



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Aboubekr Belkaïd – Tlemcen
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et
de l'Univers**
Département de Biologie

Thèse

**En vue de l'obtention du diplôme de
Doctorat en Sciences**

Option : Microbiologie

Présentée par :

Mlle Bouchloukh Warda

***Etude in vitro et in vivo de la virulence
d'Acinetobacter baumannii***

Soutenue le :

Devant le Jury:

Présidente	Mokhtari Soulimane Nassima Amel	Professeur	Université de Tlemcen
Directrice de thèse	Boucherit-Otmani Zahia	Professeur	Université de Tlemcen
Co-directeur de thèse	Djeribi Ryad	Professeur	Université d'Annaba
Examineurs	Baba Ahmed-Kazi Tani Zahira Zakia	MCA	Université de Tlemcen
	Seddiki Sidi Mohammed Lahbib	MCA	C.U. de Naâma

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements

J'aimerais en premier lieu remercier **mon dieu Allah** le tout puissant et miséricordieux qui m'a donné la force, la volonté et le courage pour la réalisation de cette thèse.

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de **nombreuses personnes** que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je tiens à remercier très chaleureusement Madame **Zahia Boucherit-Otmani**, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université *Aboubekr Belkaid de Tlemcen*, qui m'a encadré tout au long de cette thèse et qui m'a fait partager ses brillantes intuitions. Qu'elle soit aussi remerciée pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'elle m'a prodigués.

Je voudrais également remercier grandement mon co-directeur de thèse, Monsieur **Ryad Djeribi**, Professeur à l'Université *Badji Mokhtar-Annaba*, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire. C'est grâce à lui que j'ai pu concilier avec bonheur recherche théorique et appliquée pendant cette thèse. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, il a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse.

Je remercie également Madame **Nassima Amel Mokhtari Soulimane**, Professeur et Doyenne de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université *Aboubekr Belkaid* de Tlemcen pour l'honneur qu'elle me fait d'être la présidente de mon jury de thèse.

J'exprime ma gratitude à Madame **Zakia Zahira Kazi Tani-Baba Ahmed**, maître de conférences classe A à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université *Aboubekr Belkaid* de Tlemcen, et Monsieur **sidi Mohamed Lahbib Seddiki**, maître de conférences classe A au Centre Universitaire *Salhi Ahmed* de Naâma, qui ont bien voulu examiné cette thèse.

Il m'est impossible d'oublier Madame **Fahima Klabet**, Docteur à l'Université des Frères Mentouri Constantine¹, pour son aide précieuse pour ma partie pratique et plus précisément la partie *in vivo*. Elle a toujours fait tout son possible pour m'aider.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à tous mes **collègues** pour leurs encouragements, leurs soutiens et pour l'ambiance agréable.

Enfin, je tiens à remercier toutes les **personnes** qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Dédicaces

Je dédie cette thèse à :

A mes parents. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mon cher père

Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin. Sois fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour sincère et ma gratitude profonde.

A ma chère mère

Ma douce et tendre mère. Quoique je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à toi. Que dieu te donne longue vie et te protège pour moi.

A mes chers frères et sœurs.

J'ai beaucoup apprécié l'estime et l'amour fraternel que vous me portez. Que Dieu vous Préserve.

A toute ma famille, et mes amies,

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis

Merci.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des photos

Liste des tableaux

Introduction 1

Première partie: Revue bibliographique 3

Chapitre I : *Acinetobacter baumannii* 3

1. Définition 3

2. Systématique 3

3. Habitat 5

4. Caractères bactériologiques..... 5

5. Diagnostic bactériologique..... 6

Chapitre II: Infections à *Acinetobacter baumannii* 8

1. Rôle d'*Acinetobacter baumannii* en clinique humaine 8

1.1. Infections communautaires..... 8

1.2. Infections hospitalières 8

2. Principales infections nosocomiales à *Acinetobacter baumannii* 8

2.1. Infections respiratoires 8

2.2. Bactériémies 9

2.3. Infections urinaires 9

2.4. Méningites 9

2.5. Infections cutanées 9

3. Epidémiologie 10

3.1. Réservoir..... 10

3.2. Persistance dans l'environnement hospitalier..... 10

3.3. Transmission..... 10

4. Traitement 10

5. Mécanismes de résistance 11

Chapitre III : Pathogénicité d'*Acinetobacter baumannii* 12

1. Présence de lipopolysaccharide12

2. Quorum-sensing12

3. Echange génétique12

4. Formation de biofilm12

5. *Outer Membrane Proteins*.....13

6. Mécanismes de réponse au stress	13
7. Hydrophobicité	13
8. Sidérophores	13
9. Activité enzymatique de certaines enzymes	13
Chapitre IV: Généralités sur les biofilms.....	14
1. Définition d'un biofilm	14
2. Etapes du développement d'un biofilm.....	14
2.1. Adhérence réversible	14
2.2. Adhérence irréversible	14
2.3. Développement précoce du biofilm	14
2.4. Maturation du biofilm	15
2.5. Détachement de bactéries.....	15
3. Régulation de la formation de biofilms.....	15
4. Les biofilms dans le domaine médical.....	16
4.1. Biofilms et implants médicaux	16
Chapitre V: Limitation en fer et virulence bactérienne	17
1. Transport du fer via des sidérophores.....	18
1.1. Transport à travers la membrane externe	18
1.2. Transport de fer à travers la membrane cytoplasmique	19
1.3. Dissociation du complexe fer-sidérophore.....	19
Deuxième partie : Matériel et méthodes	20
1. Souches bactériennes	20
2. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques	20
3. Etude de la virulence d' <i>A. baumannii in vitro</i>	21
3.1. Evaluation de l'adhérence et du potentiel des souches à former des biofilms	21
3.1.1. Technique en tubes	21
3.1.2. Technique sur microplaques	22
3.1.3. Quantification des cellules viables dans un biofilm bactérien	23
3.1.4. Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm à <i>A. baumannii</i>	23
3.2. Croissance dans des conditions limitées en fer	24
3.2.1. Croissance sur milieu M9.....	24
3.2.2. Croissance sur milieu LB	24
a. Croissance sur gélose LB	24
b. Croissance sur bouillon LB	24
3.3. Recherche de la gélatinase	25
3.4. Etude de la mobilité des souches	25
3.4.1. Recherche de la mobilité Twitching.....	25
3.4.2. Recherche de la mobilité Swarming.....	25
3.5. Test d'hémoagglutination.....	26

4. Etude <i>in vivo</i> de la virulence d' <i>A. baumannii</i>	26
4.1. Souches bactériennes	27
4.2. Culture bactérienne	27
4.3. Animaux	27
4.4. Induction d'une pyélonéphrite ascendante à <i>A. baumannii</i> chez la souris.....	27
4.5. Examen bactériologique	28
4.6. Examen histopathologique	28
5. Traitement statistique des résultats	28

Troisième partie : Résultats et discussion 29

1. Identification d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	29
2. Résultats de l'antibiogramme d' <i>A. baumannii</i>	29
3. Etude <i>in vitro</i> des facteurs de virulence.....	32
3.1. Evaluation de l'adhérence et du potentiel des souches à former des biofilms.....	32
3.1.1. Formation de biofilms sur tubes de polystyrène.....	32
3.1.2. Formation de biofilms sur microplaques 96 puits.....	34
3.1.3. Mesure de l'activité métabolique des cellules sessiles.....	37
3.1.4. Observation au microscope électronique à balayage de biofilm d' <i>A. baumannii</i>	40
3.2. Croissance d' <i>A. baumannii</i> dans des conditions limitées en fer	42
3.2.1. Croissance sur milieu M9.....	42
3.2.2. Croissance sur milieu LB	43
a. Croissance sur gélose LB	43
b. Croissance sur bouillon LB	45
3.3. Recherche de la gélatinase.....	47
3.4. Etude de la mobilité des souches	48
3.4.1. Mobilité de type Twitching	48
3.4.2. Mobilité de type Swarming	49
3.5. Test d'hémoagglutination.....	51
4. Etude <i>in vivo</i> de la virulence d' <i>A. baumannii</i>	53
4.1. Effet sur la croissance corporelle	53
4.2. Effet sur le poids des organes urinaires.....	53
4.3. Examen bactériologique des organes	55
4.4. Etude histopathologique	56
4.4.1. Etude histopathologique après infection par <i>A. baumannii</i>	56
a. Examen histopathologique des vessies	56
b. Examen histopathologique des reins	58
4.4.2. Etude histopathologique après infection par <i>P. mirabilis</i>	58
4.5. Discussion	62

Quatrième partie : Conclusion et perspectives 65

Cinquième partie : Références bibliographiques 67

Liste des abréviations

Acb	<i>Acinetobacter baumannii</i>
AI	Auto-inducteurs
AK	Amikacine
ANOVA	Analyse de la variance
ATB	Antibiotique
ATM	Aztréonam
BLSE	β -Lactamase à Spectre Elargi
C Acb	Complexe <i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>
CAV	Cathéter Veineux
CAZ	Ceftazidime
CLED	<i>Cystine Lactose Electrolyte Déficient</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CS	Colistine
CV	Cristal Violet
DIP	2, 2'-dipyridyl
DM	Dispositif Médical
DO	Densité Optique
EPS	Exopolysaccharides
FEP	Céfépime
H&E	Hématoxyline et l'Eosine
HA	Hémagglutination
IMI	Imipenème
IN	Infection Nosocomiale
ITU	Infection du Tractus Urinaire
LB	Luria Bertani
LP	Liquide Pleural
LPS	Lipopolysaccharide
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MH	Mueller Hinton

Omp A	<i>Outer membrane protein A</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OXA	Oxacillinase
P	Valeur de Probabilité
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PC	Poids Corporel moyen
PEF	Péfloxacine
PIR	Pipéracilline
PMN	Polymorphonucléaires
PR	Poids Relatif
Prm	<i>Proteus mirabilis</i>
PT	Poids des Tissus
QS	Quorum Sensing
R²	Coefficient de détermination
SE	Sonde Endotrachéale
SU	Sonde Urinaire
TIC	Ticarcilline
TSA	Trypticase Soja Agar
UFC	Unité Formant Colonie
XTT	2, 3-bis [2-methyloxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

Liste des figures

Figure N°1 : Microphotographie d' <i>A. baumannii</i> au microscope électronique à balayage	6
Figure N°2 : Etapes de formation d'un biofilm bactérien	15
Figure N°3 : Systèmes de transport de Fe ²⁺ et Fe ³⁺ chez les bactéries à Gram négatif	18
Figure N°4 : Quantification des biofilms formés par <i>A. baumannii</i> sur tubes en polystyrène (Différence significative: *P<0,05).	33
Figure N°5 : Quantification de la production de biofilms par <i>A. baumannii</i> sur microplaques (Différence significative: *P<0,05)	34
Figure N°6 : Courbe de corrélation entre la biomasse des biofilms formés sur microplaque et sur tube (R² : coefficient de détermination)	36
Figure N°7 : Croissance des cellules planctoniques d' <i>A. baumannii</i> sur bouillon LB (Différence significative: *P<0,05)	37
Figure N°8 : Activité métabolique des cellules sessiles d' <i>A. baumannii</i> mesurée après 2 heures d'incubation à 37°C (Différence significative: *P<0,05)	38
Figure N°9 : Activité métabolique des cellules sessiles d' <i>A. baumannii</i> mesurée après 24 heures d'incubation à 37°C (Différence significative: *P<0,05)... ..	38
Figure N°10 : Activité métabolique des souches testées au sein d'un biofilm après 2 et 24 heures d'incubation à l'abri de la lumière.	39
Figure N°11 : Courbe de corrélation entre la méthode de réduction du XTT et la méthode de quantification de la biomasse au cristal violet (R² : coefficient de détermination).	40
Figure N°12 : Effet de déficience en fer sur la croissance des souches d' <i>A. baumannii</i> (Différence significative: *P<0,05).	46
Figure N°13 : Pourcentages de réductions des biomasses des souches d' <i>A. baumannii</i> après culture sur bouillon LB contenant 200 et 300µM de DIP.	46
Figure N°14 : Dénombrement des bactéries chez les souris infectées par <i>A. baumannii</i> et <i>P. mirabilis</i>	56

Liste des photos

Photo N°1 : Aspects des tubes après coloration au cristal violet.....	33
Photo N°2 : Aspects des puits après coloration au cristal violet.....	34
Photo N°3 : Aspects des puits après action du XTT.....	39
Photo N°4 : Microphotographie d'un biofilm d' <i>A. baumannii</i> formé sur sonde urinaire (A et B : X100, C et D : X 1000, E et F : X 3000)	41
Photo N°5 : Croissance des souches d' <i>A. baumannii</i> sur gélose LB contenant un gradient de DIP (0–300µM).	44
Photo N°6 : Résultats du test de recherche d'une gélatinase.....	48
Photo N°7 : Croissance des souches d' <i>A. baumannii</i> et de <i>P. aeruginosa</i> sur bouillon LB additionné de 1% d'agar.	49
Photo N°8 : Croissance des souches d' <i>A. baumannii</i> et de <i>P. aeruginosa</i> sur bouillon LB additionné de 0,25% d'agar.....	50
Photo N°9 : Activité de l'hémagglutination chez les souches d' <i>A. baumannii</i> (A : Puits sans Mannose, TN : témoin négatif, puits contenant la suspension d'érythrocytes à 1%, B : Puits avec Mannose, TNM : témoin négatif, puits contenant la suspension composé de 1% d'érythrocytes et 1% D-Mannose).	52
Photo N°10 : Aspects des organes urinaires des souris (A : vessie infectée par <i>Acb</i> , B : rein infecté par <i>Acb</i> , C : vessie témoin, D : rein témoin).....	55
Photo N°11 : Coupes histologiques des vessies des souris infectées par <i>A. baumannii</i> . Coupes histologiques colorées à l'Hématoxyline-Eosine : Histologie vésicale d'une souris infectée ; (A) (H&E 4 X), (C) (H&E 10 X), (F) (H&E 40 X). Histologie vésicale d'une souris témoin ; (B) (H&E 4 X), (D) (H&E 10 X), (F) (H&E 40 X).	57
Photo N°12 : Coupes histologiques des reins des souris infectées par <i>A. baumannii</i> . Coupes histologiques colorées à l'Hématoxyline-Eosine : Histologie rénale d'une souris infectée ; (A) (H&E 4 X), (C) (H&E 10 X), (F) (H&E 40 X). Histologie rénale d'une souris témoin ; (B) (H&E 4 X), (D) (H&E 10 X), (F) (H&E 40 X). GN : Glomérule Normal	59
Photo N°13 : Coupes histologiques des vessies des souris infectées par <i>Proteus mirabilis</i> . Coupes histologiques colorées à l'Hématoxyline-Eosine : Histologie vésicale d'une souris infectée ; (A) (H&E 4 X), (C) (H&E 10 X), (F) (H&E 40 X). Histologie vésicale d'une souris témoin ; (B) (H&E 4 X), (D) (H&E 10 X), (F) (H&E 40 X).....	60

Photo N°14 : Coupes histologiques des reins des souris infectées par *Proteus mirabilis*. Coupes histologiques colorées à l'Hématoxyline-Eosine : Histologie rénale d'une souris infectée ; **(A)** (H&E 4 X), **(C)** (H&E 10 X), **(F)** (H&E 40 X). Histologie rénale d'une souris témoin ; **(B)** (H&E 4 X), **(D)** (H&E 10 X), **(E)** (H&E 40 X)**61**

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Espèces génomiques reconnues d' <i>Acinetobacter</i>	4
Tableau N°2 : Origine des souches utilisées dans cette étude	20
Tableau N°3 : Antibiotiques testés sur les souches d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	21
Tableau N°4 : Profils de sensibilité aux antibiotiques des souches d' <i>A. baumannii</i> étudiées.	30
Tableau N°5 : Croissance des souches d' <i>A. baumannii</i> sur gélose M9 additionnée de différentes concentrations de DIP (+: Présence de croissance et -: Absence de croissance)	42
Tableau N°6 : Poids tissulaires (PT) et poids relatifs (PR) des organes urinaires des souris « Swiss »	54

Introduction

En dépit d'un nombre important d'études sur l'association entre les infections hospitalières sévères à *Acinetobacter baumannii* et la résistance aux antibiotiques (ATB), le rôle et le mécanisme des facteurs de virulence dans la pathogénèse de cette bactérie restent en grande partie obscurs dans un contexte infectieux.

Les études portant sur la virulence de cette bactérie étant peu nombreuses, l'identification des caractéristiques de sa virulence pourrait contribuer au développement d'approches thérapeutiques récentes à fin de contrôler les infections à *Acinetobacter baumannii* [(McConnell *et al.*, 2013) ; (Cerqueira *et al.*, 2014)].

Cette bactérie est devenue un agent pathogène important de par le monde, en raison de l'augmentation du nombre d'infections qu'elle cause et de l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques. Elle a été classée par « *the Infectious Diseases Society of America* » (IDSA), parmi les six microorganismes multirésistants dans le monde entier (Liu *et al.*, 2018).

La majorité des infections causées par *A. baumannii* sont acquises à l'hôpital, essentiellement dans les unités de soins intensifs. L'expression des niveaux significatifs d'antibiorésistance ainsi que la survie dans des conditions défavorables favorisent la persistance de cette bactérie dans l'environnement hospitalier [(Eijkelkamp, *et al.*, 2011a) ; (Gentile *et al.*, 2014)].

La virulence d'*A. baumannii* est liée essentiellement à la formation de biofilms, l'expression des sidérophores, la mobilité et l'adhésion aux globules rouges et aux cellules épithéliales de l'hôte (Roca *et al.*, 2012). En effet, la formation de biofilms représente un mécanisme important impliqué dans la pathogénicité pouvant expliquer l'augmentation de la virulence d'*A. baumannii*. De même, la capacité de cette bactérie versatile à coloniser et envahir l'organisme hôte met en évidence sa capacité d'obtenir les nutriments tels que le fer au cours du processus infectieux qu'elle peut acquérir par l'expression de divers systèmes d'acquisition de cet élément à fin de survivre dans des conditions limitées en fer. La mobilité, une autre caractéristique, a été corrélée à l'augmentation de virulence chez plusieurs bactéries, telles que *P. aeruginosa* [(Alarcon *et al.*, 2009) ; (Zimblér *et al.*, 2009) ; (Longo *et al.*, 2014)].

Par ailleurs, l'adhérence bactérienne aux cellules de l'hôte représente la première étape du mécanisme infectieux. Cet attachement implique des interactions moléculaires spécifiques entre les adhésines microbiennes et les récepteurs des cellules épithéliales (Geerlings *et al.*, 2002).

Dans ce contexte général et pour mieux comprendre la pathogénicité d'*A. baumannii* en vue de maîtriser sa présence dans les établissements de santé souvent associées à la formation de biofilms, il nous a paru nécessaire d'étudier sa virulence *in vitro* et *in vivo*.

Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes intéressés à :

- Rechercher *in vitro*, certains facteurs de virulence et d'invasion (formation de biofilm, croissance dans des conditions limitées en fer, synthèse d'une gélatinase, mobilité et agglutination des hématies humaines).
- Tester, *in vivo*, l'adhésion d'une souche d'*A. baumannii* isolée d'une sonde urinaire à demeure aux cellules du tractus urinaire (la vessie et les reins) chez un modèle animal, la souris Swiss.

Première partie

Revue Bibliographique

Chapitre I : *Acinetobacter baumannii*

1. Définition

Les *Acinetobacter* sont des coccobacilles, ubiquitaires à Gram négatif. Ce sont des bactéries aérobies strictes, non fermentaires, immobiles, souvent encapsulées, ne réduisant pas les nitrates, oxydase négative et catalase positive.

Les espèces de ce genre sont souvent impliquées dans un grand nombre d'infections nosocomiales (IN) du fait de leurs capacités d'acquérir des résistances aux antibiotiques (**Trajkovsk, 2009**).

2. Systématique

Le genre *Acinetobacter* a été placé originellement dans la famille de *Neisseriaceae* mais les développements de la taxonomie les plus récents ont considéré que les membres de ce genre devraient être classés dans une nouvelle famille, celle des *Moraxellaceae* (**Iregbu et al., 2002**).

Avec un taux de GC % d'ADN (coefficient de Chargaff) de 39 à 47 %, le genre *Acinetobacter* est actuellement inclus dans le domaine des *Bacteria*, le phylum des *Proteobacteria*, la classe des *Gammaproteobacteria*, l'ordre des *Pseudomonadales* et la famille des *Moraxellaceae*.

Le genre *Acinetobacter* est composé d'environ 31 espèces, dont environ 22 ont été attribuée à des espèces qui diffèrent largement par leurs origines, leurs caractères épidémiologiques et leurs importances cliniques (**Wisplinghoff, 2012**).

La différenciation, entre les espèces, basée sur les caractères phénotypiques paraît difficile, de ce fait, pour leur identification, il est important d'avoir recours à l'hybridation ADN-ADN (**Alsan and Klompas, 2010**).

Le **Tableau N°1** regroupe une description détaillée des différentes espèces du genre *Acinetobacter*.

Tableau N°1 : Espèces génomiques reconnues d'*Acinetobacter* (Fomba, 2006).

Auteur	Nom de l'espèce
Bouvet et Grimont (1986)	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
	<i>Acinetobacter junii</i>
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
Nishimura et al. (1988)	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Gemer-Smidt et Tjemberg (1993)	Espèce génomique N° 3
	Espèce génomique N° 13
Nemec et al. (2001)	<i>Acinetobacter ursingii</i>
	<i>Acinetobacter schindleri</i>
Carr et al. (2003)	<i>Acinetobacter baylye</i>
	<i>Acinetobacter gerneri</i>
	<i>Acinetobacter tandori</i>
	<i>Acinetobacter townnerie</i>
	<i>Acinetobacter grimontii</i>
	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>
Nemec et al. (2003)	<i>Acinetobacter parvus</i>
Nemec et al. (2009)	<i>Acinetobacter beijerumckii</i>
	<i>Acinetobacter soli</i>
	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>
	<i>Acinetobacter venetianus</i>
Nemec et al. (2010)	<i>Acinetobacter bereziniae</i>
	<i>Acinetobacter guillouiae</i>

Les quatre espèces génomiques, *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, l'espèce génomique N°3 et l'espèce génomique N°13 sont les plus proches par leurs caractères phénotypiques et sont difficiles à distinguer. Pour cela, et pour des raisons épidémiologiques, ces taxons sont souvent regroupés au sein d'un groupe appelé le "complexe *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*" (C Acb) [(Towner, 2006) ; (Fomba, 2006)].

A. baumannii est l'espèce la plus fréquente et la plus résistante de ce genre. Elle est associée à une variété d'infections nosocomiales principalement chez les patients immunodéprimés admis en réanimation [(Alsan and Klompas, 2010) ; (Wisplinghoff, 2012)].

3. Habitat

Les *Acinetobacter* sont des bactéries ubiquitaires de l'environnement naturel et hospitalier. Elles constituent une partie de la flore commensale, de la cavité buccale, des tractus respiratoires et gastro-intestinal et de manière prédominante dans les régions humides de la peau [(Hawkey and Berezin, 2006) ; (Marrakchi, 2008) ; (Gurey, 2009)].

Acinetobacter sp. sont très résistants dans les milieux extérieurs et se propagent facilement dans l'environnement des patients infectés ou colonisés ou ils peuvent persister pendant plusieurs jours ou semaines, voire des mois [(Elouennas *et al.*, 2001) ; (Cattoen, 2004)].

4. Caractères bactériologiques

Les *Acinetobacter* sont des bacilles courts ou coccobacilles à Gram négatif avec un diamètre de 0,9 à 1,6µm et une longueur de 1,5 à 2,5µm (Figure N°1). La structure de la paroi cellulaire est typique des bactéries à Gram négatif. Les cellules se présentent en paire, ou en chaînes de longueurs variables. Elles sont parfois entourées d'une capsule, non sporulées et les flagelles sont absents [(Towner, 2006) ; (Alsan and Klompas, 2010)].

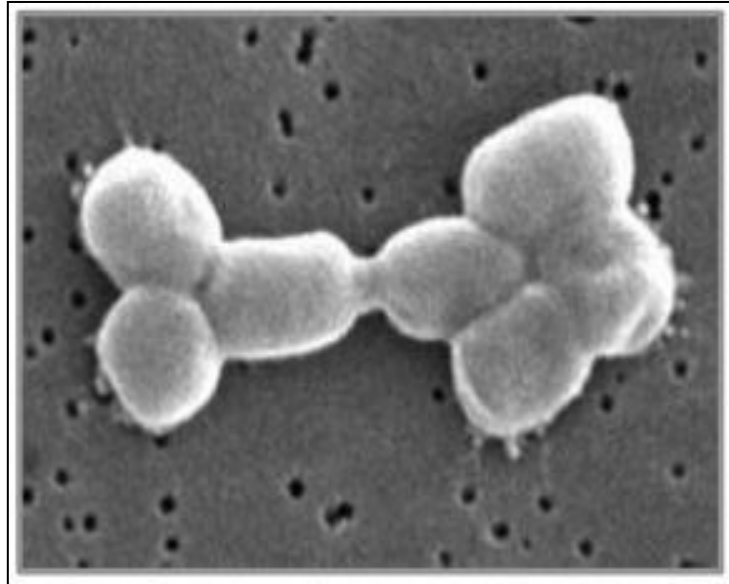


Figure N°1 : Microphotographie d'*A. baumannii* au microscope électronique à balayage (Marti, 2008).

Une réponse négative est obtenue pour la Lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC), l'arginine dihydrolase (ADH), la production d' H_2S , l'indole et la bêta-galactosidase. Plusieurs espèces d'*Acinetobacter* ont la capacité de dégrader des hydrocarbures de C8 à C20 (Euzéby, 2003). Ils forment des colonies lisses, convexes, circulaires, jaunes pâles au blanc grisonnant, translucides ou légèrement opaques parfois muqueuses et non pigmentées sur milieu solide. Le diamètre des colonies est généralement de 0,5 à 2,0mm et de 2 à 4mm après 24 heures et 48 heures d'incubation respectivement. Les colonies apparaissent comme lactose négatif sur les milieux lactosés (Fomba, 2006).

Les isolats cliniques d'*Acinetobacter* se développent à 37°C. Certaines souches peuvent croître à 42°C. Des souches cliniques ont montré une réaction hémolytique sur gélose au sang grâce à la production d'une phospholipase C (Towner, 2006).

5. Diagnostic bactériologique

Le diagnostic repose sur l'isolement du germe à partir des prélèvements biologiques tels que, l'hémoculture, les sécrétions de l'arbre respiratoire, les urines, le pus et les dispositifs médicaux (cathéters, sondes divers, prothèses....) (Fomba, 2006).

Les *Acinetobacter* se développent facilement sur gélose nutritive et gélose de trypticase soja. Les milieux sélectifs tels que le Mac Conkey et le Drigalski peuvent être utilisés pour isoler les colonies d'*Acinetobacter*.

L'identification biochimique des espèces d'*Acinetobacter* repose sur l'utilisation des galeries API 20 E et API 20 NE, basées en grande partie sur les tests d'assimilation des sources carbonées ainsi que le système Biolog qui différencie les bactéries sur la base de leur oxydation de 95 sources de carbone différentes (**Lambert, 2007**).

La capacité de croissance à différentes températures peut être recherchée dans un bouillon trypticase soja ensemencé avec deux gouttes d'une culture de 24 heures. La lecture se fait après 24 et 48 heures d'incubation. *A. baumannii* est la seule espèce de ce genre ayant la capacité de croître à +44°C [(**Euzeby, 2003**) ; (**Lambert, 2007**)].

Pour pallier aux insuffisances de l'identification biochimique, plusieurs méthodes ont été proposées à savoir l'électrophorèse des protéines de l'enveloppe, l'amplification de divers gènes (gènes codant pour les ARN ribosomiaux, gènes codant spécifiquement pour l'ARNr 16S, gènes *RecA*) le suivi de la restriction des amplicons, l'AFLP (*Amplified-Fragment Length Polymorphism*), la FAFLP (*Fluorescent Amplified-Fragment Length Polymorphism*), l'ARDRA (*AmplifiedrDNA Restriction Analysis*) ...etc (**Euzeby, 2003**).

Chapitre II : Infections à *Acinetobacter baumannii*

1. Rôle d'*Acinetobacter baumannii* en clinique humaine

Acinetobacter est un pathogène opportuniste responsable d'infections aiguës chez l'homme sur un terrain généralement débilisé. Les espèces les plus importantes pour l'homme sont *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. lwoffii* et *A. johnsonii*.

Au cours de ces 20 dernières années, les infections à *Acinetobacter sp.* sont devenues un problème nosocomial réel dans différents pays (Almasaudi, 2018).

1.2. Infections communautaires

Les infections communautaires sont souvent pulmonaires, fréquemment observées chez l'homme de plus de 40 ans, en relation avec des facteurs de risque du type tabagisme, alcoolisme, bronchite chronique, cancer ou antécédents de pneumonie. Elles sont graves, de durée brève avec une mortalité élevée si un traitement efficace n'est pas mis en place dès le début des signes pulmonaires (Zagury et Bousquet, 2013).

1.3. Infections hospitalières

Les principales infections hospitalières sévères à *A. baumannii* sont les pneumopathies, les bactériémies, les méningites secondaires et les infections de tractus urinaire. *A. baumannii* peut également provoquer des infections de la peau et des tissus mous, notamment au niveau des plaies chez les blessés de guerre et les grands brûlés [(Peleg *et al.*, 2008) ; (Custovic *et al.*, 2014)].

2. Principales infections nosocomiales à *Acinetobacter baumannii*

Selon le *Center for Disease Control* (CDC), *A. baumannii* est responsable de 20% des infections nosocomiales dans des services accueillant des patients fragilisés, notamment les services de soins intensifs et de réanimation (Nasr, 2019).

2.1. Infections respiratoires

Les *Acinetobacter sp.* atteignent généralement les voies respiratoires inférieures des patients admis en soins intensifs, nécessitant une ventilation mécanique et peuvent les coloniser. La transmission de ces bactéries se fait à travers les sondes endo-trachéales (Poduch and Lakshmi, 2007).

Plusieurs facteurs ont été identifiés comme suspects pour augmenter le risque de développer une pneumonie ou permettre la colonisation de la partie inférieure des voies respiratoires, il

s'agit notamment de l'âge avancé, la maladie pulmonaire chronique, l'immunosuppression, la chirurgie lourde et l'utilisation d'antimicrobiens (**Ducel et al., 2008**).

2.2. Bactériémies

Les bactériémies à *Acinetobacter* sont indépendantes de l'âge des patients. En revanche, il existe des facteurs prédisposant tels que les traumatismes, les brûlures, les interventions chirurgicales, la présence de cathéters veineux et la dialyse. L'immunosuppression ou la défaillance respiratoire à l'admission augmente le risque de la bactériémie d'un facteur de trois (**Trajkovska, 2009**).

2.3. Infections urinaires

Les infections des voies urinaires nosocomiales sont rarement causées par *Acinetobacter sp.* Elles surviennent le plus souvent chez les patients âgés et affaiblis, chez les malades admis en soins intensifs, et ceux qui portent de sondes urinaires à demeure. 80% des patients sont de sexe masculin et ceci est probablement le résultat de l'extension prostatique [(**Gaynes and Edwards, 2005**) ; (**Trajkovska, 2009**)].

2.4. Méningites

La méningite secondaire est la forme prédominante des méningites nosocomiales à *Acinetobacter*, particulièrement suite à des procédures neurochirurgicales ou des traumatismes crâniens. *A. baumannii* est rarement décrit comme agent responsable de méningites nosocomiales. Il peut y avoir une culture de Liquide Céphalo Rachidien (LCR) positive pour l'*Acinetobacter* en absence des caractéristiques cliniques de la méningite (contamination de LCR par *Acinetobacter sp.* présent dans le milieu hospitalier) [(**Kim et al., 2009**) ; (**Krol et al., 2009**)].

2.5. Infections cutanées

La colonisation par *Acinetobacter* des plaies traumatiques poste opératoire et des brûlures n'est pas rare particulièrement dans les unités de soins intensifs. Elle est suivie par une bactériémie après 3 à 5 jours (**Hawkey and Berezin, 2006**).

3. Epidémiologie

La prévalence des infections nosocomiales à *Acinetobacter* est de l'ordre de 9 % dans les centres hospitalo universitaires et est un peu moindre dans les hôpitaux généraux (environ 7 %). La véritable prévalence des *Acinetobacter* en milieu hospitalier est difficile à préciser en raison de la frontière mal définie entre la colonisation et l'infection (**Zagury et Bousquet, 2013**).

3.1. Réservoir

L'homme représente l'habitat principal pour *Acinetobacter sp.* La majorité d'*A. baumannii* isolée de produits pathologiques correspond à une colonisation dans les services de soins intensifs regroupant des malades fragilisés, avec des pathologies lourdes (**Joly-Guillou, 2004**).

3.2. Persistance dans l'environnement hospitalier

En milieu hospitalier, *Acinetobacter* survit facilement dans les poussières de l'environnement (litière, ameublement etc...) et colonise parfaitement toute sorte de dispositifs médicaux y compris les cathéters veineux centraux. *Acinetobacter sp.* est très résistant aux conditions environnementales. Une survie de plusieurs jours dans un environnement inanimé est tout à fait possible [(**Goubau et Van Gompel, 2000**) ; (**Siegrist, 2000**)].

3.3. Transmission

Le manuportage est la voie de transmission la plus fréquente par contamination des mains du personnel. Par ailleurs, l'existence d'un matériel contaminé peut être responsable de la transmission de cette bactérie. Ce type de contamination a largement diminué avec l'utilisation plus large de matériel à usage unique (**Joly-Guillou, 2004**).

La voie aérienne peut jouer un rôle par l'intermédiaire des aérosols dans l'environnement proche des patients ventilés, colonisés ou infectés par *Acinetobacter*. Les instruments contaminés (tuyaux et ballons d'assistance ventilatoire) ont été associés à la transmission d'infections respiratoires (**Cisneros and Rodriguez-Bano, 2002**).

4. Traitement

Seulement quelques antibiotiques sont désormais efficaces, pour le traitement des infections sévères à *Acinetobacter*, particulièrement chez les patients admis en soins intensifs. Dans le cas d'infections dues à des isolats multirésistantes, le choix de l'antibiothérapie est limité (**Marrakchi, 2008**).

La prise en charge des infections causées par des souches d'*Acinetobacter* sensibles aux antibiotiques repose habituellement sur l'utilisation de céphalosporines de 3^{ème} génération, l'association β -lactamines-inhibiteurs de β -lactamases (association incluant le sulbactam), ou les carbapénèmes. Ces derniers seuls ou associés à un aminoside représentent le traitement de première ligne en cas d'infection due à des souches résistantes hyperproductrices de céphalosporinases et/ou de pénicillinases. Les souches multi-résistantes, en particulier celles qui résistent aux carbapénèmes, constituent actuellement un obstacle thérapeutique majeur. Des associations de 2 ou 3 antibiotiques incluant l'imipénème ou le méropénème, la rifampicine, la colistine et le sulbactame ont été utilisés avec succès (**Munoz-Price and Weinstein, 2008**).

5. Mécanismes de résistance

Les souches d'*A. baumannii* sont naturellement résistantes à la pénicilline G, à l'amoxicilline et aux céphalosporines de première et deuxième génération. Les souches sauvages d'*A. baumannii* produisent une bêta-lactamase de type céphalosporinase (ou AmpC), désignée également par «*Acinetobacter*-derived cephalosporinases» (ADCs). La présence de cette enzyme représente le mécanisme de résistance aux bêta-lactamines le plus fréquent chez *A. baumannii*. Cette dernière possède naturellement sur son chromosome un gène codant pour une oxacillinase dont le représentant majeur est OXA-51 [(**Bou et al., 2000**) ; (**Héritier et al., 2006**)].

La résistance acquise aux pénicillines (notamment la ticarcilline) a été décrite dès le début des années 1980 avec l'identification de la pénicillinase (TEM-1) puis du variant TEM-2. C'est ensuite la pénicillinase CARB-5 qui a été rapportée chez *A. baumannii* et SCO-1 [(**Poirel et al., 2007**) ; (**Gurey, 2009**)].

La résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (notamment la ceftazidime) est probablement liée à l'insertion de la séquence IS*Abal* immédiatement en amont du codon d'initiation du gène *blaampC*, responsable de l'apport de séquences promotrices entraînant sa surexpression. Ce mécanisme de résistance est le plus fréquent chez *A. baumannii* suivi de l'acquisition d'une β -lactamase à spectre élargi (BLSE). Les plus classiques sont VEB-1 et PER-1 [(**Héritier et al., 2006**) ; (**Poirel et al., 2007**)].

Chapitre III : Pathogénicité d'*Acinetobacter baumannii*

La pathogénicité d'*Acinetobacter* est définie comme étant l'aptitude de cet agent à provoquer la maladie chez un être vivant. La virulence est le degré de pathogénicité qui peut varier entre les membres d'une même espèce d'agents pathogènes. En effet, les *Acinetobacter sp.* sont considérés comme des bactéries à pouvoir pathogène faible, mais certaines caractéristiques de ces organismes peuvent augmenter la virulence des souches impliquées dans des infections graves [(Joly-Guillou, 2005) ; (Braun, 2008) ; (Marti, 2008)]. Parmi ces caractéristiques nous pouvons citer :

1. Présence de lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS), produit par *Acinetobacter*, présente une toxicité létale chez la souris. Cette endotoxine est détectée lors de bactériémies à *Acinetobacter*. Le LPS altère également l'action bactéricide du complément dans le sérum humain en agissant de façon synergique avec la capsule polysaccharidique. Cette dernière étant formée de L-ramnose, d'acide D-glucuronique et de D-mannose, rend probablement la surface des souches plus hydrophile [(Joly-Guillou, 2005) ; (Marti, 2008)].

2. Quorum sensing

Il s'agit d'un mécanisme de régulation impliqué dans la biosynthèse des enzymes extracellulaires, la formation de biofilm, la synthèse des antibiotiques et les facteurs de virulence extracellulaires. Quatre systèmes de quorum sensing (QS), qui semblent jouer un rôle d'auto-induction de multiples facteurs de virulence, ont été décrits chez *Acinetobacter* (Simoes *et al.*, 2007).

3. Echange génétique

L'acquisition de nouveau matériel génétique additionnel peut faciliter la pathogénicité et la survie des microorganismes. Les plasmides conjugatifs, les transposons et les intégrons sont importants dans la dissémination des déterminants génétiques de résistance chez *Acinetobacter sp.* [(Perez *et al.*, 2007) ; (Smith *et al.*, 2007) ; (Marti, 2008)].

4. Formation de biofilm

La formation de biofilm intéresse la santé publique vue son rôle dans certaines maladies infectieuses, essentiellement celles qui nécessitent l'implantation de dispositifs médicaux. Des études ont mis en évidence la capacité des *Acinetobacter sp.* à former un biofilm [(Dijkshoorn, 2007) ; (Marti *et al.*, 2011)].

Les pilis présents à la surface bactérienne interagissent avec les cellules épithéliales humaines ; ces pilis associés avec les sucres hydrophobes du LPS peuvent promouvoir l'adhérence aux cellules de l'hôte. Le contact entre la bactérie et les cellules de l'hôte implique des adhésines, des fimbriae ou des polysaccharides (**Dijkshoorn, 2007**).

5. Outer Membrane Proteins

Outer membrane protein A (Omp A) est une protéine de la membrane externe capable d'induire l'apoptose des cellules épithéliales de l'hôte (**Marti et al., 2011**).

6. Mécanismes de réponse au stress

A. baumannii possède une capacité d'adaptation aux différentes conditions ; ce qui suggère que ce microorganisme doit disposer de mécanismes de réponses au stress efficaces (**Dijkshoorn, 2007**).

7. Hydrophobicité

Acinetobacter sp. présente une surface cellulaire de caractère hydrophobe ce qui favorise son adhésion sur différents polymères (cathéters, sondes) [(**Braun, 2008**) ; (**Figueiredo, 2011**)].

8. Sidérophores

Les sidérophores sont des protéines qui permettent la captation du fer de l'hôte au profit de la bactérie, or la diminution de la concentration en fer extracellulaire est un mécanisme de défense possible contre les infections (**Doughari et al., 2011**).

9. Activité enzymatique de certaines enzymes

Comme le cas des estérases, les aminopeptidases, les uréases et les phosphatases acides, pourraient aussi jouer un rôle dans la virulence d'*A. baumannii* (**Braun, 2008**).

Chapitre IV: Généralités sur les biofilms

1. Définition d'un biofilm

Le biofilm est une communauté de microorganismes adhérente à une surface biotique ou abiotique et caractérisée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice d'exopolymères. Ces surfaces peuvent prendre des formes minérales ou organiques, industrielles ou médicales (**Branger et al., 2007**).

2. Etapes du développement d'un biofilm

Les biofilms ont un cycle de vie, qui peut être considéré comme un équilibre dynamique entre les phénomènes qui tendent à réguler son épaisseur (**Baudin, 2017**). Sa formation passe par 5 étapes bien distinctes.

2.1. Adhérence réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité et en présence d'un film conditionnant, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par mouvements brownien, par sédimentation ou par mobilité active. Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Les cellules s'adsorbent sur une surface pendant un certain temps, mais peuvent se détacher [(**Pecastaings, 2010**) ; (**Hoiby et al., 2011**)].

2.2. Adhérence irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible et forte en raison de la production d'exopolysaccharides (EPS) par les bactéries et des liaisons hydrophobes qui s'établissent entre le microorganisme et la surface. Les structures d'adhérence bactériennes, telles que les fimbriae et les curli d'*E. coli*, jouent un rôle important dans cette étape. Ces derniers interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface d'adhésion [(**Beloin et al., 2008**) ; (**Hoiby et al., 2011**)].

2.3. Développement précoce du biofilm

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des EPS. Elles s'agrègent entre elles et forment des micro-colonies protégées par la matrice exopolysaccharidique (**Jacobsen et al., 2008**).

2.4. Maturation du biofilm

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les micro-colonies, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets. La libération de nutriments favorise la croissance du biofilm jusqu'à devenir macroscopique (Alnnasouri, 2010).

2.5. Détachement de bactéries

Le détachement intervient seulement à la fin de la croissance afin de contrôler l'épaisseur du biofilm. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués. Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables de coloniser d'autres surfaces [(Joshi *et al.*, 2010) ; (Kaplan, 2010)]. La figure N°2 montre un modèle représentant les étapes de formation d'un biofilm bactérien.

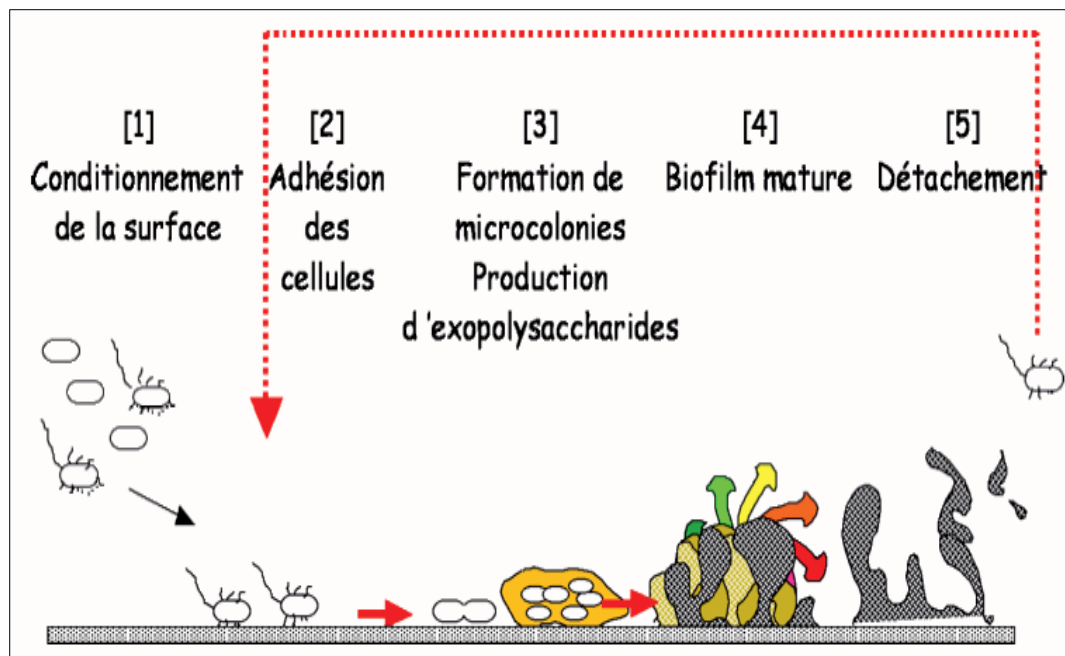


Figure N°2 : Etapes de formation d'un biofilm bactérien (Roux et Ghigo, 2006).

3. Régulation de la formation de biofilms

La densité des bactéries et leurs contacts cellulaires facilitent la communication intercellulaire via le Quorum Sensing (QS), qui implique la production, la sécrétion et la détection, par les bactéries, de petites molécules signales appelées, auto-inducteurs (AI). Plusieurs études ont mis en évidence le rôle du QS dans la formation des biofilms [(Chalvet de Rochemonteix, 2009) ; (Pecastaings, 2010)].

4. Les biofilms dans le domaine médical

L'éradication des biofilms pose de réels problèmes dans le domaine médical. En effet, si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries en mode planctonique, ils sont parfois inefficaces sur les cellules sessiles ou en mode biofilm (**Vallet *et al.*, 2001**).

4.1. Biofilms et implants médicaux

Les biofilms peuvent se former à la surface externe et/ou interne des dispositifs médicaux (DM) implantés dans l'organisme (lentilles de contact, cathéter veineux, sonde endotrachéale, dispositifs intra-utérins, valves cardiaques artificielles, sondes urinaires,...etc) (**Parot, 2007**).

Plus de 60 % des infections nosocomiales à travers le monde sont dues à des bactéries formant des biofilms sur les surfaces des dispositifs médicaux. La formation de biofilm est liée à la survie de ces bactéries dans le milieu hospitalier. Les microorganismes responsables proviennent de la flore cutanée du patient, de l'environnement ou de la microflore exogène transitoire véhiculée par le personnel hospitalier. Les biofilms peuvent être composés d'une ou plusieurs espèces de microorganismes, selon le type du dispositif utilisé et la durée de son implantation [(**Marti *et al.*, 2011**) ; (**Treter et Macedo, 2011**)].

Chapitre V: Limitation en fer et virulence bactérienne

L'association entre le fer et la virulence bactérienne est évidente. En effet, pour établir l'infection, le microorganisme envahisseur doit être capable de se multiplier avec succès dans l'environnement hostile de l'hôte (**Braun and Hantke, 2013**).

Les bactéries produisent une gamme de déterminants de virulence requis pour leur pathogénicité. Le niveau de fer, l'un des facteurs importants, est en relation avec la synthèse d'une partie de ces déterminants.

Le fer est un nutriment essentiel, qui en raison de sa faible solubilité au pH physiologique, n'est pas facilement disponible. L'hôte maintient de faibles niveaux de fer libre en circulation grâce à des protéines capables de lier cet élément à savoir, les transferrines extracellulaires, les lactoferrines et les ferritines intracellulaires, les hémossidérine et l'hème [(**Sritharan, 2006**) ; (**Braun and Hantke, 2013**)].

Pour obtenir le fer de l'hôte, le pathogène utilise l'une des stratégies suivantes :

- Production des sidérophores qui chélatent les formes de fer à partir des protéines qui le lient. Le sidérophore ferrique est ensuite absorbé via les récepteurs spécifiques de la surface cellulaire tels que les protéines de la membrane externe/enveloppe régulatrices de fer (*Iron Regulated Outer Membrane Proteins (IRMPs)*/ *Iron Regulated Envelope Proteins (IREPs)*).
- Absorption directe des formes de fer, à partir des molécules qui le contiennent via des récepteurs spécifiques qui incluent les récepteurs pour l'hémine, les transferrines et les lactoferrines (**Sritharan, 2006**).

Près de 6 systèmes d'acquisition de fer ont été identifiés chez *E. coli* parmi eux, l'entérobactine, rencontré également chez *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* et quelques espèces de *Shigella*. Alors que chez les membres de *Pasteurellaceae* et *Neisseriaceae*, le mécanisme sidérophore-indépendant, a été identifié [(**Ratledge and Dover, 2000**) ; (**Sritharan, 2000**)].

Chez les bactéries à Gram négatif, le fer doit être transporté à travers la membrane externe et la membrane cytoplasmique (**Figure N°3**).

Le Fe^{2+} soluble est capable de diffuser librement via la membrane externe à travers des porines. Il est ensuite transporté de façon active par le système Feo ABC (**Brillet, 2013**).

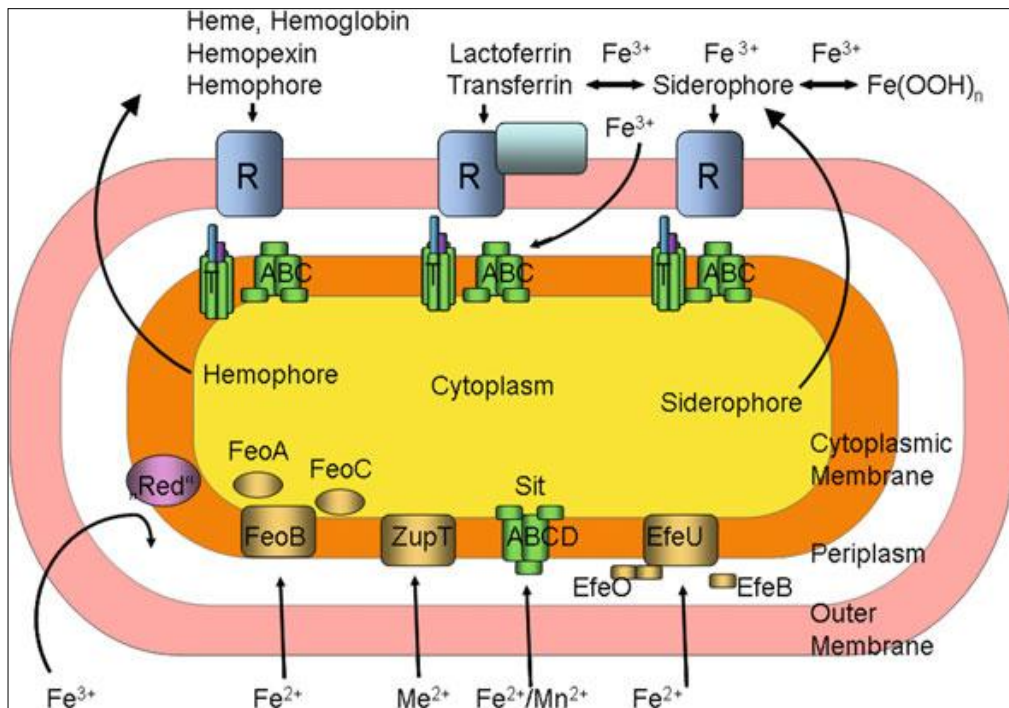


Figure N°3 : Systèmes de transport de Fe^{2+} et Fe^{3+} chez les bactéries à Gram négatif (**Braun and Hantke, 2013**).

R : les protéines réceptrices, **ABC :** les transporteurs ATP-Binding Cassette, **T :** le complexe Ton. **Red :** réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+}

Les protéines libèrent l'hème sur la surface cellulaire puis il est récupéré dans le cytoplasme.

La transferrine et la lactoferrine libèrent le fer sur la surface cellulaire puis il transporté vers le cytoplasme.

Les hémophores sont synthétisés dans le cytoplasme et ensuite libérés par des systèmes d'exportation spécifiques.

1. Transport du fer via des sidérophores

Les sidérophores sont des chélateurs spécifiques du fer synthétisés et excrétés dans le milieu extracellulaire par les bactéries en milieu aérobie et en conditions de carences en fer. Ces molécules permettent d'extraire le fer extracellulaire et de le transporter via des récepteurs spécifiques de la membrane externe des bactéries (**Brillet, 2013**).

1.1. Transport à travers la membrane externe

Le transport à travers la membrane externe implique la formation d'un canal au niveau du transporteurs TonB-dépendants (TBDT) (**Noinaj et al., 2010**).

1.2. Transport de fer à travers la membrane cytoplasmique

Le transport de sidérophore ferrique à travers la membrane cytoplasmique implique des transporteurs *ATP Binding Cassette* (ABC) et des perméases dépendantes de la force proton motrice (Brillet, 2013).

1.3. Dissociation du complexe fer-sidérophore

Pour que le fer puisse être utilisé dans les processus métaboliques, il doit être dissocié de son sidérophore dans le pèriplasme ou dans le cytoplasme. Après dissociation, le sidérophore peut être recyclé dans le milieu extracellulaire afin d'effectuer un nouveau cycle de transport (Brillet, 2013).

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de recherche « Biofilms et Biocontamination des Matériaux (LBBM) », de l'université Badji Mokhtar-Annaba.

1. Souches bactériennes

L'étude a porté sur une collection de cinq souches d'*Acinetobacter baumannii* isolées entre 2013 et 2014 de patients admis au service de réanimation médicale du CHU de Constantine.

Les souches isolées et identifiées ont reçus un code numéroté, il s'agit de **Acb 33**, **Acb 67**, **Acb 68**, **Acb 75** et **Acb 85**.

L'origine des souches est représentée sur le **tableau N°2**.

Tableau N°2 : Origine des souches utilisées dans cette étude

Souche	Acb 33	Acb 67	Acb 68	Acb 75	Acb 85
Prélèvement	Cathéter veineux (CAV)	Sonde urinaire (SU)	Sonde endotrachéale (SE)	Liquide pleural (LP)	Cathéter veineux (CAV)

Les souches sont conservées à -20°C dans du bouillon nutritif additionné de glycérol à 30% (v/v). Avant toute utilisation, les cultures bactériennes sont soigneusement décongelées à température ambiante puis repiquées deux fois sur milieu Trypticase Soja Agar (TSA). L'incubation est réalisée à 37°C en aérobiose pendant 24 heures.

2. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

La sensibilité des souches bactériennes à différentes familles d'antibiotiques est testée par la méthode de l'antibiogramme standard (par diffusion sur gélose Mueller Hinton) selon les recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute*, (CLSI M100-S20) (2010).

Les antibiotiques testés sont représentés dans le **tableau N°3**.

Tableau N°3 : Antibiotiques testés sur les souches d'*Acinetobacter baumannii*.

Famille ATB	ATB	Sigle	Charge
Béta-lactamines	Ticarcilline	TIC	75 µg
	Pipéracilline	PIR	100 µg
	Imipenème	IMI	10 µg
	Aztréonam	ATM	30 µg
	Cefepime	FEP	30 µg
	Ceftazidime	CAZ	30 µg
Aminosides	Amikacine	AK	30 µg
Quinolones	Péfloxacine	PEF	5 µg
Polypeptides	Colistine	CS	10 µg

3. Etude de la virulence d'*A. baumannii* *in vitro*

3.1. Evaluation de l'adhérence et du potentiel des souches à former des biofilms

3.1.1. Technique en tubes (Djordjevic *et al.*, 2002)

C'est une technique qui permet de quantifier la biomasse des biofilms formés par des microorganismes sur différents types de substrats. Elle est basée sur la coloration au cristal violet qui se lie aux molécules extracellulaires chargées négativement tels que les polysaccharides de la matrice exo-polymérique des biofilms (Li *et coll.*, 2003).

A partir d'une culture d'*Acinetobacter baumannii* de 24 heures, une suspension bactérienne est préparée dans du bouillon Luria Bertani. La densité optique de la suspension est ajustée à 0,2 à 600nm.

La suspension est répartie dans des tubes en polystyrène de 5mL à raison de 2mL par tube (environ $2,7 \times 10^8$ UFC/mL).

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, l'absorbance de la suspension est mesurée à 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre « model Secomam ».

La culture bactérienne est ensuite éliminée et les tubes sont rincés 3 fois avec de l'eau distillée stérile pour écarter les cellules planctoniques et/ou non adhérentes.

3mL d'une solution de cristal violet à 1% (p/v) sont, ensuite, ajoutés et les tubes sont laissés pendant 45min à température ambiante. Les biofilms formés sont décolorés par addition de 2mL d'un mélange éthanol-acétone (75:25) dans les tubes. Après 1 heure d'incubation à

température ambiante, l'absorbance est mesurée à 570nm à l'aide d'un spectrophotomètre « model Secomam ».

La coloration adsorbée est proportionnelle à la biomasse du biofilm formé, et sa solubilisation permet sa quantification (Musk *et al.*, 2005).

Le rapport DO570nm/DO600nm est calculé pour normaliser la quantité de biofilm formé par rapport au contenu cellulaire totale (Giannouli *et al.*, 2013).

3.1.2. Technique sur microplaques (Lee *et al.*, 2008)

La quantité de biofilm formé par les isolats d'*A. baumannii* est mesurée sur une microplaque en polystyrène à 96 puits.

Une culture bactérienne de 18 heures avec une densité optique lue à 620nm égale à 2,0 est diluée au 1/100 dans le bouillon Luria Bertani. A partir de cette suspension bactérienne, un volume de 200µL est prélevé et ajouté dans tous les puits d'une microplaque 96 puits à fond plat. Après une incubation de la microplaque à 37°C pendant 24 heures, les cellules planctoniques sont délicatement éliminées et les puits sont lavés 3 fois avec de l'eau distillée stérile puis séchés à l'air libre. 200µL d'une solution de cristal violet à 0,1% (p/v) sont, ensuite, ajoutés puis la microplaque est laissée pendant 20min à température ambiante. Les biofilms formés sont décolorés par addition de 200µL d'un mélange d'éthanol/acétone (75:25) (v/v) dans tous les puits. La microplaque est laissée pendant 15min à température ambiante avant de lire l'absorbance à 590nm en utilisant un lecteur de microplaques « model FilterMax F5 multimode ».

L'absorbance des cellules planctoniques est également mesurée à 620nm.

Selon Cevahir *et al.* (2008), les souches sont classées en :

- non productrices de biofilms : $DO_{595nm} < 1$
- faiblement formatrices de biofilms : $1 < DO_{595nm} < 2$
- moyennement formatrices de biofilms : $2 < DO_{595nm} < 3$
- fortement formatrices de biofilms : $3 < DO_{595nm}$

3.1.3. Quantification des cellules viables dans un biofilm bactérien

Afin de mesurer la croissance et l'activité métabolique des bactéries au sein des biofilms, nous avons suivi la technique de réduction du XTT basée sur la capacité des cellules métaboliquement actives à réduire le sel de tetrazolium (2,3-bis [2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) en un composé orangé, le formazan. L'activité métabolique est proportionnelle à l'intensité de la couleur de ce composé (**Chaieb et al., 2011**).

200µL de la suspension bactérienne, préalablement préparée dans du bouillon LB sont introduits dans les puits d'une microplaque 96 puits. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les puits sont vidés, lavés et séchés.

Le XTT est préparé dans le PBS (10mM, pH 7,4) à une concentration de 1mg/mL. Après stérilisation par filtration à travers un filtre millipore de diamètre de 0,22µm, il est stocké à -20°C à l'abri de la lumière.

La ménadione (2-méthyl-1,4-naphthoquinone) ou vitamine K3 (SIGMA) est utilisée comme accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire. La solution mère de ménadione est préparée dans l'acétone à une concentration de 0,4mM puis stérilisée par filtration en extemporané.

1 volume de la solution de ménadione est mélangé à 12,5 volumes de la solution de XTT. Le mélange est stérilisé par filtration à travers un filtre millipore de porosité 0,22µm.

100µL du mélange XTT-ménadione sont ajoutés à chaque puits de la microplaque. Cette dernière est scellée puis incubée à l'abri de la lumière à 37°C pendant 2 heures.

L'absorbance est mesurée à 450nm en utilisant un lecteur de microplaques « model FilterMax F5 multimode » (**Silva et al., 2008**). Ce test est réalisé en triplicata.

3.1.4. Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm à *A. baumannii*

L'architecture des biofilms d'*A. baumannii* formés *in vitro* sur une sonde urinaire est mise en évidence par des observations au microscope électronique à balayage (MEB).

Des disques de 2mm d'épaisseur sont soigneusement coupés d'une sonde en silicone stérile modèle « Foley » de 38cm de longueur et 6mm de diamètre interne. Les disques sont aseptiquement introduits dans des tubes contenant 9mL de bouillon nutritif, préalablement ensemencés avec une culture d'*A. baumannii* de 18 heures. Les tubes sont agités au vortex puis placés dans une étuve à 37°C pendant 6 jours. Après élimination de la culture

bactérienne, les disques contaminés sont lavés à l'eau distillée stérile puis observés au MEB Cambridge S200 (Cambridge Instruments, LEO Electron Microscopy, Inc., Thornwood, NY).

3.2. Croissance dans des conditions limitées en fer

La limitation en fer est obtenue par culture des souches d'*A. baumannii* sur deux milieux de culture, le milieu M9 et le milieu LB, additionnés d'un chélateur de fer synthétique le 2,2'-dipyridyl (DIP) (Sigma Aldrich). La solution mère du DIP est préparée dans l'eau distillée stérile à une concentration de 20mM puis conservé à -20°C.

3.2.1. Croissance sur milieu M9

Le milieu liquide M9 X5 (Sigma-Aldrich) est un milieu minimum contenant les ions/électrolytes essentiels tel que le phosphate de sodium, le phosphate de potassium, le chlorure d'ammonium, et des quantités minimales de chlorure de sodium. Ce milieu est supplémenté de 20% de glucose, 1M de sulfate de magnésium et 1M de chlorure de calcium (Martinez, 2011).

Le milieu minérale M9 (gélose à 2%) permet d'étudier la croissance dans des conditions limitées en fer sur milieu gélosé (Giannouli *et al.*, 2013). Des concentrations de 50, 100, 200 et 300µM de DIP sont additionnées au milieu de culture [(Antunes *et al.*, 2012) ; (Zimblet *et al.*, 2013)].

3.2.2. Croissance sur milieu LB

Le milieu LB est utilisé sous forme bouillon et gélose.

a. Croissance sur gélose LB

La croissance d'*A. baumannii* est menée sur gélose LB (2% agar) en présence de 50, 100, 200 et 300µM de DIP afin de réduire le fer disponible dans le milieu LB. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures [(Braun and Vidotto, 2004) ; (Eijkelkamp *et al.*, 2011b)].

b. Croissance sur bouillon LB

L'effet chélateur du fer sur la croissance bactérienne est testé sur bouillon LB dans des microplaques à 96 puits contenant des concentrations croissantes de DIP (Tiwari and Moganty, 2013).

Les microplaques sont inoculées avec des suspensions bactériennes, préalablement préparées dans le bouillon LB, à une DO 620 de 0,02 dans un volume final de 200µL de LB en absence ou en présence de chélateur de fer aux concentrations testées. Les microplaquesensemencées

sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Les absorbances sont lues à une longueur d'onde de 620nm dans un lecteur de plaques « model FilterMax F5 multimode ».

3.3. Recherche de la gélatinase

A partir d'une culture d'*A. baumannii* de 24 heures sur gélose MH, une colonie bactérienne est ensemencée sous forme de spots sur gélose LB contenant 3% de gélatine. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures puis placées au réfrigérateur à 4°C pendant 5 heures.

Une souche est considérée comme productrice de gélatinase s'il y a apparition d'un halo turbide autour des colonies.

Une souche clinique de *Pseudomonas aeruginosa* « Gélatinase + » (**PA**) est utilisée comme contrôle positif (**Sechi et al., 2004**). Les tests sont réalisés en triplicata.

3.4. Etude de la mobilité des souches

Nous avons recherché deux types de mobilités, le « Twitching » et le « Swarming ».

Une souche clinique de *P. aeruginosa* (**PA**) est utilisée comme contrôle positif. Ces tests sont réalisés en triplicata.

3.4.1. Recherche de la mobilité Twitching (**Semmler et al., 1999**)

A partir d'une culture de 24 heures sur TSA, une colonie est prélevée puis inoculée en spot au centre de boîtes contenant du milieu LB additionné de 1% d'agar. Les boîtes sont placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Les souches d'*A. baumannii* qui présentent une zone avec un diamètre supérieure à 10mm autour du point d'inoculation sont considérées comme possédant une mobilité « Twitching » positive (**McQueary and Actis, 2011**).

3.4.2. Recherche de la mobilité Swarming

Une colonie jeune est transférée, sous forme de spot sur le milieu LB additionné de 0,25% d'agar. Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Les souches positives pour ce type de mobilité montrent une zone de croissance sous forme d'halo avec un diamètre supérieure à 20mm (**Eijkelkamp et al., 2011a et b**).

3.5. Test d'hémagglutination

L'activité d'hémagglutination (HA), chez les cinq isolats d'*A. baumannii*, est déterminée à l'aide du test de micro-agglutination, en utilisant le sang humain frais provenant d'un donneur sain.

Une suspension d'érythrocytes est préparée à une concentration finale de 1% dans du PBS (pH=7,4 -10 mM) [(Cevahir *et al.*, 2008) ; (Abdul, 2018)].

Chaque souche d'*A. baumannii* estensemencée séparément sur gélose LB. Après 24 heures d'incubation à 37°C, des suspensions bactériennes sont diluées dans du PBS stérile. La concentration cellulaire initiale est fixée à environ 10⁹ UFC/mL.

100µL d'une suspension bactérienne sont ajoutés dans tous les puits d'une microplaque contenant 100µL de la suspension érythrocytaire. Des puits, contenant seulement la suspension érythrocytaire servent de témoins. La microplaque est placée à 4°C pendant 1 heure.

Afin d'étudier l'effet du D-mannose sur l'activité d'hémagglutination, dans tous les puits d'une nouvelle microplaque, 100µL de chaque suspension bactérienne sont mélangés avec 100µL de PBS, contenant 1% d'érythrocytes et 1% de D-mannose.

Un culot de sédimentation des érythrocytes, visible à l'œil nu, au fond des puits indique une réaction d'agglutination négative. Tandis qu'une agglutination positive donne un tapis continu (sous forme de voile ou de crêpe) de particules au fond des puits.

Pour chaque expérience, trois répétitions sont effectuées.

4. Etude *in vivo* de la virulence d'*A. baumannii*

Cette partie de l'étude a porté sur l'induction expérimentale d'une pyélonéphrite ascendante à *A. baumannii* chez des souris Swiss.

Le degré et les effets de la virulence d'*A. baumannii* sont évalués par des coupes histocytologiques et des analyses de la vessie et des reins.

Les effets de cette infection sur la vessie et les reins des souris sont comparés à ceux provoqués par *Proteus mirabilis*, bactérie souvent responsable d'infections des voies urinaires nosocomiales. Grâce à son uréase puissante, *Proteus mirabilis*, peut alcaliniser les urines et être responsable de lithiases qui permettent à l'infection de devenir chronique, entraînant ainsi une destruction progressive du parenchyme rénal (Stickler, 2009).

4.1. Souches bactériennes

Les deux souches utilisées pour cette partie de l'étude *A. baumannii* (**Acb 67**) et *Proteus mirabilis* (**Prm**) sont isolées de sondes urinaires chez des patients admis en réanimation médicale.

4.2. Culture bactérienne

Des cultures stocks sont préparées dans un bouillon nutritif contenant 30% de glycérol et conservée à -20°C. La souche est ensuiteensemencée sur TSA et incubée à 37°C pendant 24 heures.

4.3. Animaux

Des souris albinos de la souche Swiss, de sexe féminin âgées de 6 semaines et pesant environ 20g, sont soumises à une période d'adaptation d'un mois dans des conditions standards de température (à 20°C) et de lumière (photopériode naturelle).

Les souris sont logées dans des cages propres en polyéthylène et regroupées en lots de huit par cage (n=8), où elles bénéficient d'un accès libre à l'eau et à l'alimentation. Ces cages sont nettoyées régulièrement et la litière est changée tous les jours jusqu'à la fin de l'expérience.

4.4. Induction d'une pyélonéphrite ascendante à *A. baumannii* chez la souris

Pour l'induction de la pyélonéphrite expérimentale, un premier lot de souris test est infecté par la souche **Acb 67**. Un deuxième lot test est infecté par une autre bactérie responsable des infections urinaires, *Proteus mirabilis* (**Prm**). Le troisième lot correspond aux souris non infectées (lot témoin). Cette expérience est suivie sur une période de 15 jours.

La souche multirésistante, (**Acb 67**), utilisée pour induire une IU chez la souris est cultivée sur gélose TSA à 37°C pendant 24 heures. Une suspension bactérienne préparée dans du PBS (pH 7,4-10mM) servira pour infecter les souris.

La vessie de chaque animal est d'abord pressée pour évacuer l'urine avant l'induction de l'infection. A t = 0, un volume de 50µL contenant 10⁸UFC/mL dans le PBS est directement injecté dans la vessie des souris tests (n=8) en utilisant une fine seringue (**Mittal et al., 2009a**). Afin d'obtenir une infection persistante, la vessie de chaque animal est réinfectée par une double dose (100µL) après une semaine.

Le lot témoin reçoit une injection de 50µL de PBS stérile.

Pour confirmer l'établissement de l'infection, des échantillons d'urine sont récupérés et cultivés sur gélose Cystine Lactose Electrolyte Déficient (CLED). Après 15 jours, les souris de chaque lot sont sacrifiées et les reins et les vessies sont prélevés et serviront pour l'évaluation des effets pathologiques.

4.5. Examen bactériologique

Après 15 jours, les tissus de la vessie et l'un des reins de chaque souris sont aseptiquement récupérés, pesés et homogénéisés dans 1mL de PBS stérile. Le nombre de bactéries par gramme d'organe est déterminé et calculé après culture sur gélose CLED (**Mittal et al., 2004**).

4.6. Examen histopathologique

La vessie et l'un des reins sont fixés dans 10% de formol et déshydratés dans des gradients d'éthanol de 30-100%. Les tissus sont ensuite immergés dans la paraffine, coupés en disques de 5µm d'épaisseur et colorés à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) (**Garg et al., 1987**).

Les coupes histologiques sont observées au microscope optique et photographiées.

5. Traitement statistique des résultats

Les données sont représentées sous forme de moyenne plus ou moins l'écart type (Moy ± ET). La comparaison, entre les différents résultats obtenus, est effectuée après une analyse de la variance (ANOVA) et les moyennes sont comparées par un test t de Student.

Les différences ont été considérées comme :

- Significatives (*) : lorsque la valeur de probabilité **P<0,05**.
- Hautement significatives (**) comparant au témoin : lorsque **P<0,01**.
- Très hautement significatives (***) comparant au témoin : lorsque **P<0,001**.

Troisième partie

Résultats et discussion

1. Identification d'*Acinetobacter baumannii*

L'identification par culture sur milieu Hektoen et caractères biochimiques des galeries API 20 E et API 20 NE (Biomérieux, France), a permis d'assigner les cinq souches étudiées (**Acb 33**, **Acb 67**, **Acb 68**, **Acb 75** et **Acb 85**) au complexe « *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* » (**CAcb**) qui regroupe quatre espèces génomiques très proches, *A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *Acinetobacter* espèce génomique 3 et *Acinetobacter* espèce génomique 13TU (**Peleg et al., 2008**).

L'appartenance à l'espèce *baumannii* est confirmée par la capacité des cinq souches à croître à une température de +44°C.

A. baumannii apparaît comme l'espèce génomique la plus impliquée dans les infections nosocomiales (90 à 95% des *Acinetobacter*) dans les services de soins intensifs et de réanimation. Les espèces autres que *baumannii* habituellement isolées de l'environnement sont rarement impliquées dans ces infections et sont nettement plus sensibles aux antibiotiques [(**Joly-Guillou et al., 1992**) ; (**Lambert, 2007**)].

2. Résultats de l'antibiogramme d'*A. baumannii*

La résistance aux antibiotiques des cinq souches d'*A. baumannii* est évaluée par la méthode classique de diffusion des antibiotiques sur gélose muëller hinton selon les recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2010)*.

L'analyse des profils de résistance a révélé que les 4 souches d'*A. baumannii* isolées des dispositifs médicaux invasives (**Acb 33**, **Acb 67**, **Acb 68** et **Acb 85**) résistent à tous les antibiotiques testés à l'exception de la colistine. En revanche, la souche **Acb75**, isolée d'un liquide pleural (**LP**), est sensible à la colistine et à l'imipénème (**Tableau N°4**).

Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Djeribi et al. (2012)** qui ont montré qu'une souche d'*A. baumannii* isolée d'une sonde urinaire chez un patient immunodéprimé, était résistante à tous les antibiotiques à l'exception de la colistine.

Il est à noter qu'*A. baumannii* pose de grands problèmes thérapeutiques à travers le monde, principalement dans les services de réanimation. La capacité de survie dans des conditions rudimentaires, la résistance naturelle et la grande diversité des plasmides lui confèrent un grand potentiel d'acquisition de résistance. Par ailleurs, l'utilisation croissante d'antibiotiques à large spectre semble sélectionner des souches multirésistantes (**Soukaina, 2017**).

Tableau N°4 : Profils de sensibilité aux antibiotiques des souches d'*A. baumannii* étudiées.

Souches	TIC	CAZ	ATM	AK	PRL	FEP	IMI	PEF	CS
	CMI (µg/mL)								
	128	32	-	64	128	64	16	-	-
	Profil de résistance								
Acb 33	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Acb 67	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Acb 68	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Acb 75	R	R	R	R	R	R	S	R	S
Acb 85	R	R	R	R	R	R	R	R	S

A. baumannii est naturellement résistante à de nombreux antibiotiques tels que la pénicilline G, les aminopénicillines, les céphalosporines de première et de deuxième génération ainsi que l'ertapénème. Elle est également dotée d'une grande capacité adaptative lui permettant d'acquérir facilement et rapidement de nouvelles résistances (**Giamarellou et al., 2008**). En effet, deux β -lactamases interviennent dans la résistance naturelle d'*A. baumannii*, une céphalosporinase (AmpC) exprimée à bas niveau et une oxacillinase représentée par les variantes de OXA-51/69 [(**Naas et al., 2008**) ; (**Nordmann, 2010**)].

A. baumannii a acquis de multiples résistances aux principaux groupes antibactériens. Les mécanismes de résistance développés par cette espèce sont divers et englobent les enzymes d'inactivation, les pompes à efflux, l'imperméabilité et la modification de cibles ainsi que les supports génétiques (mutations, acquisition de transposons, plasmides, intégrons, séquences d'insertion promotrices...).

La résistance d'*A. baumannii* concerne de nombreuses classes d'antibiotiques à savoir les β -lactamines à large spectre, les aminosides et les fluoroquinolones [(**Lee et al., 2017**) ; (**Leungtonkam et al., 2018**)].

L'émergence de la résistance aux carbapénèmes est l'un des problèmes majeurs posés par la résistance aux antibiotiques car il existe peu d'alternatives thérapeutiques possibles. Les carbapénèmes demeurent les β -lactamines dont le spectre d'action est le plus large.

Leur activité est liée en particulier à la rapidité de leur pénétration à travers la paroi externe des bacilles à Gram négatif et à leur stabilité vis-à-vis de la plupart des β -lactamases naturelles ou acquises.

La résistance des souches d'*A. baumannii* aux carbapénèmes constitue un réel problème de santé publique. Elle est actuellement dominée par la production des β -lactamases à spectre élargi (BLSE) et de carbapénémases, OXA et métallo-enzymes [**Bakour et al. (2013)** ; (**Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014**)].

La multirésistance chez *A. baumannii* inclut habituellement la résistance à l'imipénème (**Nordmann, 2010**). Ainsi, aux Etats-Unis, il a été rapporté qu'entre 20 et 39,8% des isolats cliniques d'*A. baumannii* sont résistants à l'imipénème. Des taux de résistance de près de 30% sont rapportés en Afrique et en Asie et de 40% en Europe (**Grall et al., 2011**).

Les aminosides sont actifs sur les souches d'*A. baumannii* en raison de leur caractère bactéricide. Une évolution de la résistance aux aminosides a été également observée et on estime qu'environ 50% des souches d'*A. baumannii* sont résistantes à au moins un aminoside. Cette résistance est due à la présence de l'ARNr 16S méthylase ArmA chez plusieurs souches d'*A. baumannii* [(**Baba Ahmed-Kazi Tani et Arlet, 2014**) ; (**Lee et al., 2017**) ; (**Soukaina, 2017**)].

La résistance aux fluoroquinolones a été attribuée aux changements dans la structure de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV, impliquées dans la réplication et la synthèse des acides nucléiques. Ce type de résistance atteint actuellement des taux élevés de l'ordre de 50 à 70% [(**Maleki et al., 2014**) ; (**Rajih, 2019**)].

En 2013, **Bakour et al.**, ont mis en évidence un taux de résistance de 22-80% pour les aminosides et de plus de 90% pour les fluoroquinolones chez des souches d'*A. baumannii* d'origine algérienne. De ce fait, nous assistons à un regain d'intérêt pour la colistine, un ancien antibiotique abandonné pour sa toxicité potentielle et son faible pouvoir de diffusion dans les tissus muqueux.

La colistine reste le dernier recours efficace, utilisé en monothérapie ou en thérapie combinée, pour la prise en charge des infections à *A. baumannii* dans les établissements de santé. C'est un antibiotique de la famille des polymyxines (polypeptides cationiques), il possède une activité à large spectre vis-à-vis des bactéries à Gram négatif. Cette activité implique une interaction avec le lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe. Les mécanismes de résistance qui ont été récemment décrits impliquent la modification de la membrane externe

des lipopolysaccharides. Les taux de résistance aux polymyxines dans les études de surveillance restent très faibles [(Cafiso *et al.*, 2019) ; (Rajih, 2019)].

Plusieurs études ont également rapporté que la majorité des souches sont sensibles à la colistine, telles que celles réalisées au niveau national par **Bakour *et al.* (2013)**, **Boudia (2014)** et **Bouguenoun (2017)** et au niveau international par **Kaboré (2016)**, **Soukaina (2017)** et **Rajih (2019)**. En Algérie, la résistance à la colistine chez les *A. baumannii* a été détectée en 2014 par **Bakour *et al.* (2014)**. Elle a été associée à une mutation au niveau du gène *pmrB*.

3. Etude *in vitro* des facteurs de virulence

La résistance aux antibiotiques et les déterminants de virulence représentent les principaux traits de pathogénicité qui caractérisent les bactéries lors des infections associées aux soins. En effet, malgré que le phénomène de multi-résistance d'*A. baumannii* a été bien décrit, il n'en n'est pas de même pour sa virulence qui, selon **Antunes *et al.* (2011a)**, est multifactorielle (**McConnell *et al.*, 2013**).

La capacité de formation de biofilms est considérée comme le facteur de virulence le plus important chez *A. baumannii*. Généralement, les cellules sessiles ou en mode biofilm sont caractérisées par une résistance accrue aux antibiotiques par rapport à leurs homologues planctoniques (**Cerqueira *et al.*, 2014**).

En 2008, **Rodriguez *et al.***, ont montré que les souches d'*A. baumannii* isolées de cathéters veineux centraux et de sondes urinaires possèdent un potentiel élevé de formation de biofilms sur des surfaces abiotiques. Cette caractéristique est probablement liée à sa résistance aux antibiotiques et aux propriétés représentatives de survie sur les dispositifs médicaux dans un environnement hospitalier [(Costa *et al.*, 2006) ; (Richet and Fournier, 2006)].

3.1. Evaluation de l'adhérence et du potentiel des souches à former des biofilms

3.1.1. Formation de biofilms sur tubes de polystyrène

La **figure N°4** et la **photo N°1** représentent les quantités de biofilms formées par les cinq souches d'*Acinetobacter baumannii* sur tubes après 24 heures d'incubation à 37°C.

Les rapports DO 570/DO 600 sont de 0,377 ; 0,457 ; 0,511 ; 0,705 et 0,869 pour les souches **Acb 67**, **Acb 85**, **Acb 68**, **Acb 33** et **Acb 75** respectivement. La fixation la plus importante à la surface des tubes en polystyrène est obtenue avec la souche **Acb 75**.

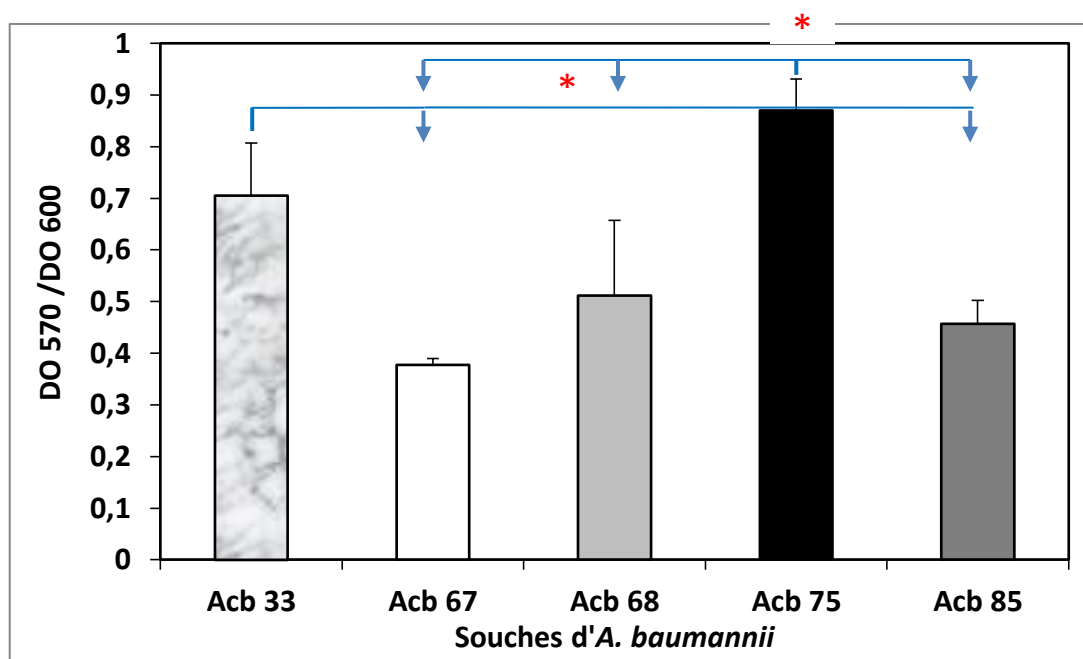


Figure N°4 : Quantification des biofilms formés par *A. baumannii* sur tubes en polystyrène
(Différence significative: * $P < 0,05$).

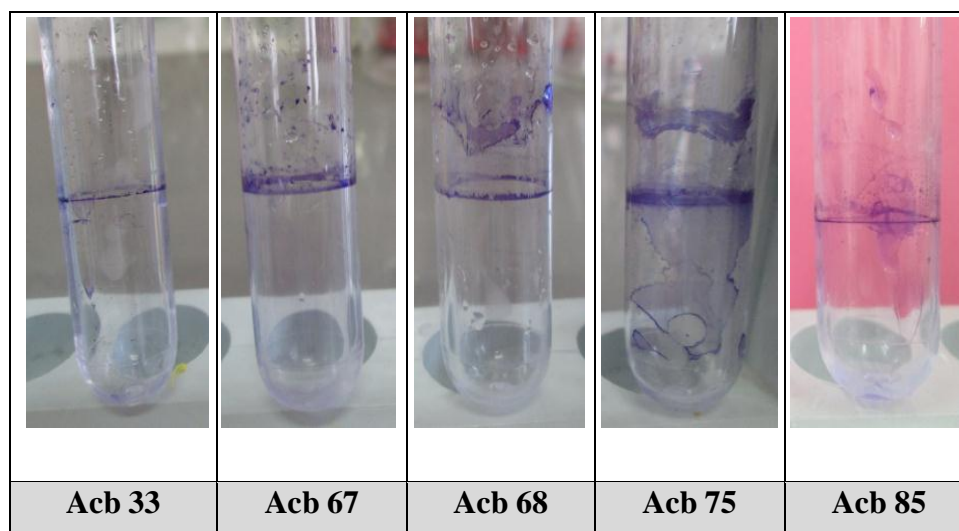


Photo N°1 : Aspects des tubes après coloration au cristal violet.

Les résultats obtenus montrent que les souches d'*A. baumannii* testées interagissent avec les surfaces hydrophobes telles que le polystyrène et forment des biofilms avec des quantités significativement différentes ($P < 0,05$). Ce résultat est en accord avec celui de **McQueary and Actis (2011)**. En effet, une différence significative ($P < 0,05$) dans le potentiel de formation de biofilms est observée, entre la souche **Acb 33** et les souches **Acb 67** et **Acb 85**, d'une part, et entre la souche **Acb 75** et les souches **Acb 67**, **Acb 68** et **Acb 85** d'autre part.

3.1.2. Formation de biofilms sur microplaques 96 puits

Les résultats relatifs à la quantification des biofilms formés, *in vitro*, par les cinq souches d'*Acinetobacter baumannii* sur microplaque 96 puits sont représentés sur la **figure N°5** et la **photo N°2**.

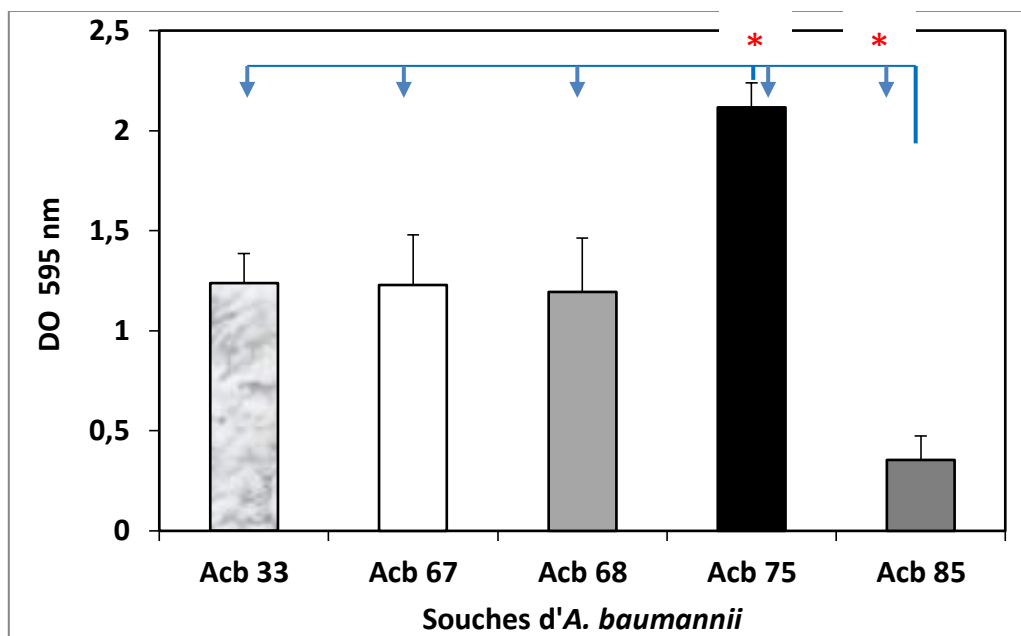


Figure N°5 : Quantification de la production de biofilms par *A. baumannii* sur microplaques (Différence significative: *P<0,05).

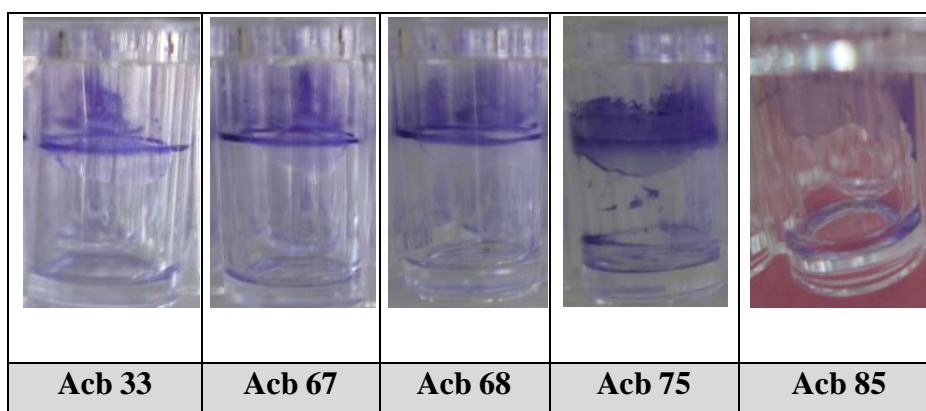


Photo N°2 : Aspects des puits après coloration au cristal violet.

Toutes les souches d'*A. baumannii* ont formé des biofilms sur les parois des puits de la microplaque à l'interface air-liquide (**Photo N°2**). Or, cette interface représente une niche favorable pour le développement des bactéries aérobies strictes qui peuvent obtenir l'oxygène à partir de l'atmosphère et les nutriments à partir du milieu liquide. Les biomasses des biofilms formés sont hétérogènes et significativement différentes ($P < 0,05$).

La comparaison de la biomasse des biofilms formés sur microplaques après 24 heures d'incubation à 37°C a révélé une différence significative ($P < 0,05$) entre les souches testées (comparaison deux à deux) à l'exception des trois isolats **Acb 33**, **Acb 67** et **Acb68**. De plus, selon les intervalles fixés par **Cevahir et al. (2008)**, les souches **Acb 33**, **Acb 67**, **Acb 68** sont considérées comme faiblement formatrices de biofilms, la souche **Acb 75** comme moyennement formatrice de biofilms alors que la souche **Acb 85** est non formatrice de biofilm.

Ce résultat va dans le même sens que celui de **Sechi et al. (2004)** qui ont montré que 16 souches d'*Acinetobacter* sur 20 sont capables de former des biofilms. Aussi, en **2008**, **Cevahir et al.**, ont révélé que 64 de souches d'*A. baumannii* sur 86 sont formatrices de biofilms.

Les souches **Acb 33**, **Acb 67** et **Acb 68** d'*A. baumannii* sont faiblement formatrices de biofilms malgré leur multirésistance aux antibiotiques, alors que la souche **Acb75**, sensible à deux antibiotiques, produit un biofilm moyen. Ce résultat est en accord avec les travaux de **Mc Queary and Actis (2011)** qui ont mis en évidence une différence significative entre les souches ayant une capacité d'attachement aux surfaces abiotiques, sans aucune relation apparente avec leur origine et leur résistance aux carbapénèmes.

Il est à noter que le phénotype de biofilms d'*A. baumannii* dépend de nombreux facteurs environnementaux, tels que la concentration des ions libres à savoir le calcium et le fer qui améliorent la formation de biofilm sur le plastique [(**Gaddy and Actis, 2009**) ; (**Singh et al., 2016**)].

La comparaison entre les résultats des deux techniques que nous avons utilisés pour la quantification de la biomasse des biofilms formés par les cinq souches d'*A. baumannii* a mis en évidence l'existence d'une corrélation moyennement positive ($r = 0,73$) (**Figure N°6**).

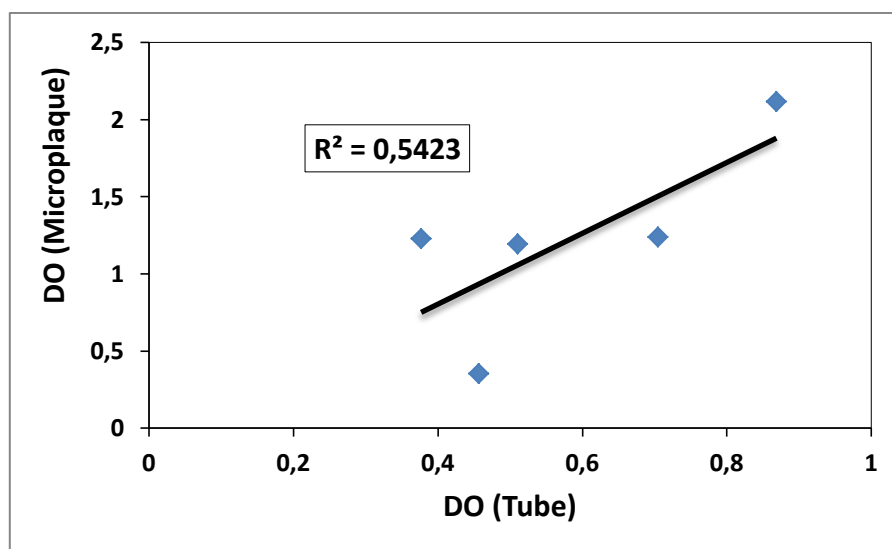


Figure N°6 : Courbe de corrélation entre la biomasse des biofilms formés sur microplaque et sur tube (R^2 : coefficient de détermination).

La formation de biofilm bactérien est toujours en transition entre deux états ; sessile et planctonique. En effet, afin d'évaluer la proportion de cellules planctoniques, non fixées sur microplaque et confirmer que les souches testées ne montrent aucune déficience de croissance au moment de l'évaluation de leurs potentiels à former des biofilms, les densités optiques sont également mesurées à 620 nm après 24 heures d'incubation à 37°C dans le milieu LB (**Figure N°7**).

Les seules différences significatives ($P < 0,05$) de la croissance des cellules planctoniques sont retrouvées entre **Acb 75** et **Acb 85** et les souches **Acb 33**, **Acb 67** et **Acb 68**.

Par ailleurs, les trois souches faiblement formatrices de biofilms (**Acb 33**, **Acb 67** et **Acb 68**) enregistrent les taux de cellules planctoniques les plus élevés (0,773 ; 0,744 ; 0,793) comparativement aux souches **Acb75** et **Acb 85** (considérées comme moyennement et non formatrice de biofilms respectivement) (0,687 ; 0,681).

Ainsi, il semble que les cellules sessiles formant les biofilms d'*A. baumannii* présentent un comportement différent de leurs homologues planctoniques. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature qui ont montré qu'en mode sessile, les bactéries présentent des caractéristiques très différentes des cellules planctoniques par leur morphologie, leur physiologie et leur expression génique [(**Bester et al., 2005**) ; (**Roux et Ghigo, 2006**) ; (**Smet et al., 2019**)].

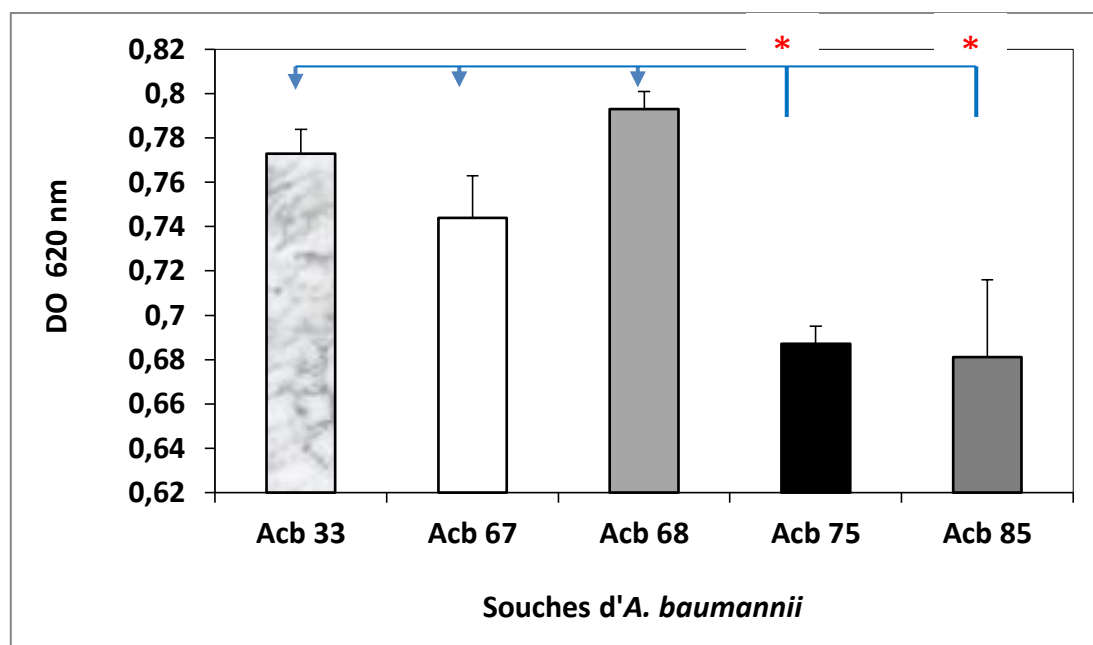


Figure N°7 : Croissance des cellules planctoniques d'*A. baumannii* sur bouillon LB

(Différence significative: * $P < 0,05$).

3.1.3. Mesure de l'activité métabolique des cellules sessiles

L'activité métabolique des cellules sessiles adhérentes d'*A. baumannii* est mesurée après 2 et 24 heures d'incubation à 37°C.

La **figure N°8** représente les valeurs relatives à l'activité métabolique des cellules sessiles d'*A. baumannii* mesurée après 2 heures d'incubation à 37°C. Une différence significative des activités métaboliques est observée entre les souches testées avec un $P < 0,05$.

La comparaison des souches deux à deux montre une différence significative ($P < 0,05$) de la formation de biofilm entre la souche **Acb 67** et les autres souches, alors qu'aucune variation significative ($P > 0,05$) de la production de biofilm n'est observée entre le reste des souches d'*A. baumannii*.

Il est important de signaler que la souche **Acb 85** non formatrice de biofilm par la technique de coloration au cristal violet a présenté la meilleure activité métabolique avec une densité optique de 0,409, tandis que la souche **Acb 67**, faiblement formatrice, a donné la plus faible activité métabolique (DO=0,226).

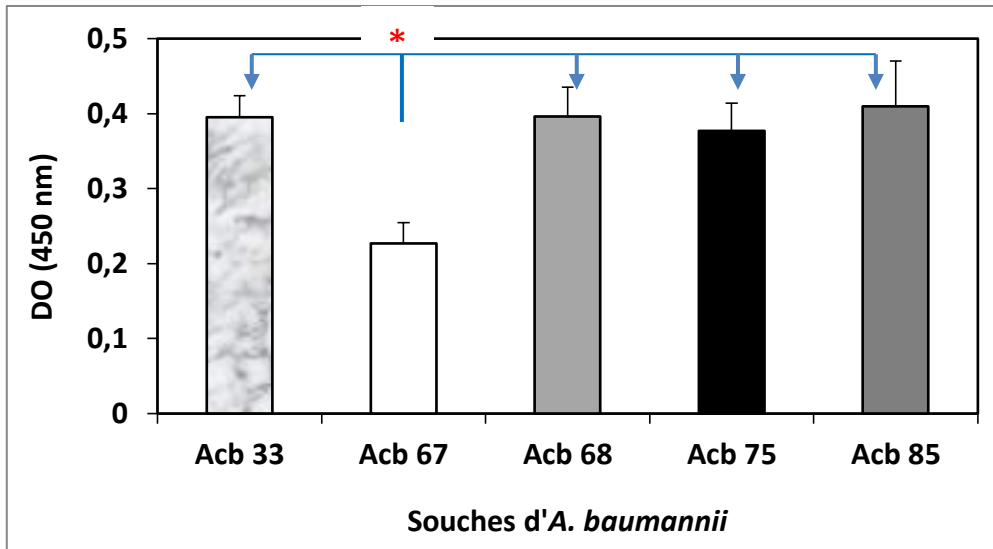


Figure N°8 : Activité métabolique des cellules sessiles d'*A. baumannii* mesurée après 2 heures d'incubation à 37°C (Différence significative: *P<0,05)

En revanche, après 24 heures d'incubation à 37°C, aucune variation significative ($P > 0,05$) de l'activité métabolique des cellules sessiles n'est observée entre les cinq souches d'*A. baumannii* (**Figure N°9 et Photo N°3**). En comparant les souches deux à deux, nous remarquons une différence significative ($P < 0,05$) entre l'activité métabolique de la souche **Acb 85** et celles des souches **Acb 67** et **Acb 68**.

De même, après 24 heures d'incubation, la valeur la plus importante (0,838) est obtenue avec la souche **Acb 85** et la plus faible 0,387 pour la souche **Acb 67**.

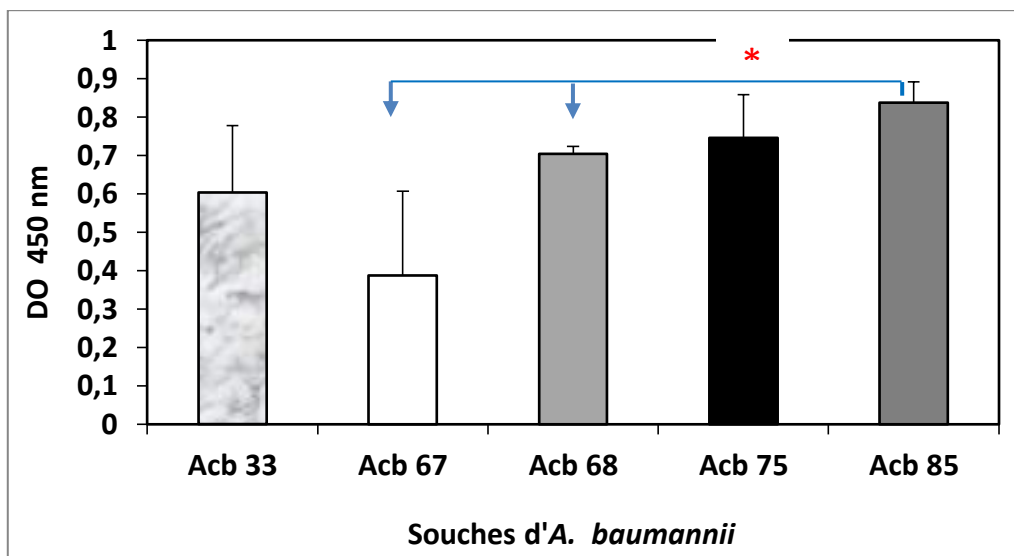


Figure N°9 : Activité métabolique des cellules sessiles d'*A. baumannii* mesurée après 24 heures d'incubation à 37°C (Différence significative: *P<0,05).

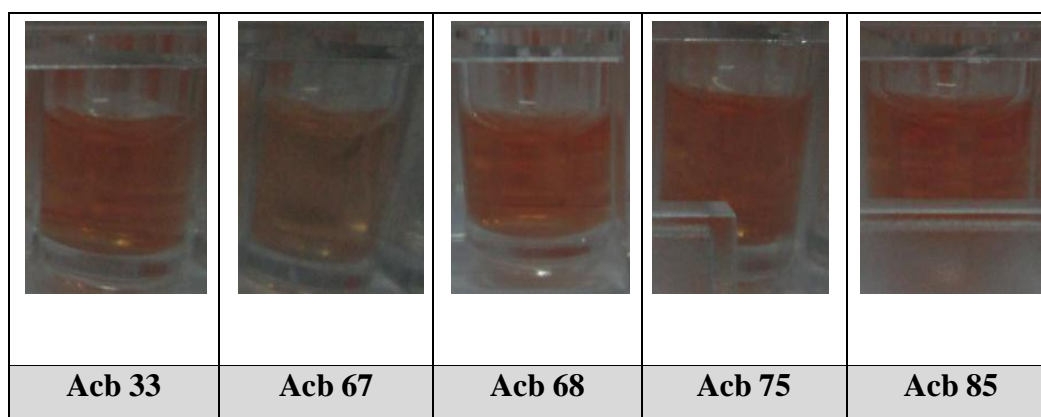


Photo N°3 : Aspects des puits après action du XTT

Une augmentation significative ($P < 0,05$) de l'activité métabolique des cellules sessiles des souches **Acb 68**, **Acb 75** et **Acb 85** est observée lorsque le temps d'incubation passe de 2h à 24h (**Figure N°10**).

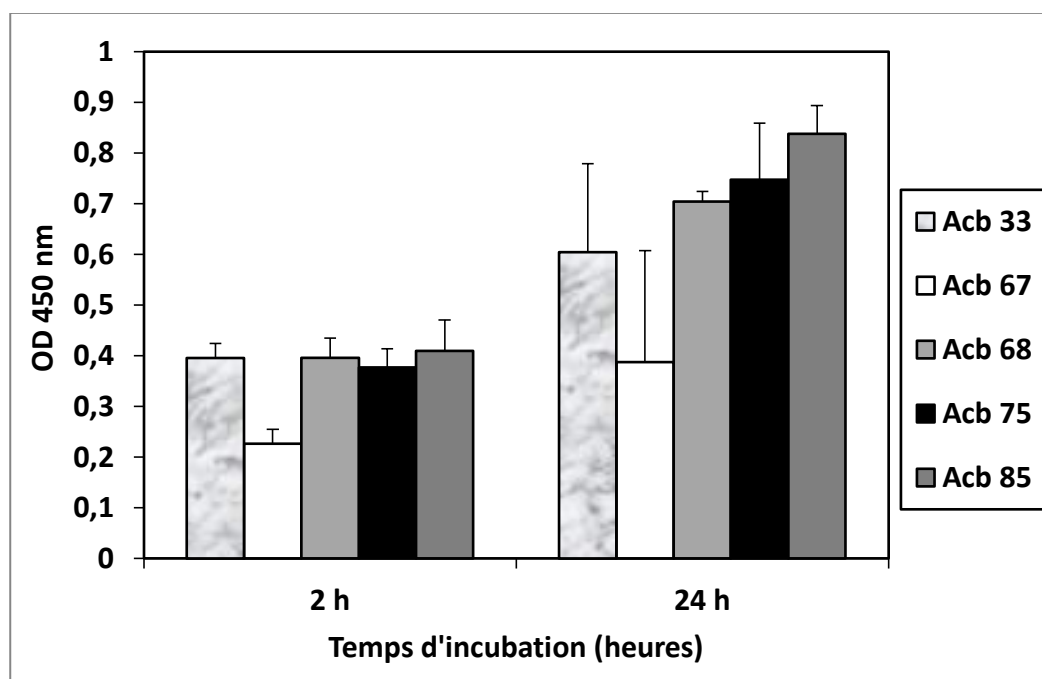


Figure N°10 : Activités métaboliques des souches testées au sein d'un biofilm après 2 et 24 heures d'incubation à l'abri de la lumière.

Ces résultats sont nettement supérieurs à ceux de **Hendiani et al., (2014)**. Selon **Silva et al. (2008)**, la réduction du XTT dépend de l'activité cellulaire et non de la masse cellulaire.

La **figure N°11**, révèle une corrélation faible et décroissante (négative) entre les résultats de l'activité métabolique des cellules sessiles d'*A. baumannii* obtenus par la méthode de réduction du XTT et la méthode de coloration au cristal violet ($r = -0,19$).

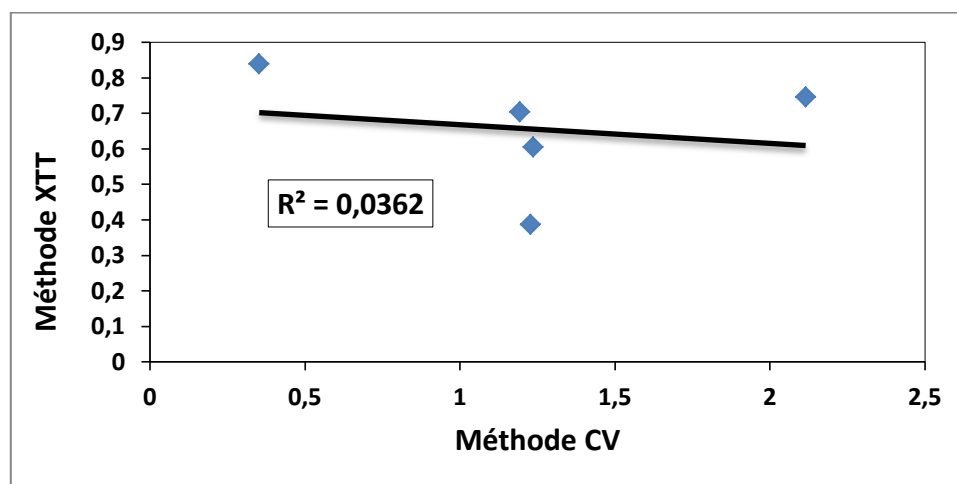


Figure N°11 : Courbe de corrélation entre la méthode de réduction du XTT et la méthode de quantification de la biomasse au cristal violet (R^2 : coefficient de détermination).

Les deux méthodes que nous avons utilisées n'ont pas donné les mêmes résultats. Cela est probablement lié au fait que la réduction du XTT mesure l'activité des cellules viables au sein du biofilm et est basée sur la respiration des bactéries, alors que le cristal violet peut colorer les cellules actives et la matrice extracellulaire d'un biofilm mature [(Li *et al.*, 2003) ; (Hendiani *et al.*, 2014)].

3.1.4. Observation au microscope électronique à balayage de biofilm d'*A. baumannii*

Pour mettre en évidence l'architecture des biofilms formés *in vitro* par *Acinetobacter baumannii* par Microscopie Electronique à Balayage (MEB), nous avons utilisé, comme support, le matériel constituant les sondes urinaires.

Après 6 jours d'incubation à 37°C, les observations faites au MEB ont permis de visualiser une monocouche fine de cellules d'*A. baumannii* fixée à la surface du substrat et surmontée de plusieurs couches épaisses de cellules. Il s'agit d'une organisation spatiale stratifiée (**Photo N°4 A et B**).

Les cellules d'*A. baumannii* apparaissent sous forme de coccobacilles isolées, groupées en paires ou en chaînes de longueurs variables et liées les unes aux autres par le biais d'un réseau dense de polymères extracellulaires (**Photo N°4 C**).

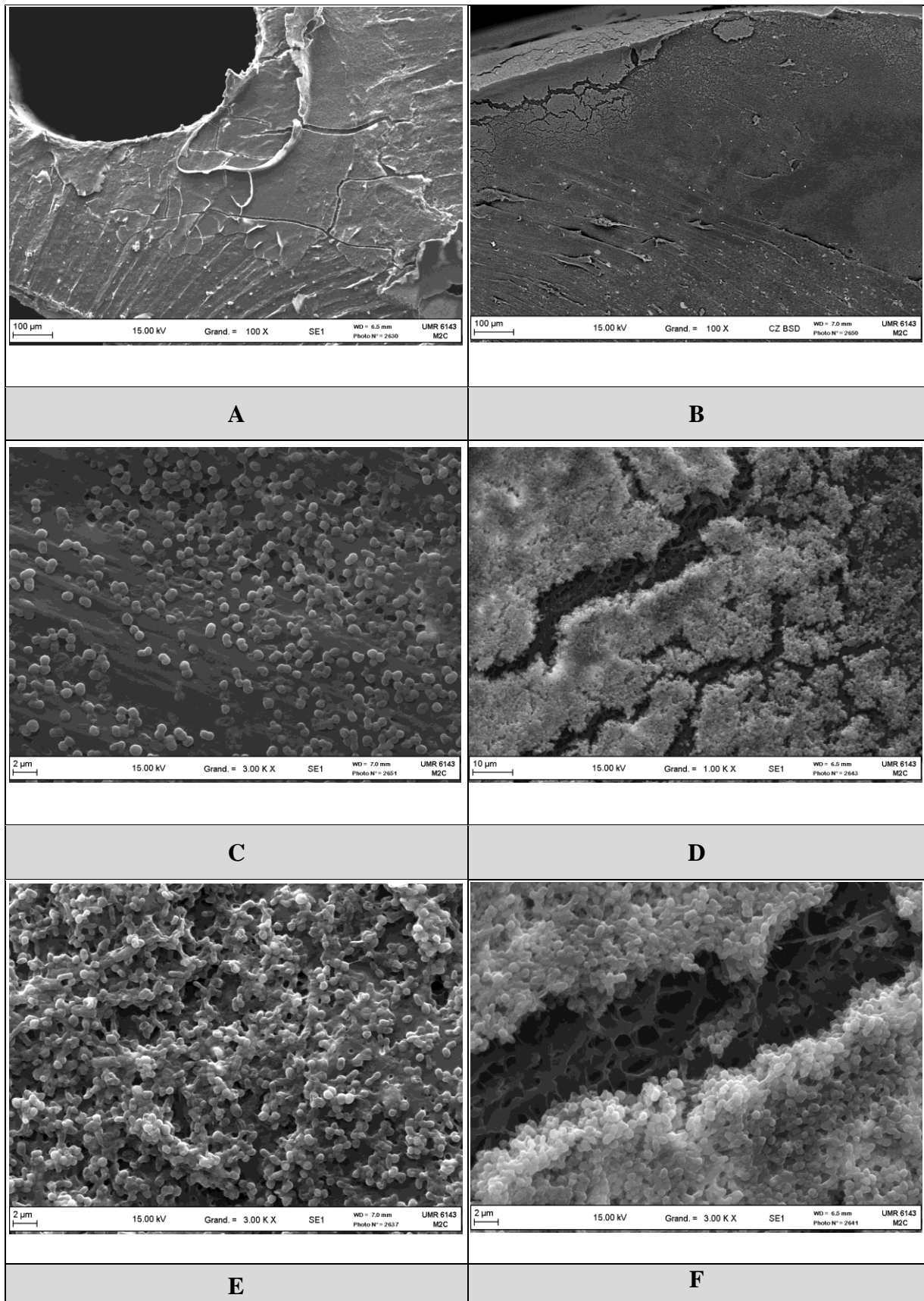


Photo N°4 : Microphotographie d'un biofilm d'*A. baumannii* formé sur sonde urinaire (A et B: X 100, C et D : X 1000, E et F : X 3000).

La **photo N°4 (D, E et F)** révèle la présence d'agrégats cellulaires englobés dans une matrice protectrice d'exopolysaccharides. Ces biofilms sont séparés par des « canaux aqueux » assurant l'échange d'informations, la circulation des fluides, l'apport de nutriments à la bactérie et l'élimination de leurs produits de dégradation.

L'architecture des biofilms formés par notre isolat clinique d'*A. baumannii* est similaire à celle observée par **Flynn et al. (2019)** et **Yang et al. (2019)**. Ces auteurs ont montré également que les biofilms d'*A. baumannii* ont une structure typique identique à celle des autres bactéries formatrices de biofilms telle que *P. aeruginosa*. Cette organisation permet au microorganisme de croître sous diverses conditions et elle est caractéristique des biofilms formés sur les implants médicaux invasifs [(**Djeribi et al., 2012**) ; (**Veerachamy et al., 2014**)].

3.2. Croissance d'*A. baumannii* dans des conditions limitées en fer

3.2.1. Croissance sur milieu M9

Le **tableau N°5** regroupe les résultats de la croissance des cinq souches d'*A. baumannii* testées sur milieu M9 en présence de concentrations croissantes de 2,2'-dipyridyl (DIP) après 24 heures d'incubation à 37°C.

Toutes les souches testées ont la capacité de croître sur gélose M9 additionnée de 50 et 100µM de DIP. Une faible croissance est observée à 200µM de DIP, alors qu'une inhibition totale de la croissance est obtenue avec 300µM de DIP.

Tableau N°5 : Croissance des souches d'*A. baumannii* sur gélose M9 additionnée de différentes concentrations de DIP (+: Présence de croissance et -: Absence de croissance).

	Acb 33	Acb 67	Acb 68	Acb75	Acb 85
0 DIP	+++	++	++	++	++
50 DIP	++	+++	+++	++	++
100 DIP	++	++	++	++	++
200 DIP	+	+	+	+	+
300 DIP	-	-	-	-	-

Ce résultat ne va pas dans le même sens que celui d'**Actis et al. (1993)**, qui ont montré que 12 souches cliniques d'*A. baumannii* étaient capables de croître en présence de 200µM de DIP. Il est important de signaler que ces souches étaient préalablement cultivées sur bouillon M9 additionné de différents chélateurs de fer à savoir l'apo-transferrine humaine (TE), 2,2'-dipyridyl (DIP), ethylenediamine-di-(o-hydroxyphenyl) acétique (EDDA), et l'acide nitrilotriacétique pour assurer leur adaptation à des conditions limitées en fer.

3.2.2. Croissance sur milieu LB

Nous avons testé également le milieu LB sous forme solide et liquide.

a. Croissance sur gélose LB

Une croissance des cinq souches d'*A. baumannii* testées est observée sur gélose LB supplémentée de 50 et 100µM de DIP (**Photo N°5**). En revanche, en présence de 200µM de DIP, seules les souches **Acb 67**, **Acb 68** et **Acb 75** ont pu se développer, alors qu'à 300µM de DIP, à l'exception de la souche **Acb 75**, une inhibition totale de la croissance des souches est observée.

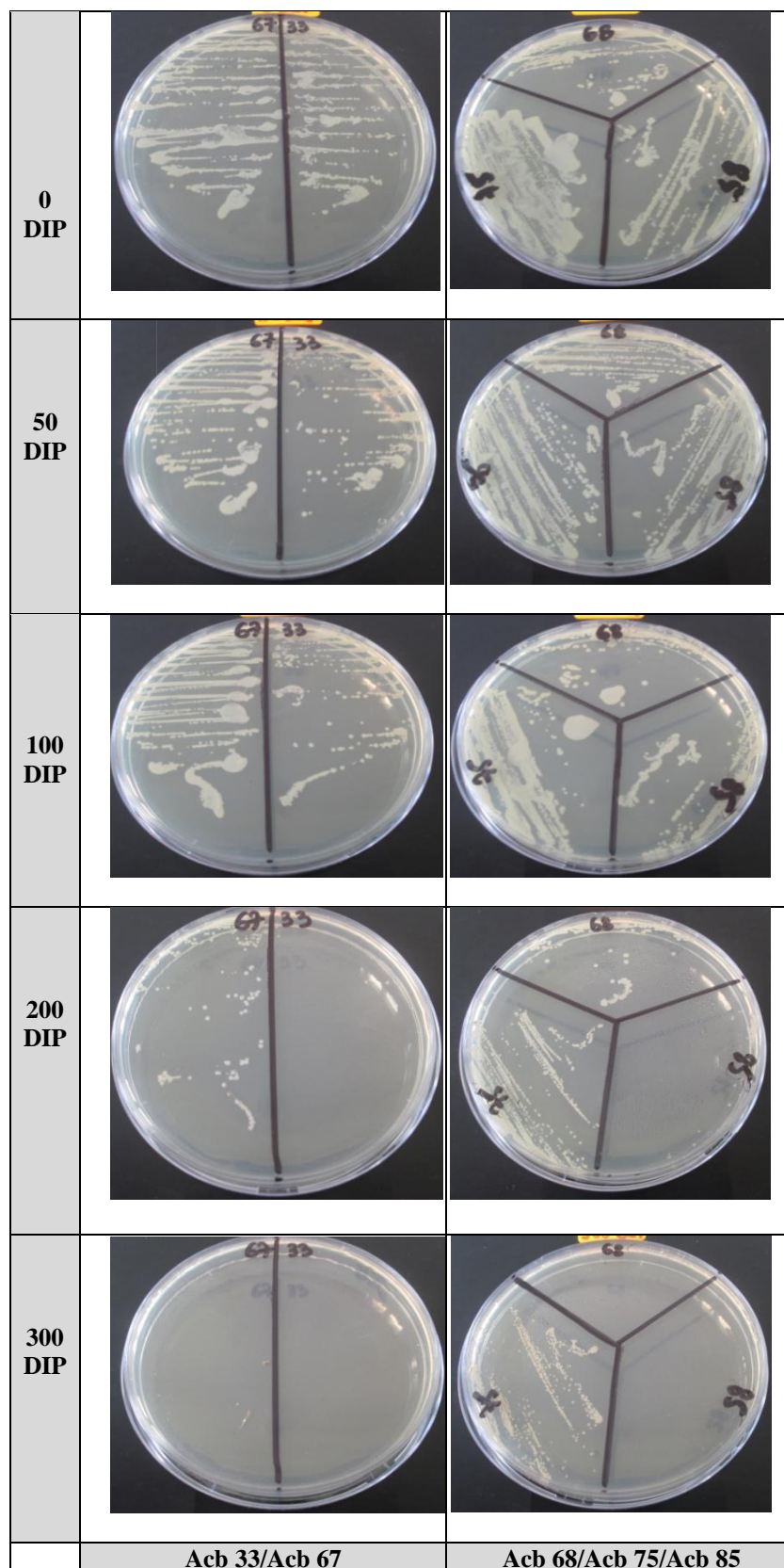


Photo N°5 : Croissance des souches d'*A. baumannii* sur gélose LB contenant un gradient de DIP (0-300 μ M).

b. Croissance sur bouillon LB

La **figure N° 12** représente l'effet des différentes concentrations de DIP sur la croissance des cinq souches d'*A. baumannii* testées.

Les résultats obtenus montrent que l'addition du DIP à 50 et 100µM, n'induit pas de changements significatifs des taux de croissance de nos isolats cliniques d'*A. baumannii*. Ceci est en accord avec les travaux de **Braun and Vidotto (2004)** qui ont révélé que les souches d'*A. baumannii* sont capables de croître sur gélose M9 contenant 50µM de DIP.

Par ailleurs, après 24 heures d'incubation, une réduction de la valeur de la densité optique à 620nm est observée dans les cultures contenant 200 et 300µM de chélateur de fer. En effet, en présence d'une concentration de 200µM de DIP, l'analyse statistique montre une différence significative ($P < 0,05$) entre la croissance de la souche **Acb 33** et celle de la souche **Acb 68** mais aucune différence significative ($P > 0,05$) entre les trois souches **Acb 33**, **Acb 67** et **Acb 85**. Aussi, une différence significative ($P < 0,05$) est observée entre la souche **Acb 75** et le reste des souches. Cette souche apparaît comme étant la plus résistante dans des conditions limitées en fer. En revanche, à 300µM de DIP, aucune différence significative ($P > 0,05$) de la croissance entre les trois souches **Acb 33**, **Acb 67** et **Acb 68** n'est observée. Tandis qu'une différence significative ($P < 0,05$) existe, d'une part, entre la souche **Acb 75** et les autres souches et entre la souche **Acb 85** et les autres souches d'autre part.

Les souches **Acb 85** et **Acb 75** ont montré une haute aptitude à supporter la limitation en fer avec un effet plus important pour la souche **Acb 75**.

Selon les travaux de **Dorsey et al. (2003)**, les systèmes d'absorption de fer exprimés par *A. baumannii*, pathogène opportuniste de l'homme, sont complexes et variables. Il existe des variations significatives dans l'expression des éléments impliqués dans l'acquisition de fer parmi les différentes souches nosocomiales d'*A. baumannii* et même à l'intérieur des souches obtenues lors de manifestations particulières (**Echenique et al., 1992**).

L'addition de 200µM de DIP au milieu de culture provoque une réduction de plus de 50% de la biomasse totale pour la souche **Acb 85**. Contrairement à la concentration de 300µM de DIP ou un taux d'inhibition d'environ 90% est obtenu pour les souches **Acb 33**, **Acb 67** et **Acb 68** (**Figure N°13**). Ces résultats vont dans le même sens que ceux d'**Eijkelkamp et al. (2011b)**.

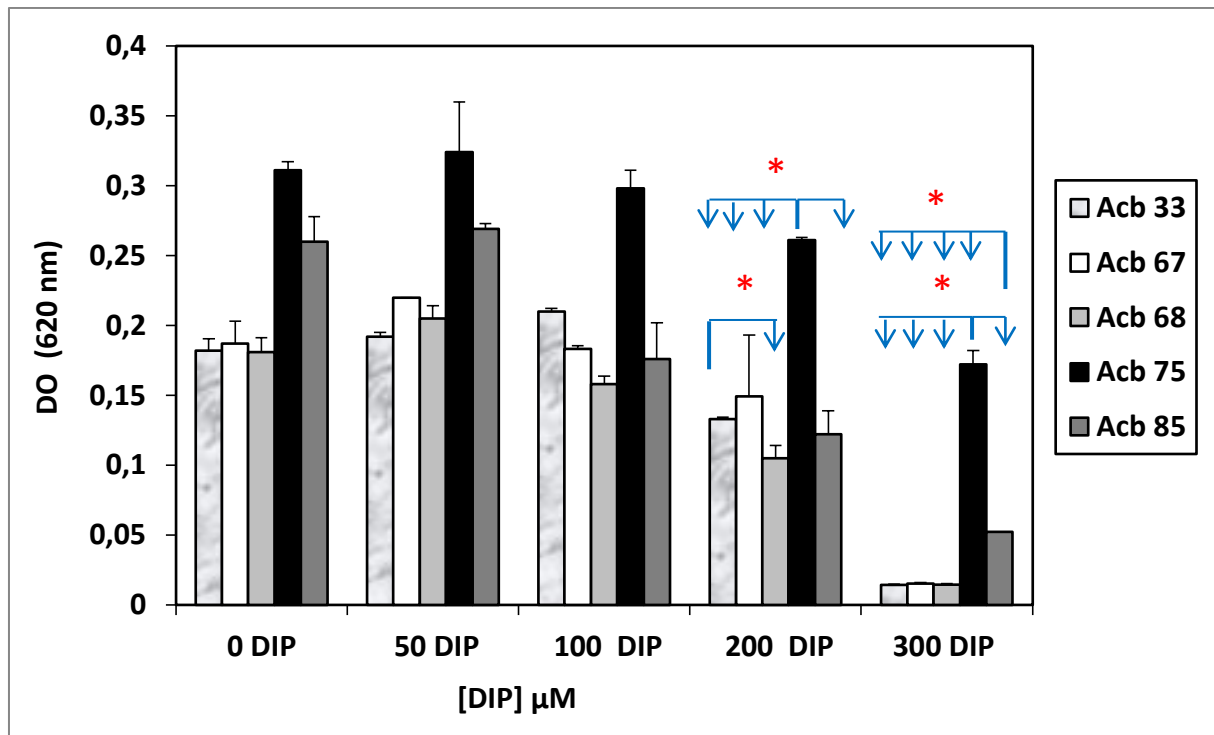


Figure N°12 : Effet de déficience en fer sur la croissance des souches d'*A. baumannii*

(Différence significative: * $P < 0,05$).

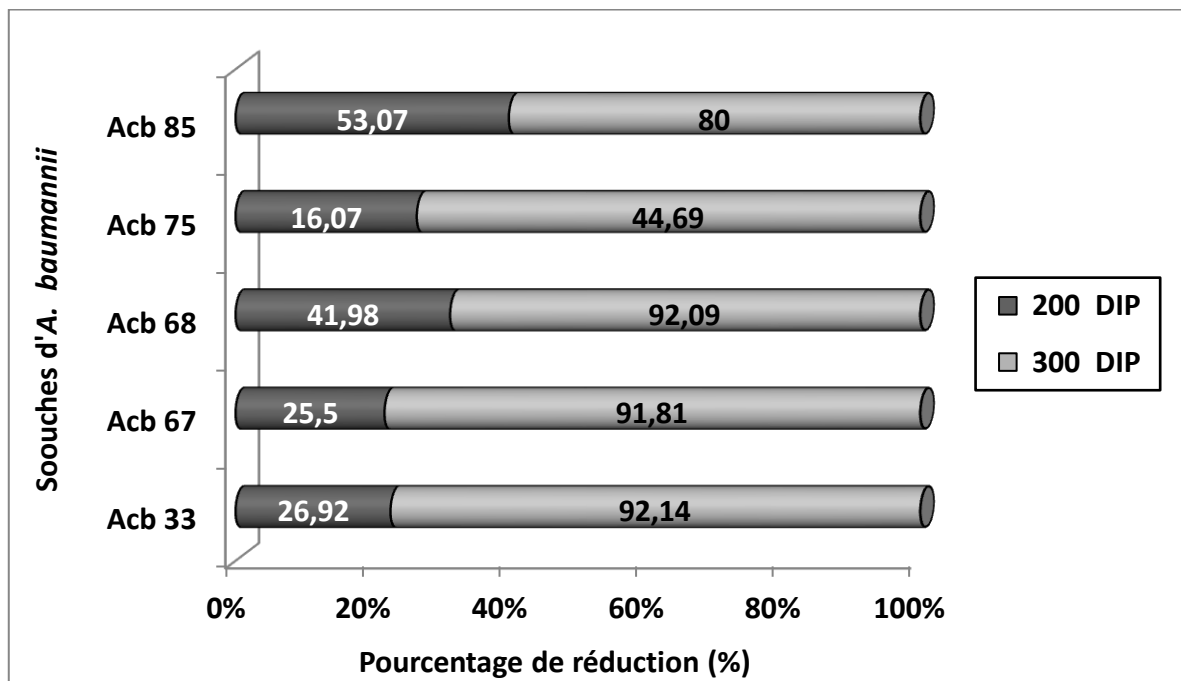


Figure N°13 : Pourcentages de réduction des biomasses des souches d'*A. baumannii* après

culture sur bouillon LB contenant 200 et 300 μM de DIP.

Il ressort de cette partie de l'étude qu'*A. baumannii* peut s'adapter à un environnement avec une disponibilité limitée en fer. Cela est probablement lié à la présence de plusieurs systèmes d'acquisition de fer chez cette bactérie, tous codés par le chromosome des souches hospitalières (**Antunes et al., 2011b**).

Acinetobactin, est le sidérophore, produit par *A. baumannii*, le plus étudié. Il possède la fonction de réserver le fer à partir de la transferrine et de la lactoferrine, générer l'infection et éliminer les larves du papillon *Galleria mellonella* et de la souris [(**Antunes et al., 2012**) ; (**Gaddy et al., 2012**)].

Ces caractéristiques montrent une exceptionnelle adaptabilité de croître dans des conditions limitées en fer et soulignent le rôle important de métabolisme de fer dans la virulence d'*A. baumannii* (**Antunes et al., 2012**).

3.3. Recherche de la gélatinase

La gélatinase est une protéase capable d'hydrolyser la gélatine, le collagène, la caséine, l'hémoglobine, et autres peptides bioactifs. Les protéinases sont associées à l'inflammation, et contribuent à la virulence chez le modèle animal et également humain (**Cevahir et al., 2008**).

Après 24 heures d'incubation à 37°C, la croissance des cinq souches d'*A. baumannii* s'est traduite par l'apparition de grosses colonies sur gélose LB contenant 3% de gélatine (**Photo N°6 A**). Par conséquent, elles sont non productrices de gélatinase (Gélatinase négative), contrairement à la souche de *Pseudomonas aeruginosa* (**PA**) que nous avons utilisé (comme contrôle positif) qui a exprimé un halo turbide important signifiant la production d'une gélatinase (Gélatinase positive) (**Photo N°6 B**).

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Sechi et al. (2004)**, qui n'ont pas détecté l'activité gélatinase chez les souches d'*A. baumannii*. En revanche, **Cevahir et ses collaborateurs (2008)**, ont mis en évidence la gélatinase chez 14% de souches d'*A. baumannii*.

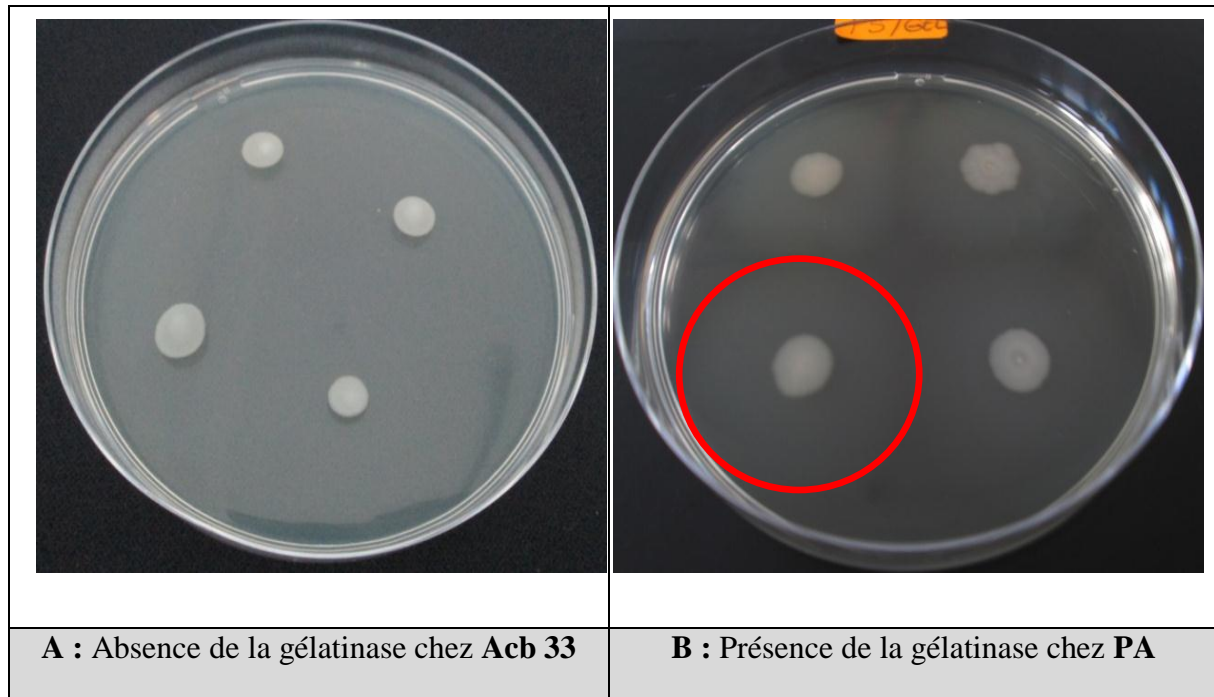


Photo N°6 : Résultats du test de recherche d'une gélatinase.

3.4. Etude de la mobilité des souches

Deux types de mobilités sont recherchés sur nos isolats cliniques d'*A. baumannii*, le Twitching et le Swarming. Ces deux types de mobilité représentent deux phénotypes distincts chez les *Acinetobacter*.

Les phénotypes de mobilité sont déterminés suivant les classifications des Twitching et Swarming (Kaiser, 2007).

P. aeruginosa est utilisée comme souche de référence pour ces expériences étant donné que la mobilité est un facteur de sa virulence (Aларcon *et al.*, 2009).

3.4.1. Mobilité de type Twitching

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches ont la capacité de migrer à l'interface du milieu gélosé à l'exception de la souche **Acb 68**. La souche **Acb 75** s'est montrée la plus mobile (18mm) suivie de la souche **Acb 85** (17,5mm) et d'**Acb 33** (13mm). La souche **Acb 67** est la moins mobile avec un diamètre de croissance de 12mm (Photo N°7).

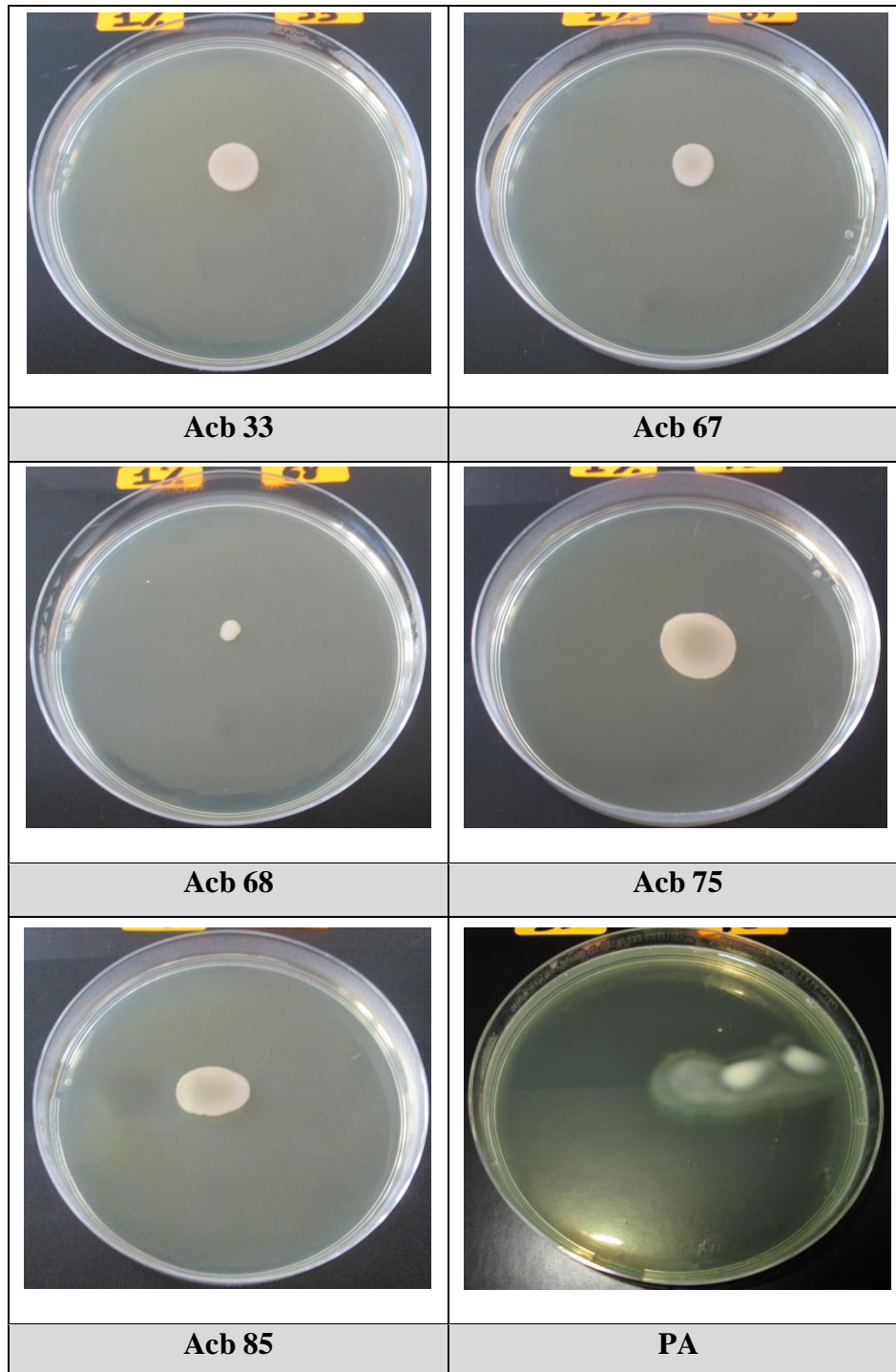


Photo N°7 : Croissance des souches d'*A. baumannii* et de *P. aeruginosa* sur bouillon LB additionné de 1% d'agar.

3.4.2. Mobilité de type Swarming

Les diamètres de croissance mesurés pour les souches étudiées sont inférieurs à 12mm (**Photo N° 8**). Nos isolats cliniques n'ont pas la capacité de migrer sur milieu semi-solide (0,25% d'agar).

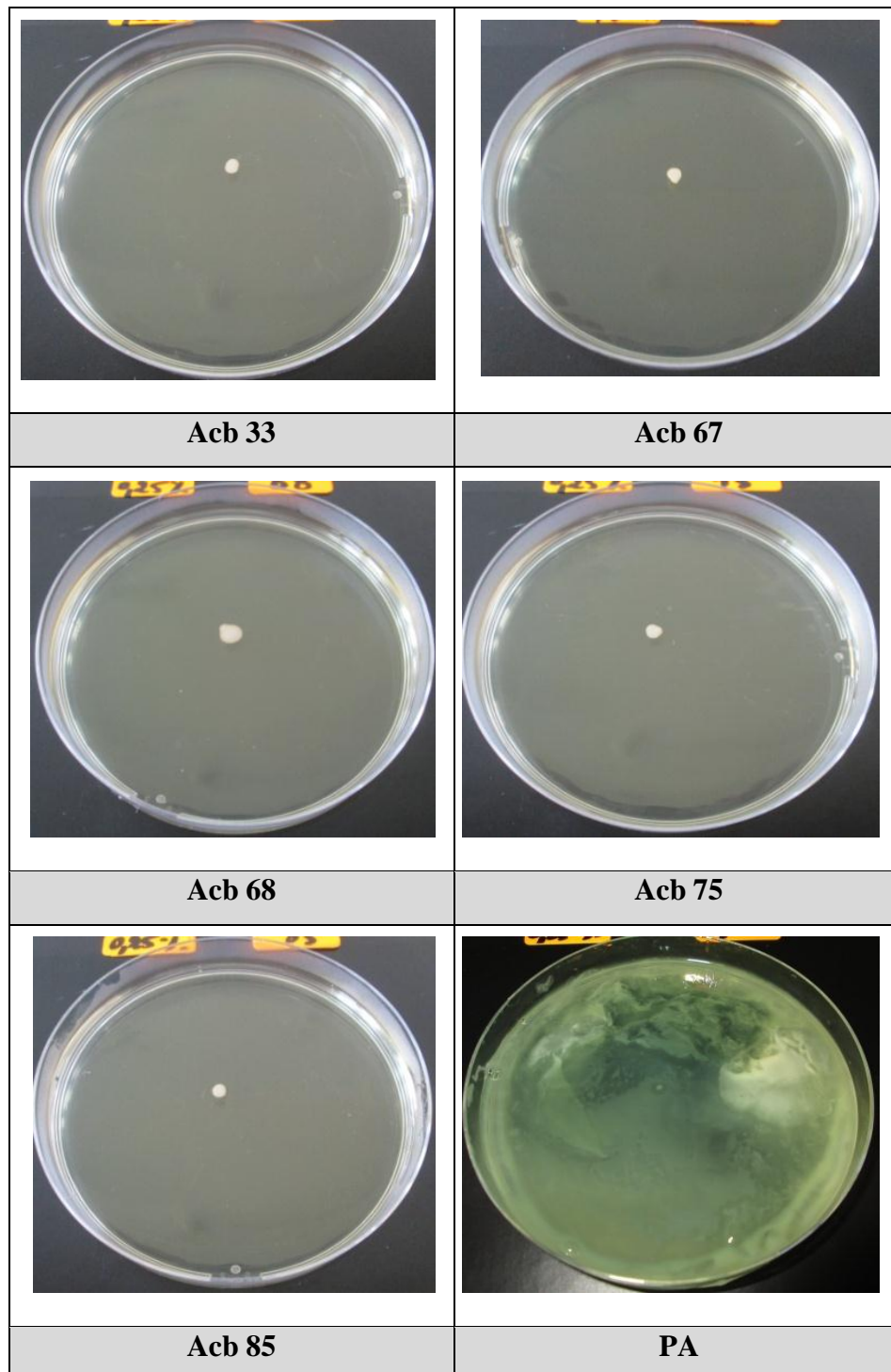


Photo N°8 : Croissance des souches d'*A. baumannii* et de *P. aeruginosa* sur bouillon LB additionné de 0,25% d'agar.

Les résultats obtenus pour cette partie de l'étude ont montré qu'à l'exception d'**Acb 68** qui s'est montrée immobile, les souches *A. baumannii* testées présentent des phénotypes de mobilité identiques de type Twitching.

Ceci est en accord avec les travaux de **Eijkelkamp et al. (2011a)** qui ont montré que malgré que la majorité des souches cliniques d'*A. baumannii* sont immobiles, certaines ont présenté un phénotype de mobilité de type Twitching ou Swarming. Ces mêmes auteurs ont montré également que, chez les souches présentant le phénotype de mobilité Twitching, le pila possède un degré élevé de conservation de sa séquence d'acides aminés. Il peut, par conséquent, jouer un rôle dans la mobilité de cette espèce.

Par ailleurs, la souche la plus mobile en l'occurrence **Acb 75**, présente le meilleur potentiel de formation de biofilm sur tubes et microplaque en polystyrène et l'activité métabolique la plus importante. L'étude statistique a mis en évidence une forte corrélation entre la mobilité de cette souche et sa capacité à former un biofilm.

Pour les autres souches d'*A. baumannii* que nous avons étudiées, aucune corrélation entre la mobilité cellulaire et la formation de biofilm n'est observée. Les souches mobiles semblent former des biofilms comparables à celui formé par la souche immobile (**Acb 68**).

Ce résultat va dans le même sens que celui de **Mc Queary and Actis (2011)**. Ces auteurs se sont intéressés à la comparaison du phénotype de formation de biofilm d'*A. baumannii* ATCC 19606^T avec 8 souches cliniques. Ils ont montré que le phénotype de mobilité était variable entre les 8 souches cliniques d'*A. baumannii* et que cette propriété cellulaire n'est pas corrélée directement avec la formation de biofilm sur surfaces abiotiques.

3.5. Test d'hémagglutination

Les résultats des tests d'hémagglutination des cinq souches d'*A. baumannii* sont représentés sur la **photo N°9**.

Nous remarquons que toutes les souches peuvent agglutiner les érythrocytes en absence de mannose. Il est à noter qu'aucune réaction n'est produite en présence de ce monosaccharide. La réaction d'hémagglutination des souches testées est par conséquent, sensible au D-mannose. De même, les réactions positives d'hémagglutination sont obtenues avec les puits contenant une concentration bactérienne importante. La souche **Acb 85**, exprime une importante activité d'agglutination par rapport aux autres souches. En effet, l'activité HA positive est observée jusqu'à la dilution **1:16**. Les souches **Acb 33**, **Acb 68** et **Acb75**, ont exprimé des réactions HA positives identiques pour quatre dilutions (**1:1**, **1:2**, **1:4**, et **1:8**). Cependant, la souche **Acb 67** agglutine les érythrocytes seulement à trois concentrations ; **1:1**, **1:2** et **1:4**.

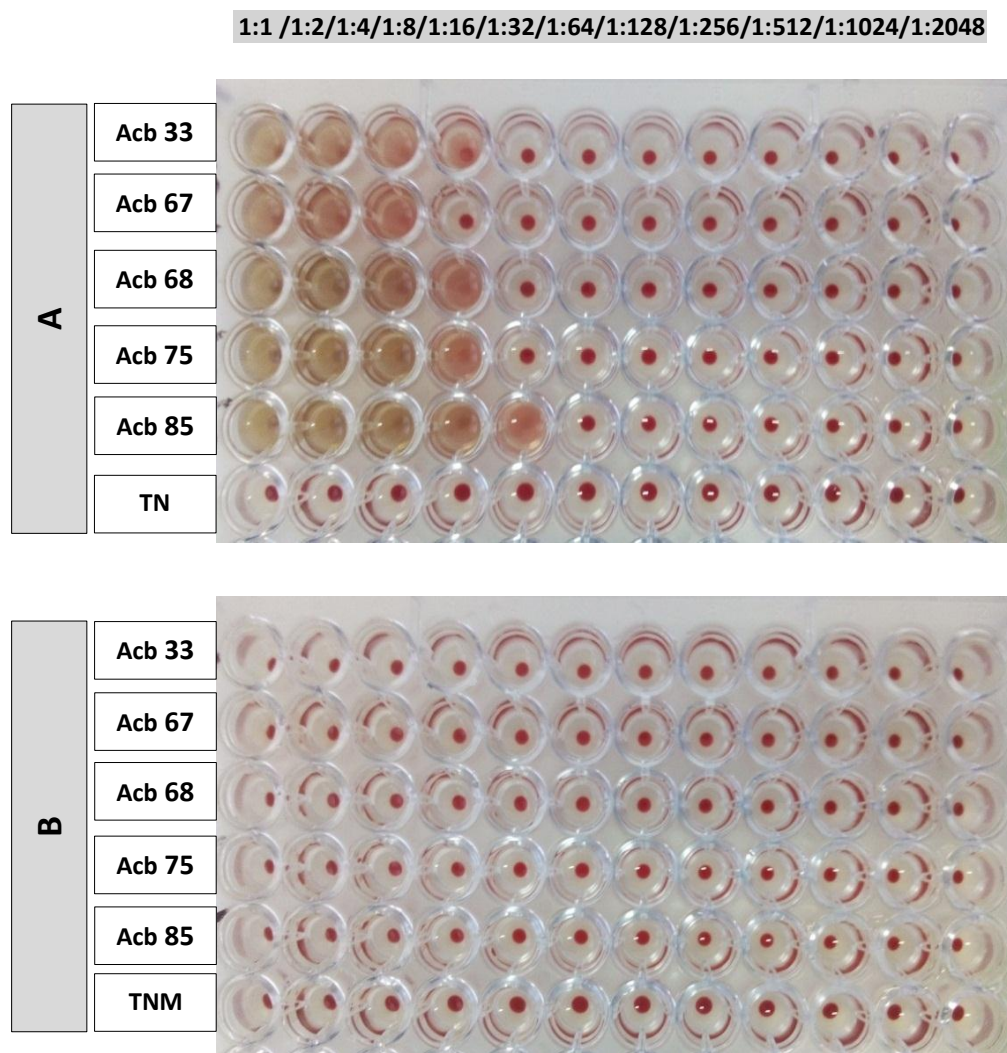


Photo N°9 : Activité de l'hémagglutination chez les souches d'*A. baumannii*

(**A :** Puits sans Mannose, **TN :** témoin négatif, puits contenant la suspension d'érythrocytes à 1%, **B :** Puits avec Mannose, **TNM :** témoin négatif, puits contenant la suspension composé de 1% d'érythrocytes et 1% D-Mannose).

En 2004, **Braun and Vidotto (2004)** ont vérifié l'expression de plusieurs hémagglutinines mannose résistantes désignées comme fimbriae de type P, S, Dr, et F, fréquemment retrouvés chez *E. coli* et chez *A. baumannii*. Ce travail a révélé que sur 13 souches uropathogènes d'*A. baumannii*, 9 ont pu agglutiner des érythrocytes humaines en présence de mannose. De plus, le fimbriae chez *A. baumannii* impliqué dans l'adhérence est probablement mannose résistant, malgré que le mécanisme d'adhérence aux cellules épithéliales humaines reste encore non élucidé.

Selon **Cevahir et al. (2008)**, la présence de structures de type fimbriae, chez *A. baumannii*, est en parfaite corrélation avec leur capacité d'agglutiner les globules rouges humains.

Les données obtenues des études basées sur la microscopie électronique et de l'activité d'hémagglutination, suggèrent que le fimbriae et le pili d'*A. baumannii* participent à son adhésion aux globules rouges (Cevahir *et al.*, 2008). Selon ces mêmes auteurs, certaines souches cliniques d'*A. baumannii* ont agglutiné les globules rouges en présence de mannose. Le pili épais est donc essentiel à l'adhésion aux érythrocytes et aux surfaces hydrophobes.

La capacité d'une variété de bactéries entéropathogènes à provoquer une réaction d'hémagglutination d'érythrocytes est considérée comme un facteur de virulence étant donné qu'elle est liée au potentiel d'adhésion des cellules bactériennes aux cellules épithéliales. Il est à noter que l'adhésion est l'étape cruciale dans la pathogénie des infections entériques (Ali Shareef *et al.*, 2010).

L'interaction microbe/hôte dépend des molécules d'adhérence présentes à la surface bactérienne, qui reconnaissent des récepteurs spécifiques de la cellule hôte. Ces réactions sont classées en sensibles ou résistantes selon la capacité du D-mannose ou de ses dérivés à inhiber l'hémagglutination (Ali Shareef *et al.*, 2010). Ces auteurs ont montré que *Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.* et *Proteus sp.*, responsables d'infections digestives humaines, ont pu exprimer une activité HA sensible ou résistante des érythrocytes humains.

4. Etude *in vivo* de la virulence d'*A. baumannii*

L'induction d'une pyélonéphrite expérimentale chez la souris, une infection urinaire ascendante, est réalisée par la souche *A. baumannii* (Acb 67).

4.1. Effet sur la croissance corporelle

Pendant toute la durée de l'expérimentation, aucune mortalité n'est détectée chez les souris infectées.

Avant sacrifice, le poids corporel des souris est mesuré et est exprimé en moyennes \pm l'écart-type. Les résultats ont révélé que le poids corporel moyen (PC) des souris témoins était de 25,39g \pm 1,27, et celui des souris infectées par *A. baumannii* était de 24,52g \pm 1,87.

4.2. Effet sur le poids des organes urinaires

Le poids des tissus (PT) et relatif (PR) (g/100g de PC) des organes clé du système urinaire à savoir la vessie et les reins sont également déterminés. Nous avons constaté que le PT et le PR de la vessie et des reins diminuent dans le lot infecté par rapport au lot témoin (Tableau N°6).

Tableau N°6 : Poids tissulaires (PT) et poids relatifs (PR) des organes urinaires des souris Swiss.

Lots	Poids des Tissus (g) PT		Poids Relatif des tissus PR	
	Vessie	Rein	Vessie	Rein
Lot témoin	0,027±0,009	0,120±0,012	10,60x10 ⁻⁶ ±3,73x10 ⁻⁶	4,67x10 ⁻⁵ ± 5,16x10 ⁻⁶
Lot infecté par (Acb)	0,017±0,004	0,113±0,024	06,77x10 ⁻⁶ ±1,68x10 ⁻⁶	4,48x10 ⁻⁵ ±6,41x10 ⁻⁶
Lot infecté Par (Prm)	0,016±0,002	0,097±0,003	06,55x10 ⁻⁶ ±9,68x10 ⁻⁷	3,91x10 ⁻⁵ ±1,11x10 ⁻⁶ *

(**Lot témoin**: souris non infectées, **lot infecté par (Acb)** : souris infectées par *A. baumannii*, **lot infecté par (Prm)** : souris infectées par *P. mirabilis*) (Différence significative comparant au groupe témoin : * $P < 0,05$).

Aucune variation significative de **PT** et de **PR** des organes urinaires n'est observée, entre les souris infectées et les témoins et entre les deux lots infectés. Néanmoins, une diminution significative est constatée au niveau du **PR** des reins chez le lot infecté par *P. mirabilis* ($P < 0,05$). Par ailleurs, une légère diminution du poids des reins est observée par rapport au poids vésical, ce qui reflète une élimination possible de la bactérie dans le tissu rénal (**Photo N° 10**).

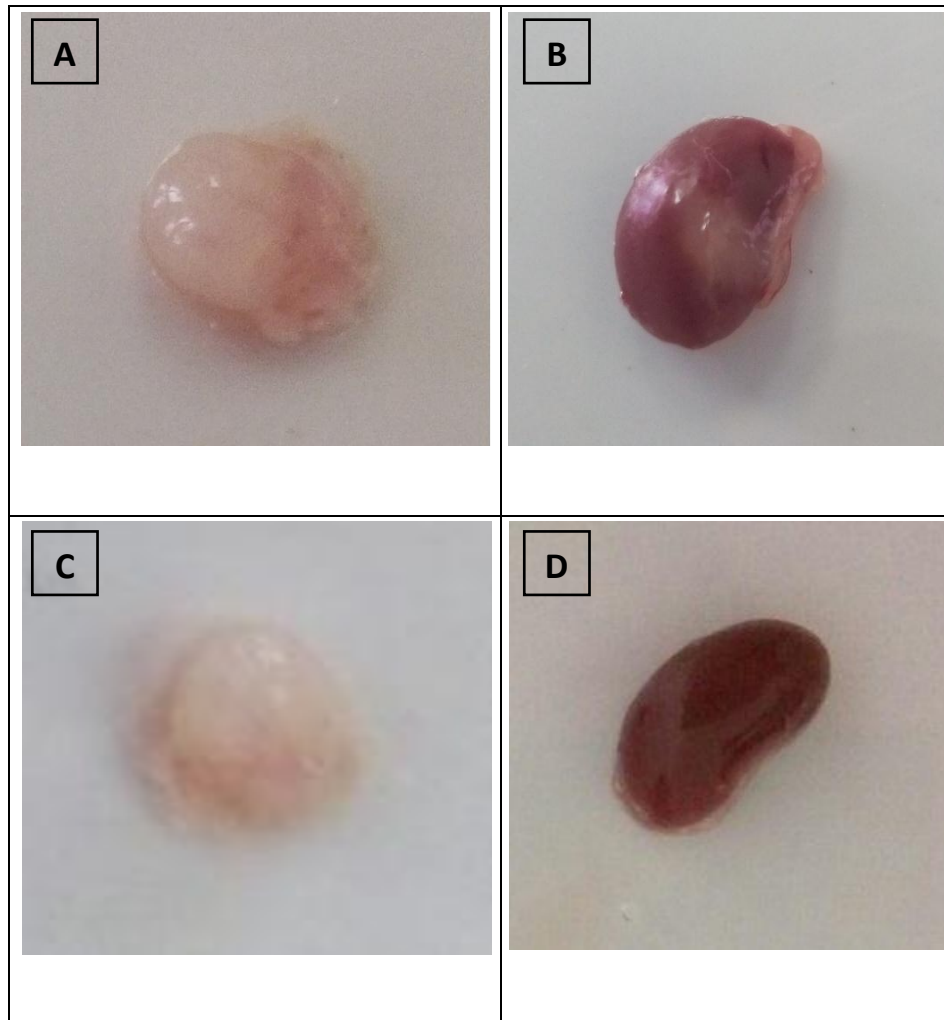


Photo N°10: Aspects des organes urinaires des souris (**A:** vessie infectée par **Acb**, **B:** rein infecté par **Acb**, **C:** vessie témoin, **D:** rein témoin).

4.3. Examen bactériologique des organes

Les analyses bactériologiques de la vessie et des reins des souris infectées par la souche **Acb 67** sont réalisées. Le nombre de bactéries est exprimé en log UFC moyen par gramme de tissus (**Figure N° 14**).

Après 15 jours d'inoculation par **Acb 67**, les dénombrements effectués ont montré que le nombre de cellules d'*A. baumannii* est plus élevé dans les reins.

La même observation est obtenue pour *P. mirabilis*. Le traitement statistique des résultats a montré l'absence d'une différence significative du nombre de bactéries entre les lots de souris infectées par *A. baumannii* et *P. mirabilis*.

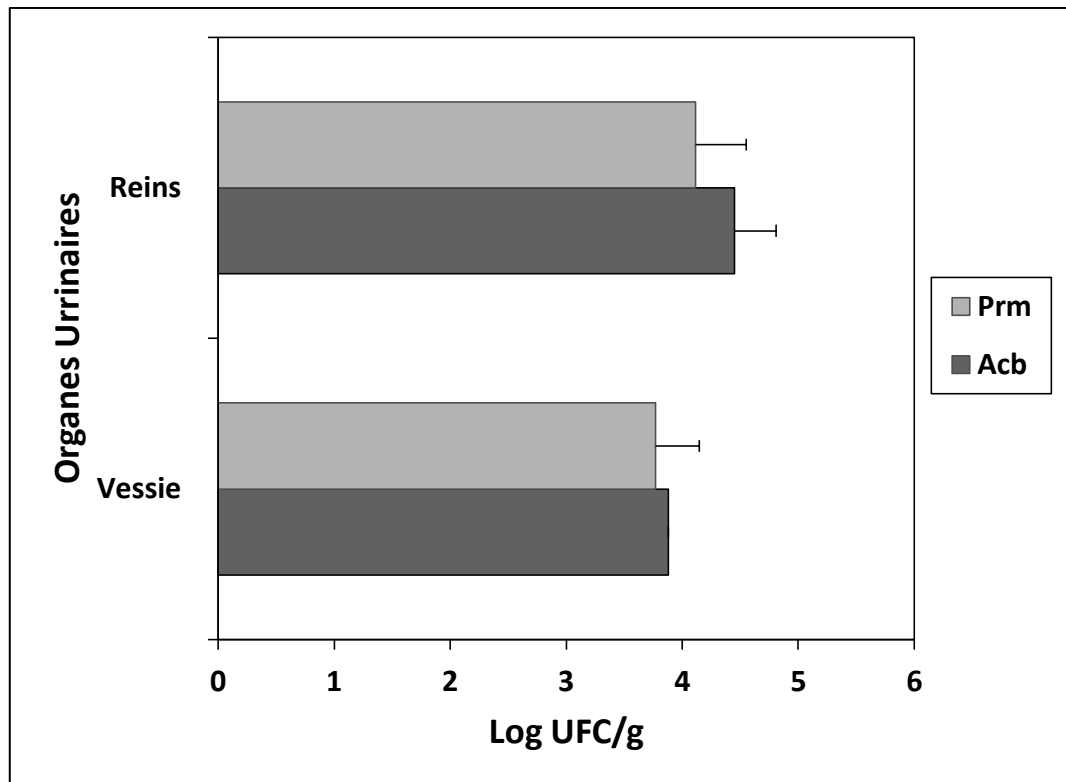


Figure N°14 : Dénombrement des bactéries chez les souris infectées par *A. baumannii* et *P. mirabilis*.

4.4. Etude histopathologique

4.4.1. Etude histopathologique après infection par *A. baumannii*

Les coupes histologiques de la vessie et des reins des souris infectées avec *A. baumannii* après deux semaines, sont examinées pour visualiser les effets cellulaires possibles de cette souche sur ces organes.

a. Examen histopathologique des vessies

Les observations microscopiques, des coupes histologiques de la vessie, révèlent une inflammation significative de l'épithélium vésical chez les souris infectées. Cette inflammation est caractérisée par une infiltration cellulaire, par des amas et de pellets nappés diffusés de type lymphoplasmocytaire (**Photo N°11 A, C, E**).

En revanche, chez les souris témoins, la paroi vésicale possède un remplissage d'ensemble conservé, surmonté par un urothélium régulier (absence d'infiltrat inflammatoire) (**Photo N°11 B, D, F**).

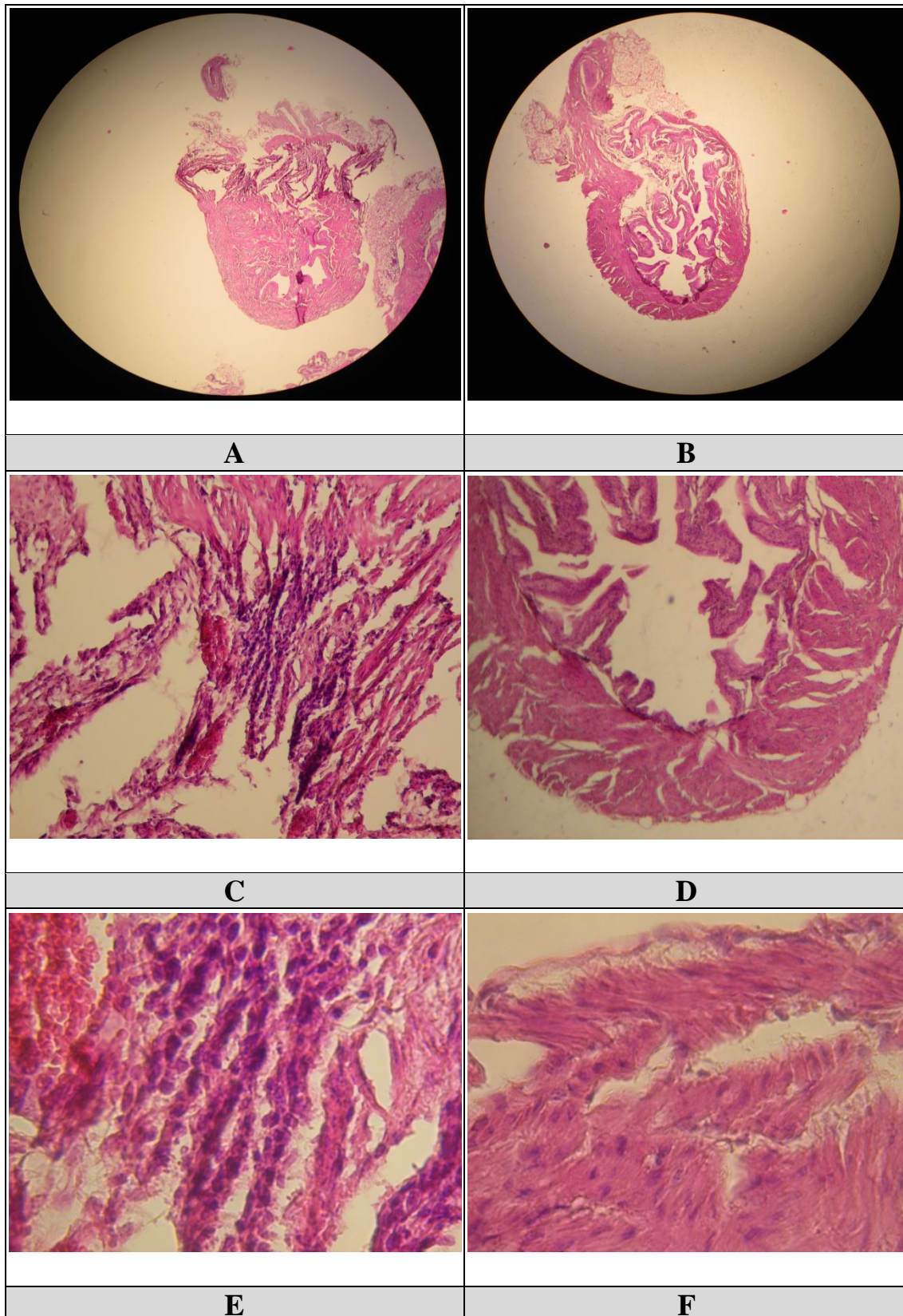


Photo N°11 : Coupes histologiques des vessies des souris infectées par *A. baumannii*.

Coupes histologiques colorées à l'Hématoxyline-Eosine : Histologie vésicale d'une souris infectée ; (A) (H&E 4 X), (C) (H&E 10 X), (E) (H&E 40 X). Histologie vésicale d'une souris témoin ; (B) (H&E 4 X), (D) (H&E 10 X), (F) (H&E 40 X).

b. Examen histopathologique des reins

Les observations microscopiques, des coupes histologiques des tissus rénaux infectés par *A. baumannii*, ont montré une structure floue de l'épithélium tubulaire impliquant une dégénérescence glomérulaire considérable et un infiltrat inflammatoire modéré de type lymphoplasmocytaire, ainsi que la présence de quelques cellules polymorphonucléaires (PMN) dans la région hilare (**Photo N°12 A, C, E**). Alors que chez les souris témoins, le parenchyme rénal est normal, les zones corticales et médullaires ne présentent aucun signe d'infiltration inflammatoire (**Photo N°12 B, D, F**).

4.4.2. Etude histopathologique après infection par *P. mirabilis*

Dans les mêmes conditions expérimentales, une autre étude histopathologique comparative est effectuée avec une autre souche d'origine urinaire, *Proteus mirabilis*.

Aucun changement significatif au niveau de l'histologie vésicale (**Photo N°13 A, C, E**) ou rénale (**Photo N°14 A, C, E**) n'est observée chez les souris infectées par *P. mirabilis*. En effet, une conservation de l'architecture vésicale et rénale est obtenue après comparaison avec celle du lot témoin (**Photos N°13 B, D, F et Photo N°14 B, D, F**).

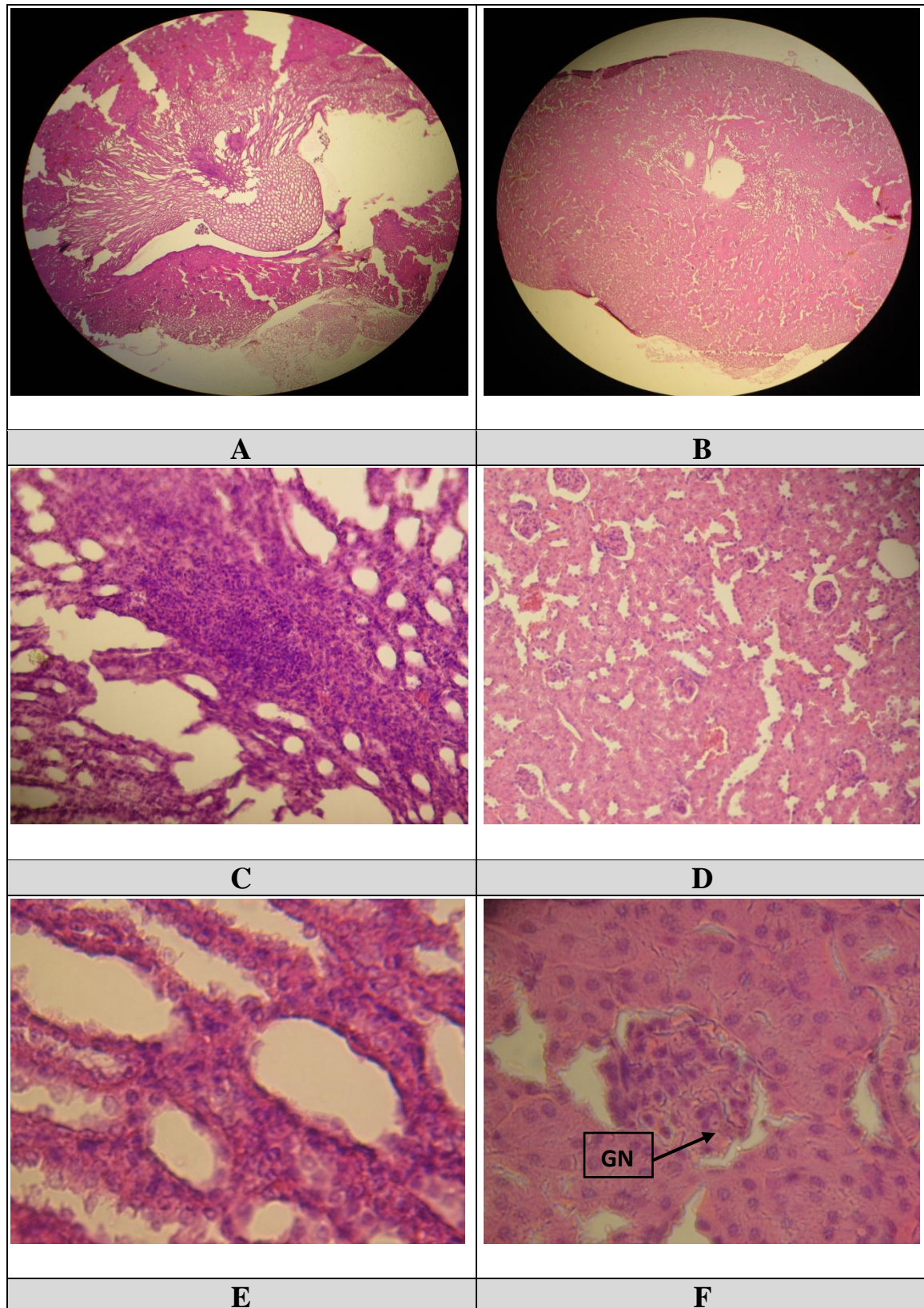


Photo N°12 : Coupes histologiques des reins des souris infectées par *A. baumannii*.

Coupes histologiques colorées à l'Hématoxyline-Eosine : Histologie rénale d'une souris infectée ; (A) (H&E 4 X), (C) (H&E 10 X), (E) (H&E 40 X). Histologie rénale d'une souris témoin ; (B) (H&E 4 X), (D) (H&E 10 X), (F) (H&E 40 X). GN : Glomérule Normal.

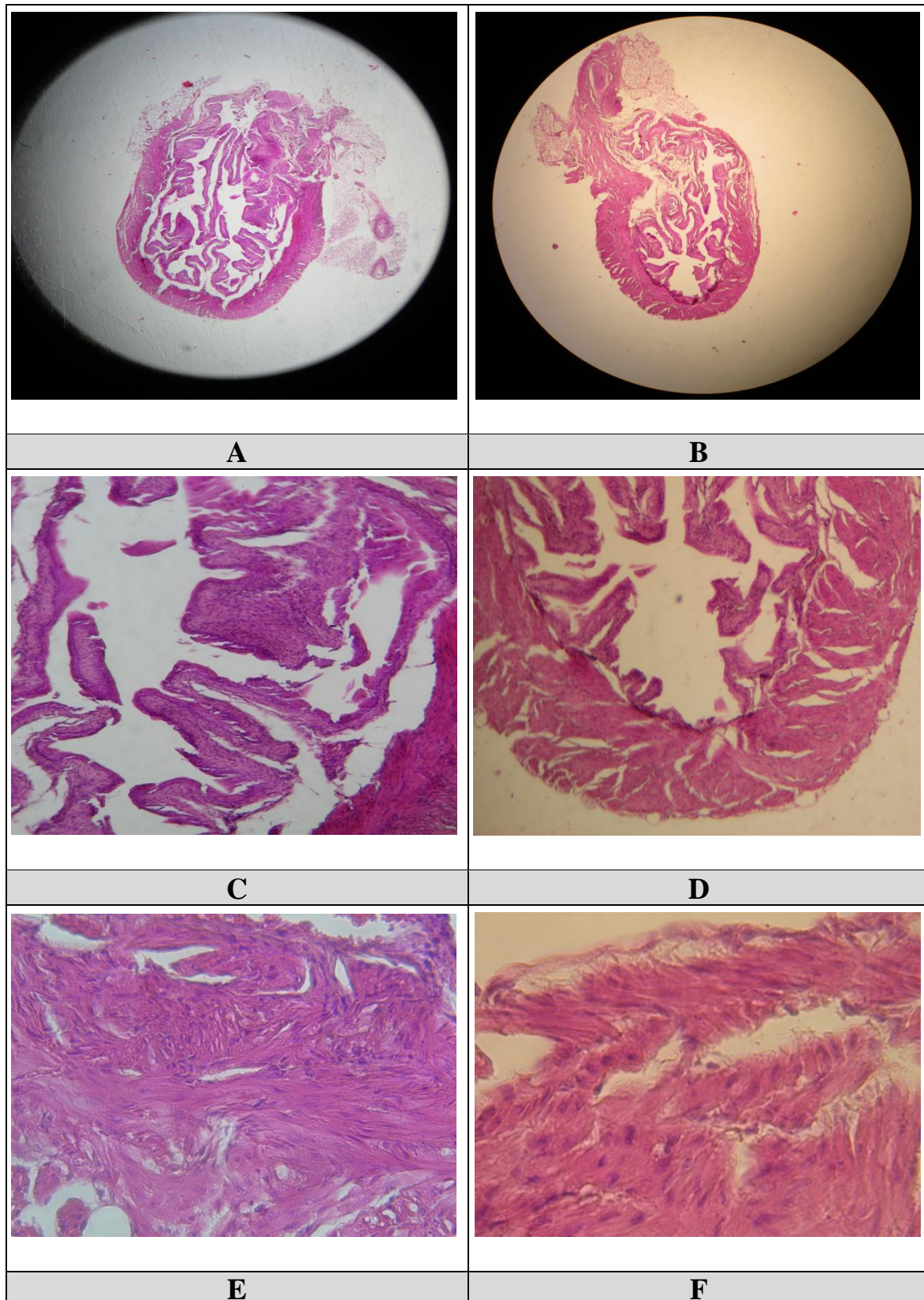


Photo N°13 : Coupes histologiques des vessies des souris infectées par *P. mirabilis*.

Coupes histologiques colorées à l'Hématoxyline-Eosine : Histologie vésicale d'une souris infectée ; (A) (H&E 4 X), (C) (H&E 10 X), (F) (H&E 40 X). Histologie vésicale d'une souris témoin ; (B) (H&E 4 X), (D) (H&E 10 X), (F) (H&E 40 X).

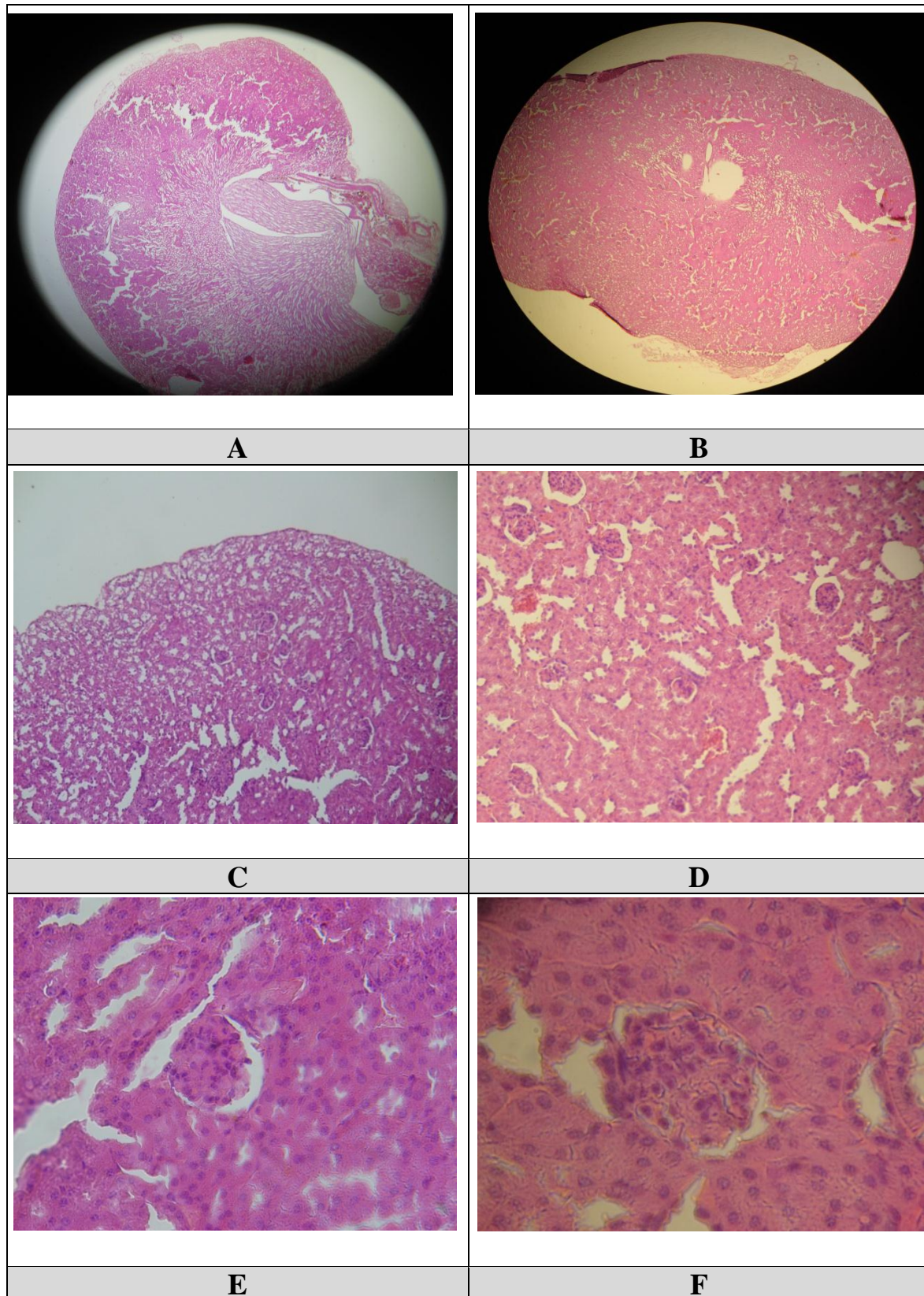


Photo N°14 : Coupes histologiques des reins des souris infectées par *P. mirabilis*.

Coupes histologiques colorées à l'Hématoxyline-Eosine : Histologie rénale d'une souris infectée ; (A) (H&E 4 X), (C) (H&E 10 X), (E) (H&E 40 X). Histologie rénale d'une souris témoin ; (B) (H&E 4 X), (D) (H&E 10 X), (F) (H&E 40 X).

4.5. Discussion

L'infection du tractus urinaire (ITU) est une réaction inflammatoire de l'urothélium en réponse à une invasion bactérienne habituellement associée à la bactériurie et à la pyurie (**Al-Ani et al., 2011**).

L'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales représente un phénomène important qui détermine leur virulence. Ainsi, l'établissement d'une infection des voies urinaires est en partie lié à la capacité de la bactérie à adhérer et à coloniser la vessie et les reins [(**Schoolrik, 1989**) ; (**Mulvey 2002**)].

Dans la pathogénicité d'*A. baumannii*, l'étape critique est sa capacité à adhérer aux cellules eucaryotes. Des études portant sur l'adhérence à des lignées cellulaires ont révélé un haut niveau de variabilité entre les souches dans leurs aptitudes à adhérer aux cellules [(**Lee et al., 2008**) ; (**Eijkelkamp et al., 2011a**)].

Dans notre étude, nous avons évalué *in vivo* les effets infectieux d'une souche d'*A. baumannii* multirésistante. Le choix de l'espèce animale revêt également une importance critique car il devrait permettre l'établissement d'une infection par des isolats cliniques humains.

Généralement, l'ITU débute par une infection de la vessie, mais évolue souvent en pyélonéphrite puis en bactériémie (**Ulett et al., 2007**).

La pyélonéphrite est relativement facile à établir chez le rat en raison du reflux vésico-urétral spontané, cependant, le gloside isolé de ses récepteurs rénaux contient une liaison Gal α (1-3) Gal β au lieu de la liaison critique Gal α (1-4) Gal β de l'homme. En revanche, le tissu rénal des souris contient une concentration non négligeable de Gal α (1-4) Gal β contenant un glycolipide qui correspond à celui rencontré chez l'homme (**Mittal et al., 2009b**).

De plus, des similitudes génétiques remarquables entre la souris et les humains ont été mise en évidence par **Kondo et ses collaborateurs en 2001**. La souris représente, par conséquent, un modèle valide pour établir une infection des voies urinaires supérieures (**Kanwal et al., 2009**).

Pour toutes ces raisons, notre choix a porté sur des souris femelles, de la souche Swiss que nous avons infecté par *A. baumannii*, en utilisant une voie d'infection ascendante.

Les résultats obtenus de cette partie de l'étude ont montré que :

- Le nombre de cellules d'*A. baumannii* était plus important dans le tissu rénal. Cela peut être expliqué par le fait que le tissu rénal n'a pas pu éliminer la bactérie qui a probablement provoqué une perte de poids des organes urinaires chez les souris infectées.
- Les observations microscopiques des coupes histologiques de la vessie, ont révélé des changements inflammatoires significatifs dans l'épithélium vésical chez les souris infectées.
- La désorganisation architecturale/ destruction de tissus (apparition de tissus morts/tissus lésés) est probablement liée à la réponse inflammatoire induite par nécrose/oncose des tissus vésicales causées par l'infection à *A. baumannii* (toxines). Ces phénomènes se traduisent par une infiltration tissulaire avec les leucocytes, initialement constitués de neutrophiles suivie de l'accumulation de monocytes, implication de cytokines inflammatoires, perte d'intégrité membranaire, présence de phagocytes et expression de facteurs de nécrose relativement spécifiques tels que la protéine High-Morbidity Group Box 1 « HMGB1 ». Cet effet cellulaire mortel est probablement responsable de la perte de poids de cet organe par rapport à celui des témoins.
- L'examen pathologique des tissus rénaux, infectés par *A. baumannii*, a montré une pyélonéphrite, qui pourrait être responsable de la perte de poids de cet organe par rapport à celui des témoins.
- La majorité des infections à *A. baumannii* sont liées à l'utilisation de dispositifs médicaux. Près de 60% de souches d'*A. baumannii*, isolées à partir des urines, proviennent de sondes urinaires à demeure ou de sondages intermittents. L'étude de **Venanzio et al. (2019)** avait comme objectif d'évaluer la capacité de deux isolats urinaires appartenant à l'espèce *A. baumannii*, ATCC 19606 et UPAB1, à coloniser les reins et la vessie des souris. Ces deux bactéries ont été inoculées chez la souris par voie transurétrale via un petit fragment d'un implant en silicone. Les résultats de cette étude ont montré que la colonisation des voies urinaires peut être renforcée par un plasmide qui régule les gènes chromosomiques chez les souches uropathogènes d'*A. baumannii*.
- Nous avons observé également des changements inflammatoires aigus, caractérisés par l'infiltration des polynucléaires dans le tissu interstitiel jusqu'à 15 jours après l'infection.
- Malgré la pathogénicité de la souche de *P. mirabilis* utilisée dans cette étude, l'isolat n'a pas montré d'inflammation significative des organes urinaires (vessie et reins) comparé à celle obtenue avec *A. baumannii*. Rappelons que *P. mirabilis*, un bacille à Gram négatif

appartenant aux *Enterobacteriaceae*, est une espèce communément responsable d'infection du tractus urinaire chez les personnes ayant des sondes urinaires à long terme ou souffrant d'infections urinaires compliquées. Ce microorganisme provoque une bactériurie importante, infectant la vessie, et possède également une tendance à infecter les reins [(Li *et al.*, 2002) ; (Jabalamelil *et al.*, 2005) ; (Schaffer and Pearson, 2015)].

- Il est important de signaler que les effets inflammatoires que nous avons observé après infection des souris par *A. baumannii* sont similaires à ceux rapportés dans des travaux antérieurs avec l'espèce *P. aeruginosa* [(Kumar *et al.*, 2009) ; (Mittal *et al.*, 2009a et b)].

Quatrième partie

Conclusion et

Perspectives

La présente étude a été réalisée au laboratoire de recherche « Biofilms et Biocontamination des Matériaux (LBBM) », de l'université Badji Mokhtar-Annaba.

Elle a porté sur l'évaluation, *in vitro* et *in vivo*, des facteurs de virulence de souches hospitalières d'*Acinetobacter baumannii*.

Dans un premier temps, nous avons recherché *in vitro*, certains facteurs de virulence et d'invasion (formation de biofilm, croissance sous conditions limitées en fer, synthèse d'une gélatinase, mobilité et agglutination des hématies humaines). Dans un deuxième temps, nous avons testé, *in vivo*, l'adhésion d'une souche d'*A. baumannii* isolée d'une sonde urinaire à demeure aux cellules du tractus urinaire chez un modèle animal, la souris Swiss.

Les résultats obtenus ont montré que :

- Les 4 souches d'*A. baumannii* étudiées sont résistantes aux antibiotiques testés à l'exception de la colistine. La souche **Acb75**, isolée d'un liquide pleural, est sensible à l'imipénème et à la colistine.
- L'étude *in vitro*, a montré que les 5 souches testées possèdent le potentiel d'interagir et de se fixer aux surfaces abiotiques telle que le polystyrène (surface hydrophobe) et de former des biofilms dont la biomasse varie d'une souche à une autre. Néanmoins, la fixation la plus importante est obtenue avec la souche **Acb 75**.
- Les activités métaboliques des cellules sessiles d'*A. baumannii* diffèrent selon les souches. Les valeurs obtenues sont relativement élevées par rapport à celles de **Hendiani et al. (2014)**.
- Les observations au microscope électronique à balayage (MEB) ont mis en évidence la présence d'agrégats cellulaires d'*A. baumannii* entourés d'une matrice adhésive et protectrice sur le matériel constitutif des sondes urinaires. Cette organisation est typique de biofilms retrouvés sur les implants médicaux invasifs.
- Les souches étudiées sont capables de croître dans des conditions limitées en fer et présentent une mobilité de type Twitching à l'exception de la souche **Acb 68** qui était immobile. La souche **Acb 75** était la plus mobile.
- Toutes les souches étudiées ont exprimé une réaction d'hémagglutination sensible au D-mannose. Cette capacité d'adhésion aux globules rouges est en parfaite corrélation avec la présence des fimbriae à la surface d'*A. baumannii*. Cette interaction spécifique facilite la dissémination de cette bactérie à travers les muqueuses de l'hôte

- Les résultats de l'étude *in vivo* ont montré que l'infection des souris type Swiss par la souche **Acb 67** provoque des changements inflammatoires significatifs dans l'épithélium vésical ainsi qu'une pyélonéphrite. De plus, la pathogénicité d'*A. baumannii* est étroitement associée à la colonisation des organes urinaires des souris. La pyélonéphrite induite *in vivo* peut donc être considérée comme un outil intéressant pour mieux comprendre la biologie et la pathogénicité d'*A. baumannii* afin de développer des stratégies effectives et préventives contre les infections du tractus urinaires associées à cette bactérie. En dépit de la pathogénicité de la souche uropathogène de *P. mirabilis* utilisée dans cette étude, aucune inflammation significative des organes urinaires n'est observée.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de :

- Identifier d'autres facteurs de virulence qui peuvent être exprimés par les souches d'*A. baumannii* en milieu hospitalier.
- Contrôler les infections à *A. baumannii*, en particulier en soins intensifs, sur la base de la détection de marqueurs de virulence en association avec des tests de sensibilité aux antibiotiques.
- Développer de nouvelles stratégies permettant d'appréhender la relation entre résistance et virulence.
- Mettre en place des méthodes rapides pour détecter les facteurs de virulence, qui peuvent aider à identifier les souches virulentes et maîtriser voir traiter les infections sévères dont elles sont responsables.

Cinquième partie

Références

Bibliographiques

A

- Abdul FR (2018).** Evaluation of some Virulence Factors, Hemagglutination and Agglutination of Antigens of *Acinetobacter Baumannii* Isolated From Clinical Samples. *Journal of Global Pharma Technology*; 10 (03):200-208.
- Actis LA, Tolmasky ME, Crosa LM, and Crosa JH (1993).** Effect of Iron-Limiting Conditions on Growth of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*; 31(10): 2812-2815.
- Al-Ani IM, Al-Murayati HY, Salman MO and Ghani HM (2011).** Histological findings of ascending urinary tract infections in experimental rats caused by *Proteus mirabilis*. *Biomedical Research*; 22 (4): 425-430.
- Alarcon I, Evans DJ and Fleiszig SM (2009).** The role of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* exit from and translocation of corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* ; 50: 2237–2244.
- Ali Shareef H, Abdulla ET and Mostafa ZN (2010).** Hemagglutination properties of some intestinal bacterial pathogens isolated from clinical samples. *Tikrit Journal of Pure Science*; 15 (3): 5-10.
- Almasaudi SB (2018).** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi J Biol Sci* ; 25(3): 586–596.
- Alnnasouri M (2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Alsan M and Klompas M (2010).** *Acinetobacter baumannii*: An Emerging and Important Pathogen. *Clinical Review* ; 17(8) : 363- 369.
- Antunes LC, Imperi F, Carattoli A and Visca P (2011a).** Deciphering the Multifactorial Nature of *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. *PLoS One* ; 6 (8): e22674.
- Antunes LC, Imperi F, Minandri F and Visca P (2012).** *In Vitro* and *In Vivo* Antimicrobial Activities of Gallium Nitrate against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.*; 56 (11): 5961–5970.
- Antunes LC, Imperi F, Towner KJ and Visca P (2011b).** Genome–assisted identification of putative iron-utilization genes in *Acinetobacter baumannii* and their distribution among a genotypically diverse collection of clinical isolates. *Rev. Microbiol.* ; 162: 279-284.
- Avril JL, Dabernat H, Denis F et Monteil H (2000).** Bactériologie clinique (2^{ème} édition). Editeur : Ellipses. France. 602 pages.

B

- Baba Ahmed-Kazi Tani Z et Arlet G (2014).** Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. *Pathologie Biologie* ; 62 : 169–178.

- Bakour S, Touati A, Bachiri T, Sahli F, Tiouit D, Naim M, Azouaou M, Rolain JM (2014).** First report of 16S rRNA methylase ArmA-producing *Acinetobacter baumannii* and spread of metallo- β -lactamase NDM-1 in Algerian hospitals. *J. Infect. Chemother.*; 20:696-701.
- Bakour S, Touati A, Sahli F, Ait Ameer A, Haouchine D and Rolain JM (2013).** Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 76: 529–531.
- Baudin M (2017).** Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms. Thèse de doctorat: Biologie. France: Université Paris-Saclay, 158p.
- Beloin C, Roux A and Svanborg C (2008).** *Escherichia coli* biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*; 322: 249-289.
- Bester E, Wolfaardt G, Joubert L, Garny K, and Saffic S (2005).** Planktonic-cell yield of a *Pseudomonas* biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*; 71 (12): 7792–7798.
- Bou G, Cervero G, Dominguez MA, Quereda C and Martinez-Beltran J (2000).** Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases. *J. Clin. Microbiol.* ; 38: 3299-3305.
- Boudia M (2014).** Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter baumannii*. Thèse de Doctorat en biochimie appliquée. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen. 126 p. Disponible sur : <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/5690/1/MERAD-BOUDIA.pdf>
- Bouguenoun W (2017).** Étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de Guelma. Thèse de Doctorat en biologie moléculaire et cellulaire. Université Badji Mokhtar-Annaba. 218 p. Disponible sur : <http://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2017/10/These-BouguenounWidad.pdf>.
- Branger A, Richer MM et Roustel S (2007).** Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon: 131-164.
- Braun G (2008).** Virulence Mechanisms of *Acinetobacter*. E. Bergogne-Berezin *et al.* (eds.), *Acinetobacter Biology and Pathogenesis*: 145– 154.
- Braun G and Vidotto MC (2004).** Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of *Acinetobacter baumannii* causing urinary tract infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*; 99 (8): 839– 844.
- Braun V and Hantke K (2013).** Chapter 2: The tricky ways bacteria cope with iron limitation. R. Chakraborty *et al.* (eds.), *Iron Uptake in Bacteria with Emphasis on E. coli and Pseudomonas*. *Springer Briefs in Biometals* : 31-66.
- Brillet K (2013).** Etudes structurales et fonctionnelles de protéines impliquées dans l'assimilation du fer chez les bactéries Gram-négative. Thèse de Doctorat en aspects

moléculaires et cellulaires de la biologie. Université de Strasbourg. 257 p. Disponible sur : <http://www.theses.fr/2013STRAJ008/abes>.

C

- Cafiso V, Stracquadanio S, Lo Verde F, Gabriele G, Mezzatesta ML, Caio C, Pigola G, Ferro A and Stefani S (2019).** Colistin Resistant *A. baumannii*: Genomic and Transcriptomic Traits Acquired Under Colistin Therapy. *Frontiers in Microbiology*; 9:1-20.
- Cattoen C (2004).** Epidémie à *Acinetobacter baumannii* dans les établissements de soins du Nord pas de calais. CH Valenciennes.
- Cerqueira GM, Kostoulias X, Khoo C, Aibinu I, Qu Y, Traven A and Peleg AY (2014).** A global virulence regulator in *Acinetobacter baumannii* and its control of the phenylacetic acid catabolic pathway. *J. Infect. Dis.*; 210 (1): 46-55.
- Cevahir N, Demir M, Kaleli I, Gurbuz M and Tikvesli S (2008).** Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* ; 41 (6): 513– 518.
- Chaieb K, Zmantar T, Souiden Y, Mahdouani K and Bakhrouf A (2011).** XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microb.Pathog.*; 50 (1): 1-5.
- Chalvet de Rochemonteix A (2009).** Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'Alfort Paris.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2010).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth informational supplement M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Costa GF, Tognim MC, Cardoso CL, Carrara-Marrone FE and Garcia LB (2006).** Preliminary evaluation of adherence on abiotic and cellular surfaces of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from catheter tips. *Braz. J. Infect. Dis.*; 10(5): 346– 351.
- Custovic A, Smajlovic J, Tihic N, Hadzic S, Ahmetagic S and Hadzagic H (2014).** Epidemiological monitoring of nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*. *Med Arch.*; 68(6): 402–406.

D

- Dijkshoorn L, Nemec A and Seifert H (2007).** An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*; 5: 939-951.
- Djeribi R, Bouchloukh W, Jouenne J and Mena M (2012).** Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. *Am. J. Infect. Control.* ; 40 (9): 854-9.
- Djordjevic D, Wiedmann M and McLandsborough LA (2002).** Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied And Environmental Microbiology*; 68 (6): 2950– 2958.

- Dorsey CW, Beglin MS and Actis LA (2003).** Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology* ; 41 (9) : 4188–4193.
- Doughari H, Ndakodemi PA, Human IS and Benade S (2011).** The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter spp.*: An overview. *Microbes Environ.*; 26 (2) : 101-12.
- Ducel G, Fabry J et Nicole L (2008).** Prévention des infections nosocomiales. Guide pratique 2^{ème} édition. *Organisation mondiale de la santé*. Disponible sur : http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.12_fre.pdf. Date de consultation: 03/2014.

E

- Echenique JR, Arienti H, Tolmasky ME, Read RR, Staneloni RJ, Crosa JH and Actis LA (1992).** Characterization of a high-affinity iron transport system in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*; 174 (23): 7670-7679.
- Eijkelkamp BA, Hassan KA, Paulsen IT and Brown MH (2011b).** Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics*; 12:126.
- Eijkelkamp BA, Stroehrer UH, Hassan KA, Papadimitriou MS, Paulsen IT and Brown MH (2011a).** Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* ; 323 (1): 44–51.
- Elouennas M, Bajjou T et Baaj AJ (2001).** Infection à *Acinetobacter* en milieu hospitalier. Service de microbiologie, Hôpital militaire d'instruction Mohamed V, Rabat. *Biologie et infectiologie* ; 2 (1) : 5- 13.
- Euzeby JP (2003).** *Acinetobacter spp.* dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Disponible sur : <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/aa/acinetobacter.html>. Consulté le :03/05/2013.

F

- Figueiredo S (2011).** *Acinetobacter spp* et réservoirs de gènes de carbapénémases, Université Paris Sud. 206 P. Thèse de doctorat disponible sur : http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/74/30/39/PDF/VA_Figueiredo_Samy_17102011.pdf. Consulté le : 04/04/2013.
- Flynn PB, Graham WG and Gilmore BF (2019).** *Acinetobacter baumannii* biofilm biomass mediates tolerance to cold plasma. *Letters in Applied Microbiology* ; 68: 344-349.
- Fomba M (2006).** Rôle pathogène et sensibilité aux ATB des *Acinetobacter* et *Staphylococcus* à coagulase négative à l'hôpital du point Université du Bamako-Mali. P : 95. Thèse en vue de l'obtention d'un grade de Docteur en Pharmacie. Disponible sur : <http://www.keneya.net/fmpos/theses/2006/pharma/pdf/06P61.pdf>. Consulté le: 19/04/2013.

Fux AC, Stoodley P, Hall-Stoodley L and Costerton JW (2003). Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev. Anti-infect. Ther*; 1, 4: 667– 683.

G

Gaddy JA and Actis LA (2009). Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol.* ; 4 (3): 273-8.

Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, López-Rojas R, Pachón J and Actis LA (2012). Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect. Immun.*; 80:1015–1024.

Garg UC, Ganguly NK, Sharma S, Chakravati RN and Bhatnagar RK (1987). Quantitative histopathological method for evaluation of experimental ascending pyelonephritis. *Med. Sci. Res.* ;15: 367–368.

Gaynes JR and Edwards JR (2005). Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.*; 41(6): 848-54.

Geerlings SE, Meiland R, Van Lith EC, Brouwer EC, Gaastra W and Hoepelman AIM (2002). Adherence of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroepithelial cells. *Diabetes Care*; 25 (8): 1405-1409.

Gentile V, Frangipani E, Bonchi C, Minandri F, Runci F and Visca P (2014). Iron and *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Pathogens*; 3 (3): 704-719.

Giamarellou H, Antoniadou A and Kanellakopoulou K (2008). *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health. *International Journal of Antimicrobial* : 106- 119.

Giannouli M, Antunes LC, Marchetti V, Triassi M, Visca P and Zarrilli R (2013). Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect Dis.*; 13:282.

Goubau P et Van Gompel A (2000). Reperes en microbiologie. *Acinetobacter*. 13^{eme} édition. P: 182.

Grall N, Andremont A et Armand-Lefèvre L (2011). Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle Impasse ? *Journal des Anti-infectieux* ; 16 : 1-16.

Gurey B (2009). Antibiothérapie des infections à *Acinetobacter* et *Pseudomonas*. *DESC maladies infectieuses*. St Antonie, Lille.

H

Harrison JJ, Ceri H, Stremick C and Turner RJ (2004). Differences in biofilm and planktonic cell mediated reduction of metalloid oxyanions. *FEMS Microbiology Letters*; 235: 357–362.

Hawkey P and Berezin EB (2006). *Acinetobacter spp. principal and practice of clinical bacteriology*. Second edition. P: 231- 241.

- Hendiani S, Abdi-Ali A and Mohammadi P (2014).** Comparison of two methods for quantification of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Biological J. Microorganism*; 2 (8): 51-56.
- Héritier C, Poirel L and Nordmann P (2006).** Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of IS Aba 1 in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* ; 12: 123-30.
- Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen P and Bjarnsholt T (2011).** The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Sciences*; 3 (2): 55-65.

I

- Iregbu RC, Ogunsola FT and Odugbemi TO (2002).** Infections caused by *Acinetobacter* species and their susceptibility to 14 ATB in Lagos University Teaching Hospital. *Lagos Wajm*; 21 (3): 226- 229.

J

- Jabalamelil F, Malekzadeh F and Mirsalehianl A (2005).** Effects of antibiotics on adhesion and invasion of *Proteus mirabilis*. *Acta Medica Iranica*; 43 (1): 55-59.
- Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley ML and Shitiliff ME (2008).** Complicated Catheter associated urinary tract infectious due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin. Microbiol. Rev.*; 21: 26-59.
- Joly-Guillou ML (2005).** Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin. Microbiol. Infect.* ; 11:868-73.
- Joly-Guillou ML et Bergogne-Bérézin E (2006).** Les bactéries du genre *Acinetobacter* revisitées : leur importance actuelle. *Antibiotiques* ; 8 : 94-99.
- Joly-Guillou ML, Decré D et Bergogne-Berezin E (1992).** Infections nosocomiales à *Acinetobacter* : surveillance épidémiologique hospitalière. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* ; 45: 211- 213.
- Joshi P, Wadhvani T, Bahaley P and Kothari V (2010).** Microbial chit-chat : quorum sensing. *The IUP Journal of Life Sciences*; 4 (1): 59-72.

K

- Kaboré WAD, Konaté A, Bako E, Bagré TS, Boisramé S, Chandad F, Traoré AS, Barro N, Sangaré L (2016).** Détection d'*Acinetobacter baumannii*, agent pathogène opportuniste et multirésistant dans les infections bucco-dentaires à Ouagadougou, Burkina Faso. *Med Buccale Chir Buccale* ; 22:105-112.
- Kaiser D (2007).** Bacterial swarming: a re-examination of cellmovement patterns. *Curr. Biol.*;17: R561–570.

- Kanwal R, Harjai K and Sharma S (2009).** Effect of mouse and human tamm-horsfall protein on adhesion of uropathogens to human uroepithelial cells. *Am. J. Biomed. Sci.*; 1(3): 215-225.
- Kaplan JB (2010).** Biofilm dispersal : mechanisms clinical implications and potential thérapeutiques uses. *J. Dent. Res.*; 89:205-218.
- Kim M, Peleg AY, Lodise TP, Lipman J, Li J, Nation R and Paterson DL (2009).** Management of meningitis due to antibiotic resistant *Acinetobacter* species. *Lancet Infectious Diseases*; 9(4):245-55.
- Kondo S, Shinagawa A, Saito T, Kiyosawa H, Yamanaka I, Aizawa K, Fukuda S, Hara A, Itoh M, Kawai J, Shibata K and Hayashizaki Y (2001).** Computational analysis of full length mouse cDNAs compared with human genome sequences. *Mamm. Genome* ; 12 : 673–677.
- Krol V, Hamid HS and Cunha BA (2009).** Neurosurgically related nosocomial *Acinetobacter baumannii* meningitis: report of two cases and literature review. *J. Hosp. Infect.* ; 71(2):176-80.
- Kumar R, Chhibber S and Harjai K (2009).** A Comparative study of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in terms of quorum sensing, outer membrane proteins and their ability to cause urinary tract infection. *Am. J. Biomed. Sci.*; 1(3): 205-214.

L

- Lambert ET (2007).** *Acinetobacter*. Livre Bactériologie médicale : techniques usuelles, Identification et Systématique Bactérienne.
- Lee CR, Jung Hun Lee JH, Park M, Park K S, Bae IK, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC and Lee SH (2017).** Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*; 7: 1-35.
- Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT and Kim J (2008).** Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin. Microbiol. Infect.*; 14 (1): 49-54.
- Leungtongkam U, Thummeepak R, Tasanapak K, Sitthisak S (2018).** Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*. *PLOS ONE* : 1-12.
- Li X, Yan Z and Xu J (2003).** Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiol.* ; 149 (2): 353-62.
- Li X, Zhao H, Lockatell CV, Drachenberg CB, Johnson DE, and Mobley HLT (2002).** Visualization of *Proteus mirabilis* within the matrix of urease-induced bladder stones during experimental urinary tract infection. *Infection and Immunity*; 70 (1): 389-394.
- Lichter JA, Van Vliet KJ and Rubner MF (2009).** Design of antibacterial surfaces and interfaces: polyelectrolyte multilayers as a multifunctional platform. *Macromolecules*; 42: 8573-8586.

- Liu C, Chang Y, Xu Y, Luo Y, Wu L, Mei Z, Li S, Wang R, Jia X (2018).** Distribution of virulence-associated genes and antimicrobial susceptibility in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Oncotarget.* ; 9 (31):21663-21673.
- Longo F, Vuotto C and Donelli G (2014).** Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* ; 37: 119-127.

M

- Maleki MH, Azizi Jalilian F, Khayat H, Mohammadi M, Pourahmad F, Asadollahi K, Pakzad I, Sadeghifard N, Soroush S, Emaneini M and Taherikalani M (2014).** Detection of highly ciprofloxacin resistance *Acinetobacter baumannii* isolated from patients with burn wound infections in presence and absence of efflux pump inhibitor. *MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine*; 9 (2): 162–167.
- Marrakchi CH (2008).** Infection à *Acinetobacter*. Service des maladies infectieuses. CHU Hedi Chaker, Sfax. *Rev. Tun. Infectiol.* ; 2 (2) : 28- 30.
- Marti S (2008).** Molecular bases of antimicrobial resistance in *Acinetobacter spp.* clinical isolates. Doctorat thesis. University of Barcelona. 281 pages.
- Marti S, Rodriguez-Baño J, Catel-Ferreira M, Jouenne T, Vila J, Seifert H and Dé E (2011).** Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Research Notes*; 4:5.
- Martinez RF (2011).** Effect of iron and sodium chloride on biofilm development of *Stenotrophomonas maltophilia*. Thesis. Department of Biological Sciences, College of Liberal Arts and Sciences, DePaul University. Chicago, Illinois.
- McConnell MJ, Actis L and Pachon J (2013).** *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol. Rev.* ; 37 (2): 130–155.
- McQueary NC and Actis LA (2011).** *Acinetobacter baumannii* Biofilms: Variations among strains and correlations with other cell properties. *J. Microbiol.*; 49 (2): 243-250.
- Mittal R, Chhibber S, Sharma S and Harjai K (2004).** Macrophage inflammatory protein-2, neutrophil recruitment and bacterial persistence in an experimental mouse model of urinary tract infection. *Microbe Infect.* ; 6: 1326-1332.
- Mittal R, Kaur A, Joshi K, Nada R, Chhibber S, Harjai K and Sharma S (2009b).** Experimental non-obstructive chronic renal infection model with planktonic and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Biomed. Sci.* ; 1(2) :103-114.
- Mittal R, Sharma S, Chhibber S and Harjaib K (2009a).** Effect of osmolarity on virulence of uropathogenic *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Biomed. Sci.*; 1 (1): 12-26.
- Mulvey MA (2002).** Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*; 4: 257.
- Munoz-Price LS and Weinstein RA (2008).** *Acinetobacter* Infection. *N. Engl. J. Med*; 358: 1271- 81.
- Musk DJ, Banko DA and Hergenrother PJ (2005).** Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*; 12: 789– 796.

N

- Naas T, Fortineau N et Nordmann P (2008).** Diffusion d'*Acinetobacter baumannii* multirésistant dans les établissements de santé : situation actuelle en France et mesures de contrôle. *Hygiène* ; XVI (6).
- Nasr P (2019).** Genetics, epidemiology and clinical manifestations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Hospital Infection*; pii: S0195-6701(19)30409-8.
- Nathwani D, Raman G, Sulham K, Gavaghan M and Menon V (2014).** Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 3(1), 32.
- Noinaj N, Guillier M, Barnard TJ and Buchanan SK (2010).** TonB dependent transporters: regulation, structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* ; 64:43–60.
- Nordmann P (2010).** Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *Médecine/Sciences*; 26 (11): 950-9.

P

- Parot S (2007).** Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de doctorat en génie des procédés et de l'environnement. L'institut national polytechnique de Toulouse, France. 257p. Disponible sur : <https://core.ac.uk/download/pdf/19938170.pdf>.
- Pecastaings S (2010).** Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.
- Peleg AY, Seifert H and Paterson DL (2008).** *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*; 21: 538-82.
- Perez F, Hujer A, Hujer K, Decker B, Rather P and Bonomo R (2007).** Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 51: 3471-3484.
- Poduch E and Lakshmi P (2007).** *Acinetobacter* infections. *The comprehensive Pharmacology Reference*. P: 1-9.
- Poirel L, Corvec S, Rapoport M, Mugnier P, Petroni A, Pasteran F, Faccone D, Galas M, Drugeon H, Cattoir V and Nordmann P (2007).** Identification of the novel narrow spectrum beta-lactamase SCO-1 in *Acinetobacter spp.* From Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 51: 2179-84.

R

- Rajih D (2019).** *Acinetobacter baumannii*: épidémiologie et résistance aux antibiotiques. Thèse de Doctorat en médecine. Faculté de médecine et de pharmacie- Marrakech.

- 113 p. Disponible sur : <http://wd.fmpm.uca.ma/biblio/theses/annee-htm/FT/2019/these102-19.pdf>.
- Ratlidge C and Dover LG (2000).** Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*; 54:881-941.
- Richet H and Fournier PE (2006).** Nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*: A major threat worldwide. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* ; 27 (7): 645-6.
- Roca I, Espinal P, Vila-Farres X and Vila J (2012).** The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: Commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Front Microbiol.*; 3: 148.
- Rodriguez-Bano J, Marti S, Soto S, Fernandez CF, Cisneros JM and Pachon J (2008).** Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin. Microbiol. Infect.* ; 14(3):276–278.
- Roux A et Ghigo JM (2006).** Les biofilms bactériens. *Bull. Acad. Vét. France* ; 159 (3) : 261-268.

S

- Schaffer JN and Pearson MM (2015).** *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. *Microbiol. Spectr.*; 3(5): 1-66.
- Schoolrik GK (1989).** How *Escherichia coli* infects the urinary tract. *N. Engl. J. Med.*; 320: 804.
- Sechi LA, Karadenizli A, Deriu A, Zanetti S, Kolayli F, Balikci E and Vahaboglu H (2004).** PER-1 type beta-lactamase production in *Acinetobacter baumannii* is related to cell adhesion. *Med Sci Monit* ; 10 : BR 180-4.
- Semmler AB, Whitchurch CB and Mattick JS (1999).** A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*; 145: 2863–2873.
- Siegrist HH (2000).** *Acinetobacter spp.*: Infections nosocomiales, épidémiologie et résistance aux antibiotiques. *Swiss –Noso. Infections nosocomiales et hygiène hospitalière : aspects actuels* ; 7 (1).
- Silva WJ, Seneviratne J, Parahitiyawa N, Rosa EAR, Samaranayake LP and Del BelCury AA (2008).** Improvement of XTT assay performance for studies involving *Candida albicans* biofilms. *Braz. Dent. J.*; 19 (4): 364-369.
- Simoes L, Simoes M and Vieira M (2007).** Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*; 73 : 6192-6200.
- Singh R, Nadhe S, Wadhvani S, Shedbalkar U and Chopade BA (2016).** Nanoparticles for control of biofilms of *Acinetobacter* species. *Materials*; 9 (5):383.
- Smet C, Govaert M, Kyrlylenko A, Easdani M, Walsh JL and Van Impe JF (2019).** Inactivation of single strains of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* planktonic cells biofilms with plasma activated liquids. *Frontiers in Microbiology*; 10: 1-15.

- Smith MG, Glanoulis T, Pukatski S, Mekalanos J, Ornston L, Gerstein M and Snyder M (2007).** New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev.*; 21: 601-614.
- Soukaina W (2017).** Epidémiologie et résistance aux antibiotiques des isolats cliniques d'*Acinetobacter baumannii*. Thèse de Doctorat en médecine. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. 145 p. Disponible sur : http://scolarite.fmp-usmba.ac.ma/cdim/mediatheque/e_theses/85-17.pdf.
- Sritharan M (2000).** Iron as a candidate in virulence and pathogenesis in mycobacteria and other microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.*;16:769-80.
- Sritharan M (2006).** Iron and bacterial virulence. *Indian Journal of Medical Microbiology*; 24 (3):163-4.
- Stickler DJ (2009).** *Proteus mirabilis* biofilm formation and catheter design. *Biomaterials and Tissue Engineering in Urology*: 157-190.
- Sutherland IW (2001).** The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* ; 9 (5): 222-227.

T

- Tiwari V and Moganty RR (2013).** Effect of iron availability on the survival of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: a proteomic approach. *J. Proteomics Bioinform.* ; 6 (6): 125- 131.
- Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE and Actis LA (2003).** Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*; 149: 3473–3484.
- Towner K (2006).** The genus *Acinetobacter*. *Prokaryotes*; 6: 746- 758.
- Trajkovska B (2009).** *Acinetobacter spp.* a serious enemy threatening hospitals worldwide. Institute of microbiology and parasitology medical faculty. *Macedonia journal of medical sciences*; 2 (2) : 157- 162.
- Treter J and Macedo AJ (2011).** A suitable surface for biofilm formation in Mendez-Vilas A. ed. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Spain: Formatex Research Center, P: 835-842.

U

- Ulett GC, Mabbett AN, Fung KC, Webb RI and Schembri MA (2007).** The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation. *Microbiology*; 153: 2321–2331.

V

- Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A and Filloux A (2001).** The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (*cup*) and their involvement in biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 98: 6911-6.
- Veerachamy S, Yarlagaadda T, Manivasagam G and Yarlagaadda PK (2014).** Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review. *Proc. Inst. Mech. Eng. H.*; 228(10): 1083-99.
- Venanzio GD, Flores-Mireles AL, Calix JJ, Haurat MF, Scott NE, Palmer LD, Potter RF, Hibbing ME, Friedman L, Wang B, Dantas G, Skaar EP, Hultgren SJ and Feldman MF (2019).** Urinary tract colonization is enhanced by a plasmid that regulates uropathogenic *Acinetobacter baumannii* chromosomal genes. *Nature Communications*; 10: (2763): 1-13.

W

- Wisplinghoff H (2012).** The importance of species identification in *Acinetobacter*. *J. Med. Microb. Diagn.*: 2-1.

Y

- Yang CH, Su PW, Moi SH and Chuang LY (2019).** Biofilm formation in *Acinetobacter Baumannii*: genotype-phenotype correlation. *Molecules*; 24 (1849):1-12.

Z

- Zagury et Bousquet (2013).** Association des internes et anciens internes des hôpitaux de Dakar, journées scientifique, *Acinetobacter*.
- Zimblér DL, Arivett BA, Beckett AC, Menke SM and Actis LA (2013).** Functional features of TonB energy transduction systems of *Acinetobacter baumannii*. *Infect. Immun.*; 81 (9): 3382–3394.
- Zimblér DL, Penwell WF, Gaddy JA, Menke SM, Tomaras AP, Connerly PL and Actis LA (2009).** Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals* ; 22 (1):23–32.

Résumé

La présente étude a porté sur la recherche, *in vitro*, de certains facteurs de virulence et d'invasion (formation de biofilm, croissance sous conditions limitées en fer, synthèse d'une gélatinase, mobilité et agglutination des hématies humaines) chez cinq souches cliniques d'*A. baumannii*, isolées de divers échantillons cliniques et sur l'évaluation, *in vivo*, de l'adhésion d'une souche d'*A. baumannii* aux cellules du tractus urinaire (la vessie et les reins) chez un modèle animal, la souris Swiss.

Les cinq souches d'*A. baumannii* ont fait l'objet d'un test de sensibilité à différents antibiotiques, d'une évaluation, *in vitro*, de quelques facteurs de virulence (formation de biofilms, croissance dans des conditions limitées en fer, synthèse d'une gélatinase, mobilité et agglutination des hématies humaines). L'architecture des biofilms formés par ces souches a été mise en évidence par microscopie électronique à balayage. Par ailleurs, une étude, *in vivo*, a été réalisée par établissement d'une pyélonéphrite ascendante, chez des souris Swiss et visualisation de ces effets sur les organes urinaires. Des coupes histologiques des vessies et des reins ont été également effectuées.

Il ressort de cette étude que les souches d'*A. baumannii* sont capables de former des biofilms avec différentes intensités entre les souches et avec des activités métaboliques élevées. Les isolats multirésistants (**Acb 33, Acb 67, Acb 68, Acb 75 et Acb 85**) sont capables de croître dans un environnement limité en fer avec des taux différents. Les cinq souches, gélatinase négative, exhibent des phénotypes de mobilité de type Twitching à l'exception de la souche **Acb 68** et expriment une réaction d'héماغglutination sensible au D-mannose. Les observations microscopiques des coupes histologiques ont révélé des inflammations significatives de l'urothélium vésical et le tissu rénal chez les souris infectées.

Mots clés : *Acinetobacter baumannii*, multirésistance, facteurs de virulence, biofilm, conditions limitées en fer, *in vitro*, *in vivo*

Abstract

The present study focused on the research, *in vitro*, of some virulence and invasion factors (biofilm formation, growth under iron-limiting conditions, gelatinase synthesis, mobility and agglutination of human erythrocytes) among five clinical strains of *A. baumannii*, isolated from various clinical samples and for the *in vivo* evaluation of the adhesion of an *A. baumannii* strain to the cells of the urinary tract (bladder and kidneys) in an animal model, Swiss mice.

The five strains of *A. baumannii* were subjected to antibiotic sensitivity test to different antibiotics, an *in vitro* evaluation of some virulence factors (formation of biofilms, growth under iron-limiting conditions, gelatinase synthesis, mobility and agglutination of human erythrocytes). The architecture of the biofilms formed by these strains was detected by scanning electron microscopy. In addition, an *in vivo* study was carried out by establishing ascending pyelonephritis in Swiss mice and visualizing these effects on urinary organs. Histological sections of the bladders and kidneys were also performed.

It emerges from this study that the strains of *A. baumannii* are able to form biofilms with different intensities between strains and with high metabolic activity. Multi-drug resistant isolates (**Acb 33, Acb 67, Acb 68, Acb 75 and Acb 85**) are able to grow under iron-limiting environment at different rates. The five gelatinase-negative strains exhibit Twitching-type mobility phenotypes except **Acb 68** strain and express an agglutination of human erythrocytes reaction sensitive to D-mannose. Microscopic observations of histological sections revealed significant inflammations of bladder urothelium and renal tissue in infected mice.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, multidrug-resistant, virulence factors, biofilm, iron limited conditions, *in vitro*, *in vivo*.

المخلص

ركزت الدراسة الحالية على بحث بعض العوامل الممرضة والمجتاحة للمضيف في المختبر (تشكيل الأغشية الحيوية، النمو في شروط محدودة من الحديد، تركيب الانزيم المحلل للجيلاتين، القدرة على التنقل والقدرة على رص الكريات الدموية الحمراء بشرية) عند خمسة سلالات اكلينيكية لـ *A. baumannii*. تم عزلها مسبقا من عدة عينات اكلينيكية و تقييم داخل جسم حي قدرة الالتصاق لسلالة *A. baumannii* بخلايا الجهاز البولي (المثانة و الكلى) في نموذج حيواني، الفار من نوع Swiss.

السلالات الخمس *A. baumannii* كانت محل موضوع اختبار الحساسية لمختلف المضادات الحيوية، تقييم لبعض العوامل الممرضة في المختبر (تشكيل الأغشية الحيوية، النمو في شروط محدودة من الحديد، تركيب الانزيم المحلل للجيلاتين، القدرة على التنقل والقدرة على رص الكريات الدموية الحمراء بشرية). تسليط الضوء على هندسة الأغشية الحيوية المشكلة من طرف هذه السلالات بواسطة المجهر الالكتروني الماسح. من جهة اخرى، تم تحقيق دراسة داخل جسم حي و ذلك بتشكيل عدوى التهاب الحويضة الصاعد عند فران من نوع Swiss و رؤية تأثيراتها على الاعضاء البولية. تم تنفيذ مقاطع نسيجية للمثانة و الكلى.

يظهر من هذه الدراسة ان السلالات *A. baumannii* قادرة على تشكيل الأغشية الحيوية مع شدة مختلفة بين السلالات و مع نشاط ابيضي عالي. السلالات المقاومة للمضادات الحيوية (**Acb 33, Acb 67, Acb 68, Acb 75 و Acb 85**) قادرة على النمو في محيط محدود من الحديد مع شدة مختلفة. اظهرت السلالات الخمس التي لا تملك الانزيم المحلل للجيلاتين نمط ظاهري للتنقل من نوع Twitching باستثناء السلالة **Acb 68** و القدرة على رص الكريات الدموية الحمراء البشرية مع حساسية لذي ما نوز. كشفت المراقبة المجهرية لمقاطع نسيجية عن وجود التهابات بليغة في المثانة و النسيج الكلوي عند الفران المصابة.

الكلمات المفتاحية : *Acinetobacter baumannii*, مقاومة المضادات الحيوية, عوامل ممرضة, الأغشية الحيوية, شروط محدودة من الحديد, في المختبر, في جسم حي.