

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Saad Dahleb Blida 01  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



## Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de master en Sciences de la Nature et de la Vie

**Option : Microbiologie**

**Présenté par**

Zidoune Sarah et Benbelkacem Yasmine

## Thème

**Etude de l'antibiorésistance chez  
*Pseudomonas aeruginosa***

Soutenu le 13/09/2020

**Devant le jury composé de:**

<b>M<sup>me</sup> Benhouna I.</b>	<b>MCB</b>	<b>USDB1</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup> Lounaci L.</b>	<b>MCB</b>	<b>USDB1</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>me</sup> Meklat A.</b>	<b>Professeur</b>	<b>USDB1</b>	<b>Promotrice</b>
<b>M<sup>me</sup> Lassas K.</b>	<b>MA</b>	<b>EPH Boufarik</b>	<b>Co-promotrice</b>

Année Universitaire 2019/2020

## Remerciements

En premier lieu, on remercie le bon dieu, le tout puissant qui nous a guidé dans la bonne voie de la science et de la connaissance, et qui nous a donné la patience et la force pour poursuivre et dépasser tous les obstacles.

Nous adressons nos profondes gratitudee et nos sincères remerciements à notre promotrice **Professeur MEKLAT A.** d'avoir accepté de nous encadrer, pour le soutien qu'elle nous a apporté, qui nous a suivi et orienté tout au long de notre travail, on la remercie pour sa grande disponibilité, sa confiance, sa patience, sa gentillesse et ses remarques.

On est tout particulièrement reconnaissantes envers notre Co-promotrice **Docteur LASSAS K.** qui nous a chaleureusement accueillis dans le laboratoire centrale de l'EPH de Boufarik et pour son aide dans la réalisation de ce travail.

On voudrait remercier également les membres du Jury,

**Docteur BENHOUNA I.** pour l'honneur qu'elle nous a fait pour présider ce jury.

**Docteur LOUNACI L.** d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous tenons à remercier sincèrement **Mme MATMOURA A.** pour l'inspiration, la gentillesse, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer.

Nos remerciements s'étendent également à tout le personnel du laboratoire central de l'EPH de Boufarik pour leur professionnalisme, leur disponibilité et leur gentillesse. Particulièrement Mlle Larbi ben Hora Soumia et Mlle Zahaf Ikram.

Aussi, nous avons à marquer notre reconnaissance et gratitude à l'administration et à l'ensemble du corps enseignant de la Faculté des Sciences de la nature et de vie de l'Université de Saad Dahlab Blida 1, pour leurs efforts à nous garantir la continuité et l'aboutissement de ce programme de Master.

Nous tenons bien évidemment à remercier nos familles, nos camarades et amis pour leur soutien et leurs aides si précieuses.

A la fin, nous tenons à remercier tous nos collègues d'étude, particulièrement notre promotion.

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

## *Dédicaces*

Avec ma gratitude et tout mon amour Je dédie ce modeste travail,

A La personne la plus chère à mon cœur ma **grand-mère Chérifa**,  
qui m'a supporté vaillamment pas à pas tout au long de ma vie. Les  
mots ne suffisent pas pour exprimer toute l'affection que j'éprouve pour  
toi; je te dois ma réussite, mon éducation, ma fierté. Tu m'as aimé très  
profondément et tu as été toujours une mère idéale.

Je te demande pardon et encore une fois Merci

**A ma très chère mère Dalila,**

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et  
l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager, ta prière et ta bénédiction  
m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être  
assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de  
me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

A ma famille de grands jusqu' aux petits

A ma chère binôme Yasmine et sa famille

A mes chères copines : Yasmine, Sadika, Amel, Fatima zahra, Dalila

Sans oublier mes braves Amies de la promotion de  
Microbiologie Master II.

*Sarah*

Je dédie ce travail

Aux deux personnes qui me sont les plus chers au monde, mes très chers parents, qui ont beaucoup sacrifié, qui m'ont soutenue jusqu'à la fin de mes études et qui n'ont jamais cessé de m'encourager et me pousser de l'avant. Je leur offre ce travail comme fruit de toutes mes années d'étude.

A mes chères Sœurs et mon cher frère, qui m'ont toujours encouragée et aidée.

A mon adorable nièce Maryem

A ma grand- mère

A mes oncles et tantes

A mes cousines et cousins

A ma très chère binôme Sarah, pour tous les moments qu'on a enduré ensemble.

A mes chères amies et copines : Rayanne, Nihed, Fella, Sihem, Dalila, Sarah, Imène, Maroua.

A toute personne que j'aime.

*Yasmine*

## Résumé

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste responsable essentiellement d'infections nosocomiales. Cette espèce manifeste vis-à-vis des antibiotiques un pouvoir d'adaptation de plus en plus grand qui aboutit à des problèmes thérapeutiques souvent aigus.

La présente étude concerne d'une part l'isolement de plusieurs souches de *Pseudomonas aeruginosa* à partir de divers prélèvements analysés au Laboratoire Central, unité de Bactériologie de l'Etablissement public hospitalier de Boufarik. Et d'autre part la détermination du profil de résistance de ces souches.

Sept souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées après analyse de 345 prélèvements. Ces souches ont été identifiées en utilisant les techniques conventionnelles de bactériologie (morphologie, coloration de Gram et tests d'oxydase) et les caractères biochimiques à l'aide des galeries API 20 NE. La majorité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* proviennent des prélèvements de pus (5 prélèvements) et de service de maladies infectieuses (4 prélèvements). Nous notons l'absence de cette espèce dans les 9 prélèvements du sang que nous avons analysé.

La sensibilité aux antibiotiques et la détection des profils de résistance ont été réalisées par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les 7 souches isolées sont sensibles à la majorité des antibiotiques testés. Cependant, nous avons observé une résistance de niveau intermédiaire de certaines souches aux : Ticarcilline, Pipéracilline, Lévofoxacine et l'Ofloxacine.

Le potentiel antagoniste de cinq souches d'actinobactéries cultivées sur le milieu ISP2 a été évalué par certains chercheurs du laboratoire de Biologie de Systèmes Microbiens contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa* par la technique des cylindres d'agar ou des stries croisées. Les résultats obtenus par ces chercheurs ont montré que quatre souches d'actinobactéries sont actives contre *Pseudomonas aeruginosa*, l'activité antibactérienne obtenue par les souches de *Sreptomycetes sp* a été plus forte que celle obtenue par les autres genres d'actinobactéries.

**Mots Clés :** Actinobactéries, Antibiotiques, Infection nosocomiales, Le potentiel antagoniste, *Pseudomonas aeruginosa*, Résistance.

## Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen mainly responsible for nosocomial infections. These bacteria exhibit a big power of adapting for the antibiotics resulting in therapeutic problems often acute.

The present study concerns on the one hand the isolation of several strains of *Pseudomonas aeruginosa* from various samples analysed at the Central Laboratory of the public hospital of Boufarik, and on the other hand the determination of the resistance profile of these strains.

Seven strains of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated after analysis of 345 samples, these strains were identified using conventional bacteriological techniques (morphology, Gram stain and oxidase test) and biochemical characteristics by API 20 NE. the majority of *Pseudomonas aeruginosa* strains are derived from samples of pus (5 samples) and infectious diseases service (4 samples). We note the absence of this species in the 9 blood samples we analyzed.

Antibiotic susceptibility and detection of resistance profile were carried out by the agar diffusion method. The 7 strains isolated are sensitive to the majority of the antibiotics tested. However, we have observed intermediate level resistance of certain strains to: Ticarcillin, Piperacillin, Levofloxacin and Ofloxacin.

The antagonistic potential of five strains of actinobacteria grown on ISP2 medium has been evaluated by some researchers in the Microbial Systems Biology Laboratory against strains of *Pseudomonas aeruginosa* by the agar cylinder or streak assay methods.

The results obtained by the researchers showed that four strains of actinobacteria were active against *Pseudomonas aeruginosa*. The antibacterial activity obtained by the *Sreptomycetes* strains was stronger than that obtained by the other actinobacteria genera.

**Keywords:** Actinobacteria, Antibiotics, Antagoniste potential, Nosocomial infections, *Pseudomonas aeruginosa*, Resistance.

## ملخص

*Pseudomonas aeruginosa* هي بكتيريا مسببة للأمراض الانتهازية، مسؤولة بشكل أساسي عدوى المستشفيات. وتظهر هذه البكتيريا قدرة التكيف اتجاه المضادات الحيوية مما يؤدي إلى مشاكل علاجية غالباً تكون حادة.

تتناول الدراسة الحالية من جهة عزل العديد من سلالات *Pseudomonas aeruginosa* من عينات متنوعة تم تحليلها في المختبر المركزي وحدة البكتريولوجيا، للمؤسسة العمومية الاستشفائية ليوفاريك، ومن ناحية أخرى بتحديد ملامح مقاومة هذه السلالات.

تم عزل سبعة سلالات *Pseudomonas aeruginosa* بعد تحليل 345 عينة. تم تحديد هذه السلالات باستخدام التقنيات التقليدية لعلم البكتيريا (مورفولوجيا، صبغة الجرام، أكسيداز) و الخصائص البيوكيميائية باستخدام معارض ال API 20 NE، معظم سلالات *Pseudomonas aeruginosa* تأتي من عينات القيح (5 عينات) و من وحدة الأمراض المعدية (4 عينات) و نلاحظ غيابها في 9 عينات الدم التي قمنا بتحليلها.

تم تقييم الحساسية للمضادات الحيوية والكشف عن أنماط المظهر الظاهري للمقاومة بواسطة طريقة الانتشار على أجار، السلالات السبعة المعزولة حساسة لمعظم المضادات الحيوية المختبرة و مع ذلك لاحظنا مقاومة متوسطة المستوى للبعض من السلالات لكل من تيكارسيلين، بيبيراسيلين، ليفوفلوكساسين و افلوكساسين.

تم تقييم الإمكانيات العدائية لخمسة سلالات من أكتينوبكتيريا المزروعة على وسط ISP2 من طرف بعض باحثين مخبر بيولوجيا الأنظمة الميكروبية ضد سلالات *Pseudomonas aeruginosa* باستخدام تقنية اسطوانة أجار أو الخطوط المتقاطعة. وقد أظهرت النتائج المتحصل عليها من قبل الباحثين، أن أربع سلالات من أكتينوبكتيريا ناشطة ضد سلالة واحدة من *Pseudomonas aeruginosa*. كان النشاط المضاد للجراثيم الذي تم الحصول عليه من سلالات *Streptomyces sp* أكبر من الذي تم الحصول عليه من أنواع أخرى من الأكتينوبكتيريا .

**الكلمات المفتاحية:** *Pseudomonas aeruginosa*، الإمكانيات العدائية، اكتينوبكتيريا، المضادات الحيوية، المقاومة، عدوى المستشفيات.

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
<b>I</b>	Taxonomie de <i>P. aeruginosa</i>	4
<b>II</b>	Les mécanismes de virulence et les effets pathogènes induits par les principaux facteurs de virulence	8
<b>III</b>	Classification des antibiotiques selon leur mode d'action des antibiotiques.	11
<b>IV</b>	Les antibiotiques habituellement actifs sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
<b>V</b>	Principaux mécanismes acquis de résistance aux antibiotiques chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
<b>VI</b>	Antibiotiques produites par les actinobactéries et actifs sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
<b>VII</b>	Les types de prélèvements	21
<b>VIII</b>	Antibiotiques testés contre les souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
<b>IX</b>	Répartition des souches de <i>P.aeruginosa</i> selon la nature des prélèvements	35
<b>X</b>	Répartition des souches de <i>P. aeruginosa</i> par service	36
<b>XI</b>	Profil de résistance des souches de <i>P. aeruginosa</i> aux antibiotiques testés.	37
<b>XII</b>	Activité antibactérienne de quelques souches d'actinobactéries contre la souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
<b>Annexes</b>		
<b>I</b>	Matériels non biologique	62
<b>II</b>	Milieux de culture	62
<b>III</b>	Table de lecture de Galerie API 20 NE	66
<b>IV</b>	Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Micrographie électronique de <i>P. aeruginosa</i> montrant son unique flagelle polaire	5
2	Les facteurs de virulence chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
3	Illustration des étapes de la méthode des cylindres d'Agar	29
4	Schéma représentatif de la méthode des stries croisées	30
5	Répartition de la population étudiée selon l'origine des prélèvements	31
6	Répartition de la population étudiée selon l'âge	32
7	Répartition de la population étudiée selon le sexe	33
8	Les taux de cultures positives, négatives et contaminées	33
9	Aspect des cultures de <i>P. aeruginosa</i> sur les milieux d'isolement	34
10	Le taux d'isolement de <i>P. aeruginosa</i> par rapport à d'autres espèces bactériennes	35
11	Résultat du test de l'antibiogramme	36
	<b>Annexes</b>	
1	Jarre à bougie	59
2	Microscope optique	59
3	Poste de sécurité microbiologique classe II	59
4	Incubateur à 37°C	60
5	Autoclave	60
6	BacT/ALERT®	61
7	Résultats de l'examen microscopique	64
8	Résultat de la coloration de Gram	64
9	Résultat de lecture du test d'oxydase	64
10	Résultat de lecture de la galerie API 20 NE	65

## Liste des abréviations

ADH	Argenine Dihydrolase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AHL	N-acyl-Homosérine Lactones
API	Analytical Profil Index
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique Messager
ATB	Antibiotique
ATCC	American Type Culture Collection
BGT	Bouillon Glucosé Temponnée
Bla	$\beta$ -lactamase
BLSE	$\beta$ -Lactamase à Spectre Etendu
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EDTA	Acide Ethylène Diamine-Tétracétique
EF-G	Facteur d'élongation G
ES-OXA	Exended Spectrum Oxacillinase
FIM	Florence Imipenemase
GES	Guiana Extended Spectrum $\beta$ -lactamase
GIM	German Imipenemase
Glu	Glucose
IMP	Imipénémases
ISP2	International Streptomyces Project 2
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LBSM	Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens
MBL	Métallo $\beta$ -actamases
MF	Mac Farland
MH	Muller Hinton
NDM	New Delhi Métallo $\beta$ lactamase
PAB	Acide Para Amino-Benzoiqne
PAC	Acide phénylacétique
PNPG	4-Nitrophényl- $\beta$ D-Galactopyranoside
PQS	<i>Signal Pseudomonas Quinolone</i>
PSE	<i>Pseudomonas Specefic Enzyme</i>
QRDR	Quinolone Resistance Determining Regions
SHV	Sulfhydryl variable
SPM	Sao Paolo Métallo $\beta$ lactamase
TEM	Temoneria Nom du Patient
UFC	Unité Formant Colonie
URE	Urée
VEB	Vietnamese Extended Resistance
VIM	Verona Imipenemase

## Sommaire

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction ..... 1

### Partie synthèse bibliographique

**I. Généralité sur *Pseudomonas aeruginosa***..... 3

**1. Historique**..... 3

**2. Habitat et mode de transmission** ..... 3

**3. Etymologie et Taxonomie** ..... 4

**4. Caractéristiques bactériologiques**..... 4

4.1. Caractéristiques morphologiques ..... 4

4.2. Caractéristiques culturaux..... 5

4.3. Caractéristiques biochimiques..... 6

4.4. Caractéristiques antigéniques ..... 6

4.5. Données sur le génome de *P.aeruginosa*..... 6

**5. Facteurs de virulences** ..... 7

**6. Facteur favorisant l'infection à *Pseudomonas aeruginosa***..... 9

**7. Infections à *Pseudomonas aeruginosa***..... 10

**II. Antibiotiques**..... 10

**1. Définition**..... 10

**2. Classification des antibiotiques** ..... 10

**3. Résistance aux antibiotiques**..... 12

3.1. Résistance naturelle..... 13

3.2. Résistance acquise ..... 14

3.2.1. Aux  $\beta$ -lactamines..... 14

3.2.2. Aux Aminosides ..... 15

3.2.3. Aux Fluoroquinolones.....	16
3.2.4. A la colistine.....	16
<b>III. Actinobactéries.....</b>	<b>18</b>
<b>1. Généralités.....</b>	<b>18</b>
<b>2. Importance et utilisation .....</b>	<b>18</b>
<b>3. Rôle des actinobactéries dans la production des antibiotiques.....</b>	<b>19</b>
<b>4. Antibiotiques produits par les Actinobactéries actif sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>19</b>

### **Partie matériel et méthodes**

<b>I. Matériel .....</b>	<b>21</b>
1. Matériel biologique.....	21
2. Matériel non biologique.....	21
<b>II. Méthodes .....</b>	<b>22</b>
<b>1. Conduite à tenir devant les différents prélèvements .....</b>	<b>22</b>
1.1. Mise en culture des prélèvements.....	22
1.1.1. Urines.....	22
1.1.2. Pus.....	23
1.1.3. Hémoculture.....	23
1.2. Identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
1.2.1. Examen macroscopique des colonies.....	24
1.2.2. Examen microscopique .....	24
1.2.3. Coloration de Gram .....	24
1.2.4. Test d'oxydase .....	25
1.2.5. Identification par galerie API 20 NE .....	25
<b>2. Antibiogramme .....</b>	<b>26</b>
<b>3. Conservation des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....</b>	<b>27</b>
<b>4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches d'actinobactéries.....</b>	<b>28</b>
4.1. Préparation des cultures d'actinobactéries.....	28
4.2 .Méthode de cylindre d'Agar .....	28
4.3. Technique des stries croisées.....	29

### **Partie résultats et discussion**

<b>Résultats .....</b>	<b>31</b>
<b>1. Etude de la population.....</b>	<b>31</b>
1.1. Répartition de la population selon les services.....	31

1.2. Répartition de la population selon l'âge.....	32
1.3. Répartition de la population selon le sexe.....	32
<b>2. Diagnostic microbiologique</b> .....	<b>33</b>
2.1. Résultats de l'isolement .....	33
2.1.1. Résultats de l'étude morphologique .....	34
2.1.2. Résultat de l'étude biochimiques .....	34
<b>3. Taux de <i>P.aeruginosa</i> dans les prélèvements</b> .....	<b>35</b>
3.1. Répartition des souches de <i>P.aeruginosa</i> selon la nature des prélèvements .....	35
3.2. Répartition des souches de <i>P.aeruginosa</i> selon les services .....	35
<b>4. Profil de résistance de <i>P.aeruginosa</i> aux antibiotiques</b> .....	<b>36</b>
4.1. Résultat de l'antibiogramme.....	36
<b>5. Evaluation du potentiel antagoniste des souches d'actinobactéries contre la souche de référence de <i>P.aeruginosa</i></b> .....	<b>37</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>40</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>45</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>47</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>59</b>

Au cours des dernières décennies, *Pseudomonas aeruginosa* s'est imposé comme un pathogène hospitalier majeur (**Mérens et al., 2011**). Il constitue l'espèce type la plus importante du genre *Pseudomonas*, et représente à lui seul 90% des bactéries de ce groupe isolé en clinique humaine. Grâce à la flexibilité génétique fournie par son grand génome, le *P. aeruginosa* est doté d'une grande capacité d'adaptation à des conditions nutritionnelles minimales, et il est capable de supporter de variables conditions physiques lui permettant de persister aussi bien en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire (**Tijani, 2019**). L'environnement hospitalier est propice à ce micro-organisme car il comporte de nombreuses niches écologiques appropriées, qu'elles soient environnementales (points d'eau et autres zones humides) ou humaines (patients de réanimation) (**Bertrand et al., 2011**).

*P. aeruginosa* est impliqué dans des infections opportunistes, responsable dans des conditions favorables, d'infections graves communautaires et surtout nosocomiales (**Bousquet et Mérens, 2018**). Une enquête méditerranéenne de prévalence en 2010 attribue à *P. aeruginosa* la responsabilité de 9,2 % de l'ensemble des infections nosocomiales, le plaçant ainsi au 3<sup>ème</sup> rang des espèces isolées juste après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (**Sefraoui, 2015**).

Ce pathogène se caractérise par sa résistance intrinsèque élevée à de nombreux antimicrobiens et sa capacité à acquérir une résistance même à des molécules à large spectre tels que les carbapénèmes et les polymyxines (**Felipe et al., 2019**). Cette accumulation de mécanismes de résistance est devenue problématique car elle conduit, à l'extrême, à une impasse thérapeutique en raison de l'émergence de souches dites totorésistantes vis-à-vis du panel d'antibiotiques (ATB) disponibles sur le marché (**Minchella et al., 2010**). Ces constats expliquent le besoin de disposer de nouvelles molécules d'antibiotiques en exploitant les sources naturelles en particulier les actinobactéries.

Les actinobactéries, bactéries à Gram positif à majorité filamenteuse, représentent la principale source naturelle de molécule bioactives dont les plus importants sont les antibiotiques, soit 45% des molécules bioactives d'origine microbienne (**Boughachiche et al., 2005; Solecka et al., 2012; Jiang et al., 2016**).

Notre étude qui entre dans ce cadre a pour objectif :

- ✓ Isolement et Identification des souches de *Pseudomonas aeruginosa* à partir de différents prélèvements pathologiques.
- ✓ Etude de la résistance des souches de *P. aeruginosa* aux antibiotiques.

- ✓ Evaluation du potentiel antagoniste d'une collection d'actinobactéries contre *P. aeruginosa*.

### I. Généralités sur *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1. Historique

Le pathogène bactérien opportuniste actuellement connu sous le nom de *Pseudomonas aeruginosa* a reçu plusieurs noms tout au long de son histoire basée sur la coloration bleu-vert caractéristique produite en culture. (*Bacillus pyocyaneus*, *Pseudomonas polycolor*, *Bakterium aeruginosa* et *Pseudomonas pyocyaneus* (**Botzenhart and Döring, 1993**).

Sédillot en 1850 a été le premier à constater que la décoloration des pansements chirurgicaux était associée à un agent transférable.

Le pigment responsable de la coloration bleue a été extrait par Fordosen en 1860, et en 1862, Lucke a été le premier à associer ce pigment à des organismes en forme de bâtonnet (**Pitt, 1998**).

*P. aeruginosa* n'a été isolé avec succès en culture pure qu'en 1882, lorsque Carle Gessard a rapporté dans une publication intitulée «Sur la coloration bleue et verte des bandages», la croissance de l'organisme à partir des blessures cutanées de deux patients atteints de pus vert bleuâtre (**Gessard, 1984**).

Dans plusieurs rapports supplémentaires entre 1889 et 1894, *P. aeruginosa* (*Bacillus pyocyaneus*) a été décrit comme l'agent causal de la purulence bleu-vert dans les plaies des patients (**Villavicencio, 1998**).

#### 2. Habitat et mode de transmission

*Pseudomonas aeruginosa* une bactérie ubiquitaire, son réservoir naturel et permanent est représenté par les sols humides, les végétaux et surtout par les eaux qu'elles soient douces, marines ou encore usées (**Ruiz et al., 2004**).

En milieu hospitalier, tous les réservoirs d'eau peuvent être une source de contamination : on retrouve ainsi comme source potentielle les siphons d'éviers, les chasses d'eau, les piscines et bains bouillonnants, les humidificateurs, les nébulisateurs et les respirateurs artificiels (**Mérens et al., 2013**). Cette bactérie se rencontre aussi au niveau du matériel médical ou chirurgical, et dans des solutions d'antiseptiques (**Delarras, 2007**).

Elle peut être transitoirement présente chez l'homme et les animaux, au niveau du tractus digestif (selles), de la peau (plis cutanés humides), du conduit auditif externe ou du nasopharynx (**Mérens et al., 2013**).

Le mode de contamination peut être endogène (par patient lui-même) ou exogène à partir de réservoirs environnementaux, du matériel contaminé et par le personnel soignant (mains) (Chomton, 2012; Nyaldome, 2016).

### 3. Etymologie et Taxonomie

L'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* est composée des mots grec *Pseudo* (imitation), *monas* (unité) et latin *aeruginosus* (couvert de rouille) autrefois appelée « **bacille pyocyanique** » (Mérens et al., 2013).

Sa taxonomie est présentée dans le tableau I :

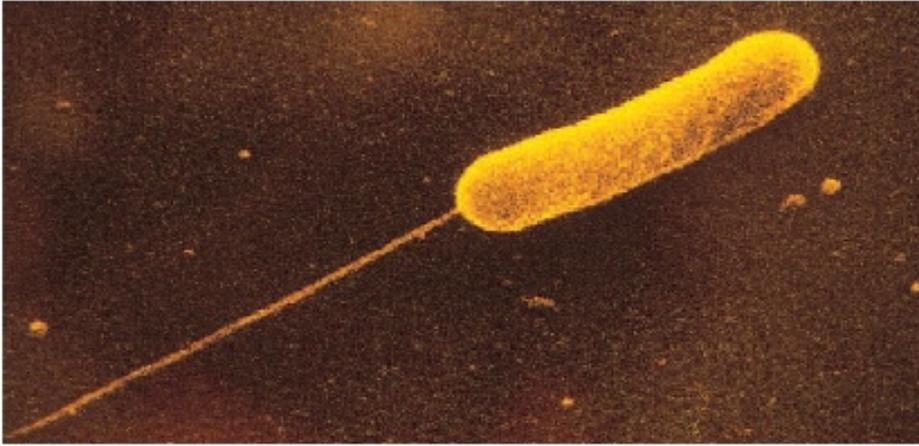
**Tableau I.** Taxonomie de *P. aeruginosa* (Balouki, 2017)

<b>Domaine</b>	<i>Bacteria</i>
<b>Phylum</b>	<i>Proteobacteria</i>
<b>Classe</b>	<i>Gammaproteobacteria</i>
<b>Ordre</b>	<i>Pseudomonales</i>
<b>Famille</b>	<i>Pseudomonaceae</i>
<b>Genre</b>	<i>Pseudomonas</i>
<b>Espèce</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

### 4. Caractéristiques bactériologiques

#### 4.1. Caractéristiques morphologiques

*P.aeruginosa* se présente sous forme de bacille à Gram négatif, parfois incurvé et d'aspect très fin (1 à 3 µm de long et 0,5 à 1 µm de large). C'est un germe non sporulé, mais il peut être entouré d'une pseudo-capsule (ou slime) impliquée dans sa pathogénicité. L'observation d'une goutte d'échantillon clinique entre lame-lamelle met en évidence de bacilles très mobiles se déplaçant en ligne droite, grâce à un flagelle en position polaire (**Figure 1**) (Freney, 2007).



**Figure 1.** Micrographie électronique de *P. aeruginosa* montrant son unique flagelle polaire (Talaro and Talaro, 2002).

#### 4.2. Caractéristiques cultureux

C'est une bactérie hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique. Par conséquent, elle peut être isolée en culture sur des milieux ordinaires ou sur des milieux rendus sélectifs par addition d'inhibiteur, tel que le cétrimide (Essoh, 2013).

Cette bactérie aérobie possède un métabolisme oxydatif mais elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons en conditions anaérobie (Khalilzadeh, 2009).

La température optimale de croissance du bacille pyocyanique est située entre 30 et 37°C mais aussi capable de pousser jusqu'à une température de 41°C (Gougeon, 2017).

Les cultures dégagent une odeur caractéristique de raisin ou seringa in vitro (Essoh, 2013).

Trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée (Denis, 2016):

- Colonies larges (« la ») de 2 à 3 mm de diamètre, à bord irrégulier, rugueuses, avec une partie centrale bombée présentant des reflets métalliques.

- Colonies plus petites lisses (« S ») bombées à bord régulier.

- Colonies muqueuses (« M »), bombées, coalescentes, filantes, rencontrées chez les souches produisant un *slime* composé d'un polymère exopolysaccharidique appelé alginate.

*P. aeruginosa* produit deux pigments qui diffusent dans le milieu de culture : la pyocyanine, pigment bleu, et la pyoverdine, pigment jaune vert fluorescent, Ils peuvent être mis en évidence dans le milieu de King B et King A (Delarras, 2007; Venier, 2011). Il existe de rares souches produisant d'autres pigments (noir pyomelanine ou rouge-brun pyorubine) et des

souches apigmentées (moins de 5% des souches sauvages ne produisent aucun pigment et sont fréquemment isolées chez des patients sous antibiotiques) (Venier, 2011).

### 4.3. Caractéristiques biochimiques

*P. aeruginosa* possède une oxydase. Il ne fermente pas les sucres, mais il peut en oxyder certains avec acidification du milieu, et il est capable d'utiliser de nombreux substrats hydrocarbonés comme seule source de carbone et d'énergie (Citrate de Simmons, mannitol et xylose). En anaérobiose, il utilise les nitrates comme accepteur final d'électrons (nitrate réductase positive). Les autres caractères biochimiques sont les suivants : gélatinase positive, lactose négatif, arginine dihydrolase (ADH) positive, indole négatif (Freney, 2007).

### 4.4. Caractéristiques antigéniques

La surface de la membrane externe de *P. aeruginosa* est composée de lipopolysaccharide (LPS). C'est un composé amphiphile constitué d'une partie hydrophobe, le lipide A, ancré dans la bicouche lipidique et d'une partie hydrophile constituée de chaînes polysaccharidiques ou antigène O. Cet antigène, dont la composition varie, permet la caractérisation des différents sérotypes de *P. aeruginosa* (Gebus, 2008). Il existe 20 différents sérotypes de *P. aeruginosa* selon le schéma international du typage antigénique dont les plus connus sont les *aeruginosa* sérovars O.1 à O.12 (Faure et al., 2002; Chaibdraa et al., 2008). Le sérotype O.12 présente la particularité d'être le plus résistant aux antibiotiques et le plus souvent incriminé dans les infections nosocomiales (Oulymata, 2007).

Il existe aussi un antigène flagellaire H, thermolabile, permettant un typage qui, en combinaison avec le typage O, permet de reconnaître au moins 25 sérovars (Cady, 2006).

### 4.5. Données sur le génome de *P. aeruginosa*

Le génome de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé en 2000, il s'agit de l'un des plus grands génomes bactériens connus avec 6,3 méga bases. Il est constitué d'une partie conservée qui représente jusqu'à 90% et d'une partie variable caractérisée par les échanges horizontaux de gènes (Essoh, 2013). Le génome chromosomique code notamment pour la plupart des facteurs de pathogénicité et pour les multiples protéines, conférant la résistance aussi à différentes classes d'ATB. La proportion de gènes de régulations est la plus importante de tous les génomes bactériens séquencés connus. *P. aeruginosa* possède aussi de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction.

La taille, la complexité et la variabilité du génome de *P. aeruginosa* reflètent une évolution adaptative de l'espèce qui lui confère la capacité d'utiliser un grand nombre de

composés organiques et ainsi de se développer dans de nombreuses niches écologiques même pauvres en nutriments (**Filopon, 2005; Aissa, 2012**).

### 5. Facteurs de virulence

La pathogénie de *P.aeruginosa* est attribuée à la production d'un vaste arsenal de facteurs de virulence (cellulaires et extracellulaires) agissant à différents niveaux au cours de l'infection, lui permettant de survivre aussi bien dans différents hôtes que dans l'environnement (**Bricha et al., 2009; Ben Haj Khalifa et al., 2011**). Ils comprennent notamment des facteurs impliqués dans l'adhérence et la motilité de *P.aeruginosa* qui permettent la colonisation de l'hôte. Les adhésines bactériennes sont typiquement des structures macromoléculaires assemblées à la surface bactérienne comme le flagelle, les pili de type IV et les alginate. Le LPS intervient également dans l'adhésion de *P. aeruginosa* sur l'épithélium respiratoire. Des toxines et des protéases qui provoquent des lésions tissulaires facilitant aussi la multiplication et la dissémination bactérienne dans les tissus de l'hôte: L'exotoxine A, l'élastase, les phospholipases C, les rhamnolipides et les exoenzymes sécrétées par le système de sécrétion de type III (**Figure 2 et Tableau II**) (**Bricha et al., 2011**).

De plus *P.aeruginosa*, possède la propriété de former le biofilm aussi bien sur les surfaces inertes (sondes urinaires ou d'intubation ...) qu'au niveau des épithéliums (**Cady, 2006**). Cette structure bactérienne est composée des microcolonies enchassées dans une matrice d'exopolysaccharides (l'alginate). En gênant la diffusion des antibiotiques et en permettant une résistance à la phagocytose et à l'action du complément. La formation du biofilm par les micro-organismes leur assure une installation durable (**Olivares, 2017**).

- **Le quorum sensing (QS)** est considéré comme le principal mécanisme de régulation de la pathogénicité et de l'adaptation écologique chez *P. aeruginosa*. Ce système de régulation est fondé sur la capacité des bactéries à communiquer entre-elles, ce qui leur permet de coordonner leur comportement et ainsi de fonctionner comme un organisme multicellulaire. La communication bactérienne repose sur la production de phéromones diffusibles, des N-acyl-homosérine lactones (AHL), qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné. Ces AHL sont synthétisés par une AHL synthétase qui est codée par un gène de type « I » (inducteur). Lorsque la concentration de ces molécules diffusibles atteint un certain seuil, elles se lient au régulateur transcriptionnel de type «R». Le complexe ainsi formé va activer la transcription de gènes cibles dits de virulence mais également du gène «I», d'où le terme de molécules auto-inductrices (**Ben Hadj Khelifa et al., 2011**).

Trois systèmes du *quorum sensing* ont été caractérisés chez *P. aeruginosa*, deux d'entre eux sont médiés par les AHL (LasI/LasR et RhII/RhIR) et le troisième est régi par des quinolones (PQS) (Olivares, 2017) :

- Le système LasR/LasI, régule l'expression des facteurs de virulence comme LasA, LasB et ExoA.
- Le système RhIR/RhII, régule l'expression des rhamnolipides, des protéases alcalines et des métabolites secondaires comme la pyocyanine.
- Le système PQS qui contrôle lui aussi l'expression de plusieurs facteurs de virulence dont l'élastase B et également la pyocyanine.

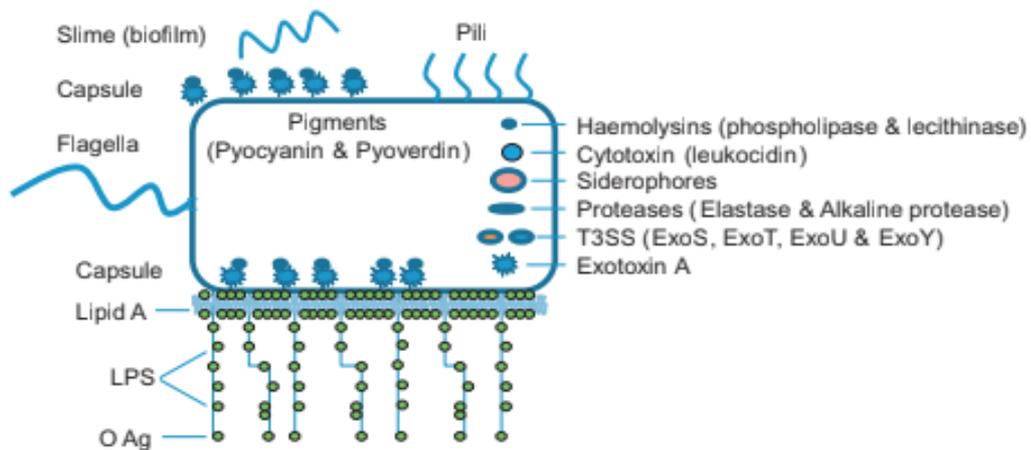


Figure 2. Les facteurs de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa* (Wu et Li, 2015).

Tableau II. Les mécanismes de virulence et les effets pathogènes induits par les principaux facteurs de virulence (Ben Hadj Khalifa et al., 2011)

Facteurs de virulence	Mécanisme de virulence	Effet pathogène induit
Lipopolysaccharide (LPS)	Stimulation de la production de cytokines	Choc septique
Pili	Adhésion aux cellules épithéliales respiratoires	Pathogénicité respiratoire
Flagelle	Adhésion aux mucines Mobilité : rôle dans l'internalisation	Diffusion bactérienne
Alginate	Provoque le phénotype muqueux. Adhésion aux cellules trachéales. Inhibition de la phagocytose, de l'action des antibiotiques et de la réponse immunitaire	Pathogénicité respiratoire Résistance aux défenses de l'hôte (phagocytose) et aux ATB Responsable du caractère mucoïde des souches

**Suite du tableau II**

<b>Facteurs de virulence</b>	<b>Mécanisme de virulence</b>	<b>Effet pathogène induit</b>
Exotoxine A	Inhibition des synthèses protéiques des cellules Cibles	Mort cellulaire : nécrose tissulaire
Exoenzyme S	Effet cytotoxique Prolifération des LT	Nécrose tissulaire Lésions des glycopeptides, de la vimentine et des IgA et IgG.
Exoenzyme U	Rôle anti-phagocytaire	Lésions des cellules épithéliales Responsable de bactériémie voire de choc Septique
Rhamnolipide	Effet détergent	Hydrolyse du surfactant
Elastases (LasA+LasB)	Dégradation de l'élastine, de la fibrine, de l'interféron, du complément et du collagène	Destruction des tissus contenant de l'élastine
Pyocyanine Pyoverdine	Action bactéricide sur les autres bactéries. Augmentation de la libération d'élastase Inhibition des battements des cils Captage du fer Induisent la synthèse de radicaux libres	Favorise l'émergence du bacille pyocyanique. Diminution de la clairance des bacilles Rôle dans la survenue de vascularite d'artères pulmonaires
Lectines solubles	Inhibition des battements ciliaires des cellules pulmonaires	Pathogénicité respiratoire Rôle dans l'infection chronique
Phospholipase C	Effet cytolytique local	Lyse des cellules cibles Rôle dans l'infection aiguë et chronique
Protéase alcaline	Protéolyse	Rôle dans les infections cornéennes

**6. Facteurs favorisant l'infection à *Pseudomonas aeruginosa***

❖ **Ceux liés à l'hôte (facteurs intrinsèques)**

Antécédents d'hospitalisation ou de colonisation à *P. aeruginosa* ; présence de co-morbidités, diabète et bronchopneumopathie chronique obstructive (**Cabrolier et al., 2014**).

❖ **Ceux liés à la prise en charge (facteurs extrinsèques)**

Notamment la durée d'hospitalisation, le nombre de dispositifs invasifs prolongés. Sans oublier, les traitements antibiotiques, particulièrement les carbapénèmes et fluoroquinolones jouant une très forte pression de sélection d'isolats très résistants, et constituent les facteurs

de risques les plus souvent retrouvés. Peuvent s'ajouter à ces derniers, les facteurs environnementaux comme la présence de la bactérie dans les points d'eau représentent également un facteur de risque important (**Cabrolier et al., 2014**).

### 7. Infections à *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes : hommes, animaux, plantes (**Didier, 2005**). L'opportuniste de cette bactérie est à l'origine de sepsis graves sur les terrains fragilisés (**Chaibdraa et al., 2008**). Il est essentiellement responsable d'infections nosocomiales (**Amezian et al., 2010**). Ce pathogène est la cause de dermatites, de méningites, des septicémies, d'otites externes chez les diabétiques, d'endocardites chez des patients abusant de drogues intraveineuses et d'infections nosocomiales du tractus urinaire (surtout après sondage), des infections ostéo-articulaires sur matériel, des pneumopathies chez les malades sous respirateur et d'infections de la peau chez les grands brûlés (**Bricha et al., 2011; Fuentefria et al., 2011**). Chez les patients atteints de mucoviscidose, *P.aeruginosa* est directement responsable du taux de mortalité élevé et précoce (**Filloux et Vallet, 2003**).

## II. Antibiotiques

### 1. Définition

Le terme « antibiotique » est dérivé des mots grecs « anti » qui veut dire contre et « bios » qui signifient la vie, c'est-à-dire, « contre la vie ». Au sens large, un antibiotique est une substance qui peut être naturelle, synthétique ou semi- synthétique inhibant ou tuant les germes pathogènes à faible concentration (**Yala et al, 2001**).

### 2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères à savoir l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action tout en adoptant la classification des antibiotiques en grandes familles (**Yala et al, 2001**).

**Tableau III.** Classification des antibiotiques selon leur mode d'action

Modes d'action	Mécanisme		Antibiotique	Références
<b>Interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire</b>	Inhibent la transpeptidation en se liant aux protéines de liaison à la pénicilline (PLP).		Les β- lactamines (les pénicillines, les carbapénèmes, les oxapénames, les céphalosporines et les monobactames). Les glycopeptides (vancomycine, Teicoplanine) Peptides linéaires (lantibiotiques), La Fosfomycine.	<b>(Kohanskiet al., 2010; Zeba, 2015) (Maffioli, 2013) (Gallo et Puglia, 2013; Yala et al, 2001)</b>
	Bloquent la polymérisation du peptidoglycane en se liant au niveau du dipeptide D-alanyl-D-alanine.			
	Exercent leur activité antimicrobienne en se liant au lipide II ou en se liant sur l'enzyme Mur A entraînant la lyse bactérienne.			
<b>Perturbation de la membrane bactérienne</b>	Perturbent la perméabilité membranaire d'où la rupture de la barrière osmotique.		Polymixine B , Polymixine E ou colistine, Lipopeptides (daptomycine), Peptides linéaires (gramicidines)	<b>(Borders, 2007) (Maffioli, 2013; Gallo et Puglia, 2013)</b>
<b>Inhibition de la synthèse protéique</b>	Sous- unité 30S du ribosome	Erreur de lecture du code génétique lors de la traduction des protéines.	Aminosides (streptomycine, la néomycine, la kanamycine, la gentamicine, la tobramycine et l'amikacine)	<b>(Yala et al, 2001; Borders, 2007; Reinert, 2004) (Nilius et Ma, 2002)</b>
		Inhibiteurs de la phase d'élongation de la chaîne polypeptidique, ils empêchent la fixation de l'aminocyl-ARNt.	Tétracyclines	

Suite du Tableau III :

Mode d'action	Mécanismes		Antibiotiques	Références
<b>Inhibition de la synthèse protéique</b>	sous- unité 50S du ribosome	Ils inhibent la croissance de la chaîne polypeptidique en formation	Macrolides-Lincosamides-Streptogramines (MLS) (kétolides)	<b>(Peterson et Kaur, 2018) (Kohanski et al., 2007; Kohanski et al., 2010).</b>
		inhibition de la polymérase	Phénicolés, Oxazolidinones	
		interférant avec le facteur d'élongation G (EF-G).	Acide fusidique	
<b>Inhibition des acides nucléiques (ADN/ARN)</b>	Inhibition des enzymes de la synthèse de l'ADN (l'ADN gyrase et Topo-isomérase IV)	Inhibe la réplication de l'ADN	Novobiocine;	<b>(Yala et al, 2001) (Borders, 2007) (Cockenpot, 2014; Kohanski et al., 2010).</b>
		Provoquant diverses lésions (coupures et substitution de bases)	Quinolones (l'acide nalidixique). Fluoroquinolones (norfloxacine, ciprofloxacine et gemifloxacine) Nitrofuranes (5 nitro-imidazolés)	
	Inhibition de la transcription de l'ADN en ARN messager (ARNm) par inhibition de l'ARN polymérase.		Rifamycines (Ansamacrolides: rifampime)	
<b>Inhibition de la voie métabolique</b>	Inhibent la synthèse des folates en 2 stades différents; entrent en compétition avec le PAB	L'association "sulfamide trimethoprime"		<b>(Yala et al., 2001)</b>

### 3. Résistance aux antibiotiques

*P. aeruginosa* a toujours été considéré comme un microorganisme difficile à traiter en raison de sa résistance aux antibiotiques (Mesaros et al., 2007). Il n'est sensible qu'à un nombre restreint d'antibiotiques (Bricha et al., 2011). Les antibiotiques à tester en première intention sont ceux de la liste standard, cette liste peut être au besoin complétée à l'initiative du biologiste

par les antibiotiques de liste complémentaire qui comprend les antibiotiques plus spécifiquement utilisés vis-à-vis des souches multirésistantes (**Tableau IV**) (**Tijani, 2019**) .

**Tableau IV.** Les antibiotiques habituellement actifs sur *Pseudomonas aeruginosa* (**Morand et Morand, 2017**).

<b>Liste standard</b>	<b>Liste complémentaire</b>
Ticarcilline	Ticarcilline/acide clavulanique
Pipéracilline	Pipéracilline/tazobactam
Ceftazidime	Céfépime
Imipénème ou meropénème ou doripénème	
Aztréonam	
Gentamicine	Nétilmicine
Tobramycine	Fosfomycine
Amikacine	
Ciprofloxacine	Lévofloxacine
Colistine	Sulfamides

### 3.1. Résistance naturelle

*P.aeruginosa* présente une résistance primaire à de nombreux antibiotiques dont les pénicillines des groupes V, G, M et A, la plupart des céphalosporines de troisième génération, les quinolones de première génération, les cyclines, la kanamycine et la rifampicine (**Philippon et al., 1985; Poole, 2004**) et ce en raison de la faible perméabilité de sa membrane externe par le nombre restreint de pores perméables formés principalement par la porine oprF, de l'expression constitutive de diverses pompes à efflux, de la production d'enzymes inactivatrices d'antibiotiques et sa faculté à former des biofilms (**Mesaros et al., 2007; Venier, 2011; Mérens et al., 2013**).

*P. aeruginosa* produit naturellement deux bêta-lactamases : une oxacillinase (OXA-50) de spectre étroit dont la contribution au phénotype de résistance naturelle n'est pas significative et une céphalosporinase (AmpC) inductible, produite à un faible niveau, qui contribue majoritairement à la résistance naturelle aux bêta-lactamines de cette espèce. L'enzyme inactive la plupart des pénicillines et céphalosporines (**Montalegre, 2016**). Elle produit également une Phosphotransférase APH (3')-IIb qui lui confère une résistance naturelle à la kanamycine (**Mérens et al., 2011**).

Les pompes d'efflux MexAB-OprM et MexXY-OprM sont constitutivement exprimées chez *P.aeruginosa* et sont associées à la résistance intrinsèque aux  $\beta$ -Lactamines, Quinolones, Macrolides, Tetracyclines, Aminosides, Céphalosporines et Chloramphénicol (**Li et al., 2015**).

### 3.2. Résistance acquise

En plus des résistances naturelles, les résistances acquises sont très fréquentes pour les antibiotiques. Les mécanismes liés à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes exogènes de résistance sont variés (**Tableau V**) (**Mérens et al., 2013**).

#### 3.2.1. Résistance aux $\beta$ - lactamines

##### ➤ Résistance enzymatique :

-Acquisition des  $\beta$ -lactamases

- **Pénicillinases de type PSE (CARB) :** le plus souvent à spectre étroit, elles n'hydrolysent que les carboxy- et les uréido-pénicillines. Cependant, l'activité des inhibiteurs (acide clavulanique, tazobactam), des céphalosporines, de l'aztréonam et des carbapénèmes est conservée (**Barbier et Wolff, 2010**).
- **BLSE :** De nombreuses  $\beta$ -lactamases à spectre étendu ont été décrites chez cette espèce de type PER (Pseudomonas Extended Resistance), GES (Guiana Extended spectrum  $\beta$ -lactamase), VEB (Vietnamese Extended Resistance), KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase), en plus des BLSE de type TEM (Temoneria) et SHV (Sulphydryl variable), qui sont largement décrites chez les entérobactéries. Ces enzymes confèrent une résistance aux uréidopénicillines, carboxypénicillines et aux céphalosporines (céftazidime, céfépime, céfpirome) et l'aztréonam et elles sont toutes sensibles aux inhibiteurs tels que l'acide clavulanique et le tazobactam (**Barbier et wolff, 2010; Cholley, 2010; Montalegre, 2013**).
- **Métallo $\beta$ -Lactamases (MBL) ou Carbapénèmases :** sont les plus représentées chez *P.aeruginosa*. Sept types de MBL ont été décrites : IMP (IMiPénémases), VIM (Verona Imipenemase), SPM (Sao Paolo Métallo $\beta$ -lactamase), GIM (German imipenemase), AIM (Australia imipenemase) et plus récemment NDM-1 (New Delhi Métallo $\beta$ -lactamase) et FIM (Florence imipenemase). Les groupes VIM et IMP sont les plus dissimulés. La biosynthèse de ces enzymes peut conduire à une résistance à l'imipénème, au mérépénème, au doripénème mais également aux autres  $\beta$ -lactamines (uréidopénicillines, ceftazidime, céfépime, etc.) sauf à l'aztréonam. Les carbapénèmases sont résistantes à l'acide clavulanique et au tazobactam, mais leur activité est supprimée

par des chélateurs ioniques, par exemple, EDTA (Nordmann, 2010; Montalegre, 2013; Gougeon, 2017; Barbier et Wolff, 2010).

- **Oxacillinases** : Elles peuvent avoir un spectre d'hydrolyse de type BLSE, seule l'activité des carbapénèmes qui reste conservée (Barbier et Wolff, 2010).

-Hyperproduction de céphalosporinases chromosomiques ampC par mutation d'un gène de régulation : « céphalosporinase dérégulée ». Ce mécanisme confère la résistance à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines à l'exception des carbapénèmes (El miskini, 2011).

### ➤ Résistance non- enzymatique

- Acquisition par mutations de systèmes d'efflux actif : L'hyperexpression acquise des systèmes naturels d'efflux transmembranaire est un mécanisme majeur de multirésistance chez *P. aeruginosa*. La surexpression de MexAB-oprM entraîne une diminution de la sensibilité, voire une résistance, à la ticarcilline, à l'aztreonam et au méropénème. L'hyperexpression du système MexCD-oprJ, plus rare, peut réduire la sensibilité au céfépime (Barbier et Wolff, 2010).

- Altération de la porine OprD : Les porines sont des canaux protéiques transmembranaires permettant aux  $\beta$ -lactamines de franchir la membrane externe bactérienne. Les  $\beta$ -lactamines franchissent la membrane externe à travers la porine majoritaire OprF, excepté les carbapénèmes qui utilisent une porine spécifique OprD. Les mutations avec altérations quantitatives ou qualitatives de cette porine constituent un mécanisme de résistance très fréquent aux carbapénèmes. Ce mécanisme confère alors une résistance de haut niveau à l'imipénème et une diminution variable de la sensibilité au méropénème et au doripénème, mais n'affecte pas l'activité des autres  $\beta$ -lactamines (Gougeon, 2017; Barbier et Wolff, 2010).

### 3.2.2. Résistance aux aminosides

#### ➤ Résistance enzymatique

- Acquisition d'enzymes plasmidiques inactivatrices : constitue de loin le mécanisme le plus fréquent. Ces enzymes sont capables de modifier des fonctions -NH<sub>2</sub> ou -OH bien précises sur les molécules d'aminoside, empêchant ces dernières de se fixer sur le ribosome (Mérens et al., 2011). Trois classes d'enzymes ont été décrites chez *P. aeruginosa* sont les aminoacétyltransférases (AAC), les nucléotidyltransférases (ANT), les phosphotransférases (APH). Les AAC participent à la résistance de *P. aeruginosa* aux gentamicines, tobramycine, nétilmicine et amikacine. Tandis que les APH augmentent le niveau de résistance de cette espèce à la kanamycine et néomycine. Enfin, les ANT confèrent une résistance à la streptomycine, la gentamycine et la tobramycine (Cholley, 2010).

➤ **Résistance non-enzymatique**

-Efflux actif : Chez *P. aeruginosa*, seul le système d'efflux MexXY-oprM qui est capable d'expulser les aminosides en dehors de la cellule. Ce système est surproduit chez certains mutants, entraînant une résistance de bas niveau à tous les aminosides (**Cholley, 2010**).

**3.2.3. Résistance aux fluoroquinolones**

La résistance acquise de *P. aeruginosa* aux quinolones est majoritairement liée à des mécanismes de résistance à support chromosomique. Le plus connu est la modification de cible. Cependant, on retrouve comme autres mécanismes la surexpression d'efflux ainsi que la protection de cible (**Montalgre, 2017**).

Des mutations au niveau de la protéine *gyrA* (sous-unité de l'ADN gyrase) ou au niveau de *parC* (la sous-unité par C de la topoisomérase) conduisent à une baisse d'affinité pour les fluoroquinolones. En effet, ces mutations introduisent des substitutions d'acides aminés dans les régions QRDR où se fixent les antibiotiques (Quinolone Resistance Determining Regions). Les mutations de *gyrA* sont les plus fréquentes et semblent pouvoir induire seules une résistance de haut niveau (**Cholley, 2010 ; Barbier et Wolff, 2010**).

La surproduction des pompes d'efflux MexAB-OprM, MexXY-OprM, plus rarement MexCD-OprJ et MexEF-OprN est à l'origine d'une résistance modérée aux fluoroquinolones ainsi qu'à d'autres classes d'antibiotiques (**Mérens et al., 2011**). Ainsi, le haut niveau de résistance aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* est attribuable à l'association des surproductions de pompes à efflux et des mutations dans les gènes codant ADN gyrase et la topoisomérase (**Sefraoui, 2015**).

Un mécanisme de résistance plasmidique a été décrit chez *P. aeruginosa* par protection de cible. Le plasmide apportant un ou des gènes à l'origine de la production de protéines à motifs pentapeptidiques répétés qui protègent les complexes ADN gyrase et topoisomérase de l'action des fluoroquinolones. Ce nouveau mécanisme est à l'origine d'un faible niveau de résistance à l'encontre des quinolones (**Montalgre, 2017**).

**3.2.4. Résistance à la colistine**

Le bacille pyocyanique a la capacité de devenir imperméable aux polymyxines en modifiant la composition de sa membrane externe, soit par mutations, soit par activation de systèmes membranaires complexes (systèmes de régulation à deux composants, tels que ParR et ParS). Il en résulte une résistance de bas niveau à la colistine (**Mérens et al., 2011**).

Tableau V. Principaux mécanismes acquis de résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa* (Barbier et Wolff, 2010).

Classes d'antibiotiques	Résistances par mutations (chromosomiques)		Résistances par acquisition de gènes (quasi exclusivement plasmidique)	
	Mécanismes	Support génétique	Molécules concernées	Mécanismes
$\beta$ -lactamines	Hyperproduction de la céphalosporinase AmpC	<i>AmpC</i> ( <i>AmpD</i> , <i>AmpR</i> )	TIC, TCC, PIP, PTZ, FEP, CAZ, AZT.	$\beta$ -lactamases de classe A <sup>1</sup> Pénicillinases
	Efflux actif	<i>MexAB-oprM</i> <i>MexXY-oprM</i> <i>MexCD-oprJ</i>	TIC, TCC, AZT FEP FEP	BLSE Carbapénémases
	Imperméabilité des carbapénèmes	<i>OprD</i>	IMP ( $\pm$ MER et DOR)	$\beta$ -lactamases des classe B <sup>1</sup> (Métallo-carbapénémases)
	Efflux actif	<i>MexXY-oprM</i>	Toutes	<i>Bla<sub>TEM</sub></i> , <i>Bla<sub>IMP</sub></i> , <i>Bla<sub>GIM</sub></i>
<b>Aminosides</b>	Modification de la cible (Topo-isomérase II et IV)	<i>gyrA</i> (++) , <i>parC</i>	CIP	Variable sauf IMI, MER, DOR
<b>Fluoroquinolones</b>	Efflux actif	<i>MexAB-oprM</i> <i>MexXY-oprM</i> <i>MexCD-oprJ</i> <i>Autres</i>	CIP	Ensemble des $\beta$ -lactamines sauf AZT
	Modification de la membrane externe (exceptionnelle)			<i>Bla<sub>OXA</sub></i>
<b>Colistine</b>				ACC (6')-I APH (3')-II
				TOB, NET, AMK AMK
				<i>rmt</i>
				Toutes

TIC : ticarcilline ; TCC : ticarcilline-acide clavulanique ; PIP : pipéracilline ; PTZ : pipéracilline-tazobactam ; FEP : céfépime ; CAZ : ceftazidime ; AZT : aztréonam ; MER : méropénème ; IMI : imipénème ; DOR : doripénème ; AMK : amikacine ; TOB : tobramycine ; NET : nétilmicine ; CIP : ciprofloxacine ; BLSE : B-lactamase à spectre élargi ; I/R : sensibilité diminuée ou résistant. <sup>1</sup> Seules les enzymes les plus fréquentes sont indiquées. <sup>2</sup> Activité variable des inhibiteurs (acide clavulanique, tazobactam).

### III. Actinobactéries

#### 1. Généralités

Les actinobactéries sont parmi les microorganismes présentant un intérêt biotechnologique en particulier pour la production de molécules bioactives (**Sabaou et al., 1998**). Ils forment un groupe diversifié de bactéries à Gram positif filamenteuses, septées, ramifiées, organotrophes, hétérotrophe, aérobies stricts et micro-aérophiles. Leur coefficient de Chargaff (G+C%) est supérieur à 55%, généralement compris entre 60 et 75% (**Larpent et Sanglier, 1989**). Appelées autrefois actinomycètes, terme utilisé pour la première fois par Bollinger en 1877, emprunté du grec « aktis » et « mykes » pour « champignons à rayons », explique que ces microorganismes ont d'abord été considérés comme des champignons en raison de leur capacité à former un véritable mycélium ramifié (**Gottlieb et al., 1973**).

On rencontre des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres forment un mycélium du substrat bien développé et ramifié mais n'ont pas de mycélium aérien (*Micromonospora*) (**Supong et al., 2013**), et enfin des espèces organisées en mycélium végétatif et/ou en mycélium aérien. Les actinobactéries sont capables de métaboliser plusieurs et différentes sources de carbone et d'énergie et croître dans des conditions très variées. Elles peuvent se développer dans des habitats très différents, et jouent un rôle important dans la fertilisation des sols.

La taxonomie des actinobactéries est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. Avec les récentes éditions du manuel de taxonomie bactérienne, plusieurs formes bactériennes non mycéliennes sont affiliées aux actinobactéries sur la base de leurs parentés phylogénétiques.

Selon la version 2012 du manuel de la systématique bactérienne, les actinobactéries sont rattachées au phylum Actinobacteria qui comprend 6 classes, 15 ordres, 43 familles et 203 genres (**Goodfellow et al., 2014**).

#### 2. Importance et utilisation

Ils ont une vraie importance pour le domaine de la biotechnologie en tant que producteurs d'une pléthore de métabolites secondaires bioactifs ayant de vastes applications industrielles, médicales et agricoles. Les actinobactéries produisent la majorité des antibiotiques naturels (**Barka et al, 2015**).

Ce sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telles que des protéases, des chitinases (Vonothini et al., 2008), des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (Park et al., 2002).

Les actinobactéries ont le potentiel d'inhiber la croissance de plusieurs agents pathogènes des plantes, p.ex. *Erwinia amylovora* (bactéries qui causent la brûlure bactérienne des pommes), *Agrobacterium tumefaciens* (agent occasionnel de la galle de la couronne) (Jeffrey et al., 2007; Oskayet al., 2004).

### 3. Rôle des Actinobactéries dans la production d'antibiotiques

De tous les microorganismes, les actinobactéries sont surtout réputées pour la production d'antibiotiques, environ 75% (soit, plus de 7600 molécules) sont produites par les espèces du genre *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (Saker, 2015). Parmi ces antibiotiques, nous pouvons citer la streptomycine, l'actinomycine D, le chloramphénicol, la kanamycine, la néomycine et la novobiocine (Aouiche, 2013). Les autres genres (dont certains sont relativement rares) tels que *Micromonospora*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Nocardiosis*, etc., sécrètent aussi de nombreux antibiotiques (plus de 2500) dont plusieurs sont importants sur le plan thérapeutique (Sarkar et al., 2008; Genilloud et al., 2012)

Les antibiotiques sécrétés par les actinobactéries peuvent être à activité antibactérienne et/ou antifongique (aminoglycosides, aromatiques, glycopeptides, macrolides, polyènes, tétracyclines, etc), ou encore, avoir des propriétés antitumorales et cytostatiques (adriamycine, anthramycine, daunomycine, rebeccamycine, etc.) (Mann, 2001).

### 4. Antibiotiques produits par les Actinobactéries actifs sur *Pseudomonas aeruginosa*

Les actinobactéries montrent une activité antibactérienne contre divers agents pathogènes et pathogènes multirésistants à des médicaments tels que les entérocoques résistants à la méthicilline, les dysenteries de *Shigella sp*, *Klebsiella sp*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* etc (Selvameenal et al., 2009; Servin et al., 2008; Singh et al., 2012).

**Tableau VI.** Antibiotiques produites par les actinobactéries et actifs sur *pseudomonas aeruginosa*

<b>Famille d'antibiotiques</b>	<b>antibiotique</b>	<b>Espèce d'actinobactérie</b>	<b>Références</b>
β-lactamines	Céphalosporines	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	(Riuset Demain, 1997; Xiao et al., 1991; Depestel et al., 2008)
Cyclines	Tétracycline (auremycine)	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	(Chopra et Roberts, 2001)
Quinolones	L'acide nalidixique	<i>Pseudonocardia sp.</i>	(Siegmund et al., 2005)
Aminoglycosides	Gentamycine	<i>Streptomyces kanamyceticus</i> , <i>Streptomyces spectabilis</i> , <i>Streptomyces tenjimariensis</i> et <i>Micromonospora sp</i>	(Benveniste et Davies, 1973)
Macrolides	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuela</i>	(Xue et al., 1998)

Notre étude a été menée à l'unité de bactériologie du laboratoire central de l'établissement public hospitalier de Boufarik. Elle comporte d'une part l'isolement et l'identification des souches de *Pseudomonas aeruginosa* à partir des divers prélèvements provenant de patients externes et de ceux rattachés aux différents services de l'hôpital à savoir les services de maladies infectieuses, médecine interne, gynéco-obstétrique, néonatalogie, réanimation, chirurgie générale et d'autre part la détermination du profil de résistance des souches isolées aux antibiotiques.

### I. Matériel

#### 1. Matériel biologique

##### ✓ Les Types de prélèvement

Durant notre étude, 345 prélèvements ont été réceptionnés à l'unité de Bactériologie du laboratoire central de l'établissement publique hospitalier de Boufarik et consiste en urines, pus et sang (**Tableau VII**).

**Tableau VII.** Les types de prélèvements

Types de prélèvements	Nombre
Urine	300
Pus	36
Sang	9

##### ✓ Les souches bactériennes

Les souches de références

- ❖ *Pseudomonas aeruginosa* IPA1.
- ❖ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

#### 2. Matériel non biologique

Notre matériel non biologique consiste en différents outils de laboratoire, réactifs et milieux de culture cité en annexe (**Annexe 1**).

✓ **Les antibiotiques testés**

Les antibiotiques testés selon la recommandation du fascicule de standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale version 2014 (**Tableau VIII**).

**Tableau VIII.** Antibiotiques testés contre les souches de *Pseudomonas aeruginosa*

La famille d'antibiotique	Antibiotiques testés	Abréviation	Charge (µg)
Les bêtalactamines	Ticarcilline	TI	75
	Pipéracilline	PI	100
	Ceftazidime	CAZ	30
	Aztréonam	AT	30
Les aminosides	Amikacine	AK	30
	Nételmicine	NET	30
	Tobramycine	TOB	10
Les fluoroquinolones	Lévofoxacine	LE	5
	Ofloxacine	OF	5
Les polypeptides	Colistine	CL	10

## II. Méthodes

### 1. Conduite à tenir devant les différents prélèvements

#### 1.1. Mise en culture des prélèvements

##### 1.1.1. Urines

**Méthode de l'anse calibrée** : Cette méthode est actuellement la plus utilisée. L'urine est prélevée à l'aide d'une anse de 10 µl etensemencée sur le milieu Gélose nutritive qui est un milieu de base permettant la croissance d'espèces bactériennes non ou peu exigeantes, selon une technique standardisée (**Denis, 2011**).

✓ **Technique**

- Décharger l'oese de 10 µl.
- Remonter légèrement pour décharger entièrement le prélèvement.
- Faires des stries horizontales en partant du point de dépôt .

- ✓ **Incubation** : dans une étuve 37°C pendant 18 à 24h.
- ✓ **Lecture** : Dénombrement bactérienne si la culture est supérieure à 10<sup>5</sup>.

### 1.1.2. Pus

Les prélèvements ont été réalisés par écouvillonnage, les écouvillons reçus sont introduits dans un tube contenant le bouillon d'enrichissement BGT, puis en déchargeant en stries condensées, ces écouvillons sur la moitié de la surface des boîtes gélosées de milieu Hektoen qui permet d'obtenir des colonies isolées permettant d'effectuer les tests d'identification ou d'étudier la sensibilité aux antibiotiques des bactéries après on ensemence par stries à l'aide d'une Pipette Pasteur.

- ✓ **Incubation** : dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 h.

### 1.1.3. Hémoculture

Les flacons d'hémocultures doivent être transportés au laboratoire, placés dans l'étuve à 37°C et inspectés pendant 10 jours.

Observation à l'œil nu des flacons d'hémocultures à partir de 6<sup>ème</sup> heure d'incubation, puis avant chaque repiquage pendant 10 jours. Elle consiste à rechercher l'apparition de :

- Bulles de gaz à la surface.
- Milieu trouble.
- Sang noir, hémolysé ou coagulé.

La subculture est réalisée en inoculant le bouillon sur des milieux gélosé (gélöse au sang) de manière à obtenir des colonies isolées du germe. Des repiquages sont réalisés après 1<sup>er</sup> jour, 3<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jour d'incubation avant de rendre un résultat négatif.

#### ✓ **Technique**

- On désinfecte les bouchons des flacons d'hémoculture avec l'alcool.
- Après avec une seringue stérile, on aspire quelques ml de bouillon contenant dans le flacon puis on dépose une à deux gouttes de bouillon sur un point périphérique d'une boîte de gélose au sang cuit.
- A l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée et refroidie on réalise des stries serrées.
- Incuber les boîtes de gélose au sang cuit dans la jarre sous une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>.
  - ✓ **incubation**: dans l'étuve à 37°C pendant 24 h.
  - ✓ **lecture** :

Si un germe est présent dans un flacon, sa subculture sur le milieu gélosé est obtenue sous forme de colonies caractéristiques après 24h d'incubation.

Si les résultats d'hémoculture sont négatif après 24h, les flacons sont réincubés pendant 10 jours avec une subculture systématique après 3<sup>ème</sup>, 10<sup>ème</sup> jour.

Tandis que les nouveaux flacons sont mis directement dans l'appareil BacT/ALERT® (bioMérieux).

✓ **Incubation** : 37° C pendant 5 jours.

✓ **Lecture** :

L'appareil avertit de toute hémoculture positive grâce à une alarme rouge visuelle et /ou sonore, dans ce cas on fait une culture sur le milieu gélose au sang cuit. Une alarme verte indique qu'une hémoculture est négative.

✓ **Incubation**: dans l'étuve à 37°C pendant 24 h.

### 1.2. L'identification de *Pseudomonas aeruginosa*

L'identification est réalisée selon les étapes suivantes.

#### 1.2.1. Examen macroscopique des colonies

L'étude macroscopique des colonies consiste à noter les caractères suivants : Odeur, couleur ou pigmentation, taille, aspect des bords de colonies, consistance, opacité, forme et aspect de surface.

#### 1.2.2. Examen microscopique

L'observation microscopique des bactéries isolées est réalisée sur des cellules vivantes (état frais) et des cellules fixées (après coloration de Gram).

Cet examen consiste à observer la morphologie des cellules bactériennes et leurs modes de regroupement au microscope optique (GX100)

#### 1.2.3. Coloration de Gram

✓ **Technique**

La coloration de Gram se déroule en plusieurs étapes :

##### A. Préparation d'un frottis

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique puis prélever à l'aide d'une pipette Pasteur une fraction d'une colonie isolée.

- Réaliser le frottis de façon à obtenir un étalement mince et homogène.
- Sécher à l'air libre puis fixer le frottis par 3 passages rapides et brefs de la lame au-dessus d'une flamme d'un Bec Bunsen (frottis situé sur le dessus).

### **B. Etapes de la coloration différentielle de Gram**

- Recouvrir la lame de violet de gentiane pendant 1 minute.
- Rejeter le violet de gentiane et recouvrir de lugol pendant 1 minute.
- Rejeter le lugol, décolorer à l'alcool 95° pendant 5 secondes et rincer immédiatement à l'eau.
- Recouvrir la lame de fuchsine diluée 1/10 pendant 1 minute puis rincer.
- Sécher à la chaleur et examiner à l'immersion (**Denis et al., 2011**).

#### ✓ **Lecture**

La lecture se fait au grossissement x 100 avec une goutte d'huile à immersion *P. aeruginosa* apparaît colorées en rose (Gram négatif).

### **1.2.4. Test d'oxydase**

#### ✓ **Principe**

Il permet de mettre en évidence la production d'enzyme la phénylène diamine oxydase par la bactérie. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif Le N diméthyle paraphénylène diamine.

#### ✓ **Technique**

Ce test est réalisé en frottant doucement la colonie déjà prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée sur le disque pré-imprégné du réactif.

#### ✓ **Lecture**

La réaction positive à l'oxydase se traduit par la coloration violette à l'endroit où la colonie a été déposée.

### **1.2.5. Identification par galerie API 20NE**

#### ✓ **Principe**

C'est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux qui permet de réaliser les tests biochimiques dont 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation. Le test oxydase constitue le 21<sup>ème</sup> test effectué hors galerie. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages

colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries croient seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

### ✓ Technique

#### • Préparation de la galerie

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

#### • Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture jeune de la bactérie, préparer une suspension d'une opacité égale à 0,5 MF dans 2 ml d'une solution saline à 0,85 %.

#### • Inoculation de la galerie

- Remplir les tubes (et non les cupules) des tests de NO<sub>3</sub> à PNPG (4-nitrophényl-βD-galactopyranoside) avec la suspension précédente en utilisant une pipette ayant servi au prélèvement pour éviter la formation des bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Ouvrir une ampoule API AUX medium et on y transfère environ 200 µl de la suspension précédente et homogénéiser avec la pipette en évitant la formation des bulles.
- Remplir les tubes et cupules des tests Glu à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave.
- Noter que les cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects, on remplit d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et l'incuber à 37° C pendant 18 à 24 h.

#### • La lecture et interprétation de la galerie

- Après incubation, la lecture se fait en se référant à un tableau de lecture (**Annexe 4**) et l'identification est obtenue à l'aide du Logiciel APIWeb™ (**Joffin et Leyral, 2014**).

## 2. Antibiogramme

L'étude de la sensibilité de *P. aeruginosa* aux différentes familles d'antibiotiques a été réalisée par la méthode d'antibiogramme standard par diffusion des disques d'antibiotique sur

gélose Muller-Hinton. Un contrôle de qualité des antibiotiques contre des souches témoins a été réalisé en parallèle.

### ✓ Technique

#### 1) Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture pure de 18 à 24 h, on racle à l'aide d'une pipette Pasteur stérile quelque colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- On décharge bien 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 MF déterminée à l'aide d'un densitomètre.

#### 2) Ensemencement

- On ensemence les boîtes par méthode d'écouvillonnage.
- On trempe un écouvillon stérile dans l'inoculum puis on l'essore on le pressant fermement contre la paroi interne de tube.
- On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose de haut en bas en stries serrées.
- On répète l'opération deux fois en tournant la boîte 60° à chaque fois.
- On finit l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

#### 3) Application des disques d'antibiotiques

- On dépose les disques sur la gélose à l'aide d'une pince préalablement flambée (les disques ne sont pas déplacés après leur application).

#### 4) Conditions d'incubation

L'incubation des boîtes est réalisée dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 h.

#### 5) Lecture

- On mesure avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle.
- On compare les résultats avec les valeurs critiques figurant dans les tables de lectures correspondantes.
- Selon les recommandations des CLSI les bactéries sont classées dans l'une des catégories : Sensible (S), Intermédiaire (I), Résistante (R).

### 3. Conservation des souches de *Pseudomonas aeruginosa*

Après isolement et identification, les souches de *P. aeruginosa* sont repiquées sur gélose nutritive, incubées à 37 °C pendant 18h afin d'obtenir des colonies jeune en phase de croissance.

A l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie est repiquée à partir de la culture puis ensemencée dans le milieu de conservation en surface. Ce milieu est contenu dans un tube de gélose et chaque tube porte une étiquette avec les mentions suivantes : le nom de la souche, les numéros de code, la date de conservation. Les souches sont conservées dans des tubes bouchés et placés à température ambiante.

#### **4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches d'actinobactéries (partie prévue mais non réalisée à cause de la pandémie de COVID-19)**

##### **4.1. Préparation des cultures d'actinobactéries**

Les isolats d'actinobactéries provenant de la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens étaient conservés dans des tubes inclinés à 4°C. La revivification de ces isolats a été réalisée par le transfert d'inoculum à partir de ces tubes sur le milieu *International Streptomyces Project 2* (ISP2) (Shirling et Gottlieb, 1966) coulé en boîtes de Pétri. Les boîtes de pétri sont incubées à 30°C pendant 10 jours.

##### **4.2. Méthode de cylindre d'agar**

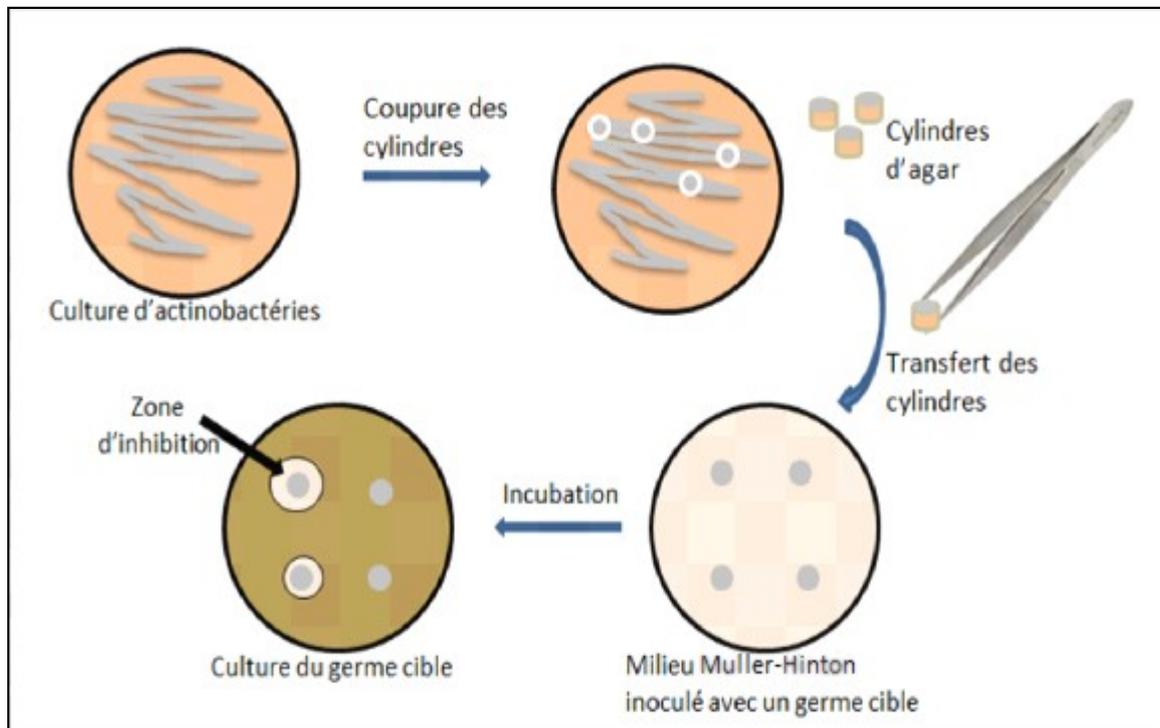
L'activité antagoniste de souches d'actinobactéries prévue d'être évaluée sur le milieu MH contre les souches de *P. aeruginosa* que nous avons isolés.

Ce test devait être réalisé par la méthode des cylindres d'agar selon les étapes suivantes

**(Figure 3)(Patel et Bronwn 1969):**

1. Ensemencement des souches d'actinobactéries en stries serrées homogènes sur milieu ISP2 solide (20 g d'agar /l) stérile et incubation à 30° C pendant 10 jours, ce milieu est préconisé pour la production des antimicrobiens par les actinobactéries.
2. Préparation des suspensions de *P. aeruginosa* à partir de culture jeunes dans l'eau distillée stérile contenue dans des tubes à vis.
3. Inoculation aseptique de milieu MH (15g d'agar /l) stérile avec les germes cibles a raison de 200 µl de la suspension par 100 ml de milieu et homogénéisation avant d'être coulé dans des boîtes pétri stériles à raison de 20ml par boîte.
4. Coupure aseptique de cylindre d'agar de diamètre de 10 mm à partir des cultures d'actinobactéries âgées de 10 jours à l'aide d'un emporte-pièce stérile.
5. Dépôt des cylindres à la surface de milieu MH inoculé avec la bactérie cible et réfrigération à 4°C pendant 2h pour permettre la diffusion des antibiotique dans le milieu et empêcher momentanément la croissance des germes cibles.
6. Incubation dans l'étuve à 30° C pendant 18h.

7. Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition doivent être mesurés à l'aide d'une règle.



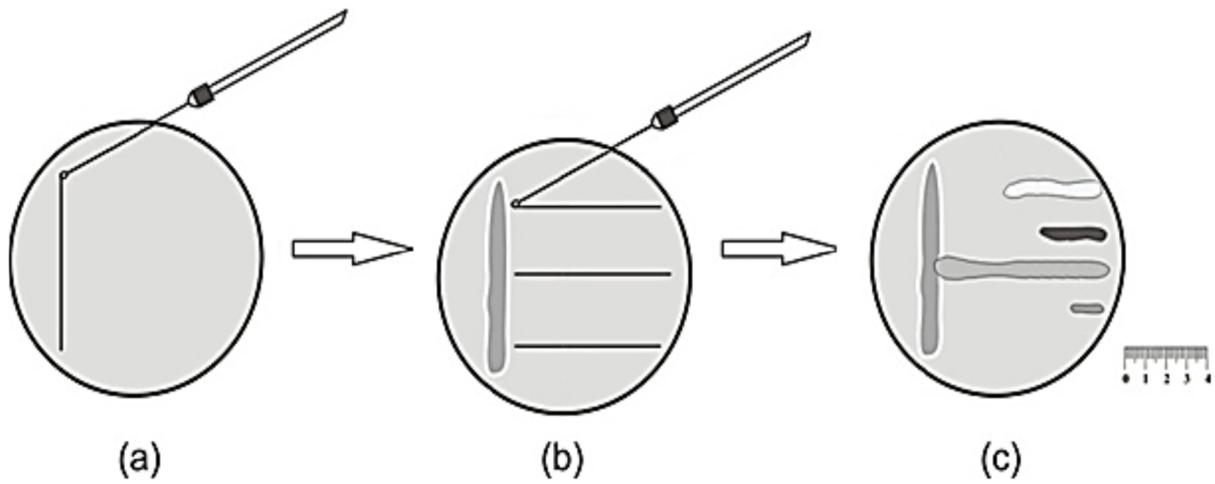
**Figure 3.** Illustration des étapes de la méthode des cylindres d'agar

#### 4.3. Technique des stries croisées

L'activité antimicrobienne des souches d'actinobactéries peut être évaluée également par la méthode des stries croisées sur le milieu solide ISP2 (Shirlinget Gottlieb, 1966).

Cette méthode consiste à ensemencer la souche d'actinobactérie en un seul trait à la surface du milieu et en bordure de la boîte de Pétri (diamètre = 9 mm). Après incubation à 30°C pendant 10 jours, les souches-cibles sont ensemencées perpendiculairement à l'actinobactérie.

L'effet de cette dernière est caractérisé par une inhibition partielle ou totale de la croissance des germes-cibles. La lecture des résultats se fait en mesurant la distance d'inhibition entre la bordure de la souche-cible et celle de l'actinobactérie, et ce après 24 h d'incubation à 30°C pour les bactéries et les levures et 48 h pour les champignons filamenteux (Khebizi, 2018) (Figure 4).



**Figure 4.** Schéma représentatif de la méthode des stries croisées.

**a:** Ensemencement de l'actinobactérie en un seul trait en bordure de boîte de Pétri.

**b:** Ensemencement des souches-cibles perpendiculairement à l'actinobactérie.

**c:** Mesure de la distance d'inhibition après la période d'incubation.

## Résultats

### 1. Etude de la population

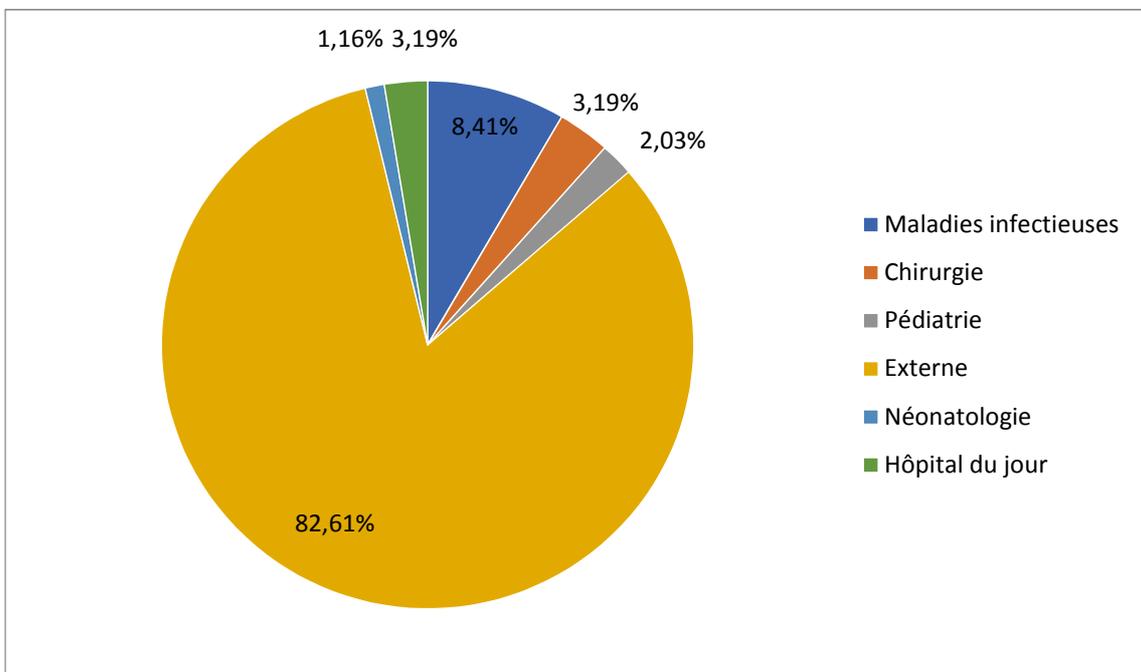
Durant notre travail au laboratoire central, unité de bactériologie de l'établissement public hospitalier de Boufarik, du 10 février jusqu'au 12 mars 2020, 345 prélèvements ont été réceptionnés et analysés.

Ces résultats montrent que la majorité des prélèvements sont de provenance externe et que la plupart des patients prélevés sont des adultes avec une prédominance du sexe masculin.

#### 1.1. Répartition de la population selon les services

Les 345 prélèvements analysés au niveau de l'unité de bactériologie proviennent de différents services (**Figure 5**) :

- 285 prélèvements de provenance externe (soit 82,61%).
- 29 prélèvements du service des maladies infectieuses (soit 8,41%).
- 11 prélèvements du service de chirurgie générale (soit 3,19%).
- 9 prélèvements d'hôpital du jour (soit 2,61%).
- 7 prélèvements du service de pédiatrie (soit 2,03%).
- 4 prélèvements du service de néonatalogie (soit 1,16%).

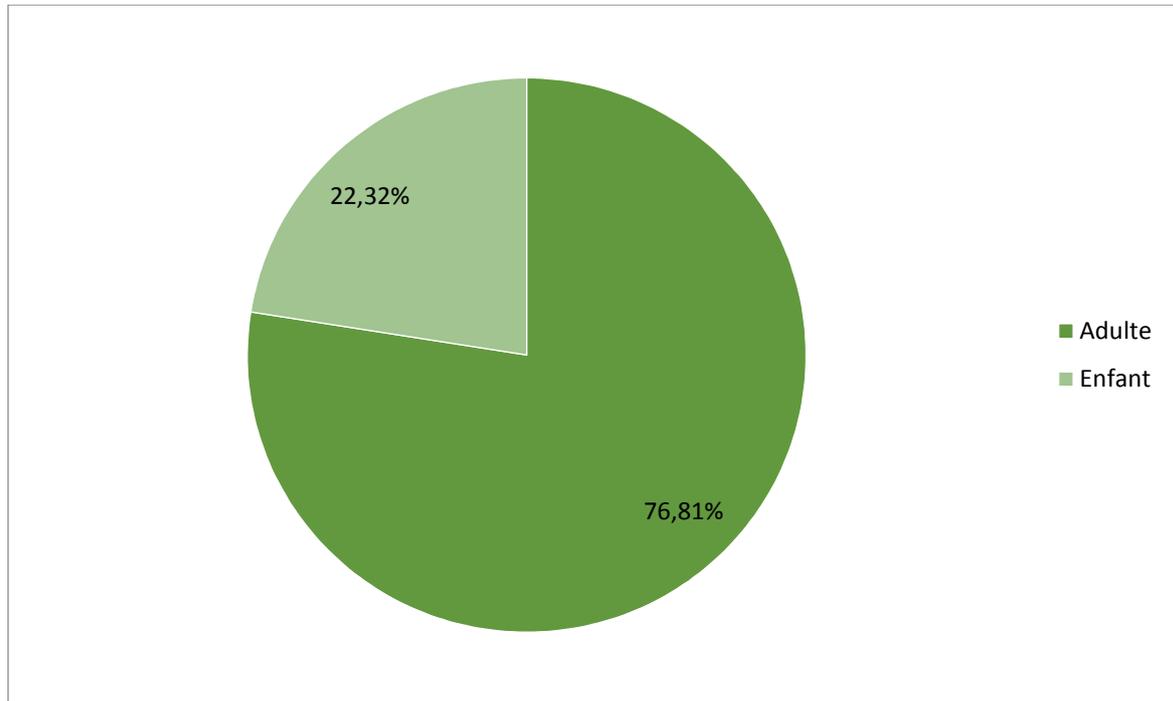


**Figure 5.** Répartition de la population étudiée selon l'origine des prélèvements.

### 1.2. Répartition de la population selon l'âge

Les patients prélevés ont été classé en deux catégories principales (**Figure 6**) :

- Adulte (<18ans), avec un total de 265 (soit 76,81%).
- Enfant ( $\geq$ 18ans), avec un total de 77 (soit 22,32%).



**Figure 6.** Répartition de la population étudiée selon l'âge

### 1.3. Répartition de la population selon le sexe

La population étudiée comprend (**Figure 7**) :

- 203 Homme (soit 58,84%).
- 142 Femme (soit 41,16 %).

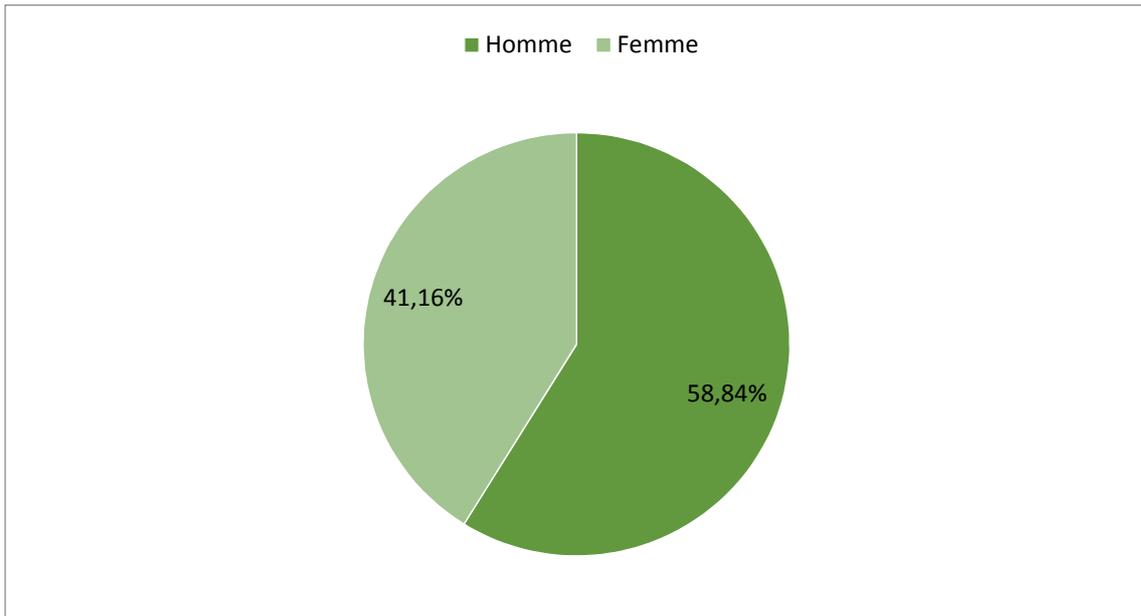


Figure 7. Répartition de la population étudiée selon le sexe.

## 2. Diagnostic microbiologique

### 2.1. Résultats de l'isolement

Durant notre travail au laboratoire central, unité de bactériologie de l'établissement public hospitalier de Boufarik, du 10 février jusqu'au 12 mars 2020, 345 prélèvements ont été analysés. Après mise en culture et incubation pendant 18 à 48h, nous avons obtenu 244 cultures négatives, 61 cultures positives soit 70,72% et 17,68% respectivement et les 40 prélèvements restants sont contaminés soit un taux de 11,59 % (Figure 8).

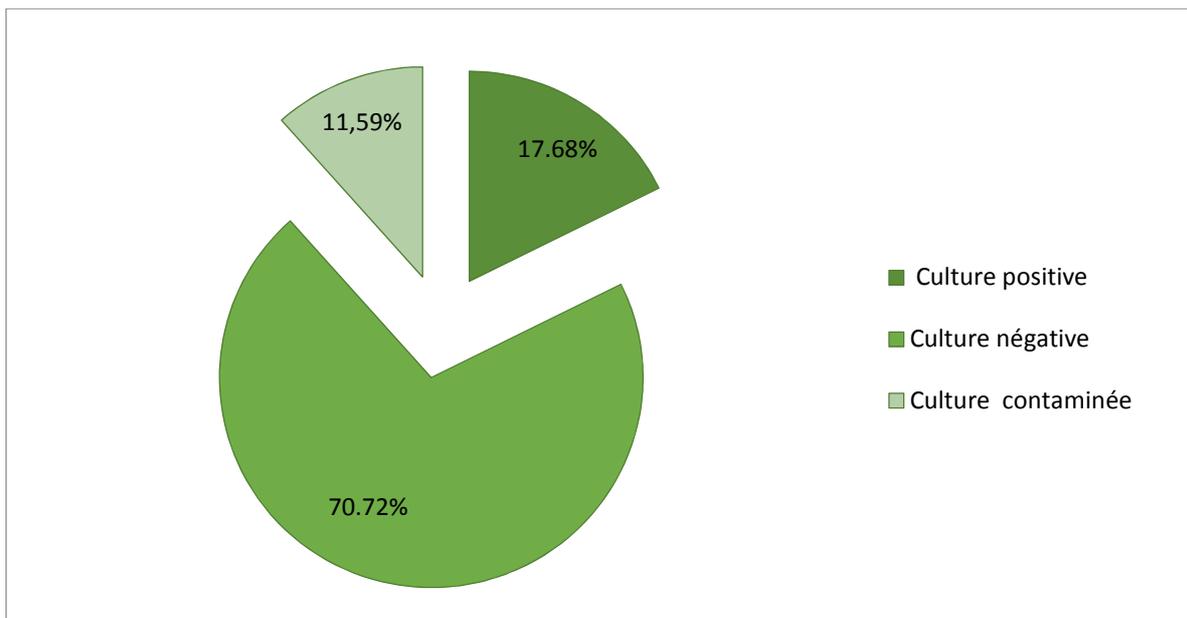
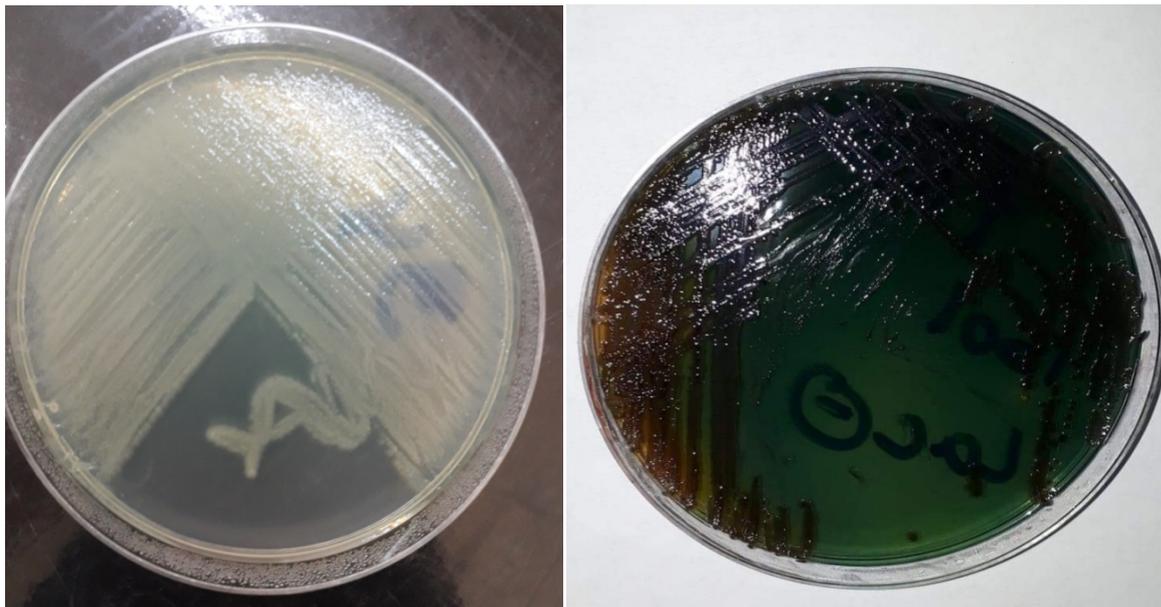


Figure 8. Les taux de cultures positives, négatives et contaminées.

### 2.2. Résultats de l'étude morphologique

L'examen macroscopique des cultures a montré des colonies larges, lisses, bombées au centre, à bord irrégulier présentant des reflets métalliques (Denis, 2011), d'une pigmentation verte sur gélose nutritive et sur Hektoen, la couleur du milieu ne change pas (non fermentaire). Elles dégagent une odeur caractéristique de *Seringa*. Celles-ci ont fait l'objet d'une coloration de Gram (Figure 9).



Gélose nutritive

Hektoen

**Figure 9.** Aspect des cultures de *P. aeruginosa* sur les milieux d'isolement

L'examen microscopique après coloration des colonies par la coloration différentielle de Gram a révélé les caractéristiques micromorphologiques de *Pseudomonas* pour certaines colonies, à savoir la présence des bacilles, colorés en rose, donc sont des bacilles à Gram négatif.

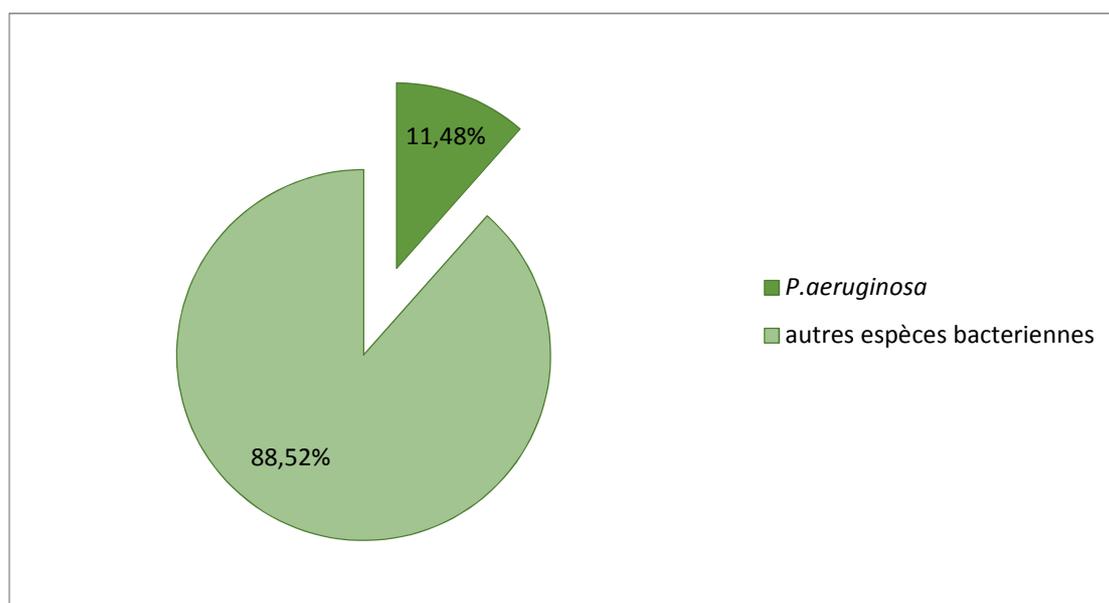
### 2.3. Résultats de l'étude biochimique

Les tests enzymatiques effectués sur les colonies bactériennes, identifiées d'une manière présomptive comme *Pseudomonas* (sur la base de la caractérisation morphologique et coloration de Gram), ont révélé une réaction positive à l'oxydase (**oxydase +**). L'ensemble des souches présentant ces caractéristiques, ont été identifiées par la galerie API 20 NE (Annexe 2). Après lecture, codification des résultats et leur interprétation par le logiciel **APIWeb™**, 7 souches ont été rattachées à *P. aeruginosa* dont leurs dénominations est

comme suit : S433, S78, S80, S94, S611, S97, S107 (le S pour Souche et les numéros après le S correspondent aux numéros des patients).

### 3. Taux de *P. aeruginosa* dans les prélèvements

Parmi les 61 bactéries isolées, 11,48 % (soit 7 souches) sont des *P. aeruginosa*, tandis que 88,52 % (soit 54 souches) appartiennent à d'autres espèces bactériennes (**Figure 10**).



**Figure10.** Le taux d'isolement de *P. aeruginosa* par rapport à d'autres espèces bactériennes.

#### 3.1. Répartition des souches de *P.aeruginosa* selon la nature des prélèvements

Les souches de *P. aeruginosa* ont été essentiellement isolées du pus (5/7) et les 2 autres des urines. On note qu'aucune souche n'a été isolée d'hémoculture (**Tableau IX**).

**Tableau IX.** Répartition des souches de *P. aeruginosa* selon la nature des prélèvements.

Nature des prélèvements	Nombre des souches de <i>P.aeruginosa</i>
Urine	2
Pus	5

#### 3.2. Répartition des souches de *P. aeruginosa* selon les services

Nous avons isolés 3 souches chez les patients externes et 4 souches chez les patients hospitalisés qui proviennent du service des maladies infectieuses (**Tableau X**).

Tableau X. Répartition des souches de *P. aeruginosa* par service

Origine des prélèvements	Le nombre de souches de <i>P. aeruginosa</i>
Maladies infectieuses	4
Externe	3
Total	7

#### 4. Profil de résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques

##### 4.1. Résultat de l'antibiogramme

Les souches de *P. aeruginosa* ont été testées vis-à-vis de 10 molécules d'antibiotiques appartenant à 4 familles différentes (figure11).

Selon les résultats des antibiogrammes, les 7 souches de *P. aeruginosa* étudiées apparaissent sensibles à l'ensemble des antibiotiques testés (Tableau XI).

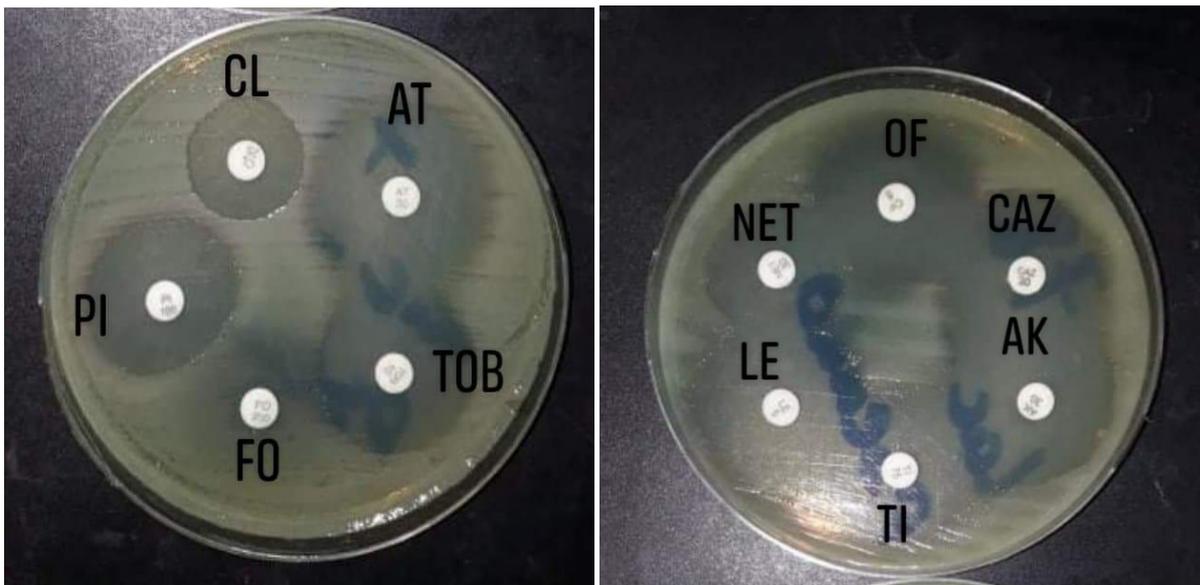


Figure11. Résultat du test de l'antibiogramme.

TI : Ticarcilline, Ak : Amikacine, PI : Pipéracilline, NET : Nételmicine, CAZ : Céftazidime, FO : Fosfomycine, CL : Colistine, LE : Lévofoxacine, TOB : Tobramycine et AT : Aztréonam.

**Tableau XI.** Profil de résistance des souches de *P. aeruginosa* aux antibiotiques testés.

Souches de <i>P. aeruginosa</i>	Les $\beta$ -lactamines				Les aminosides			Les fluoroquinolones		Les polypeptides
	TI	PI	AT	CAZ	AK	NET	TOB	LE	OF	CL
<b>S433</b>	I	NE	S	S	NE	S	S	I	NE	NE
<b>S78</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>S80</b>	S	S	S	S	NE	S	S	I	I	S
<b>S94</b>	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>S611</b>	S	S	NE	S	S	S	S	S	S	S
<b>S97</b>	S	S	NE	S	S	S	S	S	S	S
<b>S107</b>	I	I	S	S	NE	NE	S	S	I	S

**S:** Sensible, **I :** Intermédiaire, **NE :** Non effectué.

### 5. Évaluation du potentiel antagoniste des souches d'actinobactéries contre la souche de référence de *Pseudomonas aeruginosa*

Ces résultats sont trouvés par des chercheurs scientifiques qui ont réalisés leurs travaux au niveau de laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), ENS Kouba, les résultats de l'activité sont consignés dans le (**Tableau XII**).

**Tableau XII.** Activité antibactérienne de quelques souches d'actinobactéries contre la souche de *Pseudomonas aeruginosa*

Souche	Espèce	Méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IPA1 zone d'inhibition (mm)	References
AC104	<i>Actinomadura sp.</i>	Méthode des stries croisées	0	(Badji et al., 2006)
PAL54	<i>Saccharothrix sp.</i>		22	(Aouiche et al., 2012)
PAL111	<i>Streptomyces sp.</i>		3	(Aouiche et al., 2012)
SA198	<i>Saccharothrix sp.</i>		8	(Boubetra, 2013)
WAB9	<i>Streptomyces sp.</i>	Méthode des cylindres d'agar	29	(Yekkour et al., 2015)

Chaque valeur représente la moyenne de deux mesures, la distance de 1 à 8mm est faible, de 9 à 14 mm est moyenne, de 15 à 24 mm est forte, de 25 à 50 mm est très forte (Bouras, 2013), Les 5 souches d'actinobactéries cultivées sur le milieu ISP2 ont été testées contre une souche de *Pseudomonas aeruginosa* par la méthode des cylindres d'agar ou la méthode des stries croisées pour évaluer leur potentiel de production des antibactériens. Parmi les 5 souches d'actinobactéries, une souche n'a présenté aucune activité contrairement aux 4 autres.

L'activité antimicrobienne est obtenue chez deux souches de *Saccharothrix sp* (les souches PAL54 et SA198) et deux souches de *Streptomyces sp* (les souches WAB9 et PAL111), mais elle est absente chez la souche d'*Actinomadura sp* (la souche AC104). L'activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa* obtenue chez les 4 souches actives est généralement très forte pour la souche de *Streptomyces* (la souche WAB9), forte pour la souche de *Saccharothrix sp* (la souche PAL54) et faible pour les deux souches de *Streptomyces sp* (la souche PAL111) et de *Saccharothrix sp* (la souche SA198).

La souche *Streptomyces sp* (WAB9) a été hautement active avec un diamètre d'inhibition maximal de 29 mm observé contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* IPA1 (Résistante:

Carbenicilline, Erytromycine, Gentamycine, Néomycine, Spiramycine et Sulfonamide, Sensible: Chloramphenicol, Chlortétracycline, Kanamycine et Rifampicine) suivie de *Saccharothrix sp* (la souche PAL54) avec une zone d'inhibition qui atteint 22 mm contre la même souche *Pseudomonas aeruginosa* IPA1.

### Discussion

*Pseudomonas aeruginosa* est l'une des principales causes des infections nosocomiales chez les patients hospitalisés. Cette bactérie peut simplement développer une résistance à tous les antimicrobiens *anti-Pseudomonas* conventionnels grâce à des mécanismes de résistance intrinsèque et acquis uniques. Cette bactérie présente généralement de multiples isolats résistants, qui représentent une menace sérieuse pour la santé publique en raison de leur traitement limité et conduit à la morbidité et la mortalité (Nasser et al., 2020). La fréquence d'isolement ainsi que les taux de résistance aux antibiotiques diffèrent selon l'origine et le type du prélèvement (Sefraoui, 2015).

Au cours de notre étude, nous avons analysé 345 prélèvements, dont 17,68% se sont révélés positifs. Parmi les 61 prélèvements positifs, nous avons isolé 7 souches de *P. aeruginosa*, ce qui correspond à une fréquence de 11,48 %. Un taux relativement similaire a été trouvé par Rebeiro et al., (2019) (14.5%). Cependant, des prévalences largement supérieures à nos résultats ont été signalées par Gamal (2007) (18.2%), Zohoun et al., (2013) (54,3%) et Bourafa et al., (2018) (42.8%).

Les souches de *P. aeruginosa* proviennent principalement du service de maladies infectieuses (4/7), le nombre restreint des souches ne nous permet pas de déduire si l'infection est d'origine nosocomiale ou pas.

Le pus était la principale source de cette bactérie à 5/7 prélèvements. Nos résultats concordent avec les résultats obtenus par Ben abdallah et al., (2008) avec 724/1113 souches isolées du pus et cela est expliqué par le fait que *P. aeruginosa* est un germe nosocomiale responsable surtout de surinfection des plaies chirurgicales chez des patients qui sont fragilisés par l'acte chirurgical invasif, l'antibiothérapie ainsi que l'immunosuppression. Cependant, dans l'étude menée par Kamga et al., (2015), le pus était la 3<sup>ème</sup> source de *P. aeruginosa* à 6/34.

Les urines sont la seconde source de *P. aeruginosa*. Nos résultats corroborent avec ceux de l'étude menée par Rio et al., (2002) qui a révélé la présence de 28/105 souches de *P. aeruginosa* dans les urines contrairement à l'étude menée par Nyaledome (2016) qui a révélé la présence de 131/730 souches de *P. aeruginosa* dans les urines (3<sup>ème</sup> position après le pus et les prélèvements broncho-alvéolaire). Les infections urinaires causées par *P. aeruginosa*

sont généralement acquises à l'hôpital et liées à un cathétérisme des voies urinaires, de l'instrumentation ou de la chirurgie (**El meskini, 2011**).

Nous signalons qu'aucune souche de *P. aeruginosa* n'a été isolée d'hémoculture contrairement aux deux études menées par **Rio et al., (2002)** et **Ben abdallah et al., (2008)** qui notent la présence de *P. aeruginosa* au nombre de 20 /105 et 68/1368 souches respectivement. L'absence de *P. aeruginosa* dans l'hémoculture est probablement due au nombre très faible de prélèvements analysés (9 prélèvements uniquement).

Le profil de résistance aux antibiotiques des souches de *P.aeruginosa* isolées a été déterminé par la technique de l'antibiogramme vis-à-vis de 10 antibiotiques.

Les résultats obtenus montrent que les 7 souches étudiées ont une sensibilité à la grande majorité des antibiotiques testées; la totalité des souches se sont avérées sensibles aux: Céftazidime, Aztréonam, Amikacine, Nétilimicine, Tobramycine et la colistine. Cependant, certaines souches présentent une résistance de niveau intermédiaire aux : Ticarcilline (3/7), Pipéracilline (1/6), Lévofoxacine (2/7) et l'Ofloxacine (2/6).

Nos résultats sont en dis-concordance avec ceux trouvés par **Rebeiro et al., (2019)** dont 366/920 souches étaient résistantes au céftazidime, 377/924 souches à l'aztréonam, 263/925 à l'amikacine, 34/53 souches à la tobramycine et la totalité au lévofoxacine.

Dans l'étude menée par **El Ouadnassi et Boughalem (2009)**, des taux de sensibilité faibles ont été trouvés pour : Netlimicine (28/44), lévofoxacine (24/44). Cependant, nos résultats se rapprochent de ceux trouvés pour la ticarcilline (24/44), la céftazidime (35/44), la tobramycine (37/44) et l'amikacine (35/44).

Aucune souche n'a été résistante à la colistine, de même que dans les études de **Sefraoui (2015)**, **Mesli (2012)**, **Rabhi (2010)**.

La résistance de bas niveau aux fluoroquinolones ainsi la diminution de sensibilité, voire la résistance aux autres familles d'antibiotiques ( $\beta$ -lactamines sauf imipénème, les aminosides) peut être due à la surproduction des pompes d'efflux. Quatre principaux systèmes impliqués sont MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ et MexEF-OprN, des mutations dans les gènes régulateurs contrôlant leur expression sont responsables de la diminution de la sensibilité de *P. aeruginosa* aux substrats de ces systèmes d'efflux. Dans une étude menée par **Hoquet et al., (2005)**, ils ont montré que la dérégulation des pompes d'efflux MexAB-OprM et MexXY-OprM conduit à une augmentation de la résistance (de deux à quatre fois) aux

fluoroquinolones testées. Dans une autre étude menée par **Cavallo et al., (2002)**, ils rapportent la surproduction d'OprM chez 77 % des souches résistantes à la ticarcilline non productrices de  $\beta$ -lactamase. La surexpression de ce système d'efflux actif représentait le mécanisme prédominant de résistance aux  $\beta$ -lactamines sauf l'imipénème, de même que **Drissi et al., (2008)**, lors de leur étude sur les mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez *P.aeruginosa* ont trouvé que la surproduction du système d'efflux actif *MexAB-OprM* était fréquente chez les souches analysées. Cela illustre l'importance de la résistance par efflux chez les souches cliniques de *P.aeruginosa*. Le phénotype des souches surexprimant le système d'efflux *MexAB-OprM* est caractéristique: la ticarcilline et l'aztréonam sont presque toujours classés intermédiaires, tandis que les uréidopénicillines moins touchés, restent le plus souvent classés sensibles ainsi que la ceftazidime (**Péchère et Kohier, 1999; Plésiat et al., 1998**). De plus, les souches de *P. aeruginosa* avec des mutations dans le gène *nfxB* qui code pour un régulateur transcriptionnel, ont surexprimé *MexCD – OprJ* et sont moins sensibles aux fluoroquinolones et aux pénèmes (**Pang et al., 2019**). Les mutants surproducteurs de ce système sont relativement rares dans le contexte clinique (**Hocquet et al., 2007**).

les mutations de cibles sont aussi fréquentes, particulièrement dans l'ADN gyrase et la topoisomérases IV chez *P.aeruginosa* (**Pagès et al., 2011**), elles sont responsables de résistance aux fluoroquinolones.

D'autre part la résistance aux pipéracilline et ticarcilline peut être enzymatique due à la surproduction de céphalosporinases. **Bonno et Szasbo (2006)** ont mentionné que les mutants dérégulés de manière stable qui hyperproduisent l'AmpC, peuvent conduire à une résistance à la ticarcilline, à la pipéracilline. Ou due à l'acquisition de  $\beta$ -lactamases :

- Les pénicillinases de type PSE (CARB) confèrent une résistance aux carboxypénicillines et aux uréidopénicillines, mais pas à la ceftazidime et carbapénèmes. Quatre enzymes PSE ont été rapportées chez *P. aeruginosa*: PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 et CARB-4 (**Barbier et Wolff, 2010; Sefraoui, 2015**).

- Pénicillinase de type (TEM), l'enzyme TEM-110 a été rapporté à l'hôpital d'Oran (**Sefraoui, 2015**) et comme épidémique entre 2005 et 2007 à l'hôpital de Tlemcen (**Drissi et al., 2008**).

- BLSE de type OXA (ES-OXA), l'enzyme OXA-10 a été rapporté dans le nord ouest algérien (**Drissi et al., 2008**).

- MBL de type VIM et IMP ; MBL VIM-2 a été rapporté à l'hôpital d'Oran et au nord - est algérien, où on a décrit la première diffusion de souches de *P. aeruginosa* productrices de

MBL VIM-2 dans 14 isolats cliniques au niveau de Annaba (**Sefraoui, 2015; Touati et al., 2013**).

-BLSE de type PER, VEB confèrent aussi à *P. aeruginosa* une résistance à la pipéracilline et la ticarcilline (**Le Guern, 2019**).

En effet, la prévalence des phénotypes de résistance observée au sein d'un service constitue le plus souvent un reflet fidèle des habitudes de prescription (**Bertrand et al., 2003**).

La résistance des bactéries aux antibiotiques est un phénomène qui prend de plus en plus de l'ampleur et engendre des impasses thérapeutiques. Face à ce problème, la recherche de nouveaux antibiotiques s'impose et les actinobactéries constituent une source intéressante de ces molécules.

Les résultats d'activité antibactérienne obtenus par certains chercheurs du LBSM, ont montré que cette activité diffère d'une bactérie actinomycétale à l'autre, L'activité antimicrobienne des souches d'actinobactéries vis-à-vis la souche *Pseudomonas aeruginosa* IPA1 a été évaluée par la méthode des cylindres d'agar de la part d'une équipe de recherche, **Yekkour et al., (2015)** ont trouvés que l'activité antimicrobienne de la souche WAB9 vis-à-vis la même souche de *Pseudomonas aeruginosa* IPA1 était très forte et cela veut dire que la souche *Pseudomonas aeruginosa* IPA1 est sensible a l'ensembles des antimicrobiens synthétisés par cette souche d'actinobactérie.

L'activité inhibitrice des souches d'actinobactéries contre la souche de *Pseudomonas aeruginosa* a été mesurée par la technique des stries croisées de la part de trois équipes de recherches : **Badji et al., 2006 et Boubetra et al., 2013 et Aouiche et al., (2012)**. Les résultats de **Boubetra et al., (2013)** révèlent que l'activité antimicrobienne de la souche SA198 vis-à-vis la souche *Pseudomonas aeruginosa* IPA1 est faible en parallèle **Aouiche et al., (2012)** ont trouvé que l'activité antimicrobienne de la souche PAL111 était aussi faible contre la souche de *Pseudomonas aeruginosa* IPA1, tandis que l'activité antimicrobienne de la souche PAL54 était forte, par contre **Badji et al., (2006)** ont montrés aucune activité de la souche AC104 contre la souche de *Pseudomonas aeruginosa* IPA1.

Cela est dû probablement à la composition des parois des souches de *P. aeruginosa* du fait qu'elles soient de Gram négatif qui signifie qu'elle est de nature polysaccharidique donc moins perméable aux agents antimicrobiens.

En effet la résistance bactérienne vis-à-vis des antibiotiques d'actinobactéries peut être attribuée à l'inactivation enzymatique de l'antibiotique ou à la perméabilité membranaire des bactéries (**Harir, 2018**).

L'usage intensif a conduit, surtout en milieu hospitalier à une sélection fréquente de souche de *Pseudomonas aeruginosa*, résistante à la majorité des antibiotiques (**Véron, 1990**).

## Conclusion et perspectives

La résistance aux antibiotiques est devenue une préoccupation mondiale et constitue un problème majeur de santé publique. En effet, nous assistons à une importante augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif.

Depuis l'émergence de *Pseudomonas aeruginosa* autant que pathogène opportuniste majeur, de nombreuses épidémies hospitalières ont été décrites.

Notre travail nous a permis d'isoler sept souches de *Pseudomonas aeruginosa* à partir de divers prélèvements pathologiques au niveau de l'EPH de Boufarik. Cette espèce est isolée avec une fréquence relativement faible. La majorité des souches proviennent des prélèvements de pus des patients hospitalisés dans le service des maladies infectieuses.

L'évaluation de l'antibiorésistance des souches isolées aux antibiotiques recommandés pour le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa* a révélé l'efficacité de la majorité des molécules testées. Nous notons une résistance modérée aux deux  $\beta$ -lactamines (Pipéracilline et Ticarcilline) et deux fluoroquinolone (Lévofloxacine et Ofloxacine) testés sur toutes les souches isolées. Cependant, l'ensemble des antibiotiques sont actifs.

Les résultats de l'étude de pouvoir antagoniste d'une collection d'actinobactéries contre une souche de *Pseudomonas aeruginosa* ont montré la capacité de certaines souches appartenant aux genres *Saccharothrix* et *Streptomyces* de sécréter des molécules bioactives contre *Pseudomonas aeruginosa*. Cette activité est plus étendue pour les antibactériens produits par la souche WAB9 de *Streptomyces*.

Néanmoins cette étude n'est pas exhaustive, vu le nombre limité d'échantillons, ainsi que les méthodes d'analyses requises pour ce genre d'étude. Aussi, d'autres tests et techniques seront nécessaires :

- Les tests complémentaires (test de synergie pour la recherche de BLSE, test à la Cloxacilline pour la recherche d'une céphalosporinase et test de Hodge modifié pour la recherche des carbapénémases).
- Les techniques de typage moléculaires afin de détecter des cas épidémiques de souches de *Pseudomonas aeruginosa* résistantes aux antibiotiques.
- Les tests d'antagonisme entre les souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées et les souches d'actinobactéries.
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'antibiotique secrété par la souche la plus active puis une extraction et purification et évaluer sa toxicité vis-à-

vis des cellules animales afin de mieux évaluer son intérêt dans le domaine médical et vétérinaire.

## Références bibliographiques

- **Aissa, K. (2012).** Profil de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques aux services de réanimation à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de rabat entre 2006 et 2010. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- Rabat.
- **Amezian K., Rossello J., Castella A., Sekkat S., Terzaki S., Dhidah L. et al. (2010).** Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region. *East Mediterr Health J* , 16: 1070-1078.
- **Aouiche A.(2013).** Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de *Streptomyces* et de *Saccharothrix* des sols de Ghardaia actives contre les microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'homme. Thèse de doctorat. L'Ecole Normale Supérieure de Kouba –Alger.
- **Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Bijani C., Mathieu F., Lebrihi A. (2012).** *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol-producing strain isolated from a Saharan soil. *World J Microbiol Biotechnol* 28:943–951.
- **Aouiche A., Sabaou N., Meklat, A., Zitouni A., Mathieu F & Lebrihi A. (2012).** Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. *Journal de Mycologie Médicale*. **22**: 42–51.
- **Badji B., Zitouni, A., Mathieu F., Lebrihi A., Saboua N. (2006).** Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.*, 52: 373-382.
- **Balouki M., (2017).** les bactéries multirésistantes évolution dans le temps et dans l'espace. Thèse de doctorat en médecine. Université Mohammed V- RABAT.
- **Barbier F. et Wolff M., (2010)** . Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* Vers l'impasse thérapeutique ?. *Medecine /science* ,26 :960-968.
- **Barka E., Vasta P., Sanchez I., Gaveau –Vaillant N., Jacquard C., Meier-Kolthoff JP., Klenk HP., Clément C., Ouhdouch Y., Van Wezel GP. (2015).** Taxonomy, physiology and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev*; 80(1):1-43.
- **Bastide A., de Méo M., Andriantsoa M., Laget M. et Duménil G. (1986).** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen Journal*. vol. **2**. Pp : 453-466.

- **Ben Abdellah H., Noomen S., Ben Elhadj Khélifa A., Sahnoun O., Elargoubi A., Mastouri M.(2008).** Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la région de Monastir. *Médecine et maladie infectieuses* ,38: 554-55.
- **Ben Haj Khalifa A., Moissen et D., Vu Thien H., Khedher M. (2011).** Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. *Ann Biol Clin* ,69 (4) : 393-403.
- **Benveniste R., & Davies J. (1973).** Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetessimilar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria, *Proceedings of the National Academy of Science* 70 (8), 2276-2280.
- **Bertrand, X., Blasco, G., Belle, E., Boillot, A., Capellier, G., and Talon, D. (2003)** .*Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units: importance of cross-transmission. *Ann Fr Anesth Reanim* 22: 505-9.
- **Bertrand X .,Slekovec C.,Cholley P.,Talon D.(2011).** Épidémiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. *RFL*,45(435) :35-40.
- **Bonomo R.A. ,Szabo D.,(2006)..** Mécanismes de la résistance aux médicaments multiples chez les espèces *Acinetobacter* et *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases* ; 43(2) :49-56.
- **Borders D-B. (2007).** Antibiotics Survey. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*,1-16.
- **Botzenhart K., Döring G. (1993)**Ecology and Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *In: Campa M., Bendinelli M., Friedman H. (eds) Pseudomonas aeruginosa as an Opportunistic Pathogen. Infectious Agents and Pathogenesis.* Springer, Boston, MA.
- **Boubetra, D., Sabaou, N., Zitouni, A., Bijani, C., Lebrihi, A & Mathieu, F. (2013).**Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiological research*. **168**: 223–230.
- **Boughachiche F.,Reghioua S.,Oulmi L., Zerzer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A.,(2005).** Isolements d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha de Ain Mlila,23 :5-10.
- **Bourafa N., Chaalal W.,Bakour S.,Lalaoui R. , Boutefnouchet N., Diene S.-M. , Rolain J.-M.(2018).** Molecular characterization of carbapenem-resistant Gram-

negative bacilli clinical isolates in Algeria. *infection and Drugs resistance* ,11 :735-742.

- **Bouras N., Meklat A., Toumatia O., Mokrane S., Holtz D M., Strelkov E. Stephen.,Sabaou N. (2013).**Bioactive potential of a new strain of *streptomyces* sp. PP14 isolated from Canadian soil, *African Journal of Microbiology Research*, Vol 7 (25): P 3199-3208.
- **Bousquet A.,Mérens A.(2018).** « *Pseudomonas aeruginosa* » : résistance aux antibiotiques, lecture et interprétation de l'antibiogramme . *Biologie médicale* ;13(4) :1-12.
- **Bricha S., Ounine K., Oulkheir S., EL Haloui N.E. , Attarassi B.(2009).** Facteurs de virulence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa* .*Revue Tunisienne d'Infectiologie*, Vol.2 : 7 – 14.
- **Cabrolier N., Lafolie J., & Bertrand X. (2014).** Epidémiologie et facteurs de risques des infections liées à *Pseudomonas aeruginosa* . *Journal des Anti-infectieux* (2014) 16, 8-12.
- **Cady A. (2006).** Etude génétique de la résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse pour le diplôme d'État de Docteur en Pharmacie. Université de Nantes.
- **Cavallo J.D., Plesiat P., Couetdic G, Leblanc F.,(2002).** Mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study (1997). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(6) : 1039-1043.
- **Chaibdraa A., Medjellekh M.S., Saouli A. Et Bentakouk M.C. (2008).** Le *Pseudomonas*: Expérience du Centre des Brûles D'Annaba et Revue de la Littérature. *Ann Burns Fire Disasters* ;21(4): 210–218.
- **Cholley P.(2010).**Analyse génétique des souches multirésistantes de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'Est de France ,apport prédictif potentiel sur le risque infectieux.Thèse de doctorat.Université de Franche -Comte.Toulouse.
- **Chomton M. (2012).**Infections à *Pseudomonas aeruginosa* chez des enfants et adolescents atteints d'une tumeur solide : étude rétrospective de 11 ans à l'Institut Gustave Roussy . Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine . Université Paris Descartes.

- **Chopra, I. & Roberts, M. (2001).** Tetracycline antibiotics : mode of action, application, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance, *Microbiology and molecular biology reviews* 65 (2), 232-260 .
- **Cockenpot L. (2014).** Mécanismes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* en motilité de type swarming et sa fonction écologique. Mémoire en microbiologie appliquée, Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique, Armand-Frappier,10-93.
- **Delarras C. 2007.** *Pseudomonas* et ex-*Pseudomonas*. Dans : Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition médicales internationales, Paris : Technique Et Documentation Lavoisier, 1 : p339-340.
- **Denis F., Poly M.C., Martin C., Bingen E., Quentin R. (2011).** Bactériologie médicale. Techniques usuelles Eds. Elsevier Masson. Paris.
- **Denis F., Poly M.C., Martin C., Cottoir V., 2016.** Bactériologie médicale .Techniques usuelles .Elsevier Masson.Paris.
- **Depestel D., Benninger S., Danziger L., Laplante K., May C., Luskin, A., Pichichero M., & Hadley J. (2008).** Cephalosporin use in treatment of patients with penicillin allergies, *Journal of The American Pharmacists Association* 48 (4), 530-540.
- **Didier F.(2005).** Mécanismes de régulation impliqués dans la pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* : système de sécrétion de type III, épigénèse et quorum sensing. Thèse de doctorat. Université de Grenoble1.
- **Drissi M., Baba ahmed Z., Dahecq B., Bakour R., Plésiat P., Hocquet D.,(2008).** Antibiotic susceptibility and mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*: First report in Algeria. *Medecine et Maladies infectieuses*,38 :187-191.
- **El miskini K.(2011).** Etude épidémiologique des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université MOHAMMED V.Rabat.
- **El ouadnassi S., Boughalem M.(2009)** «L'infection à *Pseudomonas* en milieu de réanimation». Service de Réanimation. Hôpital Militaire Avicenne. Marrakech, Faculté de Médecine et de Pharmacie - Marrakech.
- **Essoh C .Y. (2013).** Étude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique. Thèse de Doctorat. Université Paris –Sud.

- **Faure K., Shimabukuro D., Ajayi T., Allmond L.R., Sawa T., and Wiener-Kronish J.P.(2003)** .O-Antigen Serotypes and Type III Secretory Toxins in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* . Journal of Clinical Microbiology ,41(5) : 2158–2160.
- **Felipe F.C., Luis M.M., Álvaro P.(2019)**. Évolution de la résistance aux antimicrobiens dans les isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* produisant des infections invasives dans le sud de l'Espagne .Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica,38(4) :150-154.
- **Filloux A., Vallet I. (2003)** .Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. Med. Sci , 19: 77-83.
- **Filopon, D. (2005)**.mécanismes de régulation impliqués dans la pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* : système de sécrétion de type III, Epigenèse et quorum sensing. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier – Grenoble I, France.
- **Fuentefria D.B., Ferreira A.E., Corção G.(2011)**. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water. Are they genetically related. J Environ Manage ;92:250-5.
- **Gallo G & Puglia A-M.(2013)**.Antibiotics:Targets,MechanismsandResistance.First Edition. Edited by Gualerzi C-O., Brandi L., Fabbretti A &Pon C-L,73-108.
- **Gad GF.,El-Domany RA., Zaki S., Ashour H M.(2007)** . Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental samples in Minia, Egypt: prevalence, antibiogram and resistance mechanisms. Journal of Antimicrobial Chemotherapy,60(5) :1010-1017.
- **Gebus C.(2008)**. Interactome des antigènes protecteurs V de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Yersinia pestis* : mécanisme d'assemblage et interaction avec l'aiguille de sécrétion de type II. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier de Grenoble I.
- **Genilloud, O.(2012)**. Genus *Micromonospora*, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 5, eds M.
- **Gessard C. (1984)**.Classics in infectiousdiseases. On the blue and green coloration thatappears on bandages. Rev. Infect. Dis. 6(Suppl. 3):S775–S776.

- **Goodfellow M., Nouioui I., Sanderson R., Xie F., & Bull A.(2014).** Rare taxa and darkmicrobialmatter : novel bioactive actinobacteria abound in Atacama Desert soils. *Antonie van Leeuwenhoek* 111 (8), 1315-1332.
- **Gottlieb, D. (1973).** General consideration and implication of the *Actinomycetales*. In: *Actinomycetales* characteristics and practical importance. Edited by Sykes. G and F. Skinner. AcademicPress. London, New York.
- **Gougeon A.(2017).** Bactériémies à *Pseudomonas aeruginosa* : analyse de 181 épisodes bactériémiques documentés dans deux établissements hospitaliers du Nord de la France . Thèse de doctorat. Université de Lille 2. Lille.
- **Harir M. (2018).** Caractérisation des molécules bioactives produits par des souches d'actinobactéries isolées des sols arides et semi arides d'AlgérieThèse de Doctorat enbiotechnologie, Université Ahmed ben Bella, Oran.221p.
- **Hocquet D., Roussel-Delvallez M., Cavallo J. D., and Plesiat P. (2007).** MexAB-OprM- and MexXYoverproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother* ,51, 1582-1583.
- **Jeffrey LS H. (2008).** Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok,Sarawak, *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (20): P3697-3702.
- **Jiang Y., Li Q., Chen X., Jiang C.,(2016).** Isolation and cultivation methods of actinobacteria , 10 :41-57.
- **Joffin, J. N. et Leyral, G. (2014).** *Microbiologie Technique (Dictionnaire des technique)*. Eds.Scérén.150p.
- **Kamga H .,Toukam M., Sando Z., Ngamba J-M., Mbako C-D., Adiogo D.(2015).** Caractérisation phénotypique des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans la ville de Yaoundé (Cameroun). *African Journal of Pathology and Microbiology*, 4 :1-4.
- **Khalilzadeh P.(2009).** Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat.Université Paul Sabatier .
- **Khebizi N. (2018).** Étude Taxonomique de trois souches de *Streptomyces* isolées des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques produits par *Sreptomyces*

sp. HG29. Thèse de doctorat en science biologiques, spécialité: Microbiologie. Ecole Normale Supérieure de kouba, Alger.

- **Kohanski M-A., Dwyer D-J & Collins J-J. (2010).** How antibiotic kill bacteria: from target to networks. *Nature reviews microbiology*, 8, 423-435.
- **Kohanski M-A., DWYER D-J., Hayete B., Lawrence C-A & Collins J-J. (2007).** A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 130(5), 797-810.
- **Larpent JP., Sanglier JJ. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Edition : Masson. Paris : 481p.
- **Le guern R. (2019)** .Résistance chez les bacille Gram négatif non fermentants. Université de Lille.
- **Li XZ., Plesiat P., and Nikaido H. (2015).** The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2) :337–418.
- **Maffioli S-I. (2013).** Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance. First Edition. Edited by Gualerzi C-O., Brandi L., Fabbretti A & Pon C-L, 1-22.
- **Mann J. (2001).** Natural product as immunosuppressive agents. *Nat Prod Rep* 18, 417-430.
- **Mérens A., Jaut P., Bragues L., J., Cavallo J.D. (2013).** Infections à *Pseudomonas aeruginosa*. EMC-Maladies infectieuses, 12 :1166-8598.
- **Mesaros N, Nordman P, Plesiat, Rousset –Devallez M, VAN Eldere J., Glupczynski Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., Tulkens PM., Van Bambeke F. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* : résistance and therapeutic options at the turn of the new millenium. *Clin Microbiol Infect*, 13(6) :560-578.
- **Mesli E. (2010).** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* au niveau de CHU de Tlemcen. . Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
- **Minchella A., Molinari L., Alonso S., Bouziges N., Sotto A., Lavigne J.-P. (2010).** Évolution de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* dans un centre hospitalier universitaire entre 2002 et 2006. *Pathologie Biologie*, 58 (1) :1-6.

- **Montalegre R. (2016).** Evaluation du risque d'émergence de résistances de *Pseudomonas aeruginosa* à différents antibiotiques antipycocyaniques en réanimation .Thèse de doctorat. Université Paul Sébastien (Toulouse III).
- **Montalegre R.(2016).**Evaluation du risque d'émergence de résistances de *Pseudomonas aeruginosa* à différents antibiotique antipycocyaniques en réanimation. Thèse de doctorat.Université Toulouse II.
- **Morand A., Morand J.-J.(2017).***Pseudomonas aeruginosa* en dermatologie. Annales de dermatologie et de vénéréologie ;114 (11) :666-675.
- **Nasser M., Gayen S., Kharat A.-S.(2020).**Prevalence of  $\beta$ -lactamase and antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Arab region. Journal of Global Antimicrobial Resistance .22 :152-160.
- **Nilius A-M & Ma Z.(2002).**Ketolides:thefutureofthamacrolides.*Anti-infectives*,1- 7.
- **Nordmann P.(2010).** Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. MEDECINE/SCIENCES ,26 : 950-959.
- **Nyaledome. (2016).** *Pseudomona aeruginosa* : Epidimiologie et état actuel de résistance à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V .Thèse de doctorat .Université Mohammed V –Rabat.
- **Olivares E.(2017)** . Evaluation de l'impact des antibiotiques sur la Formation de biofilms par *P. aeruginosa* : place de l'Antibiofilmogramme .Thèse de doctorat.Université de Strasbourg .
- **Oskay M., Tamer A U et Azeri C. (2004).** Antibacterialactivity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. African Journal of Biotechnology. 3 (9), 441- 446.
- **Oulymata G. (2007).**Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Geam négatif.Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie . Université cheikh anta diop de dakar.
- **Pagès J-M., Monlezun L.,Broutin I.,Davin-Regli A.(2011).** Les mécanismes d'efflux et la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa* .Revue Francophone des Laboratoires,2011(435) :63-72.
- **Pang Z.,Raudonis R.,Glic BC.,Lin T-J.,Cheng Z.(2019).**Antibiotic resistane in *Pseudomonas aeruginosa* :Mecanisms and alternative therapeutic stratigies. Biotechnology advances,37(1) :177-192.
- **Patel J.J. et Brown E. M. (1969).** Interactions of azotobacter withrhizosphere and

root- surface microflora. *Plant and Soil*, 31 : 273–281.

- **Péchère JC. Et Kohier T. (1999).** Patterns and modes of betalactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 5: 15-8.
- **Peterson E.and Kaur P.(2018).**Antibiotic resistance machanisms in bacteria relationships between resistance determinantsof antibiotic producers environmental bacteria, and clinical pathogens.*Frontiers in Microbiology*,9(2928) :1-21.
- **Philippon A, Thabaut A, Nénot P.(1985).** *P. aeruginosa* et bêtalactamines. In l'Antibiogramme (Courvalin, P., Goldstein, F., Philippon, A., & Sirot, J., Eds), Paris: MPC-videom. p. 103–10.
- **Pitt T. L. (1998).** *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and related genera, p. 1109– 1138. In B. I. Duerden (ed.), *Microbiology and microbial infections*, vol. 2. Oxford University Press Inc., New York, NY.
- **Plésiat P., Ramos-Aires J., Péchère JC., Kohier T. (1998).** Systèmes d'efflux actifs chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Méd Mal Infect*. 28: 126-33.
- **Poole K.(2004).**Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol*.
- **Rabhi F. (2012).** Contribution à l'étude de la résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants aux antibiotiques : cas de la colistine en réanimation. Mémoire de master en microbiologie. Université d'Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
- **Reinert R-R. (2004).** Clinicalefficacy of ketolides in the treatment of respiratory tract infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53,918–927.
- **Ribeiro ACS., Crozatti MTL., Adilson A.S., Macedo RS.,Machado AMO .and Silva ATA.(2019).***Pseudomonas aeruginosa* in the ICU: prevalence, resistance profile, and antimicrobial consumption. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* ;53 . doi: 10.1590/0037-8682-0498-2018
- **Rio Y., Pina P., Jurin F., Allouch P.,Didion J., Chardon H., Chiche D.(2002).** Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques, isolés chez des malades de soins intensifs français en 1998.Phénotypes de résistance aux  $\beta$ -lactamines .Etude ESCRIME. *Pathol. Biol.*,50 :12-7.
- **Rius N & Demain AL. (1997).**Regulation of lysine aminotransferase by carbon source and lack of control by phosphate in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied microbiology and biotechnology* 48 (6), 735-737.

- **Ruiz L., Dominguez M.A., Ruiz N., et al. (2004).** Relationship between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting. *Arch Med Res* ; 35:251-257.
- **Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Moustefaoui, A., Zitouni, A., Lamari, L., Bennadji H., Lefévre G et Germain P. (1998).** Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. 9 (2), 147-153.
- **Saker R.; Bouras N.; Meklat A.; Zitouni A.; Schumann P.; Spröer C.; Sabaou N.; Klenk H.P. (2015).** *Prauserella isguenensis* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from desert soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65,1598–1603.
- **Sarkar S., Saha M., Roy D., Jaisankar P., Das S., Gauri Roy L., Gachhui R., Sen T., Mukherjee J. (2008).** - Enhanced production of antimicrobial compounds by threesalt-tolerant actinobacterial strains isolated from the sundarbans in a niche-mimic bioreactor. *Mar. Biotechnol.*, 10: 518-526.
- **Sefraoui I.(2015).** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse de Doctorat. Université Abou bekr Belkaid-Tlemcen.
- **Selvameenal L., Radhakrishnan M. & Balagurunathan R.(2009).** Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes ; biological activity, purification and chemical screening. *Indian Journal of Pharmaceutical Science* 71 (5), 499.
- **Servin J., Herbold C., Skophammer R., & Lake J. (2008).** Evidence excluding the root of the tree of life from the actinobacteria. *Molecular biology and evolution* 25 (1), 1-4.
- **Sevillano E., Valderrey C., Canduela M.J., Umaran A., Calgo F., Callego L. (2006).** Resistance to antibiotics in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathologie Biologie*. 2006 ; 54 : 493-497.
- **Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. (2012).** Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol.*, 7:373–390.
- **Shirling, B. et Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16: 3313-3340.
- **Siegmund K., Maheshwary S., Narayanan S., & Connors W.(2005).** Nucleic acid research 33 (15), 4838-4848.

- **Singh N & Rai V.(2012).**Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; *Streptomyces rimosus* MTCC 10792 from soil of Chhattisgarh. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 4: 94–101.
- **Supong, K., Suriyachadkun, C., Tanasupawat, S., Suwanborirux, K. Pittayakhajonwut, P., Kudo, T. &Thawai, C.(2013).** *Micromonospora sediminicola* sp.nov., isolated from marine sediment. *Int. J. Syst.Evol.Microbiol* 63, 570-575.
- **Talao KP., Talaro A. (2002).** Foundations in microbiology. Boston :McGraw-Hill, 890p.
- **Tijani N.(2019).**Infections à *Pseudomonas aeruginosa* en dermatologie.Thèse de Doctorat .Université de Mohammed V –Rabat.
- **Touati M., Diene S.M.,Dekhil M.,Djahoudi A.,Racherache A.,Rolain J-M.(2013).** Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria, *Antimicrob Agents Chemother.*57(5):2426-7.
- **Venier A.G.(2011).** *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation : épidémiologie et facteurs de risque d’acquisition. Thèse de doctorat .Université Bordeaux 2.
- **Véron M. (1990).** *Pseudomonaceae*. In : Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. Medecine- Sciences. Flammarion. France. Ch 22: 555- 587.
- **Villavicencio R. T. (1998).** The history of blue pus. *J. Am. Coll. Surg.* 187: 212–216.Frenay J, Renaud F, Leclercq R, Riegel P, Collectif. Précis de bactériologie clinique. 2e édition. Paris: Editions Eska; 2007.
- **Wue M. and Li X.(2015).***Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*.*Molecular Medical Microbiology*,3 :1547-1564.
- **Xiao X., Wolfe S., &Demain AL. (1991).** Purification and characterization of cephalosporin 7-hydroxylase from *Streptomyce clavuligerus*, *Biochemical Journal* 280 (2), 471-474.
- **Xue Y., Zhao L., Lui H., & Sherman D.(1998).** Pceeding of the National Academy of Science, 95 (21) :12111-12116.
- **Yala D., Merad, A-S.,Mohamedi, D et Ouarkorich, M-N. (2001).** Resistance bactérienne aux antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, (91), 13-14.
- **Yekkour, A., Meklat, A., Bijani, C., Toumatia, O., Errakhi, R., Lebrihi, A., Mathieu, F., Zitouni, A., Sabaou, N. (2015).** A novel hydroxamicacid-containing

antibiotic produced by a Saharan soil-living *Streptomyces* strain. *Applied Microbiology*, 60: 589—596.

- **Zeba B. (2005).** Overview of b-lactamase incidence on bacterial drug resistance. *African Journal of Biotechnology*, 4 (13), 1559-1562.
- **Zohoun AGC., Moked D., El hamzaoui S.(2013).** Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to imipenem by production metallo- $\beta$ -lactamases in Rabat military teaching hospital Mohammed V. *Ann. Biol.clin*,71(1) :27-30.

## Annexes

### Annexe1. Matériels non biologique



**Figure 1.** Jarre à bougie



**Figure 2.** Microscope optique



**Figure 3.** Poste de sécurité microbiologique classe II



**Figure 4.** Incubateur à 37°C



**Figure 5.** Autoclave



**Figure 6. Bact/Alert**

**Tableau I.** Matériels non biologique

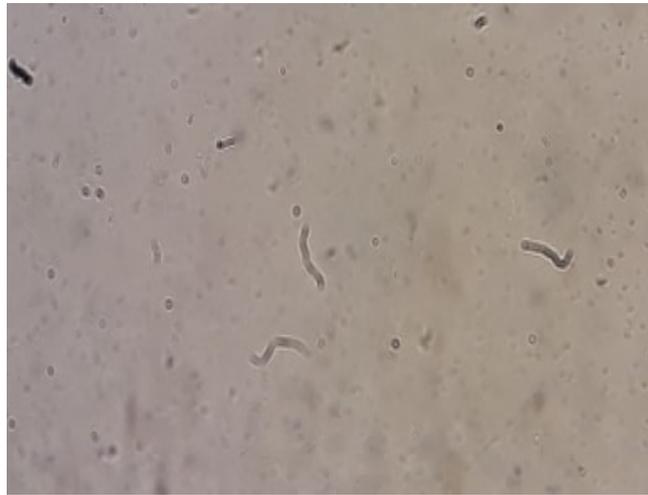
Appareillages	Outils de laboratoire	Réactifs et autres produits
-Hotte bacteriologique -Etuve d'incubation -Microscope optique -Un réfrigérateur à +4°C -Densitomètre -Bain Marie -Vortex -Ordinateur muni d'API Web -Bact'Alert -PSM classe II	-boites Petri -pipettes Pasteur -Poire -pince -Oese -lames et lamelles -Bec Benzen -seringues stériles -tubes stériles -Tubes secs -Jarre à bougie -gase -Pied à coulisse	Réactifs : - Nitrate reductase 1(NR1) - Nitrate reductase 2 (NR2) - Zinc (Lot 1006588400) Biomerieux - Réactifs de James  Autres produits : -Huile de vaseline -Huile à immersion -Eau physiologique -Disques d'antibiotiques -Disques d'oxydase -Alcool à 70% -BGT (bouillon glucosé temponné) Colorants : -Violet de gentiane -Fuchsine -Lugol

**Tableau II.** Milieux de culture

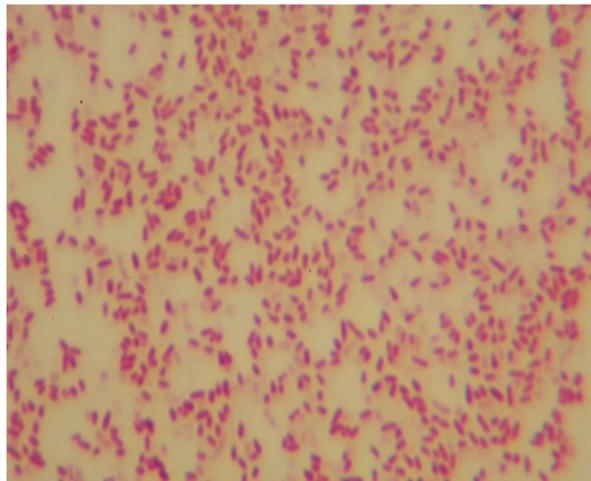
Gélose Nutritive	Extrait de viande de bœuf.....3g Extrait de levure.....3g Peptone.....10g Chlorure de sodium.....5g Agar.....18g <b>pH : 7,2-7,4</b>
Gélose Hektoen	Peptonepepsique de viande.....15g Extrait de levure.....3g Extrait de viande.....3g Lactose.....12g

	Saccharose.....12g Salicine.....2g Sels biliaires.....4g Fuchsine acide.....0,1g Bleu de bromothymol.....0,065g Agar.....18g <b>pH : 7.3</b>
Gélose Muller-Hinton	Extrait de viande.....3g Hydrolysate de caséine.....17,5g Amidon.....1,5g Agar .....16g <b>pH : 7.3</b>
Gélose ISP2	<b>Milieu ISP2 :</b> Extrait de levure.....4g Extrait de malt.....4g Glucose.....4g Agar.....12g Eau distillée.....1000 ml <b>pH : 7.2</b>
Gélose au sang cuit	Poly-peptone.....15g Amidon .....1g Phosphate dipotasique.....4g Chlorure de sodium.....1g Hémoglobine.....10g Agar.....10g <b>pH:7.2</b>

**Annexe 2.** Résultats de la lecture de différentes techniques microbiologiques utilisées



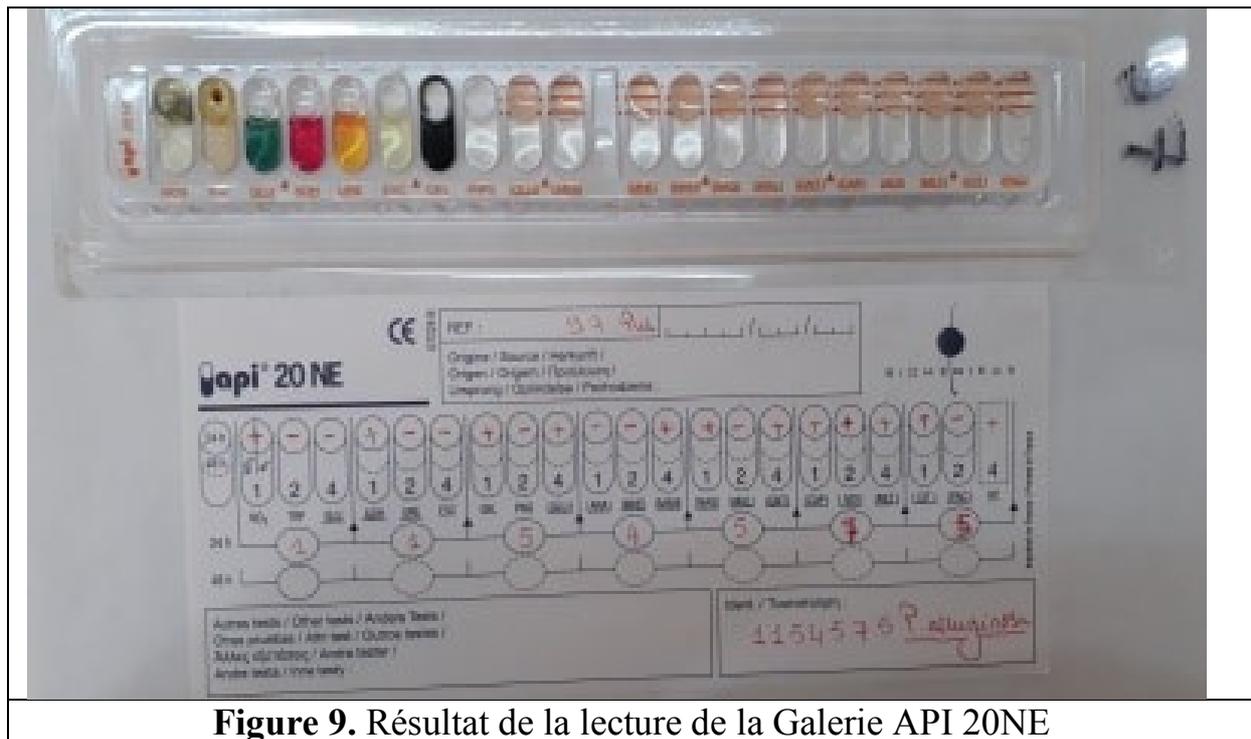
**Figure 6.** Résultat de l'examen microscopique



**Figure 7.** Résultat de la coloration de Gram



**Figure 8.** Résultat de la lecture du test de l'oxydase



**Figure 9.** Résultat de la lecture de la Galerie API 20NE

## Annexe 4. Tables de lecture

**Tableau III.** Table de lecture de Galerie API 20 NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTAS	
				NEGATIF	POSITIF
NO <sub>3</sub>	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min incolore   rose-rouge	
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min Rose   Incolore	
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptophane)	JAMES / immédiat incolorevert pâle / jaune   Rose	
<u>GLU</u>	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	Jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	Jaune	orange / rose / rouge
<u>URE</u>	Urée	0,76	UREase	Jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	Jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incolore	Jaune
GLU	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	Transparence	Trouble
ARA	L-arabinose	1,4	assimilation (ARAbinose)	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	Transparence	Trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	Transparence	Trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	Transparence	Trouble
CAP	acidecaprique	0,78	assimilation (acideCAPrique)	Transparence	Trouble
ADI	acideadipique	1,12	assimilation (acideADIpique)	Transparence	Trouble
MLT	acidemalique	1,56	assimilation (MaLaTe)	Transparence	Trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodiumCITrate)	Transparence	Trouble
PAC	acidephénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	Transparence	Trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

**Tableau IV.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Pseudomonas aeruginosa*

Antibiotiques testés	Abréviation	Charge des disques (µg)	Diamètres critiques (mm)		
			R	I	S
<b>Ticarcilline</b>	<b>TI</b>	<b>75</b>	<b>≤15</b>	<b>16-23</b>	<b>≥24</b>
<b>Ticarcilline + acideclavulanique</b>	<b>TCC</b>	<b>75</b>	<b>≤15</b>	<b>16-23</b>	<b>≥24</b>
<b>Pipéracilline</b>	<b>PI</b>	<b>100</b>	<b>≤14</b>	<b>15-20</b>	<b>≥21</b>
<b>Céftazidime</b>	<b>CAZ</b>	<b>30</b>	<b>≤14</b>	<b>15-17</b>	<b>≥18</b>
<b>Aztréonam</b>	<b>AT</b>	<b>30</b>	<b>≤15</b>	<b>16-21</b>	<b>≥22</b>
<b>Imipenème</b>	<b>IMP</b>	<b>10</b>	<b>≤15</b>	<b>16-18</b>	<b>≥19</b>
<b>Amikacine</b>	<b>AK</b>	<b>30</b>	<b>≤14</b>	<b>15-16</b>	<b>≥17</b>
<b>Gentamicine</b>	<b>AK</b>	<b>10</b>	<b>≤12</b>	<b>13-14</b>	<b>≥15</b>
<b>Nétilmicine</b>	<b>NET</b>	<b>30</b>	<b>≤12</b>	<b>13-14</b>	<b>≥15</b>
<b>Tobramycine</b>	<b>TOB</b>	<b>10</b>	<b>≤12</b>	<b>13-14</b>	<b>≥15</b>
<b>Ciprofloxacine</b>	<b>CIP</b>	<b>5</b>	<b>≤15</b>	<b>16-20</b>	<b>≥21</b>
<b>Lévofloxacine</b>	<b>LE</b>	<b>5</b>	<b>≤13</b>	<b>14-16</b>	<b>≥17</b>
<b>Fosfomycine</b>	<b>FO</b>	<b>...</b>	<b>...</b>	<b>...</b>	<b>...</b>
<b>Colistine</b>	<b>CL</b>	<b>10</b>	<b>≤10</b>	<b>...</b>	<b>≥11</b>

Tableau extrait du Document M100 – S24. Vol. 34, n°1. **2014**. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; twenty-four informational supplement ,

Extrait des recommandations2014 du comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie.