAPE », produit des métabolites secondaires qui pourraient inhiber la croissance d'autres pathogènes du même groupe et augmenter leurs chances de survie en milieu hospitalier (Tiwari et al., 2018).

Acinetobacter baumannii est l'une des bactéries qui a montrée d'après plusieurs recherches des activité anti biofilm vis à vis des *S.aureus* par la production de métabolite secondaire (Muslim et al., 2016; Tiwari et al., 2018; Binbin et al., 2022), ou par ces molécule de (QS) N-acyl-homoserine lactones (Qazi et al., 2006 ; James et al., 2016).

I.4. *Acinetobacter baumannii*

I.4.1. Généralités sur *Acinetobacter baumannii*

Le genre *Acinetobacter* est actuellement inclus dans le domaine des Bacteria, phylum des Proteobacteria, classe des Gammaproteobacteria, ordre des Pseudomonadales et classé dans la famille des Moraxellaceae (Doughari et al., 2011)

Le genre *Acinetobacter* comprend des bacilles ou des coccobacilles à gram négatif (Erdem et Leber, 2018). Ils forment un groupe hétérogène de microorganismes ubiquitaires, associées à divers habitats, comme le sol, eaux usées, humaines, animales et alimentaires (Kurcik-Trajkovska, 2009 ; Doughari et al., 2011; Jung et Park, 2015).

Concernant l'*A.baumannii*, son réservoir naturel n'est pas connu. Il reste l'espèce la plus fréquemment isolée en milieu hospitalier en particulier dans les unités de soins intensif (Qutaiba et al., 2021). Il colonise plusieurs surfaces, y compris les instruments médicalement utiles, cathéters et sondes endotrachéales (Duarte et al., 2016), les blouses, les gants et les mains non lavées du personnel soignant (Morgan et al., 2010).

A.baumannii est à l'origine de diverses infections nosocomiales telles que les méningites, les péritonites, les infections du tractus urinaire ou des infections cutanées. ; mais les plus fréquentes sont les bactériémies et les pneumonies acquises sous ventilation mécanique

(PAVM) chez des patients hospitalisés dans les services de soins intensifs (Wong et al., 2017).

À l'heure actuelle, *A. baumannii* est considérée comme l'une des bacilles à Gram négatif les plus résistantes à plusieurs classes d'antibiotique disponibles. Ces résistances lui sont conférées par la synthèse d'enzymes de dégradation comme les B-lactamases de type céphalosporinase AmpC et oxacilinase OXA-51, ainsi que par la production de la chloramphénicol acétyltransférase CAT1 (Wong et al., 2017; Leal et al., 2020).

I.4.2. Formation de biofilm chez *A.baumannii*

Parmi les facteurs de virulences d'*A.baumannii*, la capacité de formation de biofilm est devenue la caractéristique majeure de sa pathogénicité, rendant le microorganisme l'une des principales causes d'infections nosocomiales dans le système de santé actuel (Moubareck et Halat, 2020).

L'un des facteurs influençant la formation de biofilm chez *A. baumannii*, est la signalisation par les molécules du "quorum sensing" (Alemu et al., 2021 ; Moubareck et Halat, 2020).

I.4.3. Molécules du Quorum sensing de *A.baumannii*

Chez les bactéries à Gram négatif, dont les bactéries du genre *Acinetobacter*, produisent des molécules signalétiques de la famille des N-acyl-homoserine lactones (AHLs). Ces derniers sont des petites molécules lipidiques neutres composées d'une chaîne carbonée de longueur variable pouvant comporter une ou plusieurs insaturations, et d'un noyau d'homosérine lactone) (Figure 4) (Chan et al., 2014).

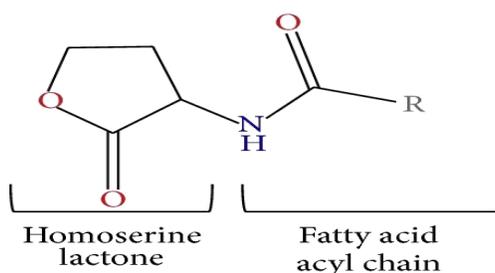


Figure 04 : la structure générale de la molécule N-acyl homoserine lactone (AHL)

(Chan et al., 2014).

Chez *A. baumannii*, le quorum sensing est médié par un système à deux composants, le système AbaI/AbaR. Ce système comprend la protéine senseur, AbaI qui fonctionne comme auto-inducteur synthase, et AbaR qui joue le rôle de protéine réceptrice pour les AHL induisant une cascade de signalisation (**Figure 05**) (Deepika et Pallaval, 2018).

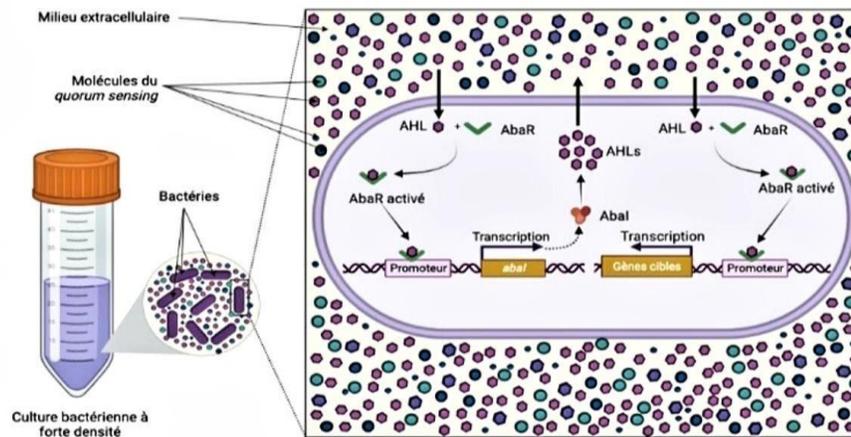


Figure 05 : Schéma du mécanisme du "quorum sensing" chez *A. baumannii* (Grace, 2021).

Matériel et méthodes

Notre travail qui consiste à étudier l’activité anti biofilm des souches d’*Acinetobacter baumannii* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* a été effectué pendant une période de 4 mois allant du février 2023 au mois de juin 2023, au niveau du laboratoire central de l’Etablissement Hospitalier de koléa et au niveau de laboratoire de recherche de Protection et Valorisation des Ressources Agrobiologique à l’université Saad Dahlab Blida 1.

II.1. Matériel

II.1. 1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique est représenté principalement par des appareillages, des verreries (**Annexe I**), des milieux de cultures, des disques d'antibiotiques et des réactifs (**Annexe II**).

II.1. 2. Matériel biologique

Les souches cliniques d’*Acinetobacter baumannii* et de *Staphylococcus aureus* ont été isolées à partir de différent prélèvements pathologiques (pus, Hémoculture, urine ...) de patients hospitalisés provenant de divers services au niveau de l’Etablissement Hospitalier de Koléa. Le (**Tableau III**) résume les différents prélèvements, leurs natures et les services concernés. **Tableau III** : Origine des prélèvements biologiques et services concernés

| | Réa | Chiru | Pédi | M.I | M.in | MA T | OR L | Nephro | UMC | Ortho | Total |
|-----------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| ECBU | 15 | 09 | 111 | 29 | 12 | 10 | 0 | 28 | 08 | 0 | 222 |
| LCR | 0 | 0 | 37 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 |
| Hémoculture | 07 | 0 | 10 | 03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 |
| Pus | 13 | 64 | 15 | 12 | 0 | 13 | 09 | 0 | 07 | 12 | 145 |
| Liquide d’ascite | 0 | 07 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 08 | 0 | 28 |
| L.B | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 |
| Otorrhée | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| KT | 08 | 07 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 07 | 0 | 22 |
| PV | 0 | 09 | 07 | 0 | 0 | 09 | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 |
| Total | 67 | 96 | 180 | 57 | 12 | 32 | 19 | 28 | 30 | 12 | 533 |

Réa : Réanimation ; **Chiru** : Chirurgie ; **Pédi** : Pédiatrie ; **M.in** :Maladies infectieuses ;**Mat** : maternité ;

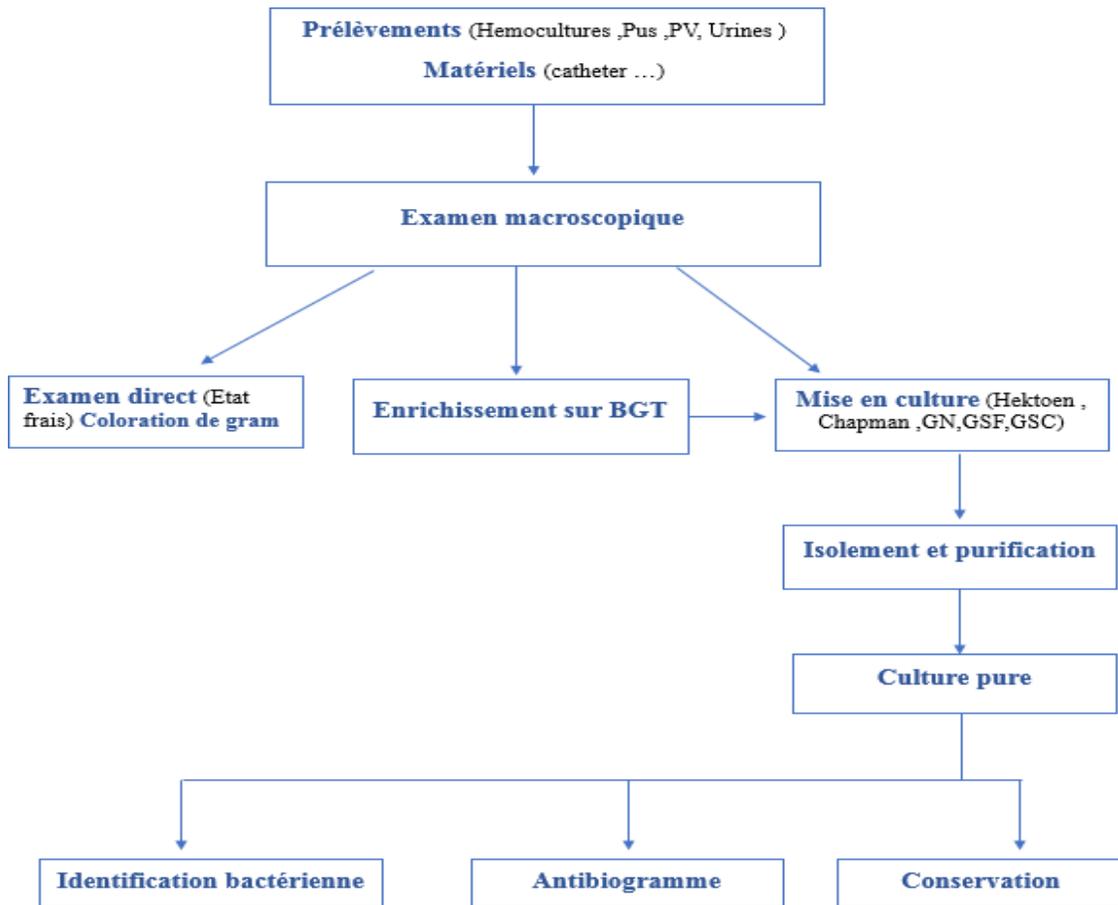
ORL : otorhinolaryngologie ; UMC : Urgences médicales et chirurgicales ; Ortho : Orthopédie ; Neph : Néphrologie ; M.I : Médecine interne.

II.2. Méthodes

II.2. 1. Isolement des souches à partir des prélèvements biologiques

Les étapes d’isolement et d’identification des souches d’*A.baumannii* et de *S.aureus* sont présentés dans la (Figure 06) .

Figure 06 : Les étapes d’identification bactérienne (Originale).



2. Mise en culture des prélèvements

Après avoir effectuée un examen macroscopique et microscopique des prélèvements reçus au laboratoire et représentée par un état frais et une coloration de Gram, afin de distinguer les prélèvements positives, on passe à la mise en culture.

La mise en culture des prélèvements positives a été réalisée sur la gélose au sang cuit, la gélose au sang frais, la gélose nutritive et les deux milieux sélectifs Chapman et Hektoen, préalablement coulé en boîte de pétri. L'ensemencement a été réalisée en surface par la technique de quatre stries permettant l'isolement des bactéries les unes des autres, puis incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures dans une étuve à l'exception des boîtes contenant de la GSF et GSC, qui ont été déposées dans une jarre en condition capnophile pour favoriser la multiplication des germes exigeantes .

A. Mise en culture des prélèvements sur milieu Baird-Parker

Gélose Baird-Parker est un milieu différentiel modérément sélectif qui a été signalé pour la première fois par **Baird-Parker (1962)**. Il permet l'isolement et l'énumération des *Staphylococcus aureus* issus d'échantillons alimentaires, environnementaux et cliniques (**Janet et al., 2003**).

- **Lecture**

Les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent de couleur noire, brillante, convexe, entourées d'un halo d'éclaircissement du jaune d'œuf.

B. Mise en culture des prélèvements sur milieu UriSelect

UriSelect™4 est un milieu chromogène non sélectif, pour l'isolement, la différenciation et la numération des germes pathogènes urinaires. UriSelect™4 permet la différenciation et l'identification directe des *Escherichia coli*, *Enterococcus spp* et *Proteus mirabilis* ainsi que l'identification présomptive d'autres agents pathogènes, en particulier les entérobactéries du groupe KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* et *Citrobacter*) et du groupe PMP (*Proteus-Morganella-Providencia*).

Les milieux contiennent à partir d'une gélose de base des mélanges chromogènes permettant de détecter des enzymes produites par les bactéries comme des bêta-glucosidases et des bêta-D galactosidases. Le milieu contenant du tryptophane et de la phénylalanine, en présence de tryptophane désaminase, les colonies sont brunes.

- **Technique**

A l'aide d'une pipette pasteur on met une goutte de liquide biologique qu'on souhaite l'identifier et on l'ensemence sur le milieu URI Select, par la méthode des quadrants

On incube la boîte à 37 °C pendant 24h.

II.1.2. Purification des souches

Après une période d'incubation, les colonies présentant des caractéristiques pouvant correspondre à celles des *staphylocoques* sur le milieu sélectif Chapman, ainsi que celles pouvant correspondre à des *Acinetobacter* sur le milieu sélectif Hektoen, sont isolées afin d'obtenir des souches pures en vue d'entamer la phase d'identification

II.1.3. Identification des souches cliniques

A. Examen macroscopique

Cet examen est principalement réalisé sur la gélose Chapman pour les *S. aureus* et sur la gélose Hektoen pour les *A. baumannii*. Il vise à étudier divers aspects des colonies bactériennes, tels que leur forme, leur taille, leur apparence de surface, leur élévation, leur opacité, leur contour et leur couleur. De plus, il permet d'évaluer la capacité de fermentation des sucres, notamment le mannitol pour la gélose Chapman et le lactose pour la gélose Hektoen.

B. Examen microscopique

❖ Coloration de Gram

L'étude microscopique des souches isolées est réalisée après une coloration de Gram. Cette technique de coloration est utilisée dans l'étude et la classification des bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, afin de déterminer leurs morphologies et leurs types de paroi (Denis et al., 2011)

➤ Lecture

Avec cette coloration double, les bactéries Gram positive apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram.

C. Identification biochimique des *S.aureus*

❖ La recherche de la catalase (Test d'orientation)

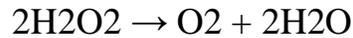
La mise en évidence de cette enzyme permet de distinguer parmi les Cocci à Gram positif les *staphylocoques* et les *streptocoques*. La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en H₂O et ½ O₂ (Prince, 2009).

➤ **Technique**

Après l'isolement sur le milieu Chapman de 24 h, on prélève une colonie bien distincte et on dépose sur une lame stérile, une goutte de solution fraîche d'eau oxygénée sera ajoutée à la colonie.

➤ **Lecture**

Une réaction positive est traduite par le dégagement immédiat des bulles de gaz (oxygène), selon l'équation suivante :



❖ **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* capables de coaguler le plasma humain ou de lapin (Prince, 2009).

➤ **Technique**

-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.

➤ **Lecture**

La coagulation se manifeste par la formation d'un coagulum, après 4h d'incubation. Ce test permet de différencier entre *S. aureus* (S. doré) à coagulase positive, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus epidermidis* (S. blanc) à coagulase négative.

➤ **Test de la coagulase liée (Pastorex)**

Test d'agglutination basé sur la détection de facteur agglutinant, protéine staphylococcique A et polysaccharides capsulaires

➤ **Technique :**

Une goutte de réactif de Pastorex Staph-plus test est déposée dans un des cercles de la carte d'agglutination et une autre goutte de réactif Pastorex test négatif est déposée sur un autre cercle.

à l'aide d'un bâtonnet jetable, une colonie est prélevée et l'émulsionnée dans la goutte de Pastorex avec une homogénéisation par rotation douce (**Prince, 2009**).

➤ **Lecture**

Une réaction positive se traduit par la formation d'agrégats.

❖ **Identification biochimique par la Galerie staph**

La galerie API 20 Staph de BioMérieux est un système standardisé pour l'identification des cocci à Gram positif du genre *Staphylococcus* (**Lecuire et al., 2007**), comprenant des tests biochimiques miniaturisés. Chaque bandelette de test se compose de 20 microtubes, y compris le puits de contrôle négatif.

➤ **Technique**

-Préparation d'une suspension d'opacité égale à 0,5 MF, à partir d'une culture jeune de *Staphylococcus* dans l'ampoule de milieu API Staph medium.

-On réunit le fond et le couvercle de la galerie et on répartit environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

-On remplit les tubules de la galerie avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement, en évitant la formation de bulles au fond des tubes, en posant la pointe de la pipette sur le côté de la cupule et en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

- On remplit d'huile de paraffine les cupules des deux tests soulignés (ADH, URE) pour former une anaérobiose.

-On ferme la boîte de la galerie et on incube à 35°C pendant 24 heures.

➤ **Lecture**

Après incubation, la lecture de la galerie se fait à l'aide du tableau de lecture de la galerie API staph, en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants :

- Test VP : VP 1 et VP 2. Attendre 10 minutes. Une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive. Une couleur rose pâle ou rose claire obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.

- Test NIT : NIT 1 et NIT 2. Attendre 10 minutes. Une coloration rouge indique une réaction positive.

- Test PAL : ZYM A et ZYM B. Attendre 10 minutes. Une coloration violette indique une réaction positive. Une couleur beige-rosé ou violet très pâle obtenue après 10 minutes doit être considérée négative

Noter les résultats sur la fiche de résultats et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel.

D. Identifications biochimiques des *Acinetobacter baumannii*

❖ Recherche du cytochrome oxydase

➤ Technique

Les bactéries dotées d'une chaîne respiratoire complète présentent une présence de cytochrome oxydase. La mise en évidence de cette oxydase est réalisée selon le protocole suivant

À l'aide d'une pipette Pasteur, on prélève une colonie de bactérie qu'on souhaite l'identifier, puis on la dépose sur un disque imprégné du réactif chlorhydrate de diméthylparaphénylène diamine (**Denis et al., 2016**).

➤ Lecture

Si la souche est oxydase positive, un complexe violet se forme au contact de cette enzyme. En revanche, si la souche est oxydase négative, aucun changement de couleur n'est observé.

❖ Identification biochimique par la Galerie Api 20 E

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et les non *Enterobacteriaceae*, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification.

➤ Mode opératoire

On humidifie en premier le fond de la galerie en mettant de l'eau distillée stérile dans les alvéoles. On prépare par la suite une suspension bactérienne à partir d'une culture jeune (18h à 24 h) d'*A.baumannii* . Les 20 cupules de la galerie sont remplies par la suspension de 0.5 Mc farland à l'aide d'une pipette pasteur pour éviter la formation des bulles au fond des tubes. On pose la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.

- pour les tests CIT , VP et GEL , remplir tube et cupule
- pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules),
- pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber à 36°C ± 2°C pendant 18-24 heures.

❖ Identification biochimique par la Galerie Api 20 NE

Api 20NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex ; *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* , *Moraxella* , *Vibrio* , *Aeromonas* ...) .Comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données.

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

➤ Mode opératoire

-Réunir fond et couvercle d'une boite d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillé ou déminéralisé dans les alvéoles pour crée une atmosphère humide.

A l'aide d'une pipette pasteur on prépare une suspension bactérienne d'opacité 0.5 MCfarland puis on remplit les tubes et non les cupules avec la suspension.

-Ouvrir une ampoule d'API AUX Medium et y transférer la suspension précédente et on homogénise le mélange avec une pipette pasteur en évitant la formation des bulles d'air

- On remplit tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontalement ou légèrement convexe mais jamais concave.
- Remplir les cupules des trois tests soulignées (GRU , ADH , UREE) par l'huile de paraffine
- Renfermer la boîte et incuber à 29°C pendant 24.

II.1.4. Détermination de la sensibilité des *S.aureus* et des *A.baumannii* aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité d'*A.baumannii* et de *S. aureus* aux différentes familles d'antibiotiques, a été réalisée par la méthode de diffusion des disques d'antibiotiques sur la gélose Mueller-Hinton (**Annexe II**) ; selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**Denis et al., 2016**).

❖ Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé à partir d'une culture pure de 18 à 24 heures. Quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. On décharge la pipette dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9 %. On homogénéise la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 MACFarland.

❖ Ensemencement

On ensemence les boîtes par méthode d'écouvillonnage. On trempe un écouvillon stérile dans la suspension, puis on l'essor en le pressant fermement contre la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum. On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface de milieu (MH), de haut en bas en stries serrées. On répète l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

A. 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. Les antibiotiques testés sont définis selon la bactérie recherchée (**Annexe III**).

B. Incubation

Les boîtes sont, ensuite, incubées en position retournée pendant 18 heures à 37°C.

C. Lecture et interprétation

On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle, puis on compare les résultats obtenus aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.

L'interprétation en sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par les recommandations SFM.

II.1.5. Conservation des souches isolées

Les souches d'*A.baumannii* et de *S. aureus* isolés sont conservées sur milieu GN, en gélose inclinée dans un tube par ensemencement en stries, après incubation à 30 °C pendant 24 à 72 heures, les cultures bien purifiées sont conservées à 4°C. Chaque tube doit porter une étiquette avec les mentions suivantes ; nom de la souche, numéro de code, date de conservation. Un repiquage est réalisé tous les deux mois.

II.2. Etude de l'activité anti biofilm de l'extrait des *A.baumannii* vis-à-vis les *S.aureus*

II.2.1. Sélection des souches formatrices de biofilm

Avant d'entreprendre l'étude de l'activité antibiofilm de l'extrait des souches d'*A.baumannii* formatrices de biofilm vis-à-vis du biofilm de *S. aureus*, nous avons sélectionné 25 souches d'*A.baumannii* et 38 souches de *S.aureus* pour évaluer leurs capacités à former un biofilm à l'aide de deux méthodes différentes : la méthode qualitative du Rouge Congo Agar (RCP) et la méthode quantitative du Tissue Culture Plate (TCP).

A) La méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

La méthode de la gélose au rouge Congo, a été décrite par **Freeman et al., (1989)**. C'est un test qualitatif, très convenable pour la détection des souches productrices de slime (**Kirmusaoglu , 2019**). Le milieu RCA (**Annexe II**) est ensemencé par la technique de quatre stries à l'aide d'une pipette pasteur stérile, à partir des cultures de 24 heures, puis incubé à 37°C pendant 24 heures (**Hassan et al., 2011**).

Concernant la lecture, différents aspects macroscopiques ont été décrits. Les souches productrices de slime donnent des colonies noires à consistance sèche et cristalline, contrairement aux souches non productrices qui restent rouges. Les souches à phénotype variable donnent des colonies à centre noire et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noire (**Kirmusaoglu, 2019**).

B) Formation de biofilms de tissus culture plate (TCP)

C'est une technique décrite par **Christensen et al., (1985)**, permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm (**Coffey et Anderson, 2014**). Les bactéries isolées à partir d'une culture pure de 18 heures ont été inoculés dans 10 ml de bouillon trypticase soja additionnée de 1% de glucose et incubés à 37°C pendant 24 h.

Trois microplaques de 96 puits ont été remplies avec 200 µL des cultures diluées. Chaque souche a été inoculée dans 3 puits, et les puits de la 3eme et la sixième ligne ont été remplis par le même milieu stérile (utilisé comme un témoin). Les microplaques sont incubées par la suite pendant 24 heures à 37°C. Les puits sont lavés successivement à l'eau distillée stérile (EDS). Les biofilms ainsi formés par les cellules adhérentes sont colorés avec du Cristal Violet (CV) à 0,1%, et l'excès du colorant a été éliminé à l'aide de l'éthanol à 95% (**Avdić et al., 2019 ; Rice, 2021**). L'évaluation de la formation de biofilm est basée sur la lecture des densités optiques (DO) du film bactérien à l'aide de l'automate micro ELISA (**Annexe I**), à la longueur d'onde de 570 nm (**Figure 07**) (**Hassan et al ., 2011**).

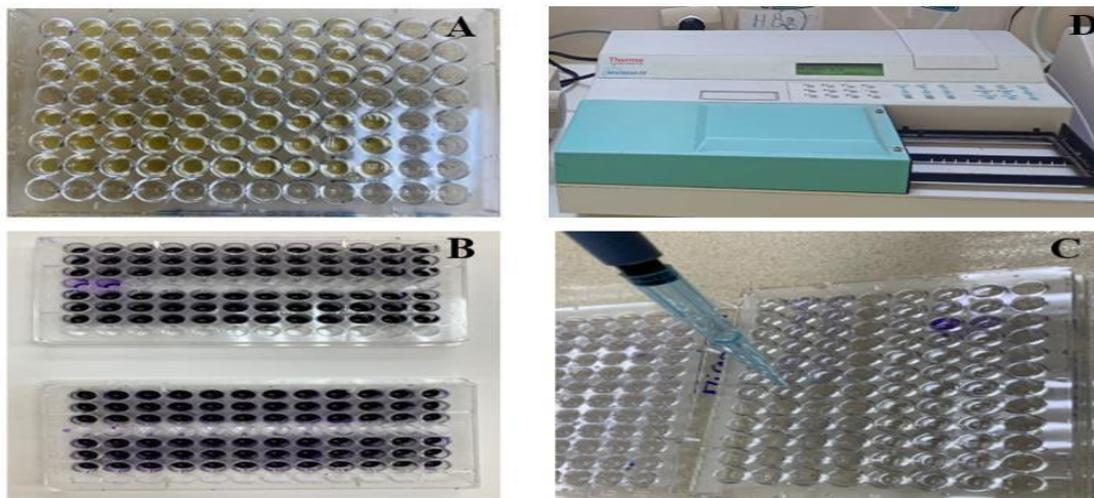


Figure 07 : les étapes de la méthode quantitative de biofilm (TCP) (**Originale**)

A – Lavage de la microplaque après incubation de la suspension pendant 24 h à 37°C dans un bouillon TSBG B- Coloration par le cristal violet 0.1 % C- l'ajout d'éthanol pour éliminer l'excès de cristal violet D- après un lavage avec de l'eau saline on fait une lecture de la microplaque par le lecteur ELISA (**Annexe I**).

• Lecture des résultats

Les bactéries sont classées comme suit : non formatrices du biofilm, formation modérée, fortement formatrice du biofilm (**Kirmusaoglu, 2019**).

$DO \leq DO_t$ (Témoin) pas de production de biofilm

$DO_t < DO \leq 2 \times DO_t$ production faible de biofilm

$2 \times DO_t < DO \leq 4 \times DO_t$ production modérée de biofilm

$4 \times DO_t < DO$ forte production de biofilm.

II.2.2. Extraction des métabolites secondaires à partir de souches formatrices de biofilm d'*A.baumannii*

L'extraction des métabolites secondaires a été réalisée en choisissant deux souches (ACTG et P1) formatrice de biofilm, celles présentant une densité optique élevée. L'extraction des biomolécules s'effectue à travers une série d'étapes. Ces dernières sont résumées dans le schéma ci-dessous (**Figure 08**).

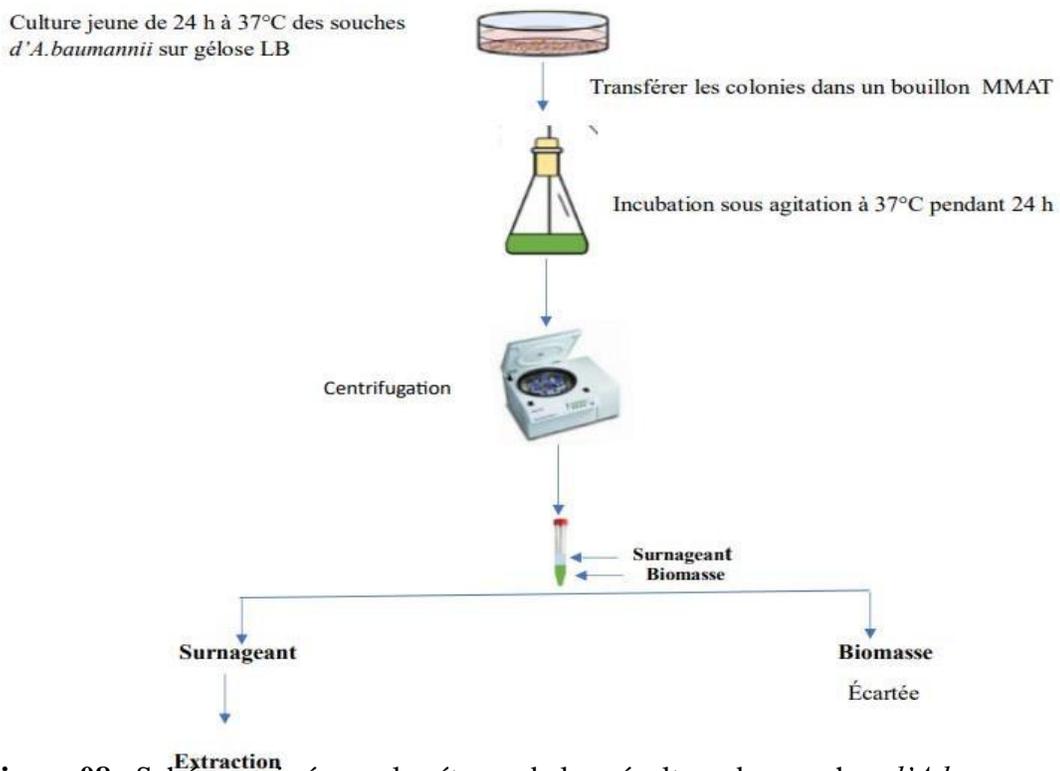


Figure 08 : Schéma qui résume les étapes de la préculture des souches d'*A.baumannii* (Originale).

A. Préparation de la pré culture des deux souches d'*A.baumannii*

Les 2 souches d'*Acinetobacter baumannii* (Pus 01 et ACTG) ont été cultivées sur gélose LB (Annexe II) pendant 24 heures à 30°C (Sambrook et al., 1989). Les cultures de 02 souches d'*A.baumannii* ont été transférées dans 2 flacons de 250ml contenant 200 ml de MMAT (Annexe II) (Figure 09)..

L'incubation a été réalisée dans un agitateur rotatif à 250 tr/min à 30°C pendant 24 heures (Gonzalez et al.,2001) (Figure09)



Figure 09: La pré culture d'*A.baumannii* (Originale).

A - la revivification des souches sur gélose LB. B - cultivation des souches dans un bouillon MMAT C - Incubation sous agitation

B. Centrifugation et Filtration

Les cellules ont été séparées par centrifugation (10 000 tr/min, 10 min) et les surnageants ont été filtrés à travers une membrane de porosité de 0,22 μm (Figure 10).

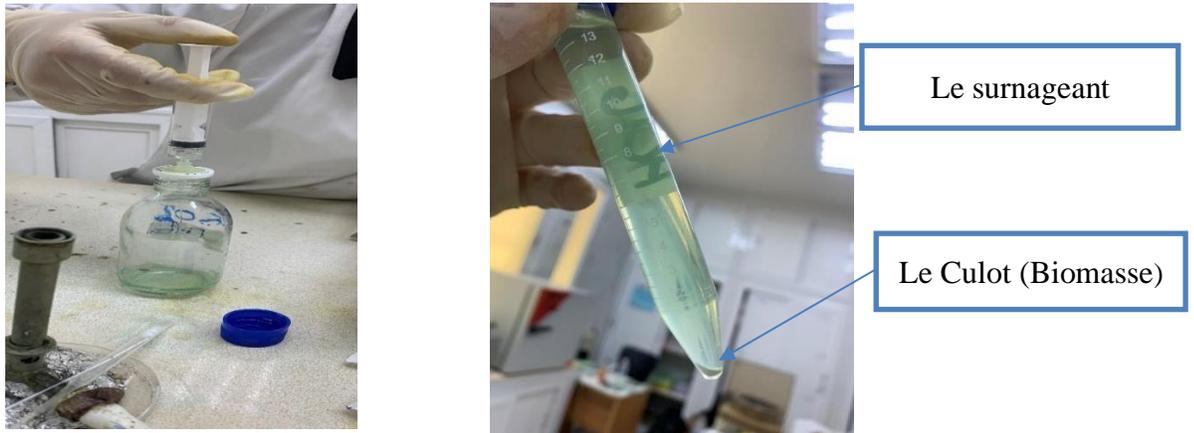


Figure 10 : Centrifugation et filtration (**Originale**).

C. Extraction à partir de surnageant

Le volume de surnageant de chaque souche a été divisé en deux parties égales afin de procéder à une extraction avec deux solvants organiques, à savoir l'acétate d'éthyle et l'hexane. Cent millilitres de surnageant ont été mélangés avec un volume équivalent d'acétate d'éthyle pour chaque souche, de même pour l'hexane. Après séparation des phases dans une ampoule à décanter, les phases organiques ont été asséchées par filtration sur du Na_2SO_4 anhydre (**Figure 12**), puis évaporées dans un évaporateur rotatif à une température de 30 °C sous vide pour l'acétate d'éthyle (**Gonzalez et al., 2001**), et 40 à 45 °C pour l'hexane (**Wang et al., 2011**). Deux millilitres du

solvant organique ont été ajoutés deux fois à l'extrait sec afin de le récupérer dans un tube à essai . On laisse le solvant s'évaporer sous hotte afin d'obtenir un extrait sec (**Figure 11**)

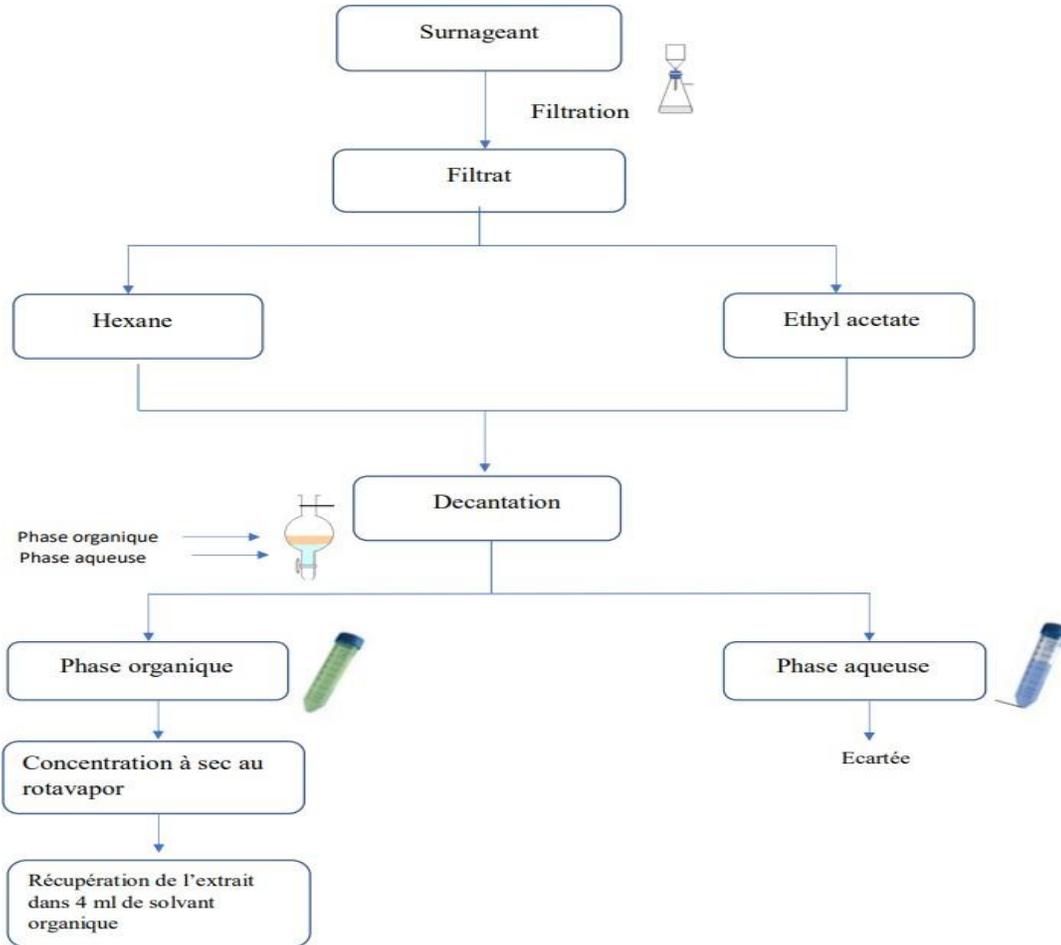


Figure 11 : Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des biomolécules *d'A.baumannii*



Figure 12 : Les étapes de l'extraction

A mélanger le solvant organique et le surnageant ; **B** Décantation et séparation des deux phases ,1 phase organique 2 phase aqueuse ; **C** phase organique ; **D** phase aqueuse ; **E** Filtration.

II.2.3. Evaluation de l'activité anti biofilm des extraits bruts des *A.baumannii* vis-à-vis de *S.aureus*

La détection de l'activité anti biofilm se fait en plusieurs étapes selon un protocole bien établie en utilisant des microplaques contenant 96 puits (**Figure 13**). Le test utilisé est basé sur la formation de biofilm à l'interface solide-liquide et par l'addition des extraits bruts d'*A.baumannii* qui pourraient éventuellement avoir un effet antibiofilm (**Doganli et al., 2016**).

Afin de tester l'effet des extraits bruts d'*A.baumannii* sur la formation de biofilms des *S.aureus*, ces extraits ont été solubilisé dans le solvant diméthylsulfoxyde (DMSO) afin d'obtenir une concentration de 50 mg/ml et 10 mg/ml (**Figure 13**) (**Monowar et al., 2019**).

Jour 1 : une à deux colonies pure de *S.aureus* ont été cultivées dans 10 ml du TSB supplémenté avec un 1% de glucose, puis incubées pendant 24h à 37°C.

Jour 2 : à l'aide d'un spectrophotomètre (**Annexe I**) les suspensions bactériennes sont ajustées à une densité équivalente au standard 0,5 Mac Farland. 100 µL de chaque suspension plus 75 µl de DMSO ont été distribués dans les plaques de microtitration à 96 puits comme contrôle négative et dans d'autre puits contenant 100µL d'extrait brut préalablement solubilisée dans le DMSO. Chaque test a été répété trois fois.

Jour 3 : Après une nuit d'incubation de la microplaque, chaque puits a été lavé trois fois avec de l'eau distillée stérile, séché et coloré avec 200 μ L de cristal violet (CV) et incubé à température ambiante pendant 15 min. Par la suite, les puits ont été lavés trois fois avec de l'eau distillée stérile pour enlever les traces du colorant. Les biofilms colorés ont été mis en suspension dans 200 μ L d'éthanol à 95 %. La densité optique (DO) a été mesurée à une longueur d'onde de 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques ELISA (Doganli, 2016).

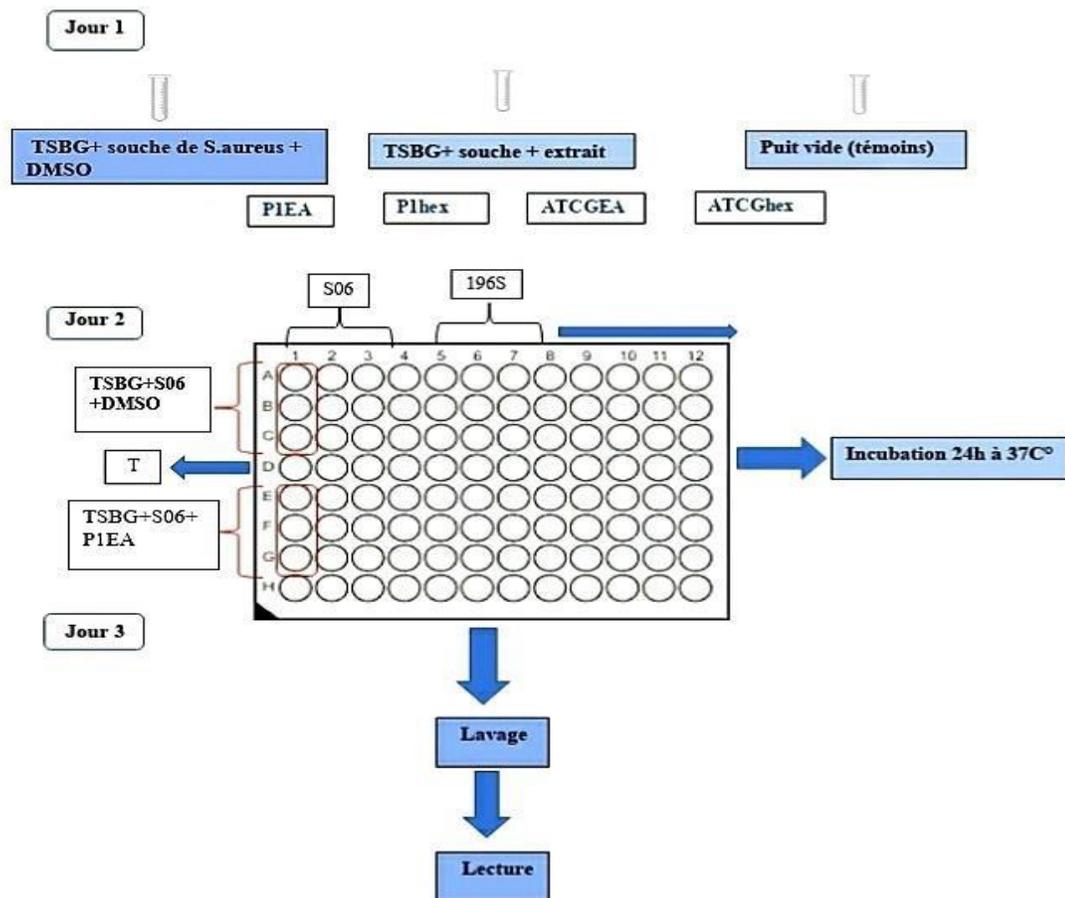


Figure 13 : Schéma représentant le test d'activité anti biofilm des extraits bruts d'*A.baumannii* vis à vis des *S.aureus* par la technique de microplaque (**Originale**).

- **Lecture**

Dans le cas d'une éventuelle inhibition de la formation de biofilms ou de la croissance des

cellules non fixées, les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de réduction de biofilms. Il est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'inhibition\%} = [(\text{moyen DO contrôle} - \text{moyen DO échantillon}) / \text{moyen DO contrôle}] \times 100 \text{ (Doganli, 2016).}$$

A. Dosage des polyphénols totaux dans l'extrait de la souche ACTG par acétate d'éthyle (ACTGEA)

La détection des polyphénols totaux, a été déterminait à fin d'évaluer l'activité antioxydante de l'extrait d'*A.baumannii* par acétate d'éthyle (ACTGEA).

➤ Principe

La teneur phénolique totale est habituellement déterminée colorimétriquement avec un spectrophotomètre en utilisant le réactif FC.

Le réactif (FCR) est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H3PW12O40) et d'acide phosphomolybdique (H3PMo12O40). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum est de 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits (Boizot et charpentier, 2006 ; Monowar et al., 2019).

➤ Technique

Le contenu phénolique total a été mesuré en suivant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu En bref, 0,1 mL d'échantillon et 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, USA) ont été mélangés à 6,0 mL d'eau distillée. Après 1 minute, 1,5 mL de Na₂CO₃ à 20% (Merck, Allemagne) ont été ajoutés et le volume total a été complété à 10,0 mL avec de l'eau distillée. Le mélange a été incubé pendant 2 heures à 25°C. L'absorbance a été mesurée à 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre par rapport à la solution blanche contenant tous les réactifs et le volume approprié du même solvant utilisé pour l'échantillon. L'acide gallique (R & M Chemicals, UK) a été utilisé comme témoin contenant tous les agents de réaction sauf l'échantillon. La quantité de phénols totaux présente a été exprimée en µg d'équivalent acide gallique par mg d'extrait (mg EAG/mg) (Monowar et al.,2019).

B. Evaluation de l'activité anti oxydante in Vitro de l'extrait ACTG

Il existe plusieurs méthodes de dosage pour la mesure de l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libre. Parmi ces méthodes la méthode utilisant le radical stable DPPH (diphényl picrylhydrazyl).

❖ Essai de Capture des Radicaux DPPH

➤ Principe du test au DPPH

La méthode du DPPH* est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH* en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non radicalaire, le DPPH-H. En présence des piégeurs de radicaux libres, le DPPH de couleur violette se réduit en 2,2 diphényl -1- picrylhydrazyle de couleur jaune. Ainsi plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme un antioxydant fort. (Brand-Williams et al., 1995)

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation (Bondet et al., 1997)



➤ La technique

L'évaluation de l'activité anti oxydante de l'extrait ACTG a été réalisé en suivant le protocole de Monowar et al., (2019). L'activité de capture des radicaux DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) a été réalisée en utilisant le DPPH en tant que radical libre. En bref, une série de 0,1 mL d'échantillon (conc. 62,5, 125, 250, 500 et 1000 µg/mL) a été mélangée à 3,9 mL d'une solution de DPPH préparée fraîchement dans le méthanol (25 mg/L). Le mélange a été vortexé vigoureusement et conservé à l'abri de la lumière pendant 2 heures à température ambiante.

Ensuite, l'absorbance du mélange a été déterminée à 515 nm par rapport au blanc. Une solution de DPPH sans échantillon a été utilisée comme témoin. L'acide ascorbique a été utilisés comme références. L'activité de capture des radicaux DPPH a été exprimée en tant que concentration efficace, CE50 (mg/mL).

L'activité d'inhibition en pourcentage a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\%(\text{AA}) = \frac{(\text{A}_{517\text{nm}} \text{contrôle} - \text{A}_{517\text{nm}} \text{échantillon})}{\text{A}_{517\text{nm}} \text{contrôle}} \times 100.$$

A_{517nm} contrôle : l'absorbance du témoin.
A_{517nm} échantillon : l'absorbance d'extrait.

Résultats et discussion

III.1. Résultats

III.1. 1. Résultats de la répartition

1.. Taux de positivité des prélèvements selon la présence de germe

Notre étude a été menée sur un échantillon de 533 prélèvements effectués sur des patients hospitalisés provenant de divers services tels que la Réanimation, l'Orthopédie, l'Oto-rhino-laryngologie (ORL), la Chirurgie, la Maternité, la Pédiatrie, la Médecine Interne, la Néphrologie, le Service des Maladies Infectieuses et l'Unité de Médecine Cardiovasculaire (UMC). Parmi 533 prélèvements 191 (35.83%) ont donné des résultats positifs, tandis que 342 (64.16%) se sont avérés négatifs (**figure 14**).

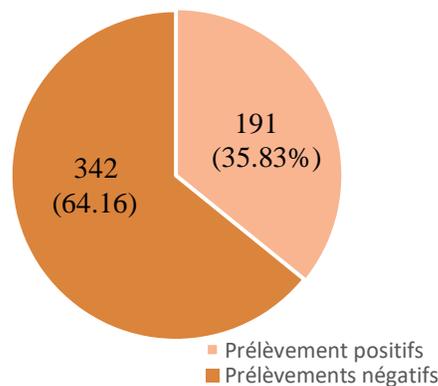


Figure 14 : Taux de positivité des prélèvements.

2. Répartition des souches cliniques

D'après nos résultats, nous remarquons que parmi les prélèvements positifs, 46 souches (soit 24%) correspondaient à *S.aureus*, 32 souches (soit 17%) à *A.baumannii*, et les 113 souches restantes (soit 59%) étaient attribuables à d'autres espèces (**Figure (15)**).

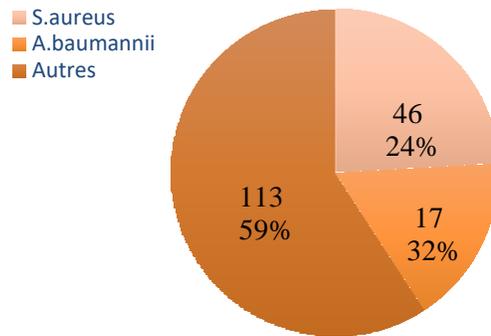


Figure 15 : Répartition des souches cliniques.

3. Répartition des souches d’A.baumannii et de S.aureus selon la nature des prélèvements

L’étude de la répartition des souches isolées en fonction de la nature des prélèvements a permis d’obtenir les résultats suivants (Figure 15).

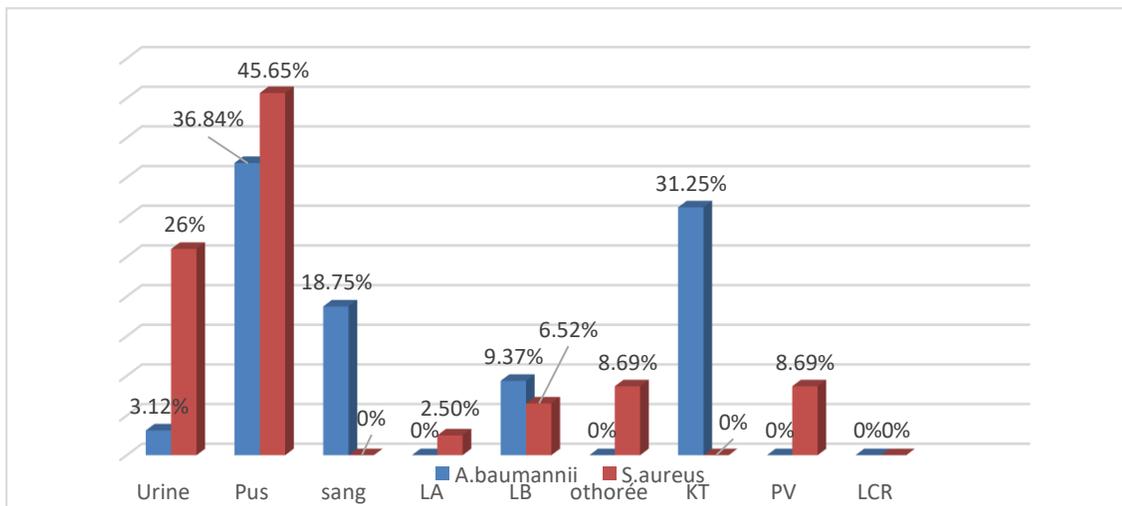


Figure 16 : Répartition des souches d’A.baumannii et de S.aureus selon la nature des prélèvements.

LA : Liquide d’Ascite ; LB : Liquide Bronchiale ; K.T : Cathéter ; P.V : Perte vaginale ; LCR : Liquide Céphalorachidien

Selon les résultats obtenus dans la figure (16), on observe une fréquence plus élevée des S.aureus dans les prélèvements de pus, s’élevant à environ 45,65%. Ensuite, on constate des proportions de 26% dans les urines, 8,69% dans les sécrétions vaginales, 6,52% dans les prélèvements branchiales et 2,5% dans les liquides d’ascite. En ce qui concerne les prélèvements de liquide céphalorachidien, de sang et de cathéters, aucune prévalence de S.aureus n’a été observée.

Pour ce qui est des souches *d'A.baumannii*, une prévalence plus élevée est observée dans les prélèvements de pus (36,84%), suivie par les cathéters (31,25%), le sang (18,75%), et les liquides broncho-alvéolaires (9,37%). Une prévalence plus faible est constatée dans les prélèvements d'urine (3,12%). En ce qui concerne les prélèvements de liquide céphalorachidien, de liquide de ponction (LA), de sécrétions vaginales (PV) et de sécrétions auriculaires, aucune prévalence n'a été observé (**Figure 16**).

4. Répartition des souches d'*A.baumannii* et de *S.aureus* selon les services

La répartition des souches des deux espèces *d'A.baumannii* et de *S.aureus* présente une variation selon les services. L'étude de cette répartition nous a permis d'obtenir les résultats mentionnés dans **la figure (17)**.

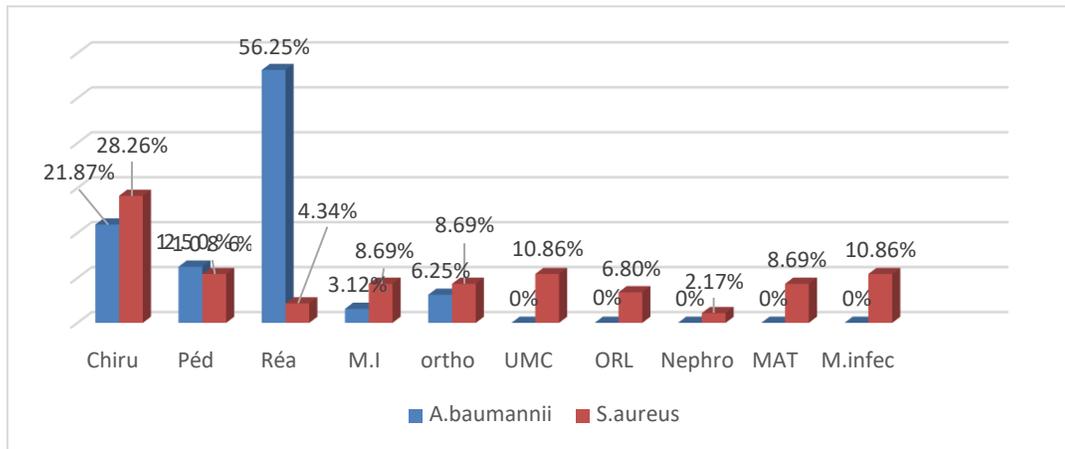


Figure 17 : Répartition des souches de *S.aureus* et d'*A.baumannii* selon les services

Selon les résultats obtenus dans la **figure (17)**, on constate que la majorité des prélèvements positifs à *S.aureus* proviennent du service de chirurgie (28,26%), suivi de la pédiatrie (10,86%) et de l'UMC (10,86%) et les maladies infectieuses ((10.86%). Une prévalence plus faible a été observée dans les services d'orthopédie (8,69%), de maternité (8,69%), d'ORL (6.8%), de réanimation (4.34%) et de néphrologie (2.17%).

La figure(17) met en évidence que la majorité des prélèvements positifs à *A.baumannii* provient du service de réanimation (56,25%), suivi par le service de chirurgie (21,87%), la pédiatrie (10,86%), l'orthopédie (6,25%) et la médecine interne (3,12%). Pour ce qui est des services de maladies infectieuses, de maternité, d'UMC, d'ORL et de néphrologie, aucune prévalence n'a été observée.

III.1.2. Isolement et identification des souches cliniques

1. Identification des *S.aureus*

A. Examen macroscopique

A.1 Examen macroscopique sur gélose Chapman et GSC

La mise en culture sur milieu Chapman a permis d'isoler les bactéries du genre *Staphylococcus*. Les colonies de *S.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. Sur la gélose au sang cuit, les colonies apparaissent pigmentées de couleur crème ou gris-blanc avec une teinte jaunâtre, légèrement surélevée et hémolytique (**Figure18**).

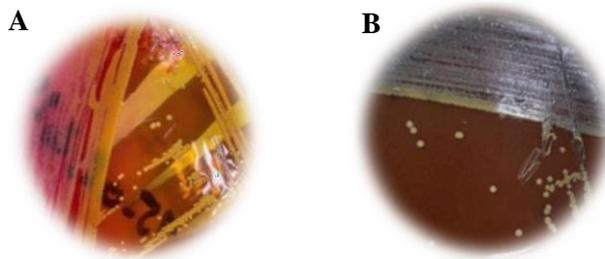


Figure 18 : Aspect macroscopique des *S.aureus* (**Originale**).

A. sur milieu Chapman B. sur gélose au sang cuit

A.2 Examen macroscopique des *S.aureus* sur milieu sélectif Baird-Parker

Le milieu Baird-Parker contient les sources de carbone et d'azote nécessaires à la croissance. La glycine, le chlorure de lithium et le tellurite de potassium jouent le rôle d'agents sélectifs. Le jaune d'œuf est le substrat qui permet de mettre en évidence la production de lécithinase, ainsi que l'activité de la lipase. Les colonies noires indiquent la réduction du tellurite en tellure et le halo d'éclaircissement du jaune d'œuf la production de lécithinase (**Figure19**).



Figure 19 : Aspect de colonies de *S.aureus* sur milieu Baird-Parker (**originale**).

B. Examen microscopique

L'examen microscopique après coloration différentielle de Gram pour les souches isolées a montré la présence des Cocci sphériques isolés, regroupés en diplocoques ou en amas ayant la forme de grappes de raisin (caractéristiques du genre *Staphylococcus*), colorés en violet (à Gram positif) (**Figure20**).

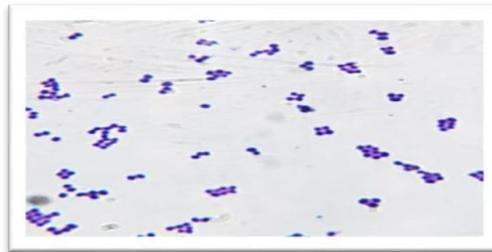


Figure 20: Aspect microscopique des *S.aureus* sous microscope optique(grossissement x 100), après coloration de Gram (**originale**).

C. Identification biochimique

C.1.La recherche de la catalase

Toutes les souches isolées, testée pour la production d'une catalase, ont décomposés l'eau oxygénée en eau et en oxygène qui se dégage et se traduit par le dégagement des bulles de gaz (**Figure 21**).



Figure 21 : Aspect de la réaction du test de la catalase (**Originale**).

C.2. Recherche de la coagulase en tube

Après 4 heures d'incubation à 37°C, l'observation visuelle du tube en position inclinée à 90°C a révélé l'apparition d'un caillot due à la présence de l'enzyme coagulase, indiquant une réaction positive (**Figure 22**)



Figure 22 : Résultat de test coagulase libre (**originale**).

C.3. Test de la coagulase liée (pastorex)

Le test de coagulase liée a montré une apparition d'un coagulum, cela signifie un test positif (**Figure 23**).

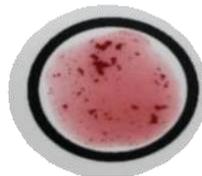


Figure 23 : Résultat de test coagulase liée (**originale**).

C.4. Identification biochimique par Galrie API Staph

La lecture des résultats de la galerie api 20 Staph se fait par la lecture des réactions (positive ou négative) et cela en fonction des variations des couleurs (**Figure24**), à partir des tests biochimique (**Tableau III**)(**Annexe III**). Les résultats de l'étude des caractères biochimique des

souches du genre *Staphylococcus* répondent au profile numérique spécifique à l'espèce *Staphylococcus aureus* (6736152).



Figure 24 : Résultats de l'identification par Galerie API 20 Staph (**originale**).

2. Identification des *Acinetobacter baumannii*

A. Examen macroscopique

A.1. Examen macroscopique sur gélose Hektoen, GSC et GSF

Les colonies apparaissent sur les 3 milieux (Hektoen, GS, GSC) (**Annexe II**) bombés, brillantes muqueuses et arrondie avec un contour régulier.

Sur gélose Hektoen les colonies apparaissent vertes due à l'alcalinisation de milieu ce qui signifie que la bactérie est lactose négatif (**Figure25**).

Sur gélose au sang frais on observe une absence d'hémolyse ce qui signifie que la bactérie ne possède pas une hémolysine (une enzyme qui dégrade les globules rouges présentes dans la GSF) (**Figure25**) .

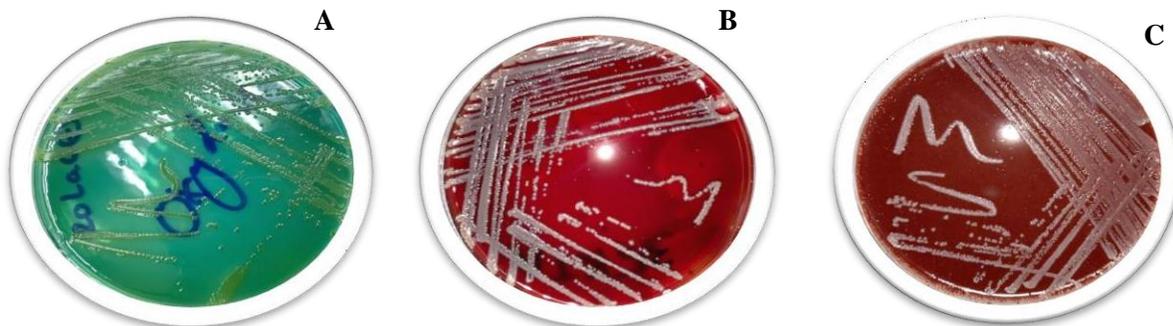


Figure 25: Aspect macroscopique des colonies d'*A.baumannii* (**Originale**).

A -sur Hektoen B- sur la GSF C- sur GSC

A.2.Examen macroscopique sur milieu Uri Select

Sur Uri selecte l'identification se fait en se basant sur la couleur des colonies, on a observé des colonies brillantes et arrondie de couleur grisâtre (**Figure26**).



Figure 26: l'aspect d'*A.baumannii* sur Uri Select (**Originale**).

B.Examen microscopique

La coloration de gram des colonies d'*A.baumannii* a montré la présence des coccobacilles de couleur rose ce qui signifie que cette bactérie est de gram négatif. Le mode de regroupement est en paire ou bien en chaînette (**Figure 27**).

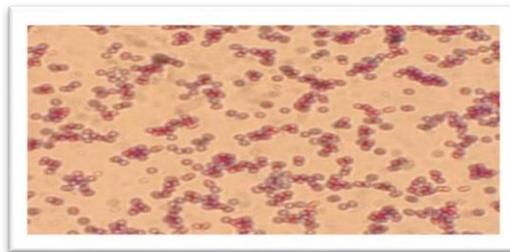


Figure 27: Aspect microscopique des cellules d'*A.baumannii* sous microscope optique (Grossissement x100) (**originale**).

C. Identification biochimique des *A.baumannii*

C.1. Test d'oxydase

Après avoir gratté la colonie sur le disque, il a été observé que le disque est demeuré incolore, ce qui indique que cette bactérie est oxydase négative, c'est-à-dire qu'elle ne possède pas la cytochrome C (**Figure28**).



Figure 28 : Aspect de Test d'oxydase chez l'*A.baumannii* (Originale).

C.2 Identification biochimique par la galerie Api 20 E et Api 20NE

Les résultats de l'étude des caractères biochimiques des souches du genre *Acinetobacter* par la galerie Api 20 E et API20NE (**Figure29**), répondent réellement au profil numérique spécifique à l'espèce *A.baumannii* (**Tableau V**) (**Annexe III**).

Les résultats de la galerie Api 20 E et Api 20NE (**Figure29**), montrent que *A.baumannii* fermente que 03 sucres (Melibiose , Arabinose et Glucose) tandis qu'elle ne fermente aucun des sucres restants (Xylose , saccharose ,mannitol , sorbitol , inositol , rhamnose et amylglucoside), et elle utilise le citrate comme seule source de carbone (**Annexe III**). Les résultats de la galerie Api 20NE montre que *A.baumannii* peut assimiler des 03 acides (Acide caproïque , acide malique et acide phényl acétique) (**TableauV**)(**Annexe III**).



Figure 29 : Résultats de l'identification d'*A.baumannii* par la galerie miniaturisée (originale).

A- galerie API 20 E et B Galerie API 20NE

2. Détermination de la sensibilité des *S.aureus* et des *A.baumannii* aux antibiotiques

Les résultats de la sensibilité et de la résistance aux antibiotiques appartenant à des familles différentes selon la méthode de diffusion sur gélose pour les 46 souches de *S.aureus* et les 32 souches d'*A.baumannii* testées, sont reportés dans le **tableau IX** et le **tableau VIII (Annexe III)**.

A. *S. aureus*

L'étude de sensibilité aux antibiotiques pour les 46 souches de *S. aureus* a montré que la majorité d'entre eux présentent une résistance importante face aux antibiotiques testés (**Tableau VII (Annexe III)**), dont 26(56%) souches sont des SARM, tandis que les autres 20(44%) souches sont sensibles à la méthiciline SASM (**Figure30**).

La recherche de la résistance à la méthiciline a été effectuée par la Céfoxitine 30 µg (OMS, 2020).

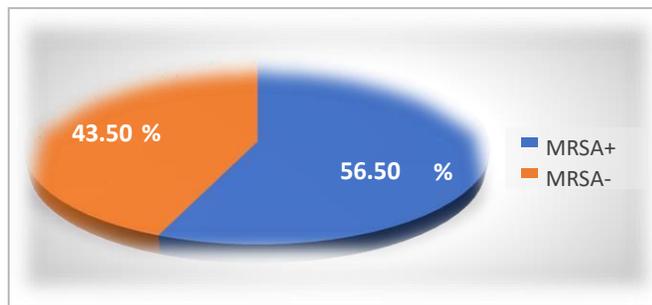


Figure 30 : Diagramme des taux de souche SARM (originale).

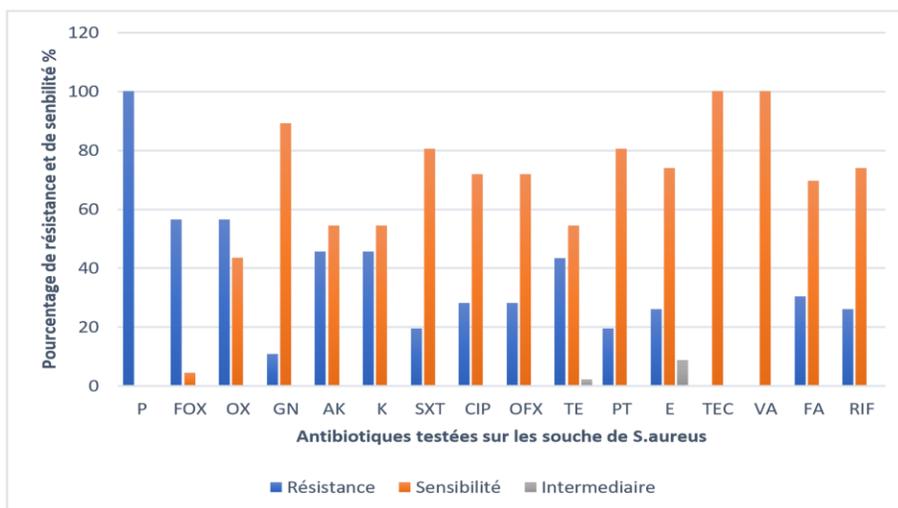


Figure 31 : Le taux de résistance et de sensibilité de *S.aureus* vis-à-vis quelques antibiotiques



Figure 32 : Zones d'inhibition vis-à-vis *S.aureus* (Originale).

Selon nos résultats des antibiogrammes mentionnée dans la **Figure (31)** et la **Figure(32)**, les 46 souches d'*S.aureus* étudiés présentant la plus faible activité sur les souches isolées était la pénicilline (100% de résistance), suivi de la Céfotaxime et l'Oxacilline (56.50%), l'Amikacine (45.60% de résistance), la Tétracycline (43.4%), l'Acide fusidique (30.43%) et de l'Erythromycine et la Rifampicine (26.08%) et enfin la Ciprofloxacine (28.20%). La Vancomycine (100% de sensibilité), la Gentamicine (89.20%) et la Pristinamycine (80.50%) étaient en revanche, actives sur l'ensemble des souches isolées.

B. *A.baumannii*

L'étude de sensibilité aux antibiotiques pour les 32 souches de *A.bamnnii* a montré que la majorité d'entre eux présentent une résistance importante face aux antibiotiques testés (**Tableau VI**) (**Annexe III**).

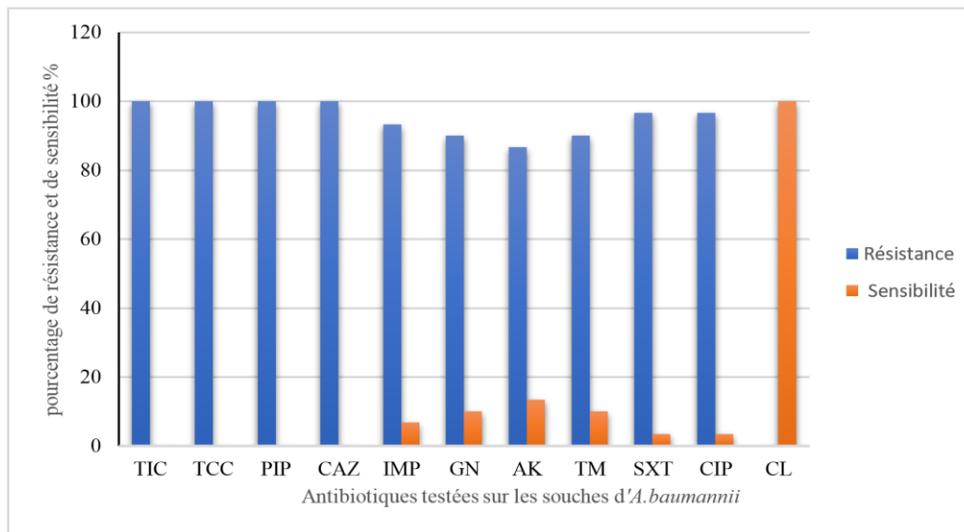


Figure 33 : Le taux de résistance et de sensibilité des *A.baumannii* vis à vis quelques antibiotiques.

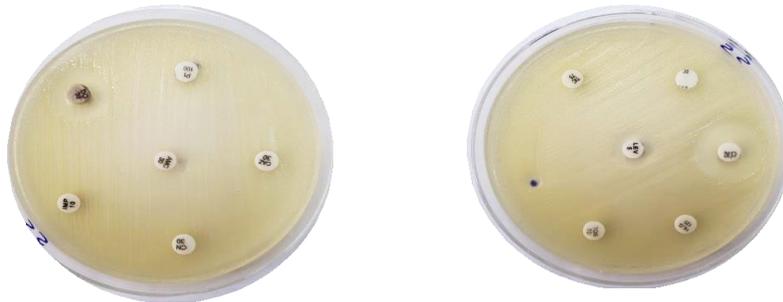


Figure34 : Zones d'inhibition vis-à-vis *A.baumannii* (originale).

Selon nos résultats des antibiogrammes mentionné dans la **figure (33)** et la **figure (34)**, les 32 souches d'*A.baumannii* étudiées présentent une résistance importante vis-à-vis la famille des bêta-lactamines. La résistante était totale vis-à-vis la Ticarcilline, la Pipéracilline, la Ticarcilline+acide clavulanique et la Céfotaxime avec (100% de résistance), et de (93.75%) contre l'Imipénème. Concernant les autres classes, pour les aminosides, le taux de résistance le plus important est noté contre la Tobramycine et la Gentamicine (90.62%) suivi par l'Amikacine (87,50 %). Un taux de la résistance important est observé contre la ciprofloxacine et la Cotrimoxazole

(96.87%) ; en revanche toutes les souches d'*A.baumannii* ont montré une sensibilité totale vis à vis la Colistine (100 % de sensibilité).

III.1.3. Etude de l'activité anti biofilm de l'extrait des *A.baumannii* vis-à-vis les *S.aureus*

1. Sélection des souches formatrices de biofilm

L'évaluation de la formation de biofilm chez les deux espèces de *S. aureus* et d'*A. baumannii*, à l'aide des méthodes qualitatives (RCA) et quantitatives (TCP), nous a permis d'obtenir des résultats variables.

A) Sélection des souches formatrices de biofilm par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

La recherche de la production de slime sur milieu Rouge Congo nous a permis d'obtenir plusieurs résultats pour les deux espèces (*A.baumannii* et *S.aureus*) (**Figure 35**).

➤ Les résultats des souches de *S.aureus*

D'après les résultats obtenus dans le **tableau X (Annexe III)**, nous observons que 63.15% des souches de *S.aureus* sont productrices de slime sur rouge Congo.



Figure 35 : la production de Slime chez les souches *S.aureus* sur Rouge Congo (**Originale**)

S137-Colonies à centre rouge et à contour noir. **S113**- Colonie rouge à surface lisse. **S02**-Colonies noirs à surface rugueuse.

Selon les résultats mentionnée dans la **Figure (35)** et dans le **tableau X (Annexe III)**, nous remarquons que parmi 38 souches de *S.aureus* 1 souche (2.63%) a donné des colonies noires sur rouge Congo ,16 (42.10%) ont donnée des colonies à centre rouge et à contour noir et 21 (55.26%) ont donnée des colonies rouges à surface lisse.

➤ Les résultats des souches d'*A.baumannii*



Figure 36 : L'aspect des colonies d'*A.baumannii* sur Rouge Congo (**Originale**)

D'après les résultats obtenus dans la **figure (36)** et dans le **tableau XI (Annexe III)**, nous observons que parmi toutes les souches d'*A.baumannii* isolés (25) à partir des patients hospitalisés aucune d'entre elles n'a démontré la production de slime sur rouge Congo (Colonies rouges à surface lisse)

B) Sélection des souches formatrices de biofilm par la technique Tissue culture plate (TCP)

Les résultats de l'essai en plaque de microtitration utilisé pour évaluer la capacité de formation de biofilm des 25 souches d'*A.baumannii* et de 38 souches de *S.aureus* sont présentés dans le **tableau X** et dans le **tableau XI (Annexe III)**.

Les valeurs moyennes de densités optiques (DO) obtenues par lecteur d'absorbance pour les 03 microplaques ont montré 03 valeurs moyennes des puits de contrôle pour les 03 microplaques 0.04, 0.06 et 0.11 (**Tableau X**) (**Tableau XI**) (**Annexe III**).

La méthode utilisée dans cette étude nous a permis de mesurer la formation de biofilm après une croissance dans du TSBG à 1% de glucose pendant 24 heures à 37 °C. La mesure spectrophotométrique des densités optiques (DO) des cellules adhérentes nous a permis de classer notre collection d'isolats cliniques en quatre catégories (Forte production de biofilm, production modérée biofilm, faible production de biofilm et pas de production de biofilm) (**Figure 37**) et (**Figure 38**).

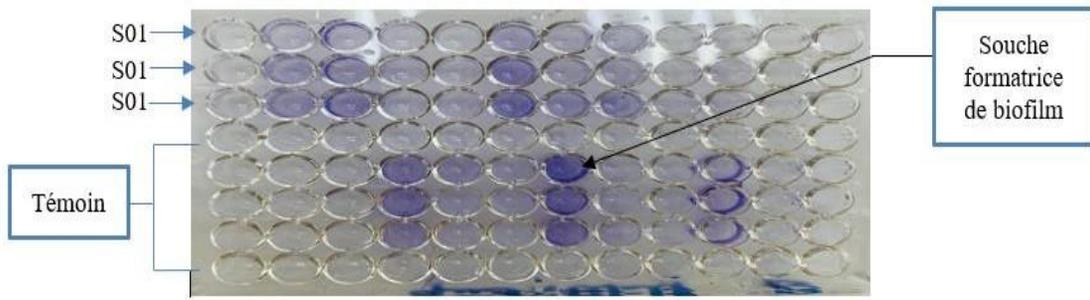


Figure 37 : Résultat de la production de biofilm par la méthode TCP.

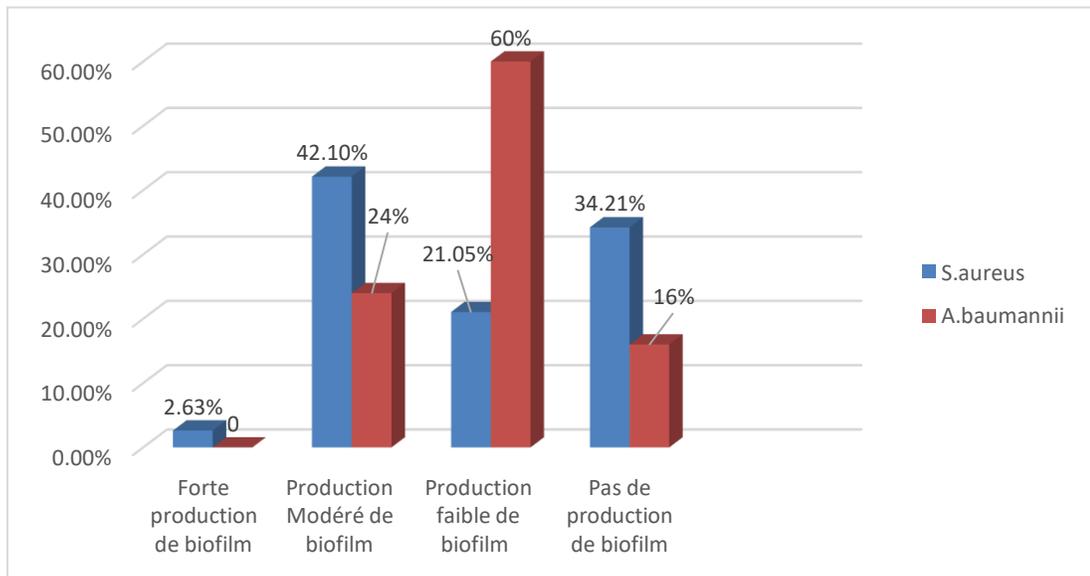


Figure38 : Les résultats de la production de biofilm chez les souches de *S.aureus* et *A.baumannii*.

D’après la **figure (38)** et le **tableau X (Annexe III)**, nous remarquons que 63.15% des souches de *S. aureus* sont dotées de capacités de production de biofilm, dont 2.63% produisent un biofilm considéré comme étant fort, tandis que 42.10% produisent un biofilm modéré et 21.05% produisent un biofilm faible et 34.21% sont considérés comme des souches non formatrice de biofilm

Concernant les souches d’*A. baumannii*, selon la **figure (38)** et le **tableau XI (Annexe III)** il a été observé que 84% d’entre elles ont la capacité de produire du biofilm, dont 24% produisent

un biofilm modéré et 60% produisent un biofilm faible, et 16% sont considérés comme des souches non formatrices de biofilm.

III.1.4. Evaluation de l'activité anti biofilm des extraits bruts des *A.baumannii* vis-à-vis de *S.aureus*

1.Evaluation de l'activité anti biofilm des extraits bruts des deux souches (ACTG et P1) (50 mg /ml) vis-à-vis les souches de *S.aureus*

Cette étude vise à expérimenter les effets possibles des métabolites extra cellulaires des deux souches d'*Acinetobacter baumannii* (P1 et ACTG) sur la formation de biofilms de *S. aureus*.

Les résultats de l'effet inhibiteur du biofilm des extraits bruts issus des deux souches d'*A.baumannii* P1 (P1EA et P1HEX) et ACTG (ACTGEA et ACTGHEX) extraite par les deux solvants Hexane et l'Acétate d'éthyle, montrent qu'il y a une activité anti biofilm traduite par une diminution de densité optique (600 nm) contre les 10 souches de *S.aureus* (SARM), productrice de biofilm modéré, en comparaison avec les DO absorbé par les biofilm des *S.aureus* formé en absences de ces extraits (contrôle).

1.Extrait brut par acétate d'éthyle

➤ L'extrait P1EA et ACTGEA

Selon les résultats de confrontation des 10 souches de *S.aureus* vis-à-vis les extraits des deux souches d' *A.baumannii* (ACTG et P1) par l'acétate d'éthyle (P1EA et ACTGEA), nous observons une inhibition de la formation de biofilm des 6 (60%) souches de *S.aureus* 303S,137S,139S ,S02 ,S06 et 98S .

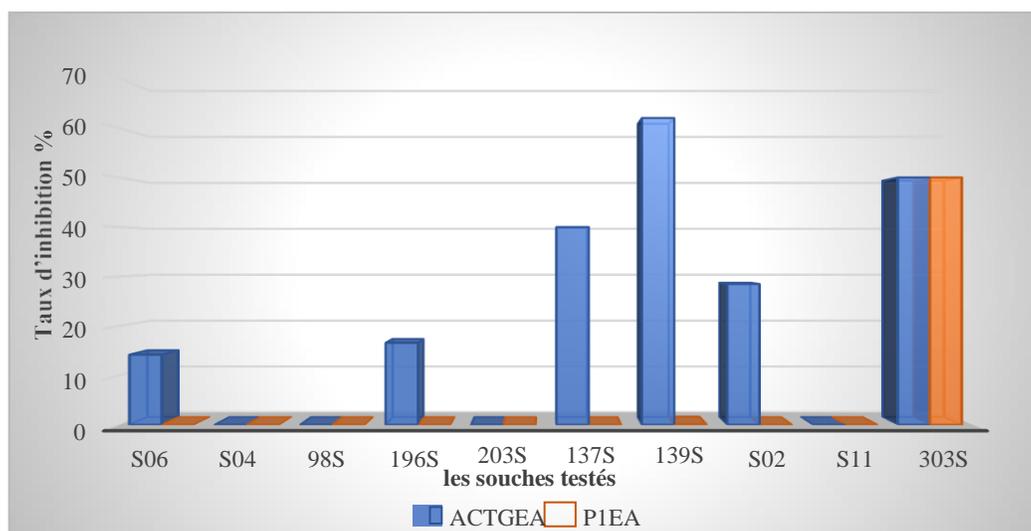


Figure 39 : les taux d'inhibition des extraits bruts des *A.baumannii* (P1EA, ACTGEA) sur la formation du biofilm des *S. aureus*.

ACTGEA:Extrait de la souche ACTG par le solvant éthyle acétate ; **P1EA**: Extrait de la souche P1 par le solvant Ethyle acétate

D'après la **figure (39)** et le **Tableau XII (Annexe III)**, nous observons une diminution de formation de biofilm maximale vis-à-vis la souche 139S avec un pourcentage d'inhibition de 62%, traduite par une diminution de sa DO de 0.08 à 0.03, en présence de l'extrait ACTGEA. Ce résultat indique une inhibition totale de biofilm car elle est égale à la DO du témoin (0.03= pas de formation de biofilm). Un pourcentage de diminution de biofilm de 12.50% en présence de l'extrait P1EA a été obtenue pour la même souche.

De même, les valeurs obtenues ont révélé une diminution de la formation de biofilm (50%) de la souche 303S, après culture en présence des deux extraits P1EA et ACTGEA. La DO absorbé en absence des extraits été (0.06). En comparant avec la DO obtenue en présence des deux extraits (0.03) nous constatons que l'inhibition de biofilm été totale.

Les taux de réduction de la formation de biofilm des souche 137S, S02, 98S et S06 ont été obtenue en présence de l'extrait ACTGEA de 40%, 28.5%, 16.60% et 14.20% respectivement (**Tableau XII**) (**Annexe III**) (**Figure 38**).

Nous remarquons aussi selon nos résultats (**TableauXII**) (**Annexe III**), que l'effet inhibiteur des deux extraits (P1EA et ACTGEA), sur la formation de biofilm des *S.aureus*

s'accompagne visiblement d'une augmentation la DO absorbé par le biofilm des souches traités (une augmentation de formation de biofilm).

2.Extrait brut par Hexane

- **L'extrait P1HEX et ACTGHEX**

L'activité anti biofilm des extraits issue des deux souche d'*A.baumannii* (ACTG et P1) extraite par le solvant hexane (P1HEX et ACTGHEX) ont été également testé à l'égard des 10 souches de *S.aureus* .

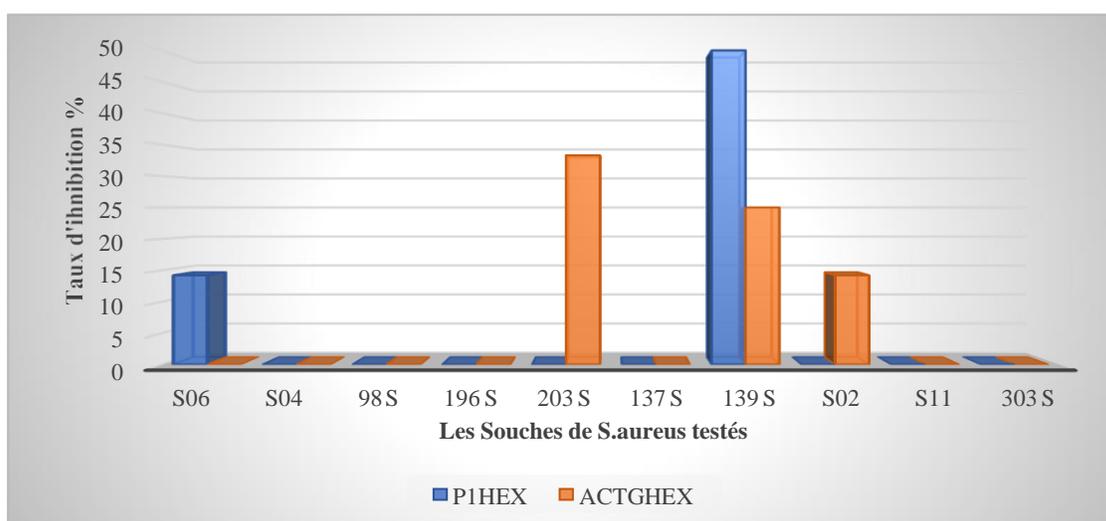


Figure 40 : les taux d'inhibition des extraits bruts des *A.baumannii* (P1HEX, ACTGHEX) sur la formation du biofilm des *S. aureus*.

P1HEX : extrait de la souche P1 par le solvant hexane ; **ACTGHEX :** extrait de 1 souche ACTG par le solvant hexane

Selon la **figure (40)** et le **tableau (Tableau XII) (Annexe III)**, les tests d'activité anti biofilm des *S.aureus* obtenu par ces deux extraits montrent que l'extraction des deux souches d'*A.baumannii* par l'hexane, est capable d'inhiber de manière moins importante la formation de biofilm par rapport aux deux extrait par l'acétate d'éthyle.

Les tests d'activité anti biofilm des deux extraits P1HEX et ACTGHEX ont révélés une réduction de la formation de biofilm de la souche 139S en présence de l'extrait P1HEX suite à la comparaison de la DO du contrôle (0.08 biofilm modéré) avec la DO du test (0.04 faible biofilm), avec un pourcentage de 50% d'inhibition. Concernant l'extrait ACTGHEX, une diminution de la formation de biofilm a été obtenu à 25% contre la même souche.

Le pourcentage d'inhibition le plus faible a été enregistré pour la concentration 14.2% avec les deux souches S06 en présence de l'extrait ACTGHEX et S02 en présence de l'extrait P1HEX.

Nous remarquons selon nos résultats obtenus (**Tableau XII**)(**Annexe III**), que l'effet inhibiteur des deux extraits (P1HEX et ACTGHEX), sur la formation de biofilm des *S.aureus* s'accompagne également d'une augmentation la DO absorbé par le biofilm des souches traités (une augmentation de formation de biofilm).

2. Evaluation de l'activité anti biofilm de l'extrait brut ACTGEA (10 mg /ml) vis-à-vis les souches de *S.aureus*

La comparaison de l'activité anti biofilm entre les deux extraits des deux souches ACTG et P1 obtenues par l'acétate d'éthyle (ACTGEA et P1EA) et l'hexane (ACTGHEX et P1HEX), indique que l'extraction par l'acétate d'éthyle a inhibée la formation de biofilm des souches de *S.aureus* plus que les extraits obtenue par l'hexane avec une concentration de 50 mg/ml.

En se basant sur ces résultats nous avons choisi la souche ACTG pour établir un deuxième essai utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant et avec une concentration de 10mg/ml. L'activité anti biofilm du nouvel extrait ACTGEA a été observée chez 6 souches (60%) de *S.aureus* (303S,137S,139S ,S02 ,S06 et 98S) .

(**Tableau XIII**) (**Annexe III**).

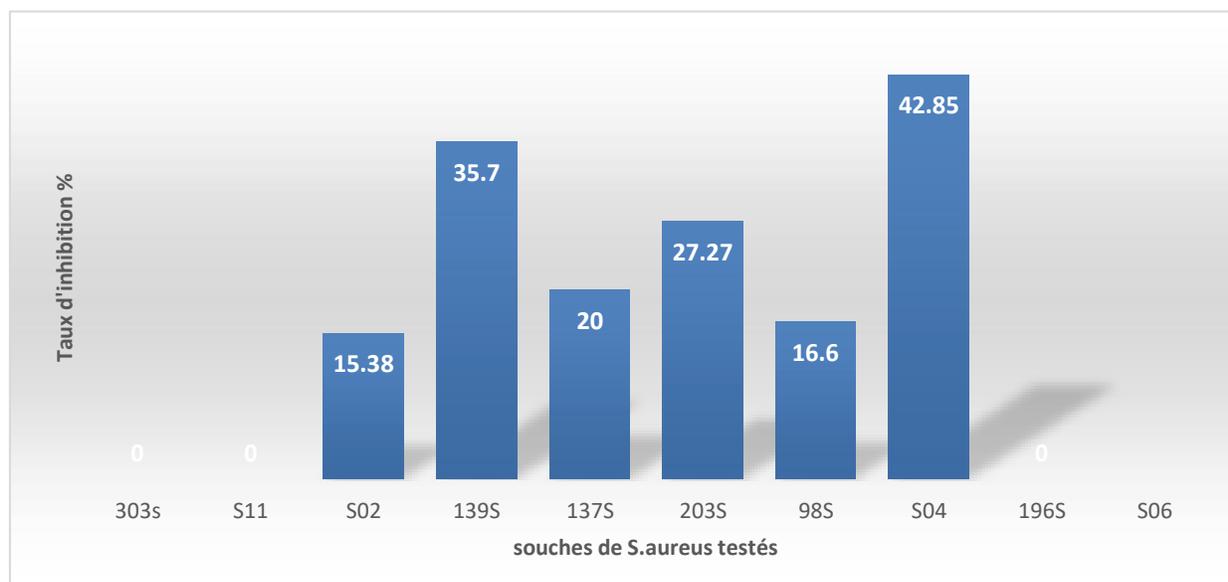


Figure 41 : Effet de l'extrait ACTGEA sur la formation du biofilm des *S.aureus*.

D'après la **figure (41)** et le **tableau XIII (Annexe III)**, nous remarquons que le plus grand taux d'inhibition de formation de biofilm a été obtenu avec la souche S04 (42.85%), avec une diminution de DO de (0.14 biofilm modéré) à (0.08 faible biofilm). Suivi par la souche 139S avec un taux d'inhibition de 35.70%, d'un biofilm modéré à un faible biofilm.

Des taux d'inhibition de biofilm ont été observés également chez les souches 203S, 137S, 98S et S02 avec un pourcentage de 27.27%, 20%, 16.60% et 15.38% respectivement.

Aucune inhibition de biofilm a été observé avec les deux souches 196S et S06, en revanche une augmentation de DO a été obtenu avec la souche S11 de 0.11 à 0.14 et avec la souche 303S de 0.10 à 0.11.

A. Dosage des polyphénols totaux de l'extrait ACTG

Après avoir constaté une importante activité anti-biofilm de l'extrait ACTGEA, notre objectif était d'expliquer les facteurs responsables de cette activité. Nous avons estimé la teneur en polyphénols totaux dans cet extrait.

La méthode de Folin-Ciocalteu a été utilisée pour estimer la teneur en phénols totaux de l'extrait ACTGEA. Le virage de couleur indique une réduction de réactif FC et par conséquent l'oxydation des polyphénols (**Figure 42**). Une gamme étalon a été établie en utilisant différentes concentrations d'acide gallique, et une équation standard de courbe a été obtenue ($y = 0,3077x + 0,0244$; $R^2 = 0,9828$) (**Figure 43**). Les résultats obtenus sont exprimés en milligrammes équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait sec (mg EAG/mg EXS). Outre sa sensibilité, cette méthode de dosage présente une reproductibilité, car l'absorbance est étroitement corrélée à la concentration d'acide gallique utilisée dans la gamme étalon



Figure 42 : Résultat des dilutions de l'acide gallique après 5min d'incubation (**Originale**).

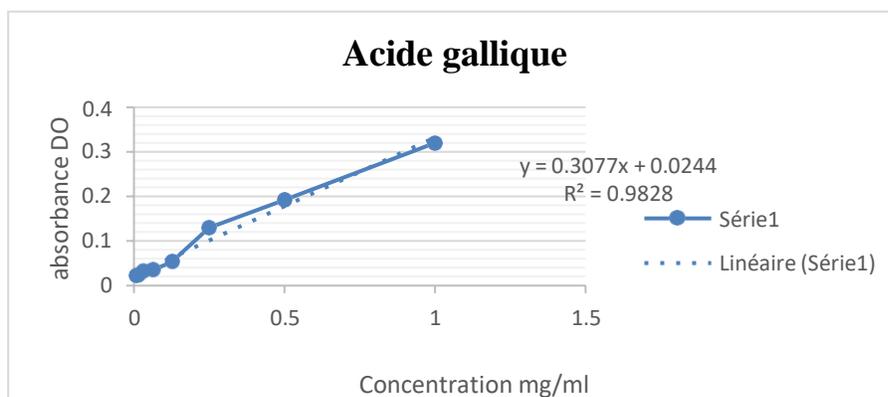


Figure 43 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique.

Selon nos résultats, il a été constaté que l'extrait ACTG EA présente une teneur en polyphénols de $2,955 \pm 0,01$ mg EAG/mg EXS.

| Extraits | Teneur en polyphénols totaux (mg GAE /mg) |
|----------|-------------------------------------------|
| ACTG | $2,955 \pm 0,01$ |

B. Evaluation de l'activité anti oxydante de l'extrait ACTG EA par DPPH

La mesure du potentiel antioxydant est réalisé en déterminants les produits résultants de l'oxydation ou en évaluant l'aptitude à piéger des radicaux de molécules réactionnels.

L'évaluation de l'aptitude de l'extrait à piéger des radicaux libres consiste donc à mesurer sa capacité à ralentir ou inhiber la création des radicaux libres.

Avant de mesurer l'absorbance de notre échantillon et notre témoin nous avons observé un changement de couleur de notre échantillon ainsi que du témoin après une incubation de 30 minutes (**Figure 44**).

Dans le cas de l'évaluation de l'activité antioxydante en fonction de l'équivalence en acide ascorbique, la méthode consiste à comparer l'absorbance de notre échantillon à celle d'une droite d'étalonnage qui relie l'absorbance à la concentration en acide ascorbique (**Figure 45**).



Figure 44 : le résultat de virage de couleur de notre échantillon (**Originale**).

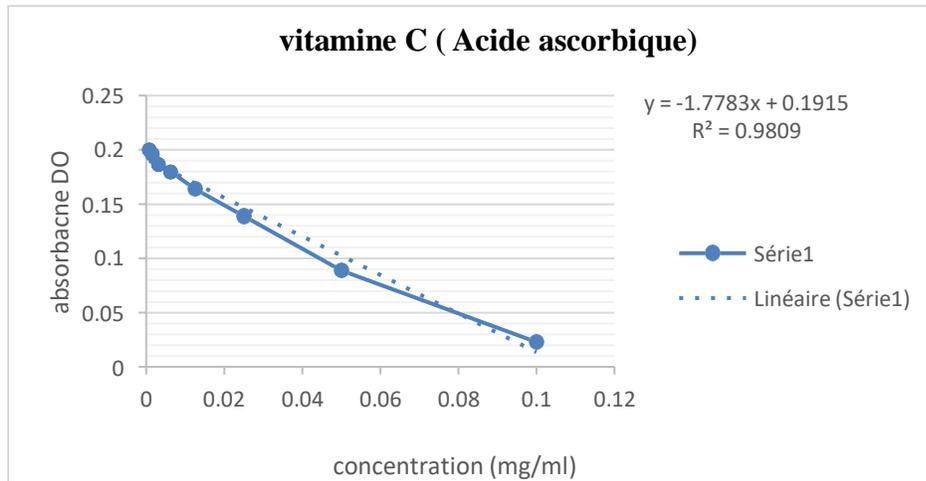
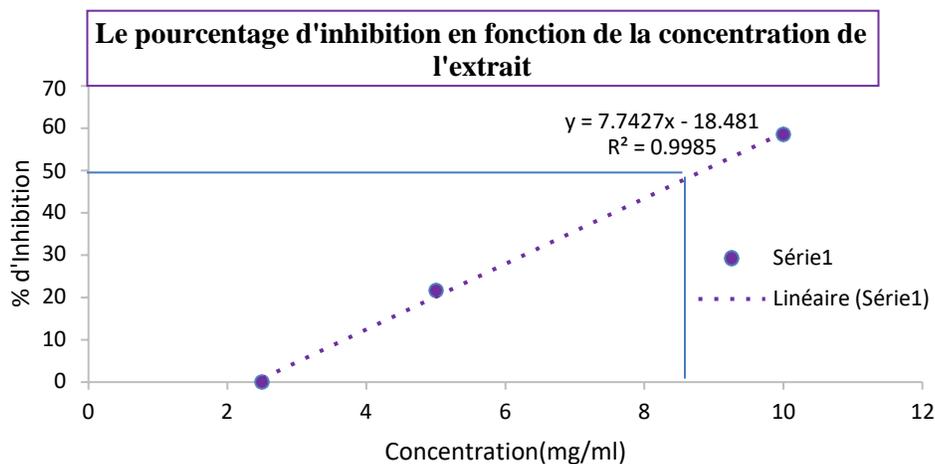


Figure45 : Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique.

Nous avons choisi parmi de nombreux modes d'expression de cette mesure d'utiliser le pourcentage d'inhibition (IP) et / l'équivalence en vitamine C (VCE) obtenue par spectroscopie UV-invisible (Figure46).

Figure 46 : Pourcentages d'inhibition du radicale DPPH* de l'extrait ACTG EA.



D'après le résultat représenté dans la figure (46), il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre de l'extrait ACTG EA augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait.

| Extraits | Activité antioxydante DPPH (Valeurs d'IC50 en mg/mL) |
|----------|------------------------------------------------------|
| ACTG | 8,844± 0,01 |

III. 2.Discussion

La formation de biofilm est un facteur de pathogénicité majeur qui entraîne des infections tolérantes aux antibiotiques. Cela est particulièrement vrai pour les patients portant des dispositifs médicaux tels que des cathéters et les prothèses articulaires. Les corps étrangers offrent un environnement propice à l'attachement et à la croissance du biofilm, ce qui entraîne une sensibilité réduite aux agents antimicrobiens ainsi qu'à la réponse immunitaire de l'hôte. Les infections liées au biofilm peuvent également se former sur des surfaces tissulaires sans rapport avec des corps étrangers, comme chez les patients atteints de fibrose kystique, la sinusite chronique et les infections chroniques (diabétiques) de plaies (**Ciarolla et al., 2022**).

Les infections nosocomiales (IN), également connues sous le nom d'infections associées aux soins (IAS), surviennent 48 heures après l'admission à l'hôpital, 3 jours après la sortie de l'hôpital ou 30 jours après une intervention chirurgicale (**Nouri et al., 2020**). Ils sont considérés comme des complications graves qui aggravent le pronostic de la maladie, entraînent un taux de mortalité plus élevé, prolongent la durée du séjour à l'hôpital et entraînent une augmentation du coût du traitement (**Labovská, 2021**).

De nos jours, le rôle pathogène des bactéries productrices de biofilms en médecine est bien établi dans l'augmentation des infections chroniques ainsi que celle associées aux dispositifs médicaux (**Olivares, 2020**).

Selon **Merradi et al., (2023)**, *S.aureus* est le deuxième agent bactérien le plus fréquent dans les infections associées aux soins de santé dans la région méditerranéenne (12,5 % en Algérie). Cette bactérie est l'un des pathogènes les plus courants dans les infections bactériennes liées aux biofilms (**Qian et al., 2020**). Étant donné que la formation de biofilm et la résistance aux antibiotiques sont fonctionnellement liées, la détection de l'expression du biofilm dans les isolats cliniques serait avantageuse pour la prise de décision thérapeutique (**Manandhar et al., 2018**).

Au cours de notre étude, nous avons analysé 533 prélèvements, parmi lesquels 35,83 % se sont révélés positifs. Parmi les prélèvements positifs, nous avons identifié 32 souches d'*A. baumannii*, correspondant à une fréquence de 17 %, ainsi que 46 souches de *S. aureus*, équivalentes à 24 %. Des taux relativement similaires ont été observés dans d'autres études par **Alioua, (2015)** qui a trouvé une positivité de 35 %. **Azzam, (2018)** a rapporté une fréquence d'*A. baumannii* de 19 % et une fréquence de *S. aureus* de 26,4 %. En revanche, **Boukhatem, (2015)** a trouvé une positivité des prélèvements de 22,73 %.

Selon nos résultats obtenus, les souches des deux espèces, *S. aureus* et *A. baumannii*, proviennent le plus souvent des prélèvements de pus, avec une fréquence de 45,65 % et 36,84 % respectivement. Ces observations concordent avec celles rapportées dans l'étude de **Meliani et al., (2019)**, et **Alamri et al., (2020)** qui ont enregistré une fréquence plus élevée dans les prélèvements de pus 71,43 % et 25% respectivement.

Selon nos résultats, la fréquence des *A. baumannii* était plus élevée dans le service de réanimation (56,25 %). Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés précédemment par **Nariganda et al., (2019)**.

Nous avons également remarqué, d'après nos résultats, que les souches de *S. aureus* proviennent le plus souvent du service de chirurgie, avec une fréquence de 28,26 %. Ces résultats concordent avec les observations faites par **Ouidri, (2018)** qui a trouvé que la majorité des souches de *S.aureus* proviennent de service traumatologie avec une fréquence de 33.48%.

Les infections associées aux soins de santé touchent un grand nombre de patients, à la fois à l'extérieur et à l'intérieur des services de soins intensifs, et près d'un patient sur dix atteint d'une infection associée aux soins décède (**Costoya et al., 2019**).

Ces résultats nous ont permis de refléter l'ampleur et l'implication majeure des souches d'*A. baumannii* et de *Staphylococcus aureus* dans la colonisation des différents services du EPH de Koléa.

Ces dernières années, l'émergence de bactéries multirésistantes a compliqué le diagnostic et le traitement cliniques (**Qian et al., 2020**). Nous avons testé dans notre étude différents familles d'antibiotiques classiques les plus utilisés en thérapie vis-à-vis 46 souches de *S.aureus* et 32 souches d'*A.baumannii*.

Staphylococcus aureus s'est rapidement adaptée aux antibiotiques, ce qui a entraîné la diffusion de souches de *S.aureus* résistantes à la méthicilline (SARM), qui sont responsables d'environ 30 % des (IN) (**Ouidri et al., 2018**).

D'après nos résultats, la résistance des souches isolées de *S.aureus* vis-à-vis la Céfotaxime

et l'oxacilline été de 56.50%, en effet 56.5% de nos souches sont des MRSA. Nos résultats s'accordent avec les résultats de **Alioua et al., (2015)**, la fréquence des *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM) isolés à partir de trois hôpitaux à Annaba, était de 63,5%. Également selon **Ouidri et al., (2018)** et **Antri et al., (2010)**, les MRSA représente 45,6 % et 47.4% respectivement des souches isolées dans les hôpitaux de l'Algérie.

La plasticité génomique confère à *S. aureus* une forte capacité à s'adapter à son environnement, même en présence de différents antibiotiques, ce qui déclenche donc l'émergence de souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques (**Wang et al., 2022**).

Concernant les *A.baumannii*, d'après nos résultats, les 32 souches ont présentés des niveaux de résistance extrêmement élevés à tous les antibiotiques, à l'exception de la colistine.

Il existe différentes méthodes décrites dans la littérature actuelle pour détecter la production de biofilms, telles que la méthode de culture tissulaire en plaque (TCP), la méthode du tube (TM) et la méthode de l'agar rouge Congo (RCA) (**Panda et al., 2016**). Dans notre étude nous avons choisis deux méthodes différentes : la méthode qualitative du Rouge Congo Agar (RCA) et la méthode quantitative du Tissue Culture Plate (TCP). Nous avons sélectionné 25 souches d'*A.baumannii* et 38 souches de *S.aureus* pour évaluer leurs capacités à former un biofilm.

La recherche de la production de slime sur milieu Rouge Congo nous et a permis d'obtenir plusieurs résultats pour les deux espèces (*A.baumannii* et *S.aureus*).

D'après les résultats obtenus nous observons que 63.15% des souches de *S.aureus* sont productrice de slime sur rouge Congo dont 1(2.63%) a donné des colonies noires sur rouge Congo, 16 (42.10%) ont donnée des colonies à centre rouge et à contour noir et 21 (55.26%) ont donnée des colonies rouges à surface lisse.

Nous avons constaté des similitudes significatives dans les résultats de **Achek et al., (2020)**, qui a trouvé une production de slime sur le rouge congo avec une fréquence de 68,4%. En revanche la répartition des résultats positifs de la production de slime diffère de celle observée

dans notre étude. Parmi les souches productrices de slime sur le rouge congo, nous avons constaté que 47,4% ont généré des colonies noires sur le rouge Congo, tandis que 21,1% ont présenté des colonies variables affichant un centre rouge et un contour noir. La fréquence de production de la production de slime sur rouge congo obtenus par **Zerroug et al., (2022)** (41,66 %) est inférieure à celle observée dans notre étude (63.15%).

D'après nos résultats nous observons que parmi toutes les souches *d'A.baumannii* isolés (25) à partir des patients hospitalisés aucune d'entre elles n'a démontré la production de slime sur rouge Congo. Selon **Gedefie et al., (2021)** 10.26% des souches *d'A.baumannii* ont été positif par la méthode qualitatif (TCP)

La méthode quantitatif (TCP) nous a permis de mesurer la formation de biofilm après une croissance dans du TSBG à 1% de glucose pendant 24 heures à 37 °C. La mesure spectrophotométrique des densités optiques (DO) des cellules adhérentes nous a permis de classer notre collection d'isolats cliniques en quatre catégories (Forte production de biofilm , production modéré , faible production et pas de production)

D'après nos résultats, on remarque que 63.15% des souches de *S. aureus* sont dotées de capacités de production de biofilm, dont 2.63%% produisent un biofilm considéré comme étant fort, tandis que 42.10% produisent un biofilm modéré et 21.05% produisent un biofilm faible et 34.21% sont considérés comme des souches non formatrice de biofilm.

Nos résultats concordent avec ceux menée par l'étude de **Zerroug et al., (2022)**, qui ont également constaté une fréquence similaire de production de biofilm à la fois par la méthode TCP et par la méthode RCP.

Le pourcentage de forte production de biofilm par l'ensemble des souches de *S. aureus* était le plus bas (2,63 %). Ce même résultat a été observé dans les résultats de l'étude menée par **Ghelai et al., (2014)**.

Selon **Achek et al., (2020)** les résultats obtenus par la technique quantitative ont révélé des résultats différents une production de biofilm de 52,6% dont 10.5% forte production ,5.3% production modérés et 36,8% faible production .

Concernant les souches d'*A. baumannii*, il a été observé que 84% d'entre elles ont la capacité de produire du biofilm, dont 24% produisent un biofilm modéré et 60% produisent un biofilm faible, et 16% sont considérés comme des souches non formatrices de biofilm. Nos résultats sont proche avec ceux rapportés précédemment par **M'Hamedi, (2015)** qui a trouvé une production de biofilm de 100% dont 20% production forte de biofilm 63.33% production modéré et 16.66% faible production.

La méthode RCA semble être une méthode moins sensible pour la détection du biofilm que les méthodes de dosage en plaque micro titration ce qui pourrait expliquer le faible niveau de formation de biofilm détecté dans notre étude (**Sharma et al., 2019**).

Face à cette émergence des *S.aureus* formatrice de biofilm et leurs grande tolérance aux biocides et au système immunitaire, la découverte de nouvelles molécules inhibitrices fait l'objet de nombreuses recherches (**Moormeier et Bayles, 2017**).

Des recherches ont montré que les communautés de biofilms mixtes, sont des communautés très compétitives à cause de l'espace et ressources limités (**Nadell et al., 2016**).

Notre travail actuel vise à évaluer le potentiel anti biofilm des composé du surnageant des *A.baumannii* contre les pathogènes nosocomiaux résistants aux antibiotiques : *Staphylococcus aureus*.

Les extraits des deux bactéries d'*A.baumannii* ACTG et P1 formatrice d'un biofilm modéré, ont présenté une activité anti-biofilm non négligeable contre les *S. aureus*.

Les pourcentages d'inhibitions ont été variables en fonction de l'extrait et la concentration. Effectivement, l'extraction par acétate d'éthyle des deux *A.baumannii* ACTG et P1 a présenté une activité anti biofilm très importante à une concentration de 50 mg/ml. Le taux maximum d'inhibition par l'extrait ACTGEA été de 62% vis à vis la souche 139S et (50%) par l'extrait P1EA vis à vis la souche 303S; indiquant une inhibition totale de biofilm des deux souches constatée après comparaison de leurs DO absorbée par le biofilm formé en présences des deux extrait (ACTGEA, P1EA) et la DO du témoin.

Au contraire, les taux maximaux qui ont été obtenus pour les deux souches extraites par l'hexane, sont (33.33%) par l'extrait ACTGHEX vis à vis la souche 203S et (50%) par l'extrait PIHEX vis à vis la souche 139S.

Le deuxième essai de l'activité anti biofilm de la souche ACTG extraite par l'acétate d'éthyle à une concentration de 10mg/ml, a montré une activité anti biofilm similaire au premier. Le plus grand taux d'inhibition été de 42.85%, par rapport au plus faible taux d'inhibition été de 15.38%.

Dans notre étude, la souche ACTG extraite par l'acétate d'éthyle a montré des résultat intéressant, en effet elle a provoqué une activité anti biofilm de 60% des souches de *S.aureus* .

En effet d'après plusieurs études récentes ont révélé que l'agent pathogène gram négatif *Acinetobacter baumannii* limite la croissance et la formation de biofilm des *Staphylococcus aureus*, par sa molécule de communication cellulaire "quorum sensing ", N acyl homoserine lactone (Qazi et al., 2006 ; James at al., 2016) et par la synthèse de plusieurs métabolites secondaires (Muslim et al., 2016; Tiwari et al., 2018; Binbin et al., 2022).

L'inhibition de formation de biofilm des *S.aureus* peut être expliquée par la production de molécule de communication cellulaire (QS) : N-acyl-homoserine-lactone par *A.baumannii*.

Selon l'étude de James et al., (2016), dans les 12 premières heures, les comptages de CFU du biofilm de *S. aureus* après le traitement par la molécule de communication AHL purifiée à une concentration de 40 uM, ont montré une réduction de (50 %) par rapport au témoin non traité, une inhibition de (67%) a été observée pour l'ATCC de *S.aureus* .Concernant les souches cliniques le taux d'inhibition varie de (68.35%) à (17.33%).

Ils ont observé que cette AHL affectait la paroi cellulaire de *S. aureus* en bloquant l'enzyme de synthèse de la paroi cellulaire D-alanine-D-alanine synthetase A. et après analyse au microscope électronique ils ont révélé des altérations de la paroi cellulaire et des changements dans la morphologie cellulaire des cellules de *S. aureus* traités par AHL.

Qazi et al., (2006) ont démontré que les AHL secrété par *P.aeruginosa* à des concentrations de 30 uM et 75 uM inhibe l'expression des gènes impliqués dans la QS chez *S.*

aureus. Ils ont observé une inhibition de 60% de l'expression du gène Agr responsable de la synthèse des molécules de "quorum sensing" des *S.aureus* (AIP) et éventuellement la formation de biofilm.

La sécrétion de métabolites secondaires peut aussi participer dans la compétitivité des *A.baumannii* et induire l'inhibition de formation de biofilm par les *S.aureus*.

Dans une autre étude de **Muslim et al., (2016)**, leurs objectif était de visé la recherche de l'enzyme L-Asparaginase dans le surnageant de *Acinetobacter baumannii* en plus de la purifier et d'étudier l'activité antibiofilm de cette dernière contre *Staphylococcus aureus* formatrices de biofilm, d'après leurs résultats le taux d'inhibition de biofilm contre les *S.aureus* était de 30%.

De plus dans l'étude **Tiwari et al., (2018)**, leurs objectifs été d'explorer la capacité de production des métabolites secondaires antimicrobiens et anti biofilm qui pourraient inhiber la croissance d'autres pathogènes ESKAPE. D'après leurs résultat, les métabolites secondaires TP-1161 et nosiheptide produites par *Acinetobacter baumannii*, les deux appartenant à la classe des antibiotiques thiopeptides, ont présenté des activité anti biofilm et anti bactérienne très élevé contre les autre pathogènes ESKAPE dont *S.aureus* avec plus de 60% d'inhibition de biofilm (**Rajput et al., 2018**).

Dans une autre étude de **Nassar et al., (2021)**, ils ont analysé l'ensemble d'expression des gènes de *S. aureus* et de leur modulation à différents stades de maturation du biofilm afin d'identifier les métabolites nécessaires, peu importe le stade de maturation du biofilm. Ils ont démontré que la glutamine et le glutamate sont essentiels au développement et à la survie des biofilms *S.aureus*, et que l'interférence avec leur métabolisme à des effets néfastes sur leurs biofilm.

Evidement la glutamine est impliqué dans la biosynthèse de l'ornithine et de l'arginine et également impliqué dans le cycle de Krebs (**Halsey et al., 2017**). Le rôle de l'arginine est important dans le développement du biofilm et l'homéostasie du pH (**Lindgren et al., 2014**).

La production de l'enzyme L-glutaminase par *Acinetobacter baumannii* a été démontrée par **Muslim, (2014)** ; **Zhang el al., (2019)** et par **Ahmed et al., (2022)**, donc ces résultats peut expliquer l'inhibition de biofilm des *S.aureus* suite à la dégradation de glutamine par cette enzyme.

Il y'a, cependant, à signaler d'après nos résultats une légère augmentation de biofilm des *S.aureus* en présence des différents extraits . Cette augmentation de biofilm peut être expliquée par la production des molécules de quorum quenching telles que *yayurea* A et B par les souches staphylococciques, qui inhibent la signalisation QS des bactéries Gram-négatif. Permettant la compétitivité lorsqu'elles partagent une niche environnementale commune avec les bactéries Gram négative (Chu et al., 2013).

Selon James et al., (2016), la molécule de communication AHL de *A.baumannii* a été trouvée d'induire la production de biofilm en termes de synthèse d'EPS nécessaire à la survie, tout en inhibant la multiplication des *S.aureus*, menant à une stagnation des nombres de cellules.

L'augmentation peut être aussi expliquée par l'utilisation du bouillon TSB additionné de 1% de glucose. Dans l'étude de Lade et al., (2019), l'addition de 1 % de glucose dans les milieux de culture (TSB) a fortement favorisé la formation de biofilms par les souches de SARM et de MSSA, comparativement au TSB seul. Parmi les 21 souches de SARM, 28,5 % ont montré une forte formation de biofilm comparativement à seulement 5,2 % des souches de MSSA.

Le stress oxydatif pourrait être l'un des principaux mécanismes pour les cellules bactériennes de passer d'un état planctonique à un état de biofilm. Ce stress oxydatif pourrait être causé par des stress abiotiques (pH, température, manque d'oxygène), la présence d'antimicrobiens ou le système immunitaire de l'hôte (Ong et al., 2018).

L'association entre le stress oxydatif et la formation de biofilm a été examinée par Gambino et Cappitelli, (2016), brièvement, le stress oxydatif chez les microorganismes joue un rôle important dans l'attachement, la modulation de QS, l'agrégation et la production de EPS dans la régulation des mécanismes de défense redox (ROS) et l'hétérogénéité des biofilms.

Par conséquent, la capacité des antioxydants a neutralisé les ROS (ROS Quenching) par la présence de groupe fonctionnels phénolique et poly-phénolique, peut réduire la formation du biofilm de *S. aureus* en interférant avec le ROS endogène ou exogène, qui sert de signaux réglementaires pour de nombreuses bactéries dans l'établissement du biofilm (Ong et al., 2018).

Ainsi, les composés qui pourraient cibler les régulateurs du stress oxydatif, tels que les antioxydants, pourraient potentiellement être exploités comme une nouvelle stratégie pour le

contrôle des biofilms et pour traiter les infections associées au biofilm à l'avenir.

Selon nos résultats, il a été constaté que l'extrait ACTG EA présente une teneur en polyphénols de $(2,955 \pm 0,01 \text{ mg EAG/g EXS})$.

Nos résultats sont différents de ceux trouvés par **Monowar et al., (2019)** qui ont trouvé que l'extrait EA des *A.baumannii* a montré une quantité de $(967,78 \pm 34,65 \mu\text{g EAG/mg})$.

La présence des composés phénoliques chez *A. baumannii* pourrait représenter des propriétés antioxydantes (**Monowar et al.,2019**).

En tant que solvant d'extraction, l'EA est sélectif pour l'extraction de composés phénoliques de faible poids moléculaire et de polyphénols de poids moléculaire élevé. De plus, l'EA permet d'obtenir le contenu phénolique le plus élevé tout en éliminant sélectivement les composés non phénoliques des matières extractibles (**Monowar et al.,2019**).

D'après nos résultats, il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre de l'extrait ACTG EA augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait ainsi que la capacité à réduire les radicaux libres est de $8,844 \pm 0,01 \text{ IC}_{50}$ en $\mu\text{g/mL}$.

Selon **Monowar et al., (2019)**, les extraits d'*A. baumannii* par l'acétate d'éthyle ont permis de réduire les radicaux libres stables de DPPH au niveau de concentration plus élevé (500 à 1000 $\mu\text{g/mL}$).

Les antioxydants ont la capacité à affecter la formation de biofilms de certains agents pathogènes microbiens, notamment *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* et *Pseudomonas aeruginosa*. (**Francolini et Piozzi ,2020**).

Dans l'étude de **Lopes et al., (2017)**, l'exposition de *S. aureus* aux polyphénols a perturbé leur fonctionnement du système d'efflux et, par conséquent, une inhibition de la formation de biofilm de plus de 70 % contre *S.aureus* a été obtenue.

En effet, l'expression des systèmes d'efflux dans les bactéries est une stratégie importante pour réguler les quantités intracellulaires des déchets du métabolisme cellulaire dans la matrice du

biofilm. Ainsi, les conditions influençant l'activité des systèmes d'efflux dans les cellules bactériennes pourraient influencer directement leur capacité à former et à maintenir la structure du biofilm (**Lopes et al., 2017**).

De plus selon les résultats d'une autre étude de **Hongmei et al., (2014)**, montrent que les polyphénols ont une capacité antibiofilm ou anti-QS et améliorent l'effet des désinfectants sur les biofilms des *S.aureus*, en réduisant la synthèse des auto inducteurs type 2 (AI-2).

Dans une étude menée par **Blando et al., (2019)**, l'inhibition du biofilm pourrait être expliquée par la présence de flavonoïdes dans les extraits de cladodes. En effet, des flavonoïdes tels que la quercétine, l'apigénine, la lutéoline et la rutine se sont révélés efficaces dans l'inhibition du biofilm de *Staphylococcus aureus*.

Notre étude nous amène à conclure que l'extrait de la souche d'*Acinetobacter baumannii* (ACTG) par l'acétate d'éthyle présente une activité antibiofilm non négligeable vis-à-vis les souches de *S.aureus* résistante à la méthiciline.

Ces résultats prometteurs ouvrent une nouvelle voie dans la recherche de nouveaux outils thérapeutiques pour l'inhibition de la formation de biofilms en milieu médical par l'un des agents pathogènes du groupe ESKAPE "*Acinetobacter baumannii*" porteurs de métabolites secondaires anti-biofilm.

Conclusion et perspectives

Le biofilm semble faciliter la survie de la bactérie pathogène *S.aureus* dans l'environnement hospitalier et chez l'hôte, en augmentant sa résistance aux antibiotiques, aux désinfectants et à la réponse immunitaire de l'hôte.

Notre travail nous a permis d'isoler 191 (35.83%) prélèvement positif parmi 533 prélèvements, dont 46 (24%) souches de *Staphylococcus aureus* et 32 (17%) souches d'*Acinetobacter baumannii* provenant de différents services de l'EPH de koléa.

L'évaluation de la formation de biofilm réalisée par les méthodes classique (RCA) et TCP a montré que (63.15%) des souches de *S.aureus* sont productrice de slime sur rouge Congo et (63.15%) sont productrice de biofilm par la méthode TCP . Concernant les *A.baumannii* aucune d'entre elles n'a démontré la production de slime sur rouge Congo , en revanche (84%) d'entre elles ont la capacité de produire du biofilm par la méthode TCP.

Notre étude a montré que l'extrait du surnageant la souche d'*A.baumannii* (ACTG) par l'acétate d'éthyle possède une meilleure activité antibiofilm vis à vis des dix souches de *S.aureus* (MRSA) avec une meilleure activité anti biofilm pour la souche 139S (un taux d'inhibition de 62% à une concentration de 50mg/ml).

Selon les résultats d'inhibition par les extraits P1EA et ACTGEA, on a marqué une diminution de formation de biofilm maximale vis-à-vis la souche 139S avec un haut pourcentage d'inhibition de 62% en présence de l'extrait ACTGEA.

Concernant les extraits P1HEX et ACTGHEX , nous avons enregistré un taux maximale d'inhibition de l'extrait P1HEX vis-à-vis la souche 139S avec un pourcentage de 50% et de 25% par l'extrait ACTGHEX vis-à-vis la même souche (139S)

Selon nos résultats, il a été constaté que l'extrait ACTG EA présente une teneur en polyphénols de $2,955 \pm 0,01$ mg EAG/g EXS.

D'après nos résultats, la capacité de l'extrait ACTGEA à réduire les radicaux libres est $8,844 \pm 0,01$ IC50 en mg/mL.

Selon nos résultats des tests d'activité anti biofilm des *S.aureus* obtenu par ces deux extraits montrent que l'extraction des deux souches d'*A.baumannii* par l'hexane, est capable d'inhiber de manière moins importante la formation de biofilm par rapport aux deux extrait par l'acétate d'éthyle.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de notre projet, restent préliminaires et nécessitent des études complémentaires approfondies à différents niveaux

- Détermination de la concentration minimale inhibitrice des biofilms de *S.aureus* par les molécules extra cellulaire d' *A.baumannii*.
- Il serait ainsi nécessaires de déterminer l'activité anti microbienne des extraits d'*A.baumannii* vis à vis les *S.aureus*.
- Établir une caractérisation fine et poussée des extraits d'*A.baumannii* par d'autre techniques telles que la CPG/SM ou l'HPLC/SM afin de purifié chaque de ses métabolites secondaires et les testé à diffèrent concentration et à diffèrent stade de formation de biofilm des *S.aureus*.
- Les activités anti biofilm et antioxydante doivent être évaluées dans d'autres systèmes in vitro (cellulaires et enzymatiques) comme in vivo afin de mieux cerner les interactions moléculaires de ces métabolites vis-à-vis de leurs cibles.
- Testé les différentes structures de la molécule AHL à différentes concentrations
- Et enfin testé ses métabolites secondaires et la molécule de QS N acyl homoserine lactone des *A.baumannii* envers les biofilm des autres bactéries pathogènes du groupe ESKAPE.

Références bibliographiques

A

Ayoub Moubareck C., Hammoudi Halat D. (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii*: A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics (Basel)*. ;9 (3):119.

Alemu G., Wondmagegn D., Melaku A., Yeshimebet K., Melkam T., Mihret T., Habtye B., Zenawork S .(2021).*Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation and Its Role in Disease Pathogenesis : A Review, Infection and Drug Resistance, 14 .pp 3711-3719.

Ahmad-Mansour N., Loubet P., Pouget C., Dunyach-Remy C., Sotto A., Lavigne J. P., Molle V. (2021). *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins*, 13(10), 677

Archer N. K., Mazaitis, M. J., Costerton J. W., Leid J. G., Powers M. E., Shirtliff M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445–459.

Avdić M., Džuzić N., Hasanić O., Spahić A., Smajlović Skenderagić L., Badnjević A., Hukić M. (2019).Development of a novel biofilm classification tool and comparative analysis of result interpretation methodologies for the evaluation of biofilm forming capacity of bacteria using tissue culture plate method. *Medicinski glasnik: official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina*, 16(1), pp13–21.

Achek, R., Hotzel, H., Nabi, I., Kechida, S., Mami, D., Didouh, N., Tomaso, H., Neubauer, H., Ehricht, R., Monecke, S., & El-Adawy, H. (2020). Phenotypic and Molecular Detection of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Sources in Algeria. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(2), 153.

Ahmed I., Rashid N., Suhail Z., Moyassar B., Hadi Al-S.(2022).Inhibition of Invasion of Breast Cancer Cells by Glutaminase Extracted from *Acinetobacter Baumannii* .in HIV nursing.vol22.N=2.

Alamri A. M., Alsultan A. A., Ansari M. A., Alnimr A. M. (2020). Biofilm-Formation in Clonally Unrelated Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(8), 630. Algeria. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(2), 153.

Alioua M.M.(2015).Les Staphylocoques : sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de staphylococcus aureus résistant à la méthicilline. Thèse de doctorat. Biochimie. Université Badji Mokhtar de Annaba.pp 117-155.

Azzam A.(2018).Evolution phylogénique de l'espèce *A.baumannii* au CHU de Tizi Ouzou et étude de la

résistance aux beta lactamines , aminosides et quinolones .Thèse de doctorat en sciences médicales .Microbiologie .Université de Mouloud Mammeri Faculté de médecine .Tizi Ouzou. Algérie.

Antri K., Rouzic, N., Dauwalder O., Boubekri I., Bes M., Lina G., Vandenesch F., Tazirn M., Ramdani-Bougouessa N., Etienne J. (2011). High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone ST80-IV in hospital and community settings in Algiers. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(4), 526–532.

B

Binbin C., Xiayu C., Quan G., Shihao S., Mingfang W., Jingyun L., Yinyue D., Beile G.,Jintae L.(2022).The Cell–Cell Communication Signal Indole Controls the Physiology and Interspecies Communication of *Acinetobacter baumannii*.*Microbiology Spectrum*.Volume 10

Bjarnsholt T., Alhede M ., Alhede M ., Eickhardt-Sørensen S ., Moser C ., Kuhl M ., Jensen P.O., Høiby N .(2013). The in vivo biofilm. *Trends in Microbiology* ; 21(9):p466-474

Bouchard D.(2013). Potentiel probiotique des bactéries lactiques de l'écosystème mammaire bovin contre les mammites à *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat. Biologie. Université de rennes 1. France. P 41-42

Baggett HC., Hennessy T.W., Rudolph K.(2004).Community-onset methicillinresistant *Staphylococcus aureus* associated with antibiotic use and the cytotoxin Panton- Valentine leukocidin during a furunculosis outbreak in rural Alaska. *J Infect Dis*. 189:p1565-1573.

Becker S.C., Roach D.R., Chauhan V.S., Shen Y., Foster-Frey J., Powell AM., Bauchan G., Lease RA., Mohammadi H., Harty W.J., Simmons C., Schmelcher M., Camp M., Dong S., Baker JR., Sheen T.R., Doran K.S., Pritchard D.G., Almeida R.A., Nelson D.C., Marriott I., Lee J.C., Donovan DM. (2016).Triple-acting lytic enzyme treatment of drug-resistant and intracellular *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*,6(2), 50-63.

Balaban N. Q., Helaine S., Lewis K., Ackermann M., Aldridge B., Andersson D. I., Brynildsen M. P., Bumann D., Camilli A., Collins J. J., Dehio C., Fortune S., Ghigo J. M., Hardt W. D., Harms A., Heinemann M., Hung D. T., Jenal U., Levin B. R., Michiels J., Zinkernagel A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature reviews. Microbiology*, 17(7), 441–448.

Bui, L. M., Conlon, B. P., & Kidd, S. P. (2017). Antibiotic tolerance and the alternative lifestyles of *Staphylococcus aureus*. *Essays in biochemistry*, 61(1), 71–79.

Bhattacharya M., Wozniak D. J., Stoodley P., Hall-Stoodley L. (2015). Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(12), 1499–1516.

Baird-Parker A.C.(1962).AN IMPROVED DIAGNOSTIC AND SELECTIVE MEDIUM FOR

ISOLATING COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI. *Journal of Applied Bacteriology*, 25(1), 12–19.

Brand-Williams W., Cuvelier, M E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. Technology* 28, 25–30.

Bondet V., Brand-Williams W., Berset C.(1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*,30(6) ,609-615

Boizot N, Charpentier J.P.,(2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA*, pp.79-82.

Bakour S., Olaitan A. O., Ammari H., Touati A., Saoudi S., Saoudi K., Rolain J. M. (2015). Emergence of Colistin- and Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 Clinical Isolate in Algeria: First Case Report. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 21(3), 279–285

Balaban N., Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R., Braunstein J. B., Silvestri C., Scalise G. (2007). Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilm Infection by the Quorum-Sensing Inhibitor RIP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 2226–2229.

Benamrouche N., Lafer O., Benmahdi L., Benslimani A., Amhis W., Ammari H., Assaous F., Azzam A., Rahal K., Tali Maamar H. (2020). Phenotypic and genotypic characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in Algerian hospitals. *Journal of infection in developing countries*, 14(12), 1395–1401.

Bouaouina S., Aouf A., Touati A., Ali H., Elkhadragey M., Yehia H., Farouk A.(2022). Effect of Nanoencapsulation on the Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. Against Multidrug-Resistant Clinical Isolates. *Nanomaterials*, 12, 2630.

Blando F., Russo R., Negro C., De Bellis L., Frassinetti S. (2019). Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Staphylococcus aureus* of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cladode Polyphenolic Extracts. *Antioxidants*, 8(5), 117.

Boukhatem M.N.,Ferhet M.A.,Mohamed R.H., Lalaoui N .,(2015). Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococci* isolated from kolea hospital (Algeria).*Journal of fundamental and applied sciences* 7(2) ,260-269

C

Chan K.-G., Cheng H. J., Chen J. W., Yin W.-F., Ngeow Y. F. (2014). Tandem Mass Spectrometry Detection of Quorum Sensing Activity in Multidrug Resistant Clinical Isolate *Acinetobacter baumannii*. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–6.

Chatane,I .Ziadi,C.(2017). Analyse phénotypique et quantitatification de la formation de biofilm par les

bactéries d'intérêt médical . Mémoire de master .Université des Frères Mentouri Constantine.Algérie .

Ciarolla A.A., Lapin N., Williams D., Chopra R., Greenberg D.E.(2022).Physical approaches to prevent and treat bacterial biofilm. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(1),54.

Costerton J. W., Geesey G.G., Cheng K.J. (1978). How bacteria stick. *Sci Am* 238:86-95

Cresti A., Chiavarelli M., Scalese M., Nencioni C., Valentini S., Guerrini F., D'Aiello I., Picchi A., De Sensi, F., Habib G. (2017). Epidemiological and mortality trends in infective endocarditis, a 17-year population-based prospective study. *Cardiovascular diagnosis and therapy*, 7(1), 27–35.

Clotilde C.(2015).Impact des antibiotiques sur l'histoire naturelle de la colonisation nasale par *S .aureus* .Thèse de doctorat .Epidemiologie .Université pierre et marie curie.France P 19.

Carocho M., Ferreira ICFR.(2013).A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chem Toxicol.* 51:15–25.

Coffey B. M., Anderson G. G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1149, 631–641.

Christensen G. D., Simpson W. A., Younger J. J., Baddour L. M., Barrett F. F., Melton D. M., Beachey E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996–1006.

Chu YY., Nega M., Wölfle M., Plener L., Grond S., Jung K., Götz F. (2013). A new class of quorum quenching molecules from *Staphylococcus* species affects communication and growth of Gram-negative bacteria. *PLOS Pathog.* 9:e1003654.

Costoya A., Becerra L. E. V., Meléndez-Ortiz H. I., Díaz-Gómez L., Mayer C., Otero A., Concheiro, A., Bucio E., Alvarez-Lorenzo C. (2019). Immobilization of antimicrobial and anti-quorum sensing enzymes onto GMA-grafted poly(vinyl chloride) catheters. *International Journal of Pharmaceutics*, 558, 72–81.

D

Deepika K.V., Pallaval V. B.(2018). Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships : Relevance to Complex Signalling Networks and Prospective Applications. In : Pallaval Veera Bramhachari (eds) *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence.* Pp 67–79

Doughari H.J., Ndakidemi P.A., Human I.S., Benade S. (2011). The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes and Environments.* 26, 101–112.

Duarte A., Ferreira S., Almeida S., Domingues F.C.(2016). Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*

from a Portuguese hospital:PFGE characterization, antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis* , 45, 29–33.

Donlan R. M. (2001).Biofilms and device-associated infections. *Emerging infectious diseases*, 7(2), 277–281.

De Haas C. J., Veldkamp K. E., Peschel A., Weerkamp F., Van Wamel W. J., Heezius E. C., Poppelier M. J., Van Kessel K. P., van Strijp, J. A. (2004).Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *The Journal of experimental medicine*, 199(5), 687–695.

Denis F., Ploy M. C., Martin C., Bingen E., Quentin R. (2011).Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Health Sciences.2^{ème} édition.Paris. p5-13

Denis F., Cattoir V., Martin C., Ploy M. C., Poyart C. (2016).Bactériologie médicale: techniques usuelles. Elsevier Health Sciences.

Doganli G.A. (2016). Phenolic content and antibiofilm activity of propolis against clinical MSSA Strains. ACG publication.10 (5) :617-627.

Doganli G.A ., Gülçin Ü ., Nazime M.D. (2016). Antibiofilm activity and chemical contents of propolis samples from Manisa-Turkey. Faculty of science and art, department of biology. 44(4):505 -513.

Djoudi F., Benallaoua S., Aleo A., Touati A., Challal M., Bonura C., Mamma C. (2015). Descriptive epidemiology of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and methicillinresistant *Staphylococcus aureus* among patients admitted to two healthcare facilities in Algeria. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 21(2), 218–223.

E

Erdem G., Leber A.(2018). Acinetobacter species. In Long S, Prober C, Fischer M (ed), Principles and practice of pediatric infectious diseases, 5th ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. e2 p 851–853.

Engelhardt K., Degnes K. F., Kemmler M., Bredholt H., Fjaervik E., Klinkenberg G., Sletta H., Ellingsen T. E.,Zotchev S. B. (2010).Production of a new thiopeptide antibiotic, TP-1161, by a marine *Nocardiopsis* species. *Applied and environmental microbiology*, 76(15), 4969–4976.

Erica S.(2016). "Fluid dynamic factors as a cause and effect of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* biofilms". *ETD collection for University of Nebraska - Lincoln*.10(24),71-72.

F

Francolini, I., Piozzi, A. (2020).Role of Antioxidant Molecules and Polymers in Prevention of Bacterial Growth and Biofilm Formation. *Current Medicinal Chemistry*, 27(29), 4882–4904.

Flemming H.-C., Wuertz S. (2019).Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*.

Fowler V. G., Jr Miro J. M., Hoen B., Cabell C. H., Abrutyn E., Rubinstein E., Corey G. R., Spelman D., Bradley S. F., Barsic B., Pappas P. A., Anstrom K. J., Wray D., Fortes C. Q., Anguera I., Athan E., Jones P., van der Meer J. T., Elliott T. S., Levine D. P.(2005).Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA*, 293(24), 3012–3021.

Freeman D. J., Falkiner F. R., Keane C. T. (1989).New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*, 42(8), 872–874.

G

Grace A.(2021).Analyses pharmacocinétique/pharmacodynamique in vitro et in vivo de l'impact de la taille de l'inoculum d'*Acinetobacter baumannii* vis-à-vis de la polymyxine B. *Médecine humaine et pathologie*. Université de Poitiers.

García-Betancur J. C., Lopez D. (2019).Cell Heterogeneity in Staphylococcal Communities. *Journal of molecular biology*, 431(23), 4699–4711.

González R.H., Nusblat A., Nudel B.C. (2001).Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiol Res*. 155:271–277.

Gambino M et Cappitelli F.(2016). Mini review: biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling*. ;32(2):167–178.

Ghellai L., Hassaine H., Klouche N., Khadir A., Aissaoui N., Nas F.,Zingg W. (2014). Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen. *Journal of Bacteriology Research*, 6(1), 1–6.

H

Holden M., Swift S.,Williams P. (2000). New signal molecules on the quorum-sensing block. *Trends in Microbiology*, 8(3), 101–103.

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

Hu L., Yue S., Qingye X., Linghong Z., Jintao H., Yan J., Lilin L. (2020).« Capsule Thickness, Not Biofilm Formation, Gives Rise to Mucoïd *Acinetobacter baumannii* Phenotypes That are More Prevalent in Long-Term Infections: A Study of Clinical Isolates from a Hospital in China ». *Infection and Drug Resistance*, 99, 109.

Holland T. L., Baddour L. M., Bayer A. S., Hoen B., Miro J. M., Fowler V.G.(2016).Infective

endocarditis. *Nature reviews. Disease primers*, 2, 16-59.

Harper D. R., Parracho H. M. R. T., Walker J., Sharp R., Hughes G., Werthén M., Lehman S., Morales S. (2014). Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*, 3(3), 270–284.

Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, Schumacher-Perdreau F, Peters G, Waldvogel FA.(1988). Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* 158:693–701.

Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M. (2011).Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(4), 305–311.

Halsey C. R., Lei S., Wax J. K., Lehman M. K., Nuxoll A. S., Steinke L. (2017).Amino acid catabolism in *Staphylococcus aureus* and the function of carbon catabolite repression. *MBio* 8:(14),34-16.

Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid, A., Iqbal M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 15(4), 305–311.

Haste N. M., Thienphrapa W., Tran D. N., Loesgen S., Sun P., Nam S. J., Jensen P. R., Fenical W., Sakoulas G., Nizet V., Hensler M. E. (2012).Activity of the thiopeptide antibiotic nosiheptide against contemporary strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antibiotics*, 65(12), 593–598.

Hecini-Hannachi A.,Bentchouala C .,Lezzar A .,Laouar H.,Benlabed K .,Smati F.(2016).

Multidrugresistant bacteria isolated from patients hospitalized in Intensive Care Unit in University Hospital of Constantine, Algeria (2011 - 2015). *African Journal of Microbiology Research*, 10 (33). pp. 1328-1336.

Hobley L., Harkins C., MacPhee CE., Stanley-Wall NR.(2015). Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol Rev* 39:649 – 669.

Hongmei Z., Wenyuan Z., Wenyan Z., Anlin Y., Yanlan L., Yan J., Shaosong H., Jianyu S.(2014).Inhibitory Effects of Citral, Cinnamaldehyde, and Tea Polyphenols on Mixed Biofilm Formation by Foodborne *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis*, *Journal of Food Protection*, Volume 77, Issue 6, Pages 927-933.

I

Ibberson C.B., Jones C. L., Singh S., Wise M. C., Hart M. E., Zurawski D. V., Horswill A. R. (2014). *Staphylococcus aureus* hyaluronidase is a CodY-regulated factor. *Infection and immunity*, 82(10), 4253–4264.

J

- Jung J., Park W. (2015).** Acinetobacter species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*. 99, 2533-2548.
- Jun Y., Youn C. K., Jo, E. R., Cho S. I. (2019).** In vitro inhibitory activity of N-acetylcysteine on tympanostomy tube biofilms from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and quinoloneresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 126, 109622.
- Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil S., Imran M., Asif Nawaz M., Hussain T., Ali M., Rafiq M., Atif K.(2018).**Bacterial biofilm and associated infections,Journal of the Chinese Medical Association,Volume 81, Issue 1,Pages 7-11,
- James J., Rajagopalan S., Lakshmi N. A., Vasanth T., Satya P. S., Pragna Lakshmi T., Mallu Abhiram CharanTej R., Srinivasa R., Krishna R., Surya Prakash Rao H., Prashanth K. (2016).** The quorum sensing molecule N-acyl homoserine lactone produced by *Acinetobacter baumannii* displays antibacterial and anticancer properties, *Biofouling*, 32:9,
- Janet E.L., Corry G.D.W., Curtis R.M., Baird P.(2003).**Baird-parker agar.Progress in Industrial Microbiology,Elsevier,Volume 37, Pages 400-403.

K

- Kurcik-Trajkovska B. (2009).** Acinetobacter spp.-A Serious Enemy Threatening Hospitals Worldwide. *Macedonian Journal of Medical Sciences* 2, 157-162.
- Kahlon N. K., Sharma A., Dogra H.,Singh R. (2022).** Quorum-sensing effector pyocyanin but not farnesol & acyl homoserine lactone exhibit antibacterial activity. *The Indian journal of medical research*, 155(1), 73–78.
- Klein E., Smith, D. L., Laxminarayan R.(2007).** Hospitalizations and Deaths Caused by MethicillinResistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerging Infectious Diseases*,13(12), 1840–1846.
- Kong K. F., Vuong C., Otto M. (2006).** *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 296(2-3), 133–139.
- Kuipers A., Stapels D. A. C., Weerwind L. T., Ko Y. P., Ruyken M., Lee J. C., van Kessel K. P. M., Rooijackers S. H. M. (2016).** The *Staphylococcus aureus* polysaccharide capsule and Efb-dependent fibrinogen shield act in concert to protect against phagocytosis. *Microbiology (Reading, England)*, 162(7), 1185–1194.

Kirmusaoglu S. (2019). The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents. Antimicrobials, antibiotic resistance, antibiofilm strategies and activity methods, 7.

L

Lade H., Park J. H., Chung S. H., Kim I. H., Kim J. M., Joo H. S., Kim J. S. (2019). Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates is Differentially Affected by Glucose and Sodium Chloride Supplemented Culture Media. *Journal of clinical medicine*, 8(11), 1853.

Lindgren J., Thomas V. C., Olson M., Chaudhari S., Nuxoll A. S., Schaeffer C.(2014). Arginine deiminase in *Staphylococcus epidermidis* functions to augment biofilm maturation through pH homeostasis. *J. Bacteriol.* 196, 2277–2289.

Labovska S.(2021).*Pseudomonas aeruginosa* as a cause of nosocomial infections . *Pseudomonas aeruginosa-Biofilm Formation. Infections and treatments .intechOpen*

Lopes L. A. A., dos Santos Rodrigues J. B., Magnani M., de Souza E. L., de Siqueira-Júnior J. P. (2017). Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* that overexpresses efflux protein genes. *Microbial Pathogenesis*, 107, 193-197.

Leal NC., Campos TL., Rezende AM., Docena C., Mendes-Marques CL., de Sá Cavalcanti FL., Wallau GL., Rocha IV., Cavalcanti CLB., Veras DL., Alves LR., Andrade-Figueiredo M., de Barros MPS., de Almeida AMP., de Moraes MMC., Leal-Balbino TC., Xavier DE ., de-Melo-Neto OP. (2020). Comparative Genomics of *Acinetobacter baumannii* Clinical Strains From Brazil Reveals Polyclonal Dissemination and Selective Exchange of Mobile Genetic Elements Associated With Resistance Genes. *Front. Microbiol.* 11 :1176.

Lee C.-R., Lee J.H., Park M., Park K.S., Bae I.K., Kim Y.B., Cha C.-J., Jeong B.C., Lee, S.H.(2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options.*Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 55.

Lebeaux D., Ghigo J-M.(2012). Infections associées aux biofilms - Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ?. *Med Sci (Paris)*, 28 8-9,727-739

Liu J.(2021).Activity of antibiotics and non-antibiotics substances on *Staphylococcus aureus* biofilms.Thèse de doctorat .Pharmacology.Université Paul Sabatier - Toulouse III,France .P40

Lei M. G., Lee C. Y. (2018). Repression of Capsule Production by XdrA and CodY in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 200(18), e00203-18.

Lew D. P., Waldvogel F. A. (2004). Osteomyelitis. *Lancet (London, England)*, 364(9431), 369–379.

Lecuire F., Gontier D., Carrere J., Basso M., Benareau I., Rubini J.(2007). Infections à *Staphylococcus lugdunensis* sur prothèses articulaires. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Réparatrice de l'Appareil Moteur*, 93(1), 88–92 .

M

Morgan DJ., Liang SY., Smith CL., Johnson JK., Harris AD., Furuno JP.(2010). Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol* ;31[7]:716–21.

Meliani S., Toumi S., Djahoudi H., Deghdegh K., Amoura K. (2020). Synergistic combination of colistin with imipenem, amikacine or ciprofloxacin against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem-resistant isolated in Annaba hospital Algeria. *BIOCELL*, 44(2), 175–182.

Monowar T., Md S-R., Subhash J.B., Gunasunderi R., Kathiresan V.S.(2019)."Secondary Metabolites Profiling of *Acinetobacter baumannii* Associated with Chili (*Capsicum annum* L.) Leaves and Concentration Dependent Antioxidant and Prooxidant Properties", *BioMed Research International*, vol. 2019, 13 pages.

Miquel S., Lagrèfeuille R., Souweine B., Forestier C .(2016).Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front. Microbiol.* 7:592.

Muhsin J., Wisal A., Saadia A., Fazal J., Muhammad I., Muhammad A.N., Tahir H., Muhammad A., Muhammad R., Muhammad A.K.(2018).Bacterial biofilm and associated infections,*Journal of the Chinese Medical Association*,Volume 81, Issue 1.Pages 7-11

Mohan R., Marie B., Emily D., Zhengqing F., Akila C.S.(2018).Quorum Sensing and Biofilm Formation in Pathogenic and Mutualistic Plant-Bacterial Interactions . In: Pallaval Veera Bramhachari (eds) *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence*.pp 133–160

Mea H.J., Phelim V.C.Y., Eng H.W.(2021).An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation,*Microbiological Research*,Volume 247.

Muslim S. N. ., AL_Kadmy I. M., Ali A. N. M. ., Hussein N. H. ., Dwaish A. S. ., El-Haboby B. T. ., Abid S.A .(2016). Extraction and Purification of L-Asparaginase Produced by *Acinetobacter Baumannii* and their Antibiofilm Activity Against Some Pathogenic Bacteria. *The International Journal of Biotechnology*. 5(1). 7-14. 10.

Mellani S., Toumi S., Djahoudi H., Deghdegh K., Amoura K. (2020). Synergistic combination of colistin with imipenem, amikacine or ciprofloxacin against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem-resistant isolated in Annaba hospital Algeria. *BIOCELL*, 44(2), 175–182.

Miller L. S., Fowler V. G., Shukla S. K., Rose W. E., Proctor R. A. (2019). *Development of a vaccine against Staphylococcus aureus invasive infections: Evidence-based on human immunity, genetics, and bacterial evasion mechanisms. FEMS Microbiology Reviews.*

Muslim S.N.(2014). "Production, purification and characterization of a novel l-asparaginase from

Acinetobacter baumannii with anticancerous activity." Int. J. Curr. Eng. Technol. 4, no. 1.

Merghni A., Bekir, K., Kadmi Y., Dallel I., Janel S., Bovio S., Barois N., Lafont F., Mastouri M.(2017).

Adhesiveness of opportunistic Staphylococcus aureus to materials used in dental office: In vitro study. Microbial Pathogenesis 103, 129–134.

Muthukrishnan G., Masters E. A., Daiss J. L., Schwarz E. M. (2019). Mechanisms of Immune Evasion and Bone Tissue Colonization That Make Staphylococcus aureus the Primary Pathogen in Osteomyelitis. *Current osteoporosis reports*, 17(6), 395–404.

Manander S., Singh A., Varma A., Pandey S., Shrivastava N.(2018). Biofilm producing clinical staphylococcus aureus isolates augmented prevalence of antibiotic resistant cases in Tertiary care hospitals of Nepal. *front .microbiol.* 9: 2749.

Moormeier D.E., Bayles K.W.(2017). Staphylococcus aureus biofilm : a complex developmental organism *Molecular Microbiology* , 104(3),365-376.

M'Hamedi I. 2015. Evaluation de la formation de biofilms des souches d'*A.baumannii* isolées de dispositifs médicaux aux CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat .Université ABOU BEKR BELKAID TLEMEN.p33

N

Nadell C. D., Drescher K., Foster K. R. (2016). Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 589–600.

Namiganda V., Mina Y., Meklat A.(2019). Antibiotic Resistance Pattern of Acinetobacter baumannii Strains Isolated from Different Clinical Specimens and Their Sensibility against Bioactive Molecules Produced by Actinobacteria. *Arab J Sci Eng* 44, 6267–6275.

Nassar R., Hachim M., Nassar M., Kaklamanos EG., Jamal M., Williams D., Senok A. (2021). Microbial Metabolic Genes Crucial for S. aureus Biofilms: An Insight From Re-analysis of Publicly Available Microarray Datasets. *Front. Microbiol.* 11:607002.

Nouri F., Karami P., Zarei O., Kosari F., Alikhani MY., Zandkarimi E., Rezazadeh Zarandi E.,

O

Oliveira W. F., Silva P. M. S., Silva R. C. S., Silva G. M. M., Machado G., Coelho L. C. B. B., Correia M. T. S. (2018). Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants. *The Journal of hospital infection*, 98(2), 111–117.

Ogston A. (1881). Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *Br. Med. J.* 1: 369.b2- 369375.

De Oliveira D. M. P., Forde B. M., Kidd T. J., Harris P. N. A., Schembri M. A., Beatson S. A., Paterson D. L., Walker M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical microbiology*

reviews, 33(3), e00181-19.

Ong K. S., Mawang C. I., Daniel-Jambun D., Lim Y. Y., Lee S. M. (2018). Current anti-biofilm strategies and potential of antioxidants in biofilm control. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*.

Ouidri M. A. (2018). Screening of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* during admission of patients to Frantz Fano Hospital, Blida, Algeria. *New microbes and new infections*, 23, 52–60.

Olivares E., Badel-Berchoux S., Provot C., Prévost G., Prévost G., Bernardi T, Jehel F. (2020). Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm infections. *Frontiers in microbiology*, 10, 2894.

P

Pallaval V.B. (2018). (Ed). Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence. Part I Introduction to Microbial Quorum Sensing p 3-6

Pompilio A., Scribano D., Sarshar M., Di Bonaventura G., Palamara A. T., Ambrosi C. (2021). Gram-Negative Bacteria Holding Together in a Biofilm : The *Acinetobacter baumannii* Way. *Microorganisms*, 9(7), 1353.

Prince C.P. (2009). Practical Manual of Medical Microbiology. Edition: Jaypee brothers medical publishers, USA. Chapitre 36 "Coagulase Test" .pp135-137.

Prince C.P. (2009). Practical Manual of Medical Microbiology. Edition: Jaypee brothers medical publishers, USA. Chapitre 40 "CRP Screen Latex Agglutination Slide Test" .pp152-155.

Prince C.P. (2009). Practical Manual of Medical Microbiology. Edition: Jaypee brothers medical publishers, USA. Chapitre 25 "Catalase Test" .pp110-112.

Panda P. S., Chaudhary U., Dube S. K. (2016). Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. *Indian journal of pathology & microbiology*, 59(2), 177–179.

Q

Qutaiba A., Sally A., Ziad J. (2021). Isolation of extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* from environmental surfaces inside intensive care units, *AJIC: American Journal of Infection Control*.

Qazi S., Middleton B., Muharram SH., Cockayne A., Hill P., O’Shea P., Chhabra SR., Cámara M., Williams P. (2006). N-acylhomoserine lactones antagonize virulence gene expression and quorum sensing in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*. 74:910–919.

Qian Y., Xia, L., Wei L., Li D., Jiang, W. (2020). Artesunate inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation by reducing alpha-toxin synthesis. *Archives of Microbiology*.

R

Rajput A., Thakur A., Sharma S., Kumar M. (2018). aBiofilm: a resource of anti-biofilm agents and their potential implications in targeting antibiotic drug resistance. *Nucleic acids research*, 46(D1), D894–D900.

Ramoul, A., Loucif, L., Bakour, S., Amiri, S., Dekhil, M., & Rolain, J. M. (2016). Co-occurrence of blaNDM-1 with blaOXA-23 or blaOXA-58 in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Algeria. *Journal of global antimicrobial resistance*, 6, 136–141.

Ramoul, A., Loucif, L., Bakour, S., Amiri, S., Dekhil, M., & Rolain, J. M. (2016). Cooccurrence of blaNDM-1 with blaOXA-23 or blaOXA-58 in clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Algeria. *Journal of global antimicrobial resistance*, 6, 136– 141.

Rather M. A., Gupta K., Mandal M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 52(4), 1701–1718.

Rumbaugh K. P., Sauer K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature reviews. Microbiology*, 18(10), 571–586.

Roux A., Ghigo J-M.(2006). Les biofilms bactériens. In: *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France* tome 159 n°3. pp. 261-268.

Rice K. C. (2021),(Ed.). *Staphylococcus aureus. Methods in Molecular Biology.*Quantification of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation by Crystal Violet and Confocal Microscopy.Chapter 9.pp 69-78

S

Schulze A., Mitterer F., Pombo J. P., Schild S. (2021). Biofilms by bacterial human pathogens : Clinical relevance – development, composition and regulation – therapeutical strategies. *Microbial cell* (Graz, Austria), 8(2), 28–56.

Sharma M., Sapkota J., Jha B., Mishra B., Bhatt C. P. (2019). Biofilm Formation and ExtendedSpectrum Beta-Lactamase Producer among *Acinetobacter* Species Isolated in a Tertiary Care Hospital: A Descriptive Cross-sectional Study. *JNMA; journal of the Nepal Medical Association*, 57(220), 424–428.

Slobodníková L., Fialová S., Rendeková K., Kováč J., Mučaji P. (2016). Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules*, 21(12), 1717.

Suresh M.K., Biswas R., Biswas L. (2018). An update on recent developments in the prevention and

treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*.

Sonia M., Benjamin R., Laure P., Éric C., David D. (2019). Quorum sensing et quorum quenching : Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence ?. *Med Sci (Paris)*, 35(1).31-38

Schilcher K., Horswill A. R. (2020). Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 84(3), e00026-19.

Sonesson A., Przybyszewska K., Eriksson S., Mörgelin M., Kjellström S., Davies J., Potempa J., Schmidtchen A. (2017). Identification of bacterial biofilm and the *Staphylococcus aureus* derived protease, staphopain, on the skin surface of patients with atopic dermatitis. *Scientific reports*, 7(1), 8689.

Shettigar K., Murali T. S. (2020). Virulence factors and clonal diversity of *Staphylococcus aureus* in colonization and wound infection with emphasis on diabetic foot infection. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(12), 2235–2246.

Sánchez-Moreno C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Subhadra B., Oh M.S., Choi C. (2016). Quorum sensing in *Acinetobacter* : with special emphasis on antibiotic resistance, biofilm formation and quorum quenching . *AIMS Microbiology*, 2(1), 27-41

T

Tiwari V., Meena K., Tiwari M. (2018). Differential anti-microbial secondary metabolites in different ESKAPE pathogens explain their adaptation in the hospital setup. *Infection, Genetics and Evolution*.

Trautner B. W., Darouiche R. O. (2004). Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *American journal of infection control*, 32(3), 177–183.

Touaitia R. (2016). *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline : Emergence et mécanismes de résistance. Thèse de doctorat. Microbiologie Appliquée. Université Badji Mokhtar – Annaba. Algérie. P 3-7

Taheri M. (2020). Prevalence of common nosocomial infections and evaluation of antibiotic resistance patterns in patients with secondary infections in Hamadan, Iran . *Infection and drug resistance*, 13, 2365-2374.

Tam K., Torres V.J. (2019). *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiology spectrum*, 7(2), 10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018.

V

Vestby L. K., Grønseth T., Simm R., Nesse L. L. (2020). Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2), 59.

W

Wong D., Nielsen T. B., Bonomo R. A., Pantapalangkoor P., Luna B., Spellberg B. (2017). Clinical and pathophysiological overview of Acinetobacter infections : a century of challenges. *Clinical microbiology reviews*, vol. 30, no 1, p. 409-447

Wolska K. I., Grudniak A. M., Rudnicka Z., Markowska K. (2016). Genetic control of bacterial biofilms. *Journal of applied genetics*, 57(2), 225–238.

Wang X., Ma Q., Niu X., Liu Z., Kang X., Mao Y., Li N., Wang G. (2022). Inhibitory Effect of *Andrographis paniculata* Lactone on *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin. *Frontiers in pharmacology*, 13, 891943.

Wang J., Quan C., Wang X., Zhao P., Fan S.(2011). Extraction, purification and identification of bacterial signal molecules based on N acyl homoserine lactones . *Microbial biotechnology*, 4(4),479-490.

X

Y

Yan J., Bassler B. L. (2019). Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell host & microbe*, 26(1), 15–21

Yagi S., Drouart N. , Bourgaud F. , Henry M., Chapleur Y. , Laurain-Mattar D.(2013). Antioxidant and antiglycation properties of *Hydnora johannis* roots. *South African Journal of Botany*.84,124-127

Z

Zhao A., Sun J., Liu Y. (2023). Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 13, 1137947.

Zhou K., Li, C., Chen D., Pan Y., Tao Y., Qu, W., Liu Z., Wang X.,Xie S. (2018). A review on nanosystems as an effective approach against infections of *Staphylococcus aureus*. *International journal of nanomedicine*, 13, 7333–7347.

Zeroug A, Belaidi A,Belhadj C .(2022). Assessment of in vitro biofilm forming by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* isolated from bladder catheters of hospitalized patients in Medea (Algeria) and efficacy of antiseptics and antibiotics as antibacterial agents,

Zhang J., Mao S., Guo Y., Wu Y., Yao X., Huang Y. (2019). Inhibition of GLS suppresses proliferation and promotes apoptosis in prostate cancer. *Bioscience reports*, 39(6).

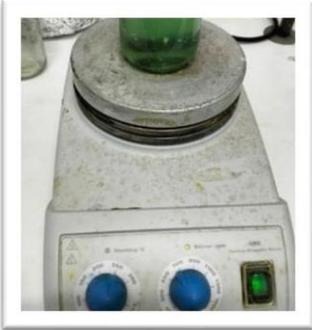
Annexes

Annexe I : Matériel non biologique

1. Matériel du laboratoire

- Ecouillons stériles
- Lame et lamelles
- Seringue
- Pipettes pasteur
- Boîtes de pétri
- Anse de platine
- Bec benzène
- Micropipettes
- Tubes stériles
- Ampoules stériles

2. Appareillage

| | |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Agitateur |  A photograph of a magnetic stirrer. It is a white, rectangular device with a circular top where a glass beaker is placed. The front panel features two blue rotary dials and a green power button. |
| Bain marie |  A photograph of a digital water bath. It is a large, rectangular, stainless steel unit with a lid on top. The front panel has a digital display showing '0.5' and a control knob. |

| | |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Autoclave</p> |  |
| <p>Rotavapor</p> |  |
| <p>Microscope optique</p> |  |
| <p>Elisa</p> |  |

| | |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Centrifugeuse</p> |  |
| <p>Etuve</p> |  |

Annexe II : Les Milieux de cultures et les solutions utilisées

1. Milieux de culture liquide

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Bouillon Brain Heart Infusion (BHIB)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Infusion de cervelle de veau.....12.5g ▪ Infusion de cœur de bœuf.....5g ▪ Peptone..... 10g ▪ Glucose2g ▪ Chlorure de sodium..... 2g ▪ Phosphatase di sodique... ..5g ▪ pH= 7.4 |  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>TSBG : Trypticase Soja Bouillon Glucosé</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hydrolysate trypsique de caséine... 17g ▪ Peptone de soja3g ▪ Chlorure de sodium..... 5g ▪ Phosphate dipotassique... 2,5g ▪ Glucose2,5g ▪ pH 7,3 ± 0,2 à 25°C |  |
| <p>Bouillon Glucosé Tamponné (BGT)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tryptone..... 20 g ▪ Glucose2g ▪ Chlorure de sodium..... 5g ▪ Dihydrogénophosphate de sodium..... 2.5g ▪ pH=7.3 |  |
| <p>Milieu Minimum Additionné de Tryptone (MMAT)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Acide lactique 1% ▪ NH₄Cl 37 mM ▪ MgSO₄..... 0.81 mM ▪ FeSO₄ 18uM ▪ CaCL₂... 68 Um ▪ KH₂PO₄... 11mM ▪ Na₂HPO₄... 95mM ▪ EDTA..... 50g/1ml ▪ ZnSO₄... 2.2g ▪ CuSO₄... 1.6g ▪ MnCl₂... 1.1g ▪ (NH₄)₆Mo₇O₂₄..... 50mg ▪ H₃BO₃... 50mg ▪ KI 10mg ▪ CoCl₂... 50mg ▪ Tryptone..... 0.1% |  |

2. Milieux de culture solides

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>La Gélose nutritive</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Extrait de viande 1,0 g/L ▪ Extrait de levure 2,0 g/L Peptone 5,0 g/L ▪ Chlorure de sodium 5,0 g/L ▪ Agar-agar... 15,0 g/L ▪ pH = 7,0 |  |
| <p>Le milieu Chapman</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Extrait de viande (bovin ou porcin)... 1g ▪ Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin) 10g ▪ Chlorure de sodium 75g ▪ Mannitol 10g ▪ Agar 15g ▪ Rouge de phénol... 25g ▪ pH=7,6 ▪ Eau distillé... 1l |  |
| <p>Le milieu Mueller Hinton</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Hydrolysate acide de caséine (peptone)..... 17,5 g ▪ Extrait de viande 2 g ▪ Amidon soluble 1,5 g ▪ Calcium... 20 à 25 mg ▪ Magnésium..... 10 à 12,5 mg ▪ Agar 17,0 g ▪ Eau distillé... 1l ▪ pH = 7,4 +/- 0,2 |  |
| <p>Milieu Rouge Congo Agar</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ BHIB (37 g/L) ▪ Saccharose..... (50 g/L) ▪ Agar agar..... (10 g/L) ▪ Rouge Congo. (0,8 g/L) |  |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Le milieu Hektoen</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Protéose-Peptide 12,0 g/l ▪ Extrait de levure 3,0 g/l ▪ Désoxycholate de sodium 9,0 g/l ▪ Lactose 12,0 g/l ▪ Saccharose... 12,0 g/l ▪ Salicine... 2,0 g/l ▪ Bleu de bromothymol 65 mg/l ▪ Fuchsine acide... 100 mg/l ▪ Thiosulfate de sodium.....5,0 g/l ▪ Citrate ferrique ammoniacal..... 1,5 g/l ▪ Chlorure de sodium.....5,0 g/l ▪ Agar 15,0 g/l ▪ pH = 7,5 |  |
| <p>Bouillon Luria (LB)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Tryptone 10g/l ▪ Extrait de levure 5g/l ▪ Chlorure de sodium..... 10g/l ▪ pH 7.0 |  |

Les solvants utilisés pour l'extraction :

- Hexane
- Acétate d'éthyle

Les solutions utilisées :

- **Eau physiologique stérile (composition en g/l)**
 - Chlorure de sodium (NaCl)..... 9 g.
 - Eau distillée..... 1000 ml.
 - pH = 7
- **Cristal Violet 0.2%**
 - 200 mg Cristal Violet
 - 25ml Méthanol
 - 75ml Eau distillé

Annexe III : les tableaux

Tableau IV: Résultats de l'identification biochimique des souches isolées par la galerie ApiStaph.

| | |
|-------|---------|
| URE | + |
| ADH | - |
| NAG | + |
| MDG | - |
| SAC | + |
| XYL | - |
| RAF | - |
| VP | + |
| PAL | + |
| NIT | + |
| MEL | - |
| XLT | - |
| MAN | + |
| TRE | + |
| LAC | + |
| MAL | + |
| MNE | + |
| FRU | + |
| GLU | + |
| 0 | - |
| Tests | 6736152 |

Tableau V : Résultats de l'identification biochimique des souches isolées par la galerie Api 20 E et Api 20NE d'*A.baumannii*

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Api 20E | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ONPG | ADH | LDC | ODC | CIT | H2S | URE | TDA | IND | VP | GEL | GLU | MAN | INO | SOR | RHA | SAC | MEL | AMY | ARA |
| ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | + | ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | + | ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | + | ▪ | + |
| Api 20NE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NO3 | TRP | GLU | ADH | URE | ESC | GEL | PNPG | GLU | ARA | MNE | MAN | NAG | MAL | GNT | CAP | ADI | MLT | CIT | PAC |
| ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | + | + | ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | ▪ | + | + | + | + | + |

Les antibiotiques utilisés pour la réalisation de l'antibiogramme

Tableau VI: Les antibiotiques utilisés vis-à-vis des souches d'*Acinetobacter baumannii*.

| Antibiotiques | Charge du disque | Abréviations |
|----------------------------------|------------------|--------------|
| Ticarcilline | 75 µg | TIC |
| Cotrimoxazole | 25 µg | SXT |
| Piperacilline | 100 µg | PIP |
| Ceftazidime | 30 µg | CAZ |
| Gentamicine | 10µg | GN |
| Imipeneme | 10 µg | IMP |
| Amikacine | 30µg | AK |
| Tobramycine | 10 µg | TM |
| Ciprofloxacine | 5 | CIP |
| Ticarcilline +Acide clavulanique | 30 µg | CL |
| Colistine | 25 µg | TCC |

Tableau VII: Les antibiotiques utilisés vis-à-vis des souches de *staphylococcus aureus*.

| Antibiotiques | Charge du disque | Abréviations |
|-----------------|------------------|--------------|
| Pénicilline G | 10µg | P |
| Acide Fusidique | 10µg | FC |
| Amikacine | 30µg | Ak |
| Céfoxitine | 30µg | Fox |
| Erythromycine | 15µg | E |
| Gentamycine | 10µg | GN |
| Rifampicine | 30µg | RIF |
| Tétracycline | 30µg | TE |
| Kanamycine | 30µg | K |
| Pristinamicine | 15µg | PT |
| Vancomycine | 30µg | VA |
| Téicoplanine | 30µg | TEC |
| Oxacilline | 5µg | OX |
| Ofloxazine | 5µg | OFX |
| Cotrimoxazole | 25µg | SXT |