



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



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID – TLEMCEEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Et Science de la Terre et de l'Univers -Département de Biologie.

Mémoire de Fin d'étude Pour l'Obtention
Du Diplôme de Master en biologie

Option : Microbiologie

Présenté par : Melle Akacem oumelkheir

Thème :

Activité protéolytique des *Pseudomonas* d'origine hospitalière
Au niveau des services de réanimation et d'urologie
(C.H.U –Tlemcen)

Soutenu le 11 juillet 2012

Devant le Jury :

Président	: Mr ABDELOUHID Djamal-eddine	Professeur
Promoteur	: Mr LAKHAL Abdelhafid	Maître de conférences
Examineur	: Mr REBIAHI Sid ahmed	Maître de conférences

Année universitaire 2011/2012

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mr Lakhal .A , Maitre de conférence à l'université Abou Bekr Belkaid de m'avoir accueilli dans le Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-Alimentaire, au Biomédicale et à l'Environnement et de m'avoir donner l'opportunité de travailler sur ce sujet , je tient également à vous remercier pour vos précieux conseils que vous m'avez prodigués tout au long de la rédaction , ont toujours été clairs, me facilitant grandement la tache et me permettant d'aboutir à la production de ce manuscrit.

A Mr ABDELOUAHID D.E. Maitre de conférence à l'université Abou Bekr Belkaid. Je suis touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury de thèse. Veuillez accepter mes plus vifs remerciements et soyez assuré de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

Mes remerciements s'adressent également à Mr REBIAHI.S. Maitre de conférence à l'université Abou Bekr Belkaid pour le temps précieux que vous avez accordé à cette étude, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

Ceux que personne ne peut compenser les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon éducation et mon bien être :

Mes chers parents

Ma mère à qui je ne saurais exprimer ma profonde gratitude, à son regard pétillant et sa complicité si profonde

À mon père qui n'as jamais cessé de me soutenir matériellement et moralement pour que je puisse avoir une bonne formation et à qui je voudrais exprimer mes affections et mes gratitudes

Merci à vous deux encore mille fois

Toute ma famille

À mes très chères sœurs, qui ont toujours été présentes dans les moments les plus difficiles malgré la distance qui nous sépare

À mes chers (es) amis (es)

hanane.A. ; sarah . D. ; mustapha .H. ;toufik.B ;hadjira.B

À toute personne qui de près ou de loin, à participé à ma formation et a toute la promotion microbiologie 2011 /2012.

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ATB : antibiotiques

ADH: Arginine Dihydrolase

UFC : unités formant colonies

CA-SFM : comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie

ONPG: l'orthonitrophényl- -D galactopyranoside

LDC: lysine Décarboxylase

LPS : lipopolysaccharide

Ps r* : souche de référence.

Liste des figures

Fig.01 facteurs de virulence de <i>P.aeruginosa</i>	9
Fig.02 model de formation de biofilm	11
Fig.03. des colonies de <i>Pseudomonas</i> (a) : petite, mates, (b) des colonies de <i>Pseudomonas</i> bombées, visqueuses.	25
Fig.04. Coloration de Gram de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> objectif x100.	25
Fig.05 . la souche U17 Ps13 oxydase positif	26
Fig. 06. Galerie Api20 NE (a) <i>P.aeruginosa</i> (U17 Ps13), (b) <i>P.aeruginosa</i> (R16Ps4); (c) <i>P.luteola</i> (U5 Ps6).	27
Fig.07. <i>Pseudomonas</i> R16 Ps4 avec zones d'inhibitions	29
Fig.08. Activité protéolytique sur gélose au lait après 24h de croissance à 37°C. autour des colonies de <i>Pseudomonas</i> isolées de service de réanimation	33
Fig.09. Activité protéolytique des <i>Pseudomonas</i> R9 Ps1, R13 Ps2, R16 Ps4, et R15 Ps3	34
Fig.10. Activité protéolytique de colonies de <i>Pseudomonas</i> du service d'urologie : U5Ps6, U17Ps13, U16Ps12, U9Ps7.sur gélose au lait, 24h à 37°C.	35
Fig. 11. Exemple de <i>Pseudomonas</i> (U3Ps5 ,U5Ps6 ,U9Ps7 ,U12Ps9) avec importante zone de protéolyse	35
Fig.12. Activité protéolytique chez les <i>Pseudomonas</i> des services : réanimation, urologie.	36
Fig. 13 : Exemple de <i>Pseudomonas</i> (U3Ps5 ,U5Ps6 ,U9Ps7 ,U12Ps9) avec faible zone de protéolyse	37

Liste des tableaux

Tab 1. types trophiques vis-à-vis de la température de croissance bactérienne	3
Tab. 2. Principaux facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	8
Tab. 3. répartition des prélèvements dans les services urologie et réanimation (C.H.U-Tlemcen).	23
Tab.4. identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par galerie Api 20NE (réanimation et urologie) et différents chimiotype	28
Tab. 5. Multirésistance des <i>P.aeruginosa</i> au service de réanimation et d'urologie	31
Tab.6. activité protéolytique des <i>Pseudomonas</i> (services: réanimation et urologie)	33
Tab.7. Zone de protéolyse des <i>Pseudomonas</i> de service de réanimation	33
Tab.8. Zone de protéolyse des <i>Pseudomonas</i> du service d'urologie	34
Tab.9. effectif et fréquence des souches de <i>Pseudomonas</i> protéolytique	37

Introduction.	1
Synthèse bibliographique	
1. Le genre <i>Pseudomonas</i>	3
1.1. Description du genre	3
1.2. La diversité taxonomique	3
1.2.1. Pyocyanine et pyoverdine	4
1.2.2. L'importance du genre <i>Pseudomonas</i>	4
2. Les <i>Pseudomonas</i> dans les infections nosocomiales	5
2.1. Définition d'une infection nosocomiale	5
2.2. Facteurs favorisant l'émergence des infections nosocomiales	6
2.3. Bilan des infections et des microorganismes les plus concernés	7
2.4. Le modèle de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en infection nosocomiale	7
3. Propriétés de virulence de <i>P.aeruginosa</i>	7
3.1. Colonisation et multiplication	9
3.2. La formation de biofilm	10
3.3. La production de biosurfactants	11
3.4. L'effet toxique	12
4. Les protéases de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
4.1. Type des protéases	13
4.1.1. Les metalloprotéases	13
4.1.1.1. Elastase	13
4.1.1.2. La protéase alcaline (<i>aeruginolysine</i>)	15
4.1.2. Les sérines-protéase	15
5. Résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques	15
5.1. Résistance naturelle	16
5.2. Résistance acquise	16
Matériels et méthodes	
1. Lieu d'étude	18

2. Prélèvements	
3. Codification	18
4. Isolement et purification	18
4.1. Examen à l'état frais	18
4.2. Coloration de Gram	19
5. Identification biochimique	19
5.1. Test d'oxydase	19
5.2. Galerie API 20NE	19
6. Détermination des phénotypes de résistance aux antibiotiques	20
7. Test de l'activité protéolytique	21
8. Conservation des souches	21
Résultats et discussions	
1. Identification des souches isolées des patients avec port de sonde	23
1 .1. Le service d'urologie	23
1 .2. Le service de réanimation	23
2. Identification des souches	24
2.1. Aspect de colonies	24
	25
2.3. Coloration de gram	
2.4. L'examen de l'état frais	26
	26
2.5. L'identification biochimique	
2.5.1. Test d'oxydase	26
2.5.2. L'identification des souches isolées par système API 20NE	26
3. Multirésistance intrinsèque	28
3.1. Multirésistance des <i>Pseudomonas</i> (services : réanimation et urologie)	30
4. Pouvoir protéolytique des souches de <i>Pseudomonas</i> isolées	32
4.1. Activité protéolytique des souches de <i>Pseudomonas</i> isolées de service de réanimation	33

4.2 .Activité protéolytique des souches de <i>Pseudomonas</i> isolées de service d'urologie	34
4.3.Frequence de presence des souches <i>Pseudomonas</i> protolytiques	37
Conclusion général	
Conclusion	39
Références bibliographiques	41
Annexes	

Introduction

Les personnes hospitalisées sont souvent exposées au risque d'attraper des infections microbiennes et surtout bactériennes qui sont communément regroupés sous le terme d'infections nosocomiales parmi les bactéries les plus retrouvés le genre *Pseudomonas* et rapporté comme une infection redoutable dans plusieurs services.

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est ubiquitaire, retrouvée dans la plupart des niches écologiques. Son intérêt médical réside principalement dans le fait qu'elle est responsable d'infections opportunistes, souvent graves et difficiles à guérir, en raison d'une forte résistance à de nombreux antibiotiques (**Veron,1983**).

Pseudomonas est aujourd'hui clairement reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez les patients immunocompromis ou affaiblis, ainsi que dans le cadre de la mucoviscidose (**Mesaros et al., 2007**). Ce qui va poser un problème de traitement des patients touchés par ces infections.

Cette bactérie dispose de nombreux facteurs de virulence (lipopolysaccharide, protéases, lipases...), la fonction des protéases a été seulement rattachée au changement ou à la digestion des protéines comme source de nourriture. De plus en plus il apparaît clairement que l'hydrolyse d'une liaison peptidique des protéines peut avoir une large gamme de fonctions biologiques qui peuvent être très subtiles et spécifiques (**Hoge et al., 2010**).

Toujours selon **Hoge et al. (2010)** et **Bentzmann et Plésiat (2011)**. Les protéases peuvent influencer un grand spectre de fonctions biologiques incluses dans le processus infectieux. Qui n'est pas seulement une simple et rapide multiplication des cellules bactériennes dans l'organisme humain. *Pseudomonas aeruginosa* à un impressionnant arsenal de protéases efficaces aidant à l'établissement et le maintien de l'infection.

Vu l'importance de l'activité protéolytique des *Pseudomonas* dans le processus infectieux il serait profitable de voir la capacité des souches d'origine hospitalière (service de réanimation et d'urologie) par l'estimation semi quantitative de diffusion sur plaques et d'étudier sa résistance aux antibiotiques.

1. Le genre *Pseudomonas*

1.1. Description du genre

Bactéries mobiles grâce à une ciliature polaire. se cultivant sur des milieux usuels non enrichis ,utilisent de nombreux substrats hydrocarbonés pour leur nutrition carbonée et leur énergie . Ayant un type respiratoire aérobie strict et un métabolisme chimio-organotrophe oxydatif. Mésophile, *P. aeruginosa* est l'espèce-type, tandis que la majorité des espèces sont psychrotrophes (**Tab. 1**).

Tableau 1: Types trophiques vis-à-vis de la température de croissance bactérienne.

	Psychrophile	Psychrotrophe	Mésophile	Thermophile	Hyperthermophile
T_m	- 4°C	0°C	5-10°C	25°C	45°C
T_o	≤ 15°C	≥ 25°C	≥ 30°C	≥ 45°C	≥ 65°C
T_M	≤ 20°C	> 25°C	< 50°C	> 50°C	> 70°C

Les classes thermiques de croissance des espèces bactériennes sont distinguées sur la base de trois températures cardinales : T_o est la température optimale de croissance (à laquelle le taux de croissance est maximal), T_m et T_M sont respectivement les températures minimale et maximale de croissance, en dessous et au dessus desquelles aucune croissance n'est observée (Morita *et al.*, 1975).

Les *Pseudomonas* et les genres apparentés appartiennent au phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, ordre des *Pseudomonadales* selon le *Bergey's manual of Systematic Bacteriology (1994)* Ce sont des bacilles à Gram négatif, droits et fins, aux extrémités arrondies, d'une taille moyenne de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm (ou plus) de longueur.

1.2. La diversité taxonomique

Palleroni et al. (1984), ont montré que le genre était génétiquement hétérogène avec l'existence de cinq groupes d'ARN distincts. Le genre *Pseudomonas-sensu stricto* correspond au groupe d'ARN I et comprend plus d'une centaine d'espèces différentes.

Cette réorganisation a permis une distinction marquée entre le genre *Pseudomonas* et les genres apparentés regroupant *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Brevundimonas*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Comamonas*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Ralstonia*, *Shewanella*, *Sphingobacterium* et *Stenotrophomonas* (**Kersters et al., 1996**). Les autres espèces *Pseudomonas sensu lato*

(groupes ARN II à V) ont été reclassées dans d'autres genres Grâce à l'hybridations ADN-ADN et ADN-ARN, ainsi que le séquençage de marqueurs taxonomiques tel l'ADN codant l'ARNr16S ont conduit à une évolution de la taxonomie au sein du groupe des *Pseudomonas* et des genres apparentés (**Anzai et al., 2000**).

1.2.1. Pyocyanine et pyoverdine

Ainsi la concentration de pyocyanine pigment retrouvé chez *P. aeruginosa* présente dans le sputum des patients atteints de fibrose kystique induit une dysfonction des cellules épithéliales nasales et inactive l'inhibiteur de protéase α 1PI3 au site d'infection protégeant donc les protéases de *P. aeruginosa* (**Ratledge et Dover., 2000**).

Pseudomonas - sensu stricto est divisé en deux groupes :

Fluorescents (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* ou *P. syringae*...) et les non-fluorescents (*P. alcaligenes*, *P. fragi* ou *P. stutzeri*...). Cette distinction, correspond à la capacité ou non de produire, la pyoverdine pigment fluorescent sous UV, de couleur jaune-vert, soluble dans l'eau et insoluble dans le chloroforme c'est un puissant sidérophore. sa synthèse dépend de la quantité de fer (Fe^{3+}) disponible dans le milieu et ses besoins (**Imperi et al in Rehm ., 2007**).

1.2.2. L'importance du genre *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* occupent la plupart des environnements naturels. Elles sont isolées de l'eau, du sol et des végétaux. Elles présentent un fort potentiel d'adaptation physiologique et génétique et sont capables d'utiliser une grande variété de nutriments. D'un point de vue écologique, les *Pseudomonas* regroupent des espèces bénéfiques pour l'environnement et des espèces pathogènes (**Talon et al ., 2006**)

Au niveau de la rhizosphère les *Pseudomonas* peuvent avoir un effet bénéfique en mobilisant certains nutriments nécessaires à la croissance de la plante. Elles peuvent aussi la protéger contre des micro-organismes pathogènes en stimulant les mécanismes de résistance intrinsèques de la plante par la sécrétion des composés antibactériens et antifongiques et/ou par la compétition vis-à-vis de certains nutriments. C'est notamment le cas de souches de *P. fluorescens*, décrites comme des bactéries

phytoprotéctrices jouant un rôle prépondérant dans le biocontrôle de la rhizosphère (Walsh *et al.*, 2001).

D'autres espèces sont des pathogènes pour les plantes, comme l'espèce *P. syringae* qui compte au moins 37 pathovars capables d'infecter de nombreuses espèces de végétaux (Sawada *et al.*, 2002).

Les *Pseudomonas spp.* Sont capables de dégrader de nombreux composés organiques, tels des composés halogénés, des hydrocarbures aromatiques et des herbicides (Ramos, 2004). elles peuvent ainsi être utilisées dans les processus de décontamination des sols « bioremédiation » (Stallwood *et al.*, 2005).

Les *Pseudomonas spp.* Peuvent également se comporter comme des agents opportunistes et être à l'origine d'infections iatrogènes et/ou nosocomiales. En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, souvent capables de résister à de nombreux antiseptiques ou antibiotiques. Ceci explique leur présence de plus en plus fréquente en milieu hospitalier, où elles peuvent être isolées de l'environnement humide, des denrées alimentaires, des réactifs biologiques, des solutés injectables, du sang ou des dérivés sanguins conservés au froid (Feuilloy *et al.*, 2007).

2. Les *Pseudomonas* dans les infections nosocomiales

2.1. Définition d'une infection nosocomiale

Une infection est dite nosocomiale si elle apparaît au cours ou à la suite d'une hospitalisation et si elle était absente à l'admission à l'hôpital. Lorsque la situation précise à l'admission n'est pas connue, un délai d'au moins 48 heures après l'admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour distinguer une infection d'acquisition nosocomiale d'une infection communautaire. Pour les infections du site opératoire, on considère comme nosocomiales les infections survenues dans les 30 jours suivant l'intervention, ou, s'il y a mise en place d'une prothèse ou d'un implant, dans l'année qui suit l'intervention. On distingue deux types d'infections nosocomiales qui relèvent des modes de transmission différents :

1. Les infections d'origine endogène. Dans ce type d'infections, c'est le malade qui s'infecte avec ses propres germes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière.

2. Les infections d'origine exogène. Ces infections peuvent être :

- croisées, c'est-à-dire transmises d'un malade à un autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical,
- provoquées par les germes du personnel soignant,
- liées à la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, matériel, alimentation...).

2.2. Facteurs favorisant l'émergence des infections nosocomiales

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (**O.M.S. ; 2002**), plusieurs facteurs participent à l'augmentation de l'incidence des infections nosocomiales :

- la pollution de l'environnement ,l'évolution démographique amenant une proportion croissante de personnes âgées qui nécessitent des soins hospitaliers, l'épidémie du SIDA qui a fortement accru la population de sujets immunodéprimés.
- L'utilisation des antimicrobiens en agriculture renforce l'émergence des résistances chez les agents pathogènes .L'utilisation massive d'antibiotiques pour lutter contre ces infections a renforcé la pression de sélection des micro-organismes multi-résistants. Le commerce mondial a accru la vitesse de propagation à la fois des maladies infectieuses et des micro-organismes multi-résistants d'un continent à l'autre (**Fagherazzi-Pagel,2006**).

Enfin, les avancées technologiques dans le domaine médical telles que la ventilation artificielle et l'intervention chirurgicale, ont favorisé les infections nosocomiales par leur côté invasif et sont mises en cause dans près de 50% des cas (**Bosseray et Micoud, 2000**). Selon le rapport du Réseau d'Alerte et d'Investigation de la Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN) , l'enquête de prévalence réalisée en France en 2001 sur plus de 1500 établissements de soins (publics et privés), montre que 7,5% des patients hospitalisés présentent une infection nosocomiale. Ces taux varient en fonction du type d'activité du service, du recrutement de l'établissement, de la méthode de calcul des taux et de la qualité du travail de recueil des informations (**Vincent et al ., 2008**). Les sites infectieux les plus fréquents sont : les infections

urinaires, les pneumopathies, les infections du site opératoire et les infections de la peau et des tissus mous.

2.3. Bilan des infections et des microorganismes les plus concernés

Le réservoir des *Pseudomonas* et apparentés se trouve principalement au niveau d'habitats hydriques tels que les siphons, les douches ou encore au niveau de nébulisateurs et d'humidificateurs. Elles contaminent également les végétaux et l'alimentation (**Husson et al., 2000**).

P. aeruginosa est le troisième micro-organisme responsable d'infection nosocomiale. *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia* sont également retrouvées au sein des hôpitaux (**Berthelot et al., 2005**).

2.4. Le modèle de *Pseudomonas aeruginosa* en infection nosocomiale

Selon **Hoiby et al. (2001)** ces patients développent une infection pulmonaire chronique qui conduit à une destruction des tissus pulmonaires par les toxines bactériennes. *P. aeruginosa* colonise les poumons et s'installe rapidement sous forme de biofilm, ce qui lui permet de résister aux défenses immunitaires de l'hôte et aux antibiotiques

Pour **Emerson et al. (2002)** *P. aeruginosa* est responsable de 16 % des infections pulmonaires, de 12% des infections du tractus urinaires, de 8% des infections touchant les grands brûlés et de 10% des infections du sang (bactériémie et/ou septicémie).

Chez l'homme, cette bactérie peut provoquer des infections sévères chez les sujets aux défenses diminuées comme les malades atteints de mucoviscidose, les brûlés, les cancéreux ayant reçu de la chimiothérapie cytotoxique et les malades intubés en réanimation (**Ruimy et Andreumont., 2004**). De plus *P. aeruginosa* est capable d'infecter un large spectre d'hôte : humains, plantes, insectes, nématodes ou amibes (**Williams et al., 2010**).

3. Propriétés de virulence de *P.aeruginosa*

Sujet d'études depuis des décennies, le bacille pyocyanique (*P. aeruginosa*) reste à bien une énigme pour les chercheurs analysant sa virulence. Rarement pathogène chez l'individu sain, car selon **Bentzmann et Plésiat (2011)**, ce bacille à Gram négatif de

l'environnement constitue pourtant la troisième cause d'infections nosocomiales en France après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

De la simple colonisation à l'infection invasive, la bactérie exprime une pathogénicité polymorphe qui dépend avant tout de l'état immunitaire, de l'intégrité des barrières cutané-muqueuses et de l'efficacité des mécanismes de clairance des patients. *P. aeruginosa* synthétise de nombreux facteurs de virulence, ces facteurs de virulence sont impliqués dans les différentes étapes du processus d'infection et permettent ainsi à *P.aeruginosa* de coloniser son hôte « tab. 2 » (Bricha *et al.*,2009).

Tab. 2 Principaux facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (Berthelot *et al.*, 2005)

Facteur	Activité	Cible	Régulation	Effet
Exotoxine A	ADP-ribosylation	EF-2	Fer, quorum sensing	Nécrose tissulaire
Elastase B	Protéolyse	Elastine, Ig	Quorum sensing	Nécrose tissulaire. anti défenses infectieuses
Phospholipase	Hydrolyse	Surfactant	?	Anti-clairance
Rhamonolipides	Détersion	Surfactant	Quorum sensing	Anti-clairance
Flagelle	Mobilité		Chimiotactisme	Diffusion tissulaire
Exotoxine S	ADP-ribosylation		Contact cellulaire	Antiphagocytose, invasion tissulaire Inflammation
Exotoxine U	Adénylate cyclase		Contact cellulaire	Antiphagocytose Inflammation
Pyoverdine Pyochéline	Captage du fer		Fer	Invasion

Lors des infections chroniques du système respiratoire, les bactéries adhèrent à la surface de l'épithélium grâce à des adhésines comme la fimbriae, le pili de type IV, le LPS (Lipopolysaccharide) et le flagelle. Elles vont ensuite former un biofilm composé d'une matrice d'exopolysaccharides mucoïdes (MEP) faite d'alginate qui protège les bactéries des systèmes de défense de l'hôte et de l'effet des antibiotiques (Van Delden *et Iglewski*, 1998). En général, les facteurs de virulence impliqués dans l'adhérence peuvent aussi avoir un rôle dans la mobilité de la bactérie tels que le flagelle, le pilus de type IV (Kohler *et al.*, 2000).

3.1. Colonisation et multiplication

P. aeruginosa (Fig. 1), produit un nombre important de facteurs pouvant intervenir dans les processus de colonisation et de multiplication et sécrète des protéines qui peuvent être potentiellement toxiques pour les cellules hôtes.

D'autres éléments participent à la colonisation et à la formation du biofilm

- *Les flagelles*

Le flagelle est essentiel pour assurer la mobilité de la bactérie, facilite l'acquisition de nutriment et joue vraisemblablement un rôle indirect dans l'adhésion cellulaire. Son importance dans la pathogenèse semble établie puisque des souches non flagellées sont sévèrement atténuées dans leur virulence. **Feldman et al, (1998)**. Ont montré que des bactéries mutantes, sans flagelles, étaient moins invasives que la souche mobile.

Selon **O'Toole et Kolter (1998)**, le flagelle joue un rôle important dans les stades précoces du développement du biofilm bactérien *in vitro*. Il est également impliqué dans l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires

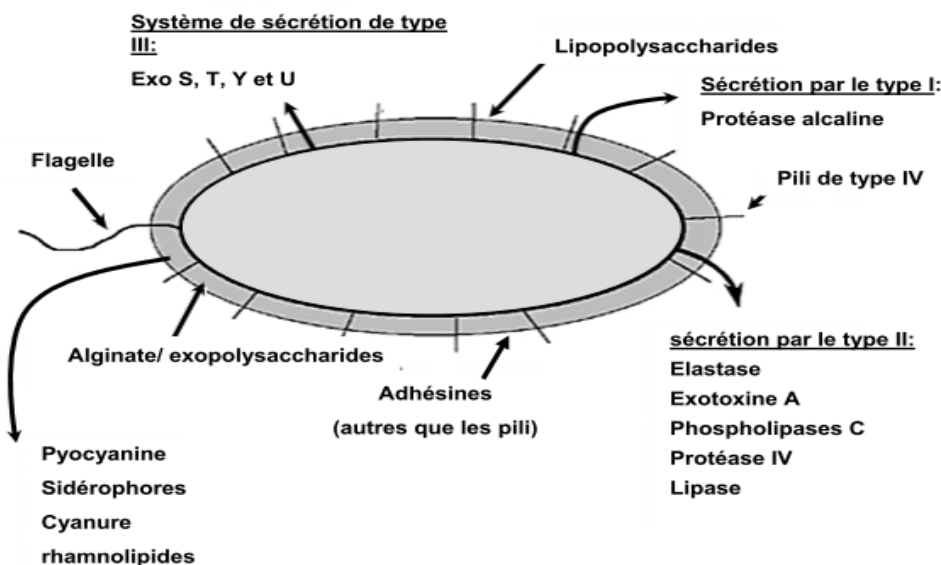


Fig.1 facteurs de virulence de *P.aeruginosa* (Van Delden et Iglewski, 1998).

- *Facteur d'attachement de type fimbriae (ou Cup)*

Chez *P. aeruginosa*, ces facteurs d'attachement sont essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques, comme le verre et le plastique, mais également dans la formation du biofilm (**Bricha et al., 2009**)

- **L'adhésion**

L'adhérence des bactéries à la cellule eucaryote cible ou à la surface tissulaire est un phénomène spécifique, qui requiert la participation de deux facteurs: un récepteur eucaryote et une adhésine bactérienne. Les récepteurs sont généralement des glucides ou des résidus peptidiques spécifiques de la cellule eucaryote (**Bricha et al., 2009**), cette adhésine est codé par le gène *lecA* et a la capacité de lier des cellules ensemble dans un biofilm (**Tremblay et Déziel., 2010**)

- **Les pili de type IV**

L'évènement initial dans l'infection de la bactérie de type rugueux aux cellules épithéliales des muqueuses grâce aux pili de type IV, qui de plus favorisent la phagocytose. Les micro-organismes incapables d'adhérer aux muqueuses perdent donc la capacité d'établir une infection. Ces pili de type IV, qui sont rétractables sont aussi impliqués dans un mécanisme de déplacement particulier, indépendant du flagelle, appelé « twitching motility » qui prédomine dans les mouvements à l'interface de surfaces solides (**Wall et Kaiser.,1999**). En outre, les souches piliées provoquent non seulement plus de pneumonies mais sont aussi à l'origine d'une plus grande mortalité que les souches ne possédant pas le pili.

- **Les lipopolysaccharides**

P. aeruginosa présente à sa surface une monocouche compacte de lipopolysaccharides (LPS) recouvrant un feuillet interne de phospholipides. Les molécules de LPS sont composées d'une partie lipidique (lipide A ou endotoxine)

Le lipide A possède des propriétés toxiques correspondant à l'endotoxine des bactéries Gram négatif et est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort (**Lynn et Golenbock.,1992**).

une pièce intermédiaire (core) et d'une chaîne polysaccharidique ramifiée plus ou moins longue pouvant être le support de l'antigène somatique O (LPS bande B) (**Bentzmann et Plésiat ., 2011**).

3.2. La formation de biofilm

Dans un biofilm (**Fig. 2**), la colonie bactérienne, qui peut être composée d'une ou de plusieurs espèces, sécrète une matrice de biopolymères caractéristique contenant

principalement des polysaccharides, des protéines et de l'ADN. Cette matrice stabilise le biofilm et protège les bactéries des attaques du système immunitaire de l'hôte et des antibiotiques. elles sont plus résistantes cent à mille fois que sous formes planctoniques (libre de leurs mouvements) (Hoiby *et al.*, 2011).

Pseudomonas aeruginosa peut former un biofilm mature en seulement 5 à 7 jours. Pour cela, une bactérie planctonique va s'attacher de manière réversible à une surface. L'étape suivante est la multiplication cellulaire, l'adhésion permanente des bactéries au support et le début de la synthèse de la matrice. Cette étape est initiée par le Quorum-Sensing. Enfin, dans certains cas, des cellules peuvent recouvrer leurs attributs planctoniques, et ainsi quitter le biofilm et aller coloniser une nouvelle surface (Hoiby *et al.*, 2011).

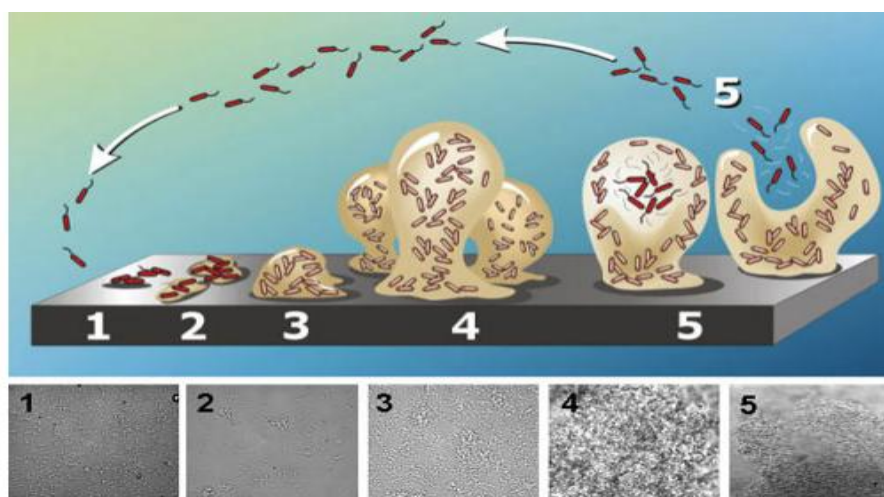


Figure 2: Modèle de formation du biofilm. Dans un premier temps, les bactéries se déplacent sous forme planctonique et adhèrent à la surface (1). Les bactéries se rassemblent et forment une microcolonie (2). Les cellules se différencient en biofilm (3), qui grandit et s'organise (4). Des cellules se détachent du biofilm (5) et reprennent une forme planctonique. (Source: <http://biology.binghamton.edu/davies/research.htm>)

3.3. La production de biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par certains micro-organismes. Leur nature, tout comme leur pouvoir tensioactif, sont fortement dépendants du type de micro-organisme concerné. Ils peuvent intervenir dans l'adhésion des bactéries sur des surfaces abiotiques et être impliqués dans la formation des biofilms (Ron et Rosenberg., 2001).

P. aeruginosa sécrète des biosurfactants rhamnolipidiques (molécules amphiphiles constitués d'un sucre hydrophile « le rhamnose » rattaché à un corps lipidique

hydrophobe.)Thermostables. Ils interviennent dans la virulence de *P. aeruginosa*, directement par une activité cytolytique sur les cellules ou indirectement en favorisant la colonisation bactérienne (Soberon-Chavez et al., 2005).

3.4. L'effet toxique

3.4.1. Les exotoxines

La production d'exotoxines est induite par un contact cellule bactérienne/ cellule eucaryote et par un milieu environnant pauvre en Ca²⁺. ExoS et ExoT sont responsables des réarrangements du cytosquelette et de l'arrondissement des cellules eucaryotes in vitro (Krall et al., 2002)

3.4.2. Le Système de Sécrétion de Type III (T3SS)

P. aeruginosa utilise un système de sécrétion de type III qui est un déterminant majeur de la virulence et permet à la bactérie d'injecter ses toxines dans la cellule hôte. Les protéines secrétées via ce système sont transloquées à travers les deux membranes de l'enveloppe cellulaire en une seule étape sans intermédiaire périplasmique . Ce système de sécrétion, provoquant des infections aiguës, nécessite le contact des pili bactériens à la cellule épithéliale pour être activé (Benabid, 2009).

4. Les protéases de *Pseudomonas aeruginosa*

Plusieurs produits extracellulaires de *P.aeruginosa* ont été intensivement étudiés, y compris l'exotoxine, les protéases, l'hémolysine, le lipopolysaccharide, et l'exoenzyme S, mais aucun ne peut s'avérer singulièrement responsable de la pathogénicité de *Pseudomonas* dans n'importe quel système modèle (Jagger et al., 1983). Les protéases ou les peptidases sont des enzymes qui peuvent hydrolyser des liaisons peptidiques dans les peptides et les protéines.

Depuis longtemps la fonction des protéases a été seulement consacrée au changement ou à la digestion des protéines comme source de nourriture. De plus en plus il apparaît clairement que l'hydrolyse d'une liaison peptidique des protéines peut avoir un éventail de fonctions biologiques qui peuvent être très subtiles et spécifiques (Hoge et al ., 2010).

4.1. Type des protéases

Le nombre exact de protéases produites par *P.aeruginosa* n'est pas connu (**Jagger et al., 1983**) mais les protéases peuvent être divisées en 6 types catalytiques différents : aspartique-protéases, métallique-protéases(élastase A, élastase B, la protéase alcaline) sérine-protéases (protéase IV), cystéine-protéases, thréonine-protéases et glutamique-protéases selon leurs résidus actifs qui sont impliqués dans la catalyse. Les aspartiques, les métalliques et des sérine-protéases sont certainement les groupes de protéase les plus abondants (**Hoge et al ., 2010**).

4 .1.1.Les metalloprotéases

4 .1.1.1. Elastase

L'élastase est une protéase majoritaire. Elle joue un rôle important dans la pathogénèse en provoquant des hémorragies et des nécroses tissulaires (**Bricha et al.,2009**), et être capable de cliver les Ig, les protéines A et D d'agent tensio-actif, et de perturber les jonctions serrées épithéliales (**Williams et al.,2010**).

- **Elastase B (pseudolysine, las B)**

Une des meilleures protéases caractérisées de *Pseudomonas* est l'élastase B (LasB). Ce metalloprotéase dépendant de zinc est de 33-kDa (**Kessler et al.,1998**) dégrade l'élastine , la fibrine et le collagène, et est empêché par des chélateurs tels que l'EDTA (**Marquart et al.,2005**), agissant sur une variété de substrats parmi lesquels on retrouve des peptides antimicrobiens tels que la cathélicidine LL-37 et la pro-protéine hCAP18 ,les chimiokines RANTES, MCP-1 et ENA-78, les récepteurs cellulaires PAR-2 et uPAR ,les protéines jonctionnelles ZO-1 et ZO-2 ,l'élastinene dont l'activité anti-sérine protéase inhibe l'élastase du polynucléaire neutrophile, ainsi que les immunoglobulines sécrétées (**Bentzmann et Plésiat, 2011**).

LasB peut cliver et activer les préformes des metalloprotéases de matrice et peut inactiver les cytokines inflammatoires de l'hôte tels que le facteur de tumeur nécrosique et l'interféron, cette protéase est également facilite l'invasion des cellules épithéliales en empêchant les régulateurs négatifs du sécrétion de type III (**Marquart et al., 2005**). Alors que selon **Bentzmann et Plésiat, (2011)**, l'élastase B est associé aux différentes pathologies telles que :

- les dommages de cornée (les kératites) ;
 - les pathologies pulmonaires, dont la production de cette métallo-protéase est corrélée à la sévérité des pneumonies acquises sous ventilation mécanique assistée ;
 - Dans la mucoviscidose au contraire, la synthèse de l'enzyme par les souches colonisant les patients tend à diminuer avec le temps sous l'effet de mutations inactivant le système de régulation du quorum sensing, indiquant que LasB est avant tout un acteur majeur dans les infections aiguës
- **Elastase A (Las A)**

La protéase LasA est une metalloendopeptidase du zinc, de 20 kDa appartenant à la famille b-lytique d'endopéptidase (**Kessler et al ., 1998**) ,également connue sous le nom de staphylolysin, elle clive les liaisons pentaglycine dans le peptidoglycane de *Staphylococcus aureus* (**Marquart et al.,2005**) . elle a été montré un rôle dans la pathogénie des infections oculaire et de poumon (**Kida et al., 2008**) est une des quatre plus abondantes endopéptidases sécrétées par *P.aeruginosa* (**Hoge et al ., 2010**).

Cette protéine possède une activité protéolytique complémentaire à celle de LasB vis-à-vis de l'élastine. Son implication dans la virulence est en relation avec son activité sur les protéoglycanes à héparan sulfate de la surface des épithéliums, ce qui relargue un ectodomaine (**Bentzmann et Plésiat, 2011**),

4.1.1.2. La protéase alcaline (aeruginolysine)

Une protéase de 48.000 d, nommée alcaline en raison du son activité à pH alcalin (**Jagger et al., 1983**) , elle a une large spécificité de clivage, ce n'est pas efficace comme l'élastase et n'a aucune activité élastolytique (**Kessler et al., 1998**) cette activité est inhibée par l'EDTA (**Sonawane et al., 2006**).

Marquart et al ., (2005), Kida et al., (2008), Hoge et al ., (2010) rapportent que la protéase alcaline est codée par le gène *aprA* et contrôlée par le *quorum sensing* de *P. aeruginosa*. Elle constitue la seule exoprotéase sécrétée par le système de sécrétion de type I. Elle dégrade efficacement les composantes du complément ainsi que les cytokines impliquées dans la réponse immune et inflammatoire comme l'INF- γ et le TNF- α .

En clivant la transferrine et en favorisant ainsi l'action des sidérophores, la protéase alcaline favorise l'approvisionnement de la bactérie en fer. Elle coupe également l'élafine

au niveau d'un domaine de liaison avec les protéines de la matrice extracellulaire (Bentzmann et Plésiat., 2011).

4.1.2. Les sérines-protéase

- *La protéase IV*

La protéase IV a été identifiée et caractérisée pour la première fois comme protéase de sérine du 26 kDa présente dans le surnageant de culture de *P. aeruginosa*. La protéase IV est également connue en tant que lysine-endopéptidase, codée par le gène *prpL* (cette protéase peut dégrader un certain nombre de protéines biologiques importantes comprenant le fibrinogène, plasminogène, immunoglobuline G et les composants C3 et C1q de complément ; son activité est empêchée par tosyl-L-lysine chlorométhylketone (TLCK) et l'agent réducteur le dithiothreitol et le 2-mercaptoéthanol (Malloy *et al.* , 2004 ; Hoge *et al.* , 2010), ainsi que le lactoferrine, la transferrine, l'élastine et la décorine (Bentzmann et Plésiat., 2011).

Cette protéase est un facteur de virulence important du fait de son implication dans diverses infections telles que les kératites, les otites, les bactériémies et la mucoviscidose (Hoge *et al.* , 2010).

- *Las D*

Las D est une sérine protéase de 23 kDa qui possède une activité staphylolytique (la capacité de lyser les bactéries staphylocci) permettant à *Pseudomonas* de concurrencer *Staphylococcus* au niveau du poumon (Benabid , 2009).

5. Résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

Les infections dues *P.aeruginosa* organisme virulent sont souvent difficile à traiter en raison du choix relativement limité des agents antimicrobiens efficaces (Harris *et al.*, 2001), bactérie de plus en plus multi-résistante aux antibiotiques, ne laissant parfois aucune alternative thérapeutique (Ben Boubakera *et al.* , 2003)

Les bactéries gram négatif non fermentants sont naturellement résistants à de nombreux antibiotiques le cas de *Pseudomonas* qui a une résistance naturel à l'imipénème et peuvent acquérir de nombreux mécanismes de résistance comme pour les b-lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones (Berthelot *et al.* , 2009)

5.1. Résistance naturelle

Outre un arsenal assez impressionnant de facteurs de virulence, *P. aeruginosa* possède naturellement les mécanismes lui permettant de résister à de nombreux antibiotiques. sa résistance intrinsèque résulte de l'action combinée de plusieurs mécanismes grâce à la très faible perméabilité de la membrane externe: en limitant la vitesse de pénétration intracellulaire des antibiotiques; cette membrane favorise l'action d'enzymes hydrolytiques ou modificatrices et le système d'efflux. (Mérens *et al.* , 2011).

5.2. Résistance acquise

P. aeruginosa peut utiliser tout un ensemble de mécanismes pour échapper à l'action des antibiotiques auxquels il est habituellement sensible. Certains mécanismes qualifiés d'intrinsèques: Mutations spontanées. cibles cellulaires ayant perdu toute affinité pour les antibiotiques (Mérens *et al.*, 2011).

1. Lieu d'étude

Les prélèvements sont pratiqués au niveau des services d'urologie et de réanimation au niveau CHU de Tlemcen. Les prélèvements sont acheminés au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-Alimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE).

2. Prélèvements

Les prélèvements ont été effectués sur des patients ayant des sondes urinaires lorsqu'il y a un changement de celui-ci ou bien à la sortie du patient. Une fois retiré, la zone insérée dans le système urinaire, rapidement transportés dans des tubes stériles au laboratoire pour être incubée à 37 °C pendant 18 à 24 heures dans du bouillon nutritif ou bouillon cœur cerveau « BHIB ».

3. Codification

Les souches prélevées du service de réanimation sont codés par la lettre R et le numéro de prélèvement exemple **R9Ps1**, celles du service d'urologie par la lettre U exemple **U3 Ps5**.

la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est utilisée pour des comparaisons.

4. Isolement et purification

L'isolement est réalisé sur milieu gélosé au cétrimide (0,2g/l) à 37 °C pendant 24 heures. Les colonies présentant une pigmentation bleu-vert sont repiquées (2 à 3 fois) sur le même milieu afin d'avoir des cultures pures pour chaque colonie.

4.1. Examen à l'état frais

On répartit un inoculum de la souche étudiée, pris à partir d'une colonie de culture sur milieu solide (gélose) sur une goutte d'eau distillée stérile, l'observation microscopique se fait à objectif x100.

4.2. Coloration de Gram

Chaque souches fait l'objet des colorations de gram pour vérifier sont appartenance a la catégorie des Gram négatif (Gram -) qui sont colorées en rose, ceci étant du à une différence de composition de la paroi. L'observation se fait à l'objectif x 100, sous immersion.

5. Identification biochimique

5.1. Test d'oxydase

Ce test est réalisé en ajoutant un disque imprégné d'oxalate N-diméthylphnyléne-diamine à une suspension bactérienne dense en eau physiologique. Ce réactif s'oxyde au contact du cytochrome des bactéries oxydase positive. La réaction d'oxydation se traduit par une coloration violette foncée en deux minutes environ.

5.2. Identification par Galerie API 20NE

• Préparation de la galerie

On réunit fond et couvercle d'une boîte d'incubation et réparti de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. On dépose stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.

• Préparation de l'inoculum

On fait une suspension bactérienne, dans une ampoule de NaCl (0,85%) ou dans un tube d'eau distillée stérile, de turbidité égale à celle de l'étalon 0,5 Mc Farland.

• Inoculation de la galerie

On remplit les tubes (et non les cupules) des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente, évitant la formation de bulles. On transfère 200 µl (4 à 8 gouttes) de la suspension précédente, dans une ampoule. On homogénéise puis remplit les tubes et cupules des tests GLU à PAC. On met de l'huile de paraffine les cupules des trois tests GLU, ADH, URE. On incube 24 à 48 heures à 30°C.

Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture.

Des tests nécessitent l'addition de réactifs : (**voir tableau de résultats en annexe1**)

- **Identification avec le tableau**

Les réactions notées sur la fiche de résultats sont comparées avec celles du tableau (annexe2)

- **Identification avec le catalogue analytique**

Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1,2 ou4) est indiquée pour chacun. On additionne à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. On obtient un nombre de 7 chiffres qui sert de code d'identification.

- **Avec un logiciel d'identification** : API 20NE version 7.0 (02/2006).

6. Les phénotypes de résistance:

6.1. Les antibiotiques testés

Les antibiotiques sont en disque AMC : Amoxicilline-clavulanate (30µg/l); CTX : Céfotaxime(30g/l); GN : Gentamicine (10g/l); K : Amikacine(30g/l); NA : Acide nalidixique (30g/l); CIP : Ciprofloxacine(5g/l); CT : Colistine (10g/l); FA : Acide fusidique(10g/l); PEF: Pefloxacine(5g/l); K: Kanamycine (10g/l); S: Sterptomycine (10g/l); OX : Oxacilline(5g/l); RA : Rifampin (Rifampicine) (30g/l); PRL : Piperacilline(100g/l).

6.2. Antibiogramme (CA SFM, 2010).

L'antibiogramme permet de catégoriser une souche bactérienne en classes semi-quantitatives (sensible, intermédiaire ou résistante) et d'orienter l'antibiothérapie. Il est basé sur l'observation de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration d'antibiotique, obtenu par diffusion à partir de disques dans un milieu gélosé, par la méthode des disques, selon le communiqué du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA – SFM, 2010).

A partir d'une culture bactérienne de 18 à 24h sur milieu gélosé, on réalise une suspension en ensemencant une colonie dans 5ml de BHIB, on incube 24h à 37 °C.

On calibre la densité optique (D.O) de la culture obtenue entre 0.08 - 0.1 à une longueur d'onde de 625nm, qui correspond à 10⁸ UFC/ml.

A partir de cette culture, on effectue une dilution au 1/10 (10⁷ UFC/ml) dans de l'eau physiologique. Puis on Ensemencer par écouvillonnage, les Boites de Pétri

préalablement coulées par 20ml de milieu Mueller Hinton, on sèche les boîtes 30 minutes à l'étuve à 37°C. On dépose les disques d'antibiotiques à l'aide d'une pince stérile, pour incuber les boîtes à 37 °C pendant 18 à 24h. , pour mesurer les diamètres d'inhibition en se référant aux valeurs critique publiées par le **CA-SFM (2010)** « **annexe 3** »

7. Test de l'activité protéolytique

L'activité protéolytique est évaluée sur un milieu de culture qui contient 3% de lait écrémé ou de caséine, et 1.5% d'agar, ce milieu estensemencé soit par touche ou par strie.

La protéolyse comme démontrée par la dégradation de la caséine incorporée dans le milieu de culture, se traduit par l'apparition d'une zone claire, autour des colonies bactériennes, après 24 à 48 h d'incubation à 37°C

8. Conservation des souches

Les souches sont conservées à 4 °C en double copie dans des tubes de gélose inclinée.

1. L'identification des souches isolées des patients avec port de sonde

La répartition et la présence des *Pseudomonas*, au niveau des services : d'urologie et de réanimation est donné par le **tableau 3**,

Après incubation sur BHIB, durant 24 heures, l'ensemble des prélèvements ont donné des troubles, signe de développement microbien. Après quoi un inoculum de chaque prélèvement est repiqué sur un milieu préparé de gélose au cétrimide pour vérifier la présence ou l'absence des *Pseudomonas*.

1.1. Le service d'urologie

Au niveau de ce service, sur un total de 17 prélèvements, neuf souches sont identifiées par API 20 NE comme étant des *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui veut dire que 8 patients ne présentent pas d'infection urinaire à *Pseudomonas*, ce nombre de 9 constitue un rapport de 1/2.

1.2. Le service de réanimation :

Contrairement au service précédent on a trouvé quatre souches étant de *Pseudomonas aeruginosa* sur un total de 23 prélèvements, ce qui veut dire que 19 patients ne présentent pas d'infection urinaire à *Pseudomonas*, ce nombre de 4 constitue un rapport de 4/23 ou 20%. (**tab 3**)

Tab. 3. répartition des prélèvements dans les services d'urologie et de réanimation (C.H.U- Tlemcen).

Service	Nbre.de prélèvements	Durée de port de sonde (js)	Dvlp sur BHIB (troubles)	Dvlp. des <i>Pseudomonas</i> sur gélose au Cétrimide	
				Négatif	Positif
Réanimation	23	7	23/23	19	4
Urologie	17	7-21	17/17	8	9
Total	40	-		27	13

Le rôle de *P.aeruginosa* en tant que pathogène opportuniste, responsable d'épidémies nosocomiales a été largement décrit. En effet, ce germe étant largement répandu dans l'environnement hospitalier, son manuportage par les patients et le personnel soignant favorise sa dissémination. L'incidence de colonisation par *P.aeruginosa* peut atteindre 60 à 70 % des patients au cours d'un séjour en unité de soins intensifs (**Ben Boubaker et al., 2003**), ceci n'est pas loin des rapports de 23/40 ou 58% .

Dans notre étude l'incidence dans le service de réanimation est de 20% chiffre qui corrèle bien avec ses constatations de **Auboyer., (2003)** qui a trouvé que *P. aeruginosa* représente 14 à 22 %, des infections nosocomiales dans le service de réanimation.

2. Identification des souches

2.1. Aspect de colonies

Petites, mates, légèrement bombées avec un bord circulaire régulier **fig.03.a**, ou bien Bombés, opaques, visqueuses parfois coulantes. Ces colonies se rencontrent spécifiquement dans des infections chroniques urinaires ou pulmonaires (mucoviscidose). Ces souches produisent de l'alginate.**fig03.b**



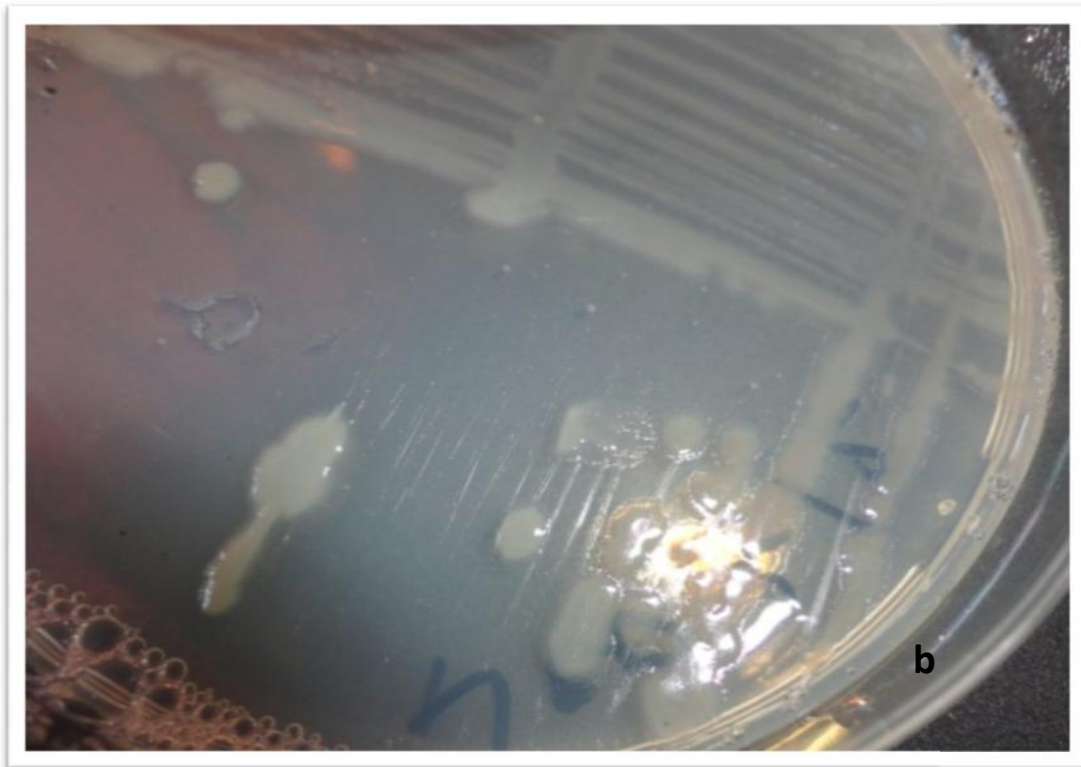


Fig.03. colonies de *Pseudomonas*: (a) petite, mates, (b) bombées, visqueuses.

2.3. Coloration de gram

La coloration met en évidence de fins bacilles à Gram négatif colorés en rose souvent incurvés non sporulés (**Fig.04**).

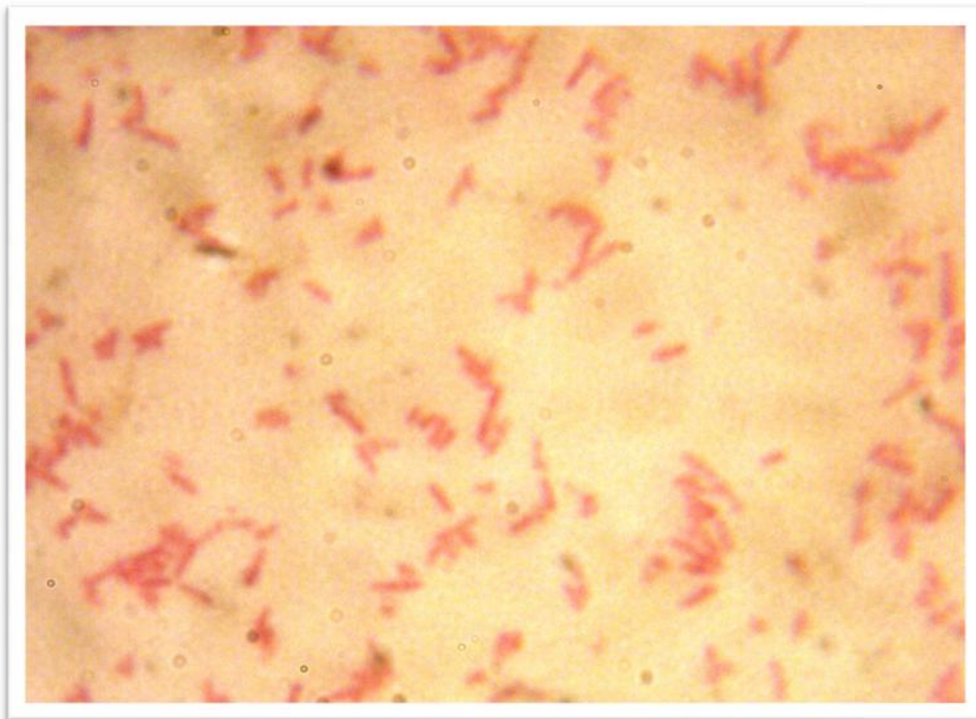


Fig.04. Coloration de gram de *Pseudomonas aeruginosa* objectif x100.

2.4. L'examen de l'état frais.

L'examen direct d'une goutte d'un échantillon liquide, entre lame et lamelle à l'objectif X100, montre des bacilles très mobiles se déplaçant en ligne droite grâce à leur flagelle polaire.

2.5. L'identification biochimique

2.5.1. Test d'oxydase :

Ce test est réalisé en ajoutant un disque imprégné d'oxalate N-diméthylphnyléne-diamine à une suspension bactérienne dense en eau physiologique. Ce réactif s'oxyde au contact du cytochrome des bactéries oxydase positive (**fig.05**). La réaction d'oxydation se traduit par une coloration rose ou violette foncée en deux minutes environ.

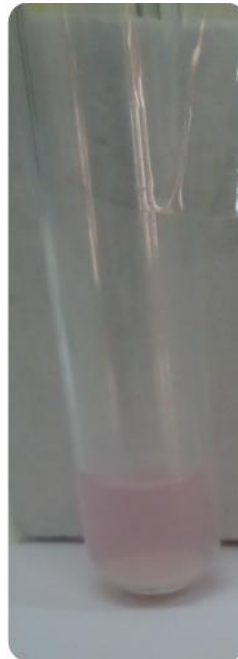


Fig.05: la souche U17 Ps13 oxydase positif

2.5.2. L'identification des souches isolées par système API 20NE

Les souches isolées des deux services sont identifiées par le système Api 20 NE. Les résultats sont référenciés au tableau de lecture et d'identification de *Pseudomonas* (**annexe 01**).



Fig. 06. Galerie Api20 NE (a) *P.aeruginosa* (U17 Ps13), (b) *P.aeruginosa* (R16Ps4); (c) *P.luteola* (U5 Ps6).

Le tableau 4 présente les résultats d'identification par API20NE, ce tableau montre que la majorité des souches isolées :

- réduisent les nitrates en nitrites ;
- ne forment pas d'indole ;
- ne fermentent pas le glucose ;
- hydrolysent la gélatine, l'esculine, L-arginine ;
- ne décomposent pas le substrat 4-nitrophényl- D-galactopyranoside par la galactosidase (para – Nitrophényl – D- Galactopyranosidase ou PNPG) ;

- assimilent le glucose, le mannitol, gluconate, l'acide caprique et plus au moins le citrate et l'acide malique, Adipique, le sucre et N-acetylglucosamine et l'arabinose ; n'assimilent pas l'acide.phénylacétique, le maltose et le mannose

Ces résultats exclu la souche (U5 Ps6) qui présente une -galactosidase et assimile l'arabinose et le mannose et n'assimile pas le gluconate.

L'identification par le système api 20NE a donné 12 souches de *Pseudomonas aeruginosa*, 4 au niveau du service de réanimation et au niveau du service d'urologie, on a 8 souches de *Pseudomonas aeruginosa* et une souche de *Pseudomonas luteola*. Ces différents chimiotypes sont exprimés au tableau 4, voir également la **figure.06 c)**

Tab.4. identification de *Pseudomonas aeruginosa* par galerie Api 20NE (réanimation et urologie) et différents chimiotype

	souches	N03/ N2	T R P	G L U	A D H	U R E	E S C	G L	P G U	G L A	A R E	M N A	M A N	N A G	M A L	G N T	C A P	A D I	M L T	C I T	P A C	OX	Chimiotype	
	Ps r* ATCC 27853	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	1354575	
réanimation	R 9 Ps1	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	1754575	
	R 13 Ps2	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	0755434	
	R 15 Ps3	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	0754575	
	R 16 Ps4	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	1754575	
urologie	U3 Ps5	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	1355475	
	U5 Ps6	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	3673051	
	U9 Ps7	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	1656436	
	U10 Ps8	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	0355535	
	U12 Ps9	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	0154475
	U14 Ps10	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	0354475
	U15 Ps11	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	0354775	
	U16 Ps12	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	1354475	
U17 Ps13	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	0354475	

Ps r* : souche de référence.

3. Multirésistance intrinsèque

L'étude de la résistance des souches issues des échantillons prélevés sur les patients, de réanimation et d'urologie, s'avère d'une importance capitale, vu que l'utilisation abusive des antibiotiques sélectionne des souches résistantes, grâce à des mécanismes biologiques et moléculaires très complexes et par la suite elle conduit à un échec thérapeutique pour des malades déjà souffrant.

L'antibiogramme a été réalisé par une méthode de diffusion sur milieu gélosé de type Mueller–Hinton selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Toutes les bactéries résistantes correspondaient aux souches classées résistantes (R) ou intermédiaires (I).

Les charges en concentration des disques d'antibiotiques testés pour les *Pseudomonas* (**fig. 07**) sont données en **annexe 3**.

Une souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, a servi pour le contrôle de la qualité de l'antibiogramme ainsi que la résistance naturelle des *Pseudomonas* aux antibiotiques.

Les antibiotiques suivants ont été testés : la Piperacilline, la Cefotaxime, l'Oxacilline, l'Amoxicilline, l'A. Clavulanique, la Kanamycine, la Ciprofloxacine, l'Acide nalidixique, la Rifampin (rifampicine), la Streptomycine, l'Acide fusidique, la Gentamicine, la Colistine, l'Amikacine et la Pefloxacine

La souche *Pseudomonas* R16Ps4 présente 7 résistances aux antibiotiques suivants : la colistine, l'Ac.Fusidique, la Kanamycine, l'Acide nalidixique, l'Oxacilline, l'Amoxicilline-A.clavunanique, la Cefotaxime et la Pefloxacine. La souche R16 Ps4 est donc sensible aux antibiotiques suivants : l'Amikacine, la ciprofloxacine, la Piperacilline, la Gentamicine.

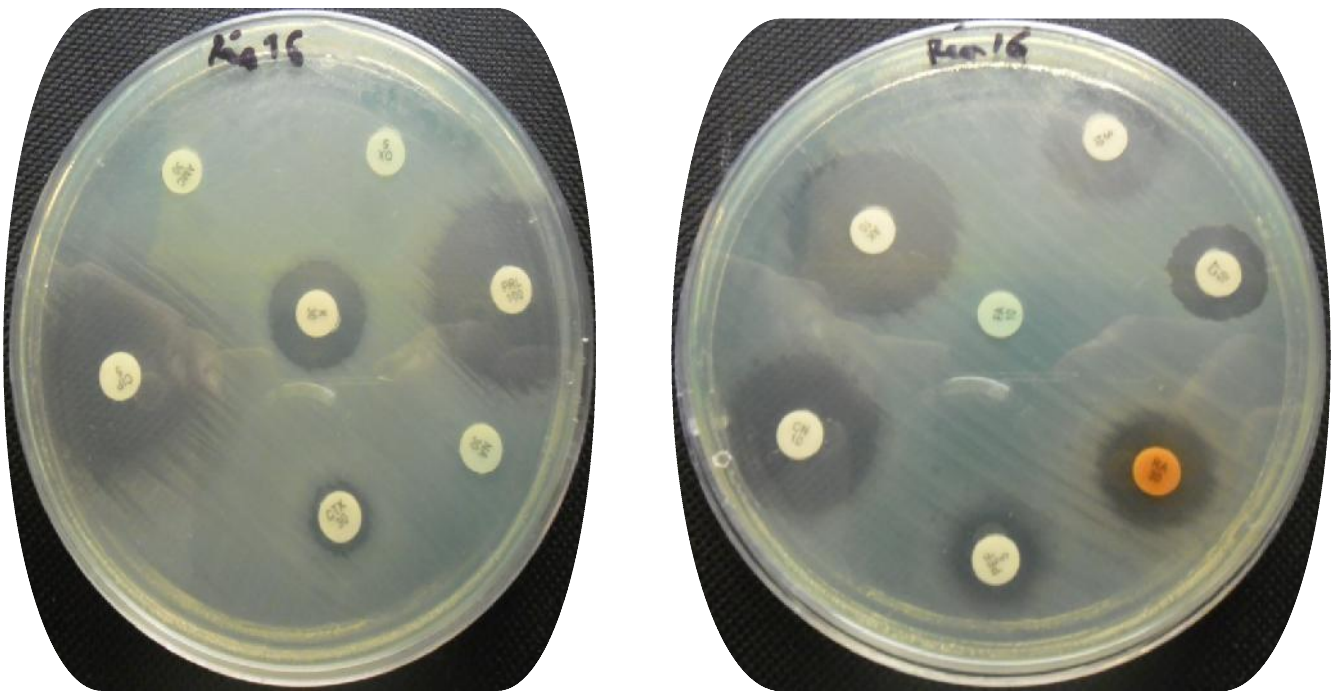


Fig.07. *Pseudomonas* R16 Ps4 avec zones d'inhibitions

Des travaux antérieurs (**Mérens et al ., 2011**) affirment que *P. aeruginosa* présente un niveau élevé de résistance naturelle aux antibiotiques., les molécules actives sur cette bactérie sont de nombre limité et sont représentées par certaines β -lactamines (pipéracilline et ticarcilline, avec ou sans inhibiteur, ceftazidime, céfépime, aztréonam, imipénème, méropénème, doripénème), les fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine), les aminosides (sauf la kanamycine), la fosfomycine et la colimycine. Les résistances acquises pour ces antibiotiques sont cependant très fréquentes, résultant de l'accumulation de mécanismes de résistance liés à des mutations chromosomiques et à l'acquisition de gènes transférables.

3.1. Multirésistance des *Pseudomonas* (services : réanimation et urologie)

Le comportement des souches vis-à-vis des antibiotiques testés est détaillé sur le **tableau 5**. L'ensemble des *Pseudomonas* résistent : à la Cefotaxime, l'Oxacilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, l'acide nalidixique, l'acide fusidique et la colistine et les $\frac{3}{4}$ à la Kanamycine et la moitié à la Streptomycine et la Pefloxacine. Les souches **R13Ps2** et **R15Ps3** sont inhibées par La Pefloxacine et la Streptomycine. La Kanamycine inhibe la souche **R16 Ps4**. La rifampicine inhibe les 04 souches du service de réanimation.

Au niveau du service d'urologie 8/9 des *Pseudomonas* résistent séparément à L'Oxacilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, l'acide fusidique, la colistine, la Céfotaxime, la Kanamycine et l'ac. Nalidixique.

2/8 des *Pseudomonas* résistent à la Ciprofloxacine, l'Amikacine, la Pefloxacine et 6/9 résistent à la streptomycine, et seulement 1/9 à la Piperacilline, la Gentamicine, la Rifampin (rifampicine).

Tab. 5. Multirésistance des *P.aeruginosa* au service de réanimation et d'urologie

SERVICE	Souches	PRL	CTX	OX	AMC	K	CIP	NA	RA	S	FA	CN	CT	AK	PEF
reanimation	R9 Ps1	S	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	R	S	I
	R13 Ps2	S	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	R	S	I
	R15 Ps3	S	R	R	R	R	S	R	I	S	R	S	R	S	R
	R16 Ps4	S	R	R	R	I	S	R	I	S	R	S	R	S	R
urologie	U3 Ps 5	S	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	R	S	I
	U5 Ps 6	S	S	R	R	S	R	R	I	R	R	S	R	R	R
	U9 Ps 7	S	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	I
	U10 Ps 8	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	S	I
	U12 Ps 9	S	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	I
	U14 Ps 10	S	R	R	R	R	S	I	I	R	R	S	R	S	I
	U15 Ps 11	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	I	R
	U16 Ps 12	S	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	R	S	I
	U17 Ps 13	S	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	R	S	I

les souches étudiées présentent une sensibilité pour la gentamicine et la ciprofloxacine, contrairement aux constatations d' **Auajjar et al ., (2006)** qui ont remarqué que les souches de *Pseudomonas* sont résistantes surtout aux antibiotiques de type pénicillines (Piperacilline), aux céphalosporines de troisième génération, aux fluoroquinolones (ciprofloxacine) et aux aminoglycosides (gentamicine)

la ciprofloxacine et dans une moindre mesure la lévofloxacine sont les fluoroquinolones possédant la meilleure activité intrinsèque sur *P. aeruginosa* (**Merens et al., 2011**).

Les 13 souches (100%) résistent à la colistine alors que 25 souches (100%).de **Sissoko (2006)**, qui a en sont sensibles.

La colistine (polymyxine E) reste active sur la quasi-totalité de ces souches et constitue fréquemment la dernière option thérapeutique disponible, au prix d'un risque non négligeable de néphrotoxicité. L'émergence d'isolats résistants à la colistine, actuellement

exceptionnelle, fait cependant craindre une évolution vers la panrésistance dans un avenir proche (**Barbier et Wolff., 2010**).

L'importance de *P. aeruginosa* comme cause des infections chez l'homme est particulièrement due à sa résistance à beaucoup d'antibiotiques. Pour ce qui concerne les antibiotiques administrés par voie parentérale, les souches sauvages de *P. aeruginosa* sont sensibles aux aminoglycosides, et à quelques céphalosporines de troisième et quatrième -générations (ceftazidime, cefepime, cefpirone) , et la piperacilline avec et sans la tazobactam, carbapenemes, monobactames, la colistine et quelques fluoroquinolones (**Hoiby et al ., 2008**).

Vu l'importance de la multirésistance de ces souches, actuellement plusieurs axes de recherche sont explorés Ainsi, il est possible de prévenir l'adhésion de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales en utilisant des agents glycomimétiques capables de « bloquer » les récepteurs sur lesquels se fixent les lectines bactériennes. Le SST3 ayant un rôle reconnu dans le développement des ces infections (**Bentzmann et Plésiat., 2010**).

D'autres auteurs (**Merens et al., 2011**) expliquent que *Pseudomonas* parvient dans certaines circonstances à modifier la composition de sa membrane externe de façon à la rendre imperméable à l'antibiotique. Ceci peut être obtenu, soit par des mutations, soit par l'activation des systèmes membranaires complexes appelés « systèmes de régulation à deux composants ».

4. Pouvoir protéolytique des souches de *Pseudomonas* isolées

Nous avons étudié l'activité protéolytique de divers isolats de *Pseudomonas* (services : réanimation et urologie), en ensemençant le milieu gélose au lait par touche ou par strie,

L'activité protéolytique est mise en évidence par l'éclaircissement de la gélose au tour de la colonie bactérienne (**Tab.6**)

La production de pyoverdine (coloration fluorescente jaune-vert) par certaines souches est visible sur ce milieu.

Tab.6. activité protéolytique des *Pseudomonas* (services: réanimation et urologie)

Souches	Ps r*	R9Ps1	R13Ps2	R15Ps3	R16Ps4	U 3Ps5	U5 Ps6	U 9 Ps7	U 10 Ps8	U 12 Ps9	U 14 Ps10	U15 Ps11	U16 Ps12	U17 Ps13
Zone de protéolyse	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

*Ps r : souche de référence

4.1. Activité protéolytique des *Pseudomonas* isolées du service de réanimation

Les souches de *Pseudomonas* isolées de ce service présentent des diamètres d'éclaircissement du milieu autour de la colonie variant de 15 à 26 mm. Ces résultats sont présentés sur le **tableau 7**.

Tab.7. Zones de protéolyses des *Pseudomonas* du service de réanimation

Souches	R9Ps1	R13Ps2	R15Ps3	R16Ps4
Zone de protéolyse (mm)	22	15	22	26

La souche R16Ps4 donne la zone la plus importante .elle est la plus protéolytique dans ce service. (**Fig. 08**), suivi par R9Ps1 et R15Ps3 qui ont donné une zone de protéolyse de 22 mm chacune.

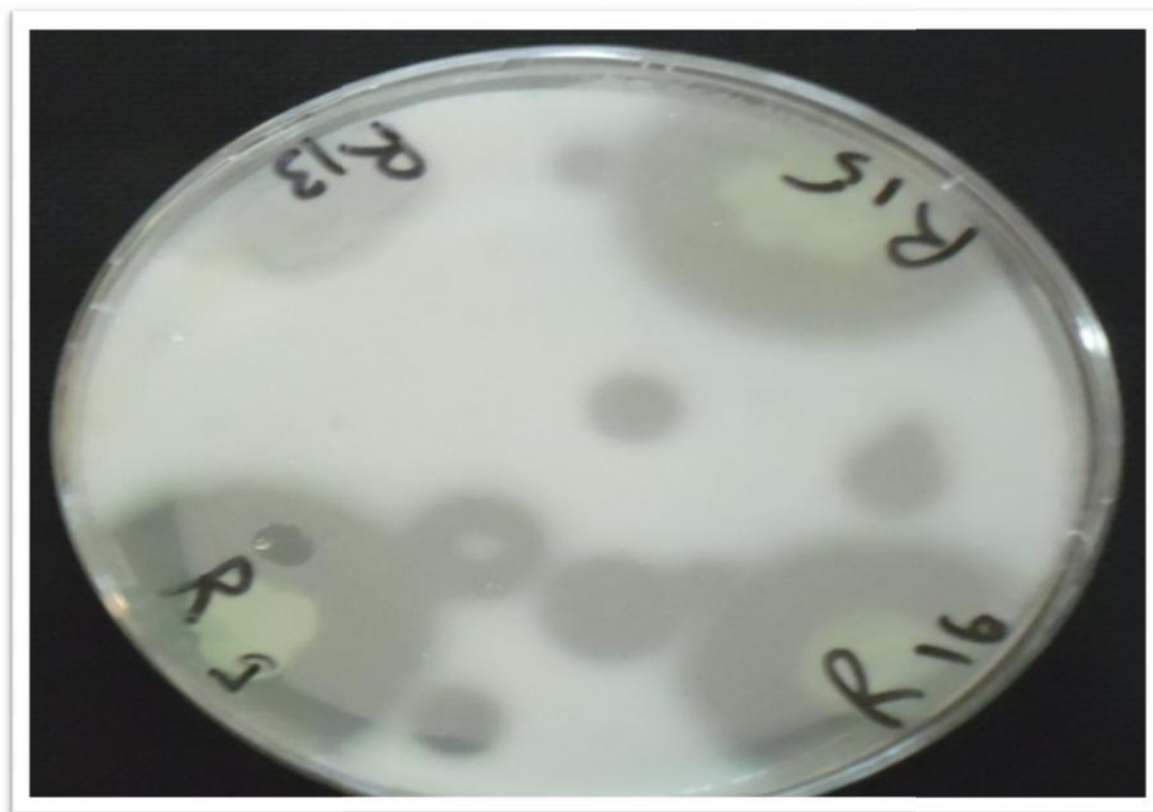


Fig.08.Activité protéolytique des *Pseudomonas* (R9Ps1 ; R13Ps2 ; R16Ps4 et R15Ps3) Sur gélose au lait après 24h D'incubation à 37°C. (Service de réanimation)

La technique d'ensemencement par strie (Fig.9) permet de répartir convenablement l'inoculum de la souche sur une longueur déterminée, sur une surface de milieu de culture. L'estimation du pouvoir du système protéolytique est plus aisée contrairement à l'ensemencement par touche.

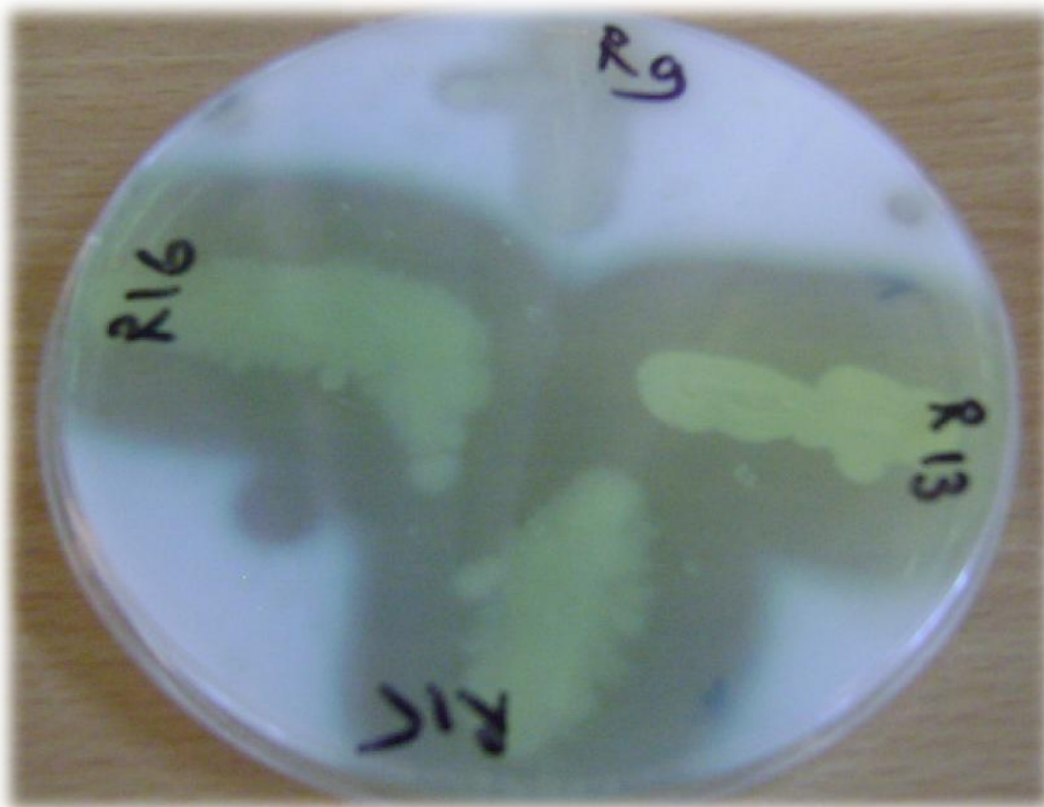


Fig.9. Activité protéolytique des *Pseudomonas* (R9 Ps1, R13 Ps2, R16 Ps4, et R15 Ps3)

4.2 .Activité protéolytique des *Pseudomonas* isolées du service d'urologie

Les résultats de ce test d'activité protéolytique sont regroupés dans le tableau 8, les diamètres des zones varient de 10 à 35 mm,

Tab.8. Zone de protéolyse des *Pseudomonas* du service d'urologie

Souches	U3Ps5	U5 Ps6	U9 Ps7	U10Ps8	U12 Ps9	U14 Ps10	U15 Ps11	U16 Ps12	U17 Ps13
Zone de protéolyse (mm)	20	0	15	14	12	33	10	34	35

Contrairement au service précédent, toutes les souches isolées de ce service présentent une activité protéolytique sauf la souche U5Ps6 qui n'a pas d'activité (**fig.10**).

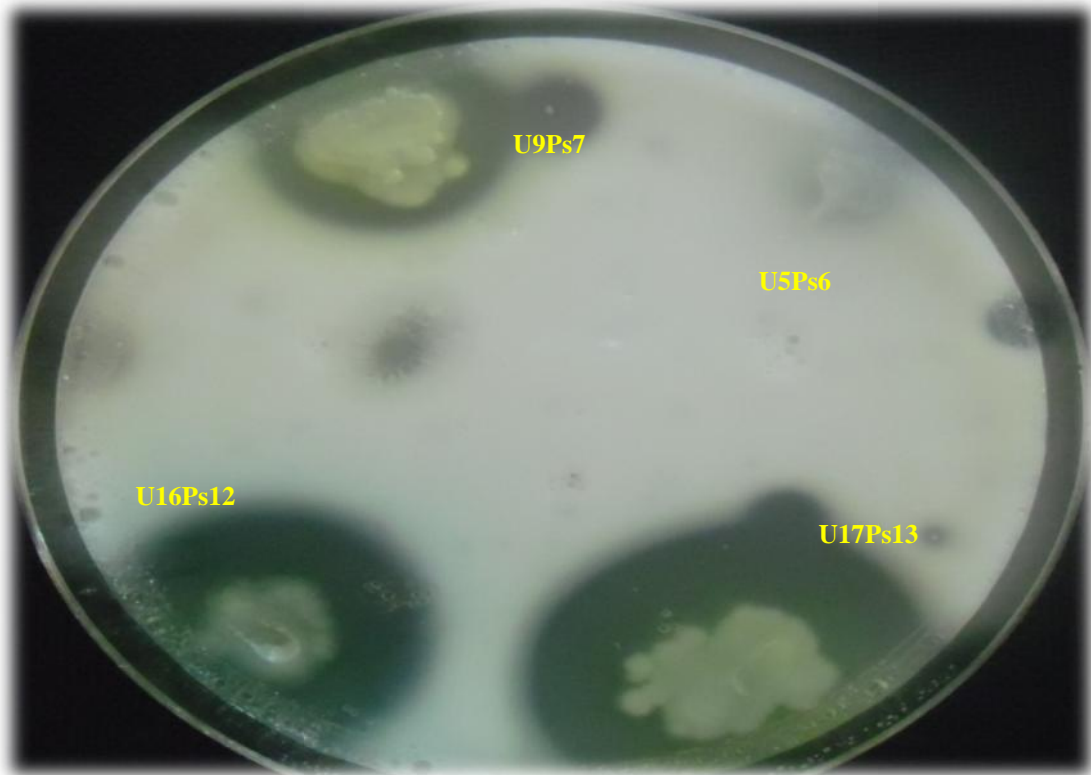


Fig.10. Activité protéolytique de colonies de *Pseudomonas* du service d'urologie : U5Ps6, U17Ps13, U16Ps12, U9Ps7. sur gélose au lait, 24h à 37°C.



Fig. 11. Exemple de *Pseudomonas* (U3Ps5 ,U5Ps6 ,U9Ps7 ,U12Ps9) avec importante zone de protéolyse

La fig. 12. Donne un histogramme de comparaison des activités protéolytiques des *Pseudomonas* des deux services.

Il apparaît que les *Pseudomonas* prélevées sur des patients du services d'urologie ont une activité proteolytique importante , cas de la souches U17Ps13, et U16Ps12 , aussi la souche R16Ps4 au service de réanimation (fig.12).

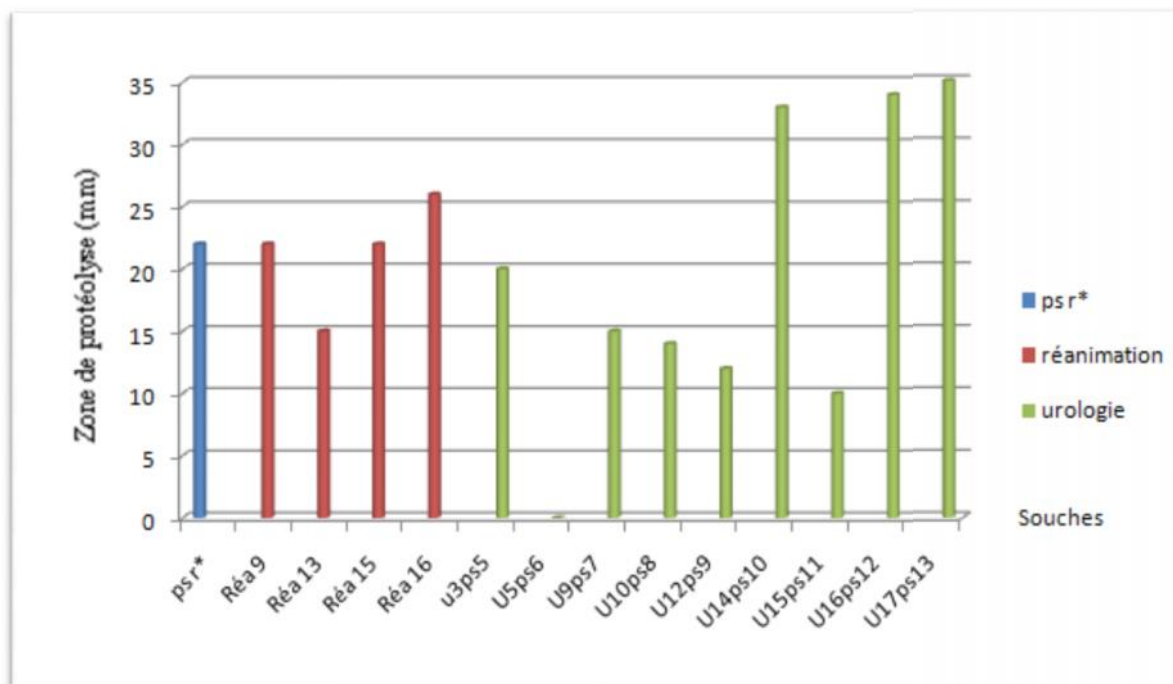


Fig.12. activité protéolytique chez les *Pseudomonas* des services : réanimation, urologie.

une hétérogénéité a pu être discernée pour les différentes souches de *P. aeruginosa*. comme jugé par l'activité protéolytique des isolats cliniques examinés ci-dessous (**fig. 12**) .

Janda et al., (1980) affirment que dans l'environnement clinique, il semble qu'il y a un processus de sélection différent, favorisant la production des protéases, par des souches isolées de crachat (des groupes cliniques) ont eu une basse activité protéolytique, il n'est pas étonnant que ce groupe d'isolats pourrait contenir un grand nombre des souches faiblement protéolytiques. Alors que *P. aeruginosa* d'origine systémique a eu une proteolytique la plus élevée, tandis que les isolats urogénitaux ont cascadé dans cette intervalle.

4.3.Frequence de présence des souches *Pseudomonas* protéolytiques

12 souches de *Pseudomonas*, 4 isolées au niveau du service de réanimation et 8 souches de l'urologie, sauf la souche U5PS6 produisent des protéases, sur un milieu gélosé au lait, avec des niveaux différents, le **tableau 9** donne la fréquence de présence de ces souches à pouvoir protéolytique avec une absence presque quasi-totale des souches non protéolytiques ce qui signifie que la major partie des *Pseudomonas* sont protéolytiques.

Tab.9. effectif et fréquence des souches de *Pseudomonas* protéolytiques

Pouvoir protéolytique en unité conventionnelle	effectifs (xi)	Frequences relatives (ni')	Fréquences cumulées N'(xi)
0	1	0.0714	0.0714
10-15	5	0.3571	0.4285
20-22	4	0.2857	0.7142
22-26	1	0.0714	0.7856
26-35	3	0.2142	0.9998

La **figure 13** donne illustration par photos des deux exemples de *Pseudomonas* faiblement protéolytiques à droite ensemencement par touche et à gauche ensemencement par strie. On remarque l'absence de protéolyse chez la souche U5 Ps6 .

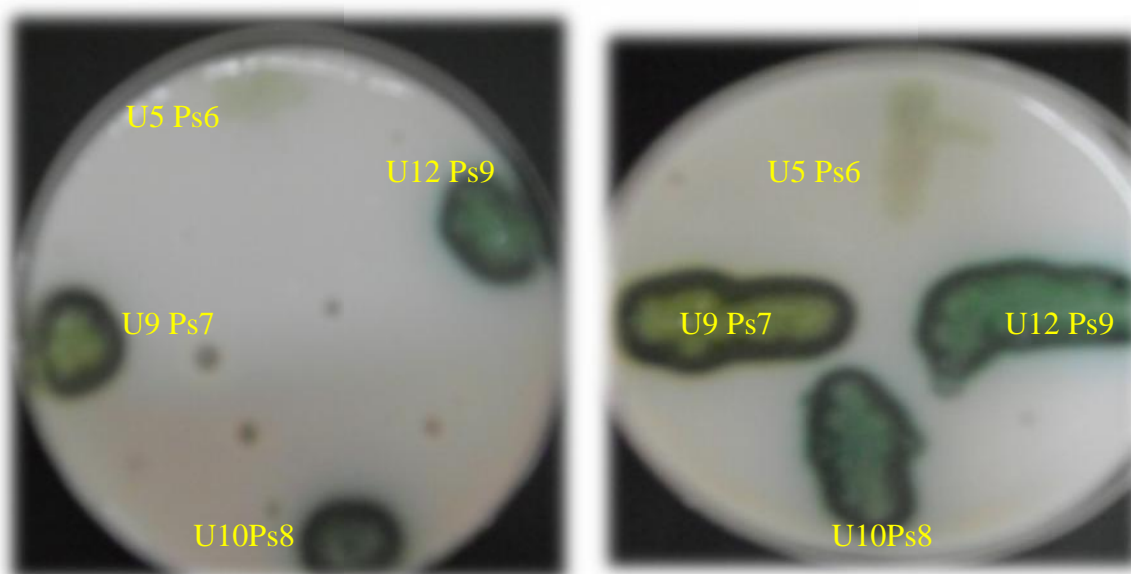


Fig. 13 : Exemple de *Pseudomonas* (U3Ps5 ,U5Ps6 ,U9Ps7 ,U12Ps9) avec faible zone de protéolyse

La colonisation par *P. aeruginosa* implique de multiples facteurs contribuant à sa pathogénicité, incluant les fimbriae ou les pili, le flagelle et les polysaccharides de surface.

La littérature scientifique rapporte que l'invasion tissulaire par *P. aeruginosa* est favorisée par la production des hémolysines (phospholipase et lecithinase), cytotoxines (leukocidine), sidérophores et du pigment pyocyanique, d'élastase, de protéases alcalines, d'où l'importance de quantifier et de qualifier ces d' métabolites.

Plusieurs auteurs rapportent des mécanismes de sécrétions d'un nombre de protéases :

L'élastase ou Pseudolysine/Las B (métalloprotéinase, à zinc) clive le collagène, les immunoglobulines G et A (IgG et IgA) ainsi que le complément (**Hong et Ghebrehiwet., 1992**), et perturbe l'intégrité de la barrière épithéliale en dérégulant les jonctions serrées des cellules épithéliales et interférant avec la clairance mucociliaire. Dégradant les protéines du surfactant A et D , qui possèdent un rôle important dans l'immunité innée.

La protéase alcaline (Aeruginolysine) , métalloprotéase de 56 kDa codée par le gène *aprA*, la seule protéase sécrétée par le système de sécrétion de type I. Elle lyse la fibrine et interfère avec sa formation. Elle inactive les principales protéines de défense de l'hôte comme les anticorps, le complément, l'interféron et les cytokines (**Avidano M.A et al., 1998**).

La protéase IV (Arginyl peptidase), est impliquée dans la dégradation du fibrinogène, de la plasmine, du plasminogène, de l'épithélium cornéen et des produits inflammatoires. Cette protéase est un facteur de virulence important du fait de son implication dans diverses infections telles que les kératites, les otites, les bactériémies et la mucoviscidose (**Louis et al., 1998**).

La protéase (la staphylolysine), codée par le gène *lasA*, dont la transcription est régulée par le *quorum sensing* et est sécrétée par le système de sécrétion de type II, est un facteur de virulence important lors des infections oculaires à *P. aeruginosa* (**Estrellas et al., 2000**).

Mais Les méthodes existantes à ce jour pour mesurer l'activité protéolytique ne permettent pas un dosage sélectif de son activité dans des surnageant de culture de *P. aeruginosa*, du fait de l'existence d'une autre protéase de spécificité comparable: l'élastase.

Conclusion

Pseudomonas. aeruginosa peut être isolé en culture sur des milieux ordinaires (gélose au lait par exemple) ou sur des milieux rendus sélectifs par l'addition d'inhibiteur, tel la cétrimide. La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37 C

C'est un pathogène nosocomial majeur, en particulier dans les services de réanimation. L'augmentation actuelle de l'incidence des souches multi résistantes de *P. aeruginosa* (PAMR) et les phénomènes épidémiques locaux qui en résultent sont donc particulièrement inquiétants

Si la sévérité des infections nosocomiales à *P. aeruginosa* est conditionnée par la virulence propre à l'espèce et par les comorbidités des patients concernés, elle dépend également de la capacité du pathogène à accumuler les mécanismes de résistance aux antibiotiques

Ces résistances acquises s'ajoutent aux nombreuses résistances naturelles de l'espèce et peuvent concerner l'ensemble des classes actives sur les souches sauvages

Ces souches sont définies par la résistance à au moins trois des quatre principales classes d'antibiotiques anti-*Pseudomonas* (pénicillines /céphalosporines/monobactames, carbapénèmes, aminosides et fluoroquinolones). Elles cumulent constamment plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques (efflux, imperméabilité, modification du site d'action ou inactivation enzymatique), conséquences d'événements génétiques multiples (mutations et/ou transfert horizontal de gènes de résistance). La pression de sélection induite par une ou plusieurs antibiothérapies préalables est le principal facteur de risque d'infection

Dans un contexte pharmaceutique peu favorable où les innovations en matière d'antibiotiques se font rares, l'émergence de souches *de P. aeruginosa* multi- voire toto-résistantes pose un réel problème de santé publique et fait craindre le pire à court ou moyen terme. Ainsi, dans les services de soins intensifs, les cliniciens sont de plus en plus souvent confrontés à des infections pour lesquelles les options Thérapeutiques sont réduites, hasardeuses (par exemple, l'association colistine et rifampicine), voire inexistantes.

Devant cet état de fait, les stratégies anti-virulence visant, non pas à détruire, mais à neutraliser la bactérie de façon à l'empêcher de nuire deviennent intéressantes

Conclusion

L'étude de 13 souches de *Pseudomonas* (12 *Pseudomonas aeruginosa* et une *Pseudomonas luteola*) isolées au niveau des services de réanimation et d'urologie (CHU de Tlemcen) sur une période de 40 jours, montre une variabilité phénotypique de la multirésistance aux antibiotiques et de la production des protéases, qui sont associées à la virulence des souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsable des infections urinaires.

Des fréquences importantes d'isolement de *Pseudomonas* sur des patients (avec port de sondes urinaires) des services de réanimation et d'urologie (23 souches de *Pseudomonas* sur 40 prélèvements)

La majorité des souches résistent à au moins 7 antibiotiques (l'amoxicilline+acide clavulanique la Céfotaxime, l'Oxacilline, l'acide nalidixique, l'acide fusidique, la colistine) de différentes classes.

La méthode de diffusion sur plaque permet d'estimer l'activité protéolytique des souches de *Pseudomonas*

Les souches issues des patients du service d'urologie semblent être plus protéolytiques

Il serait important dans le future de mener des études dans d'autre services du CHU de Tlemcen et d'essayer d'autre molécules autres que les antibiotiques

Il serait important d'élargir l'étude l'extraction et la caractérisation de ces protéases et d'essayer de trouver des méthodes thérapeutiques permettant de réduire la multi résistance et la protéolyse de ces souches.

Références bibliographiques

- 1-Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. (2000).** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 1563 -1589.
- 2-Auboyer C.,(2003).** Infections urinaires en réanimation : diagnostic et traitement. *Médecine et maladies infectieuses* 33 : 474–482.
- 3- Auajjar N., Attarassi B., Elhaloui N. E., Badoc A. (2006).** Multirésistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *p. fluorescens* et *staphylococcus aureus* et survie sur divers tissus hospitaliers, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 145 :61-76.
- 4-Barbier F. Wolff M .(2010).** Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* Vers l'impasse thérapeutique. *MS. Médecine sciences*, 26 : 960-968 .
- 5-Benabid R. (2009).** Rôle de l'élastase du neutrophile dans les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*, thèse de doctorat, université de reims champagne-ardenne, pp22-25.
- 6-Ben Boubaker -Boutiba I., Boukadida J., Triki O., Hannachi N., ben Redjeb S. (2003).** Épidémie d'infections urinaires nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes aux antibiotiques. *Pathologie Biologie* 51: 147– 150.
- 7-Berthelot P., Grattard F., Mallaval F.O., Ros A., Lucht F., Pozzetto B. (2005).** Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathologie Biologie* 53: 341-348.
- 8-Bentzmann Sophie., Plésiat P. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* une virulence complexe. *Revue Francophone des Laboratoires* – septembre octobre 435: 73-81.
- 9-Bosseray A., Micoud M. (2000).** Infections nosocomiales. *Maladies infectieuses*, 8001-f-10, p 8.
- 10-Bricha S., Ounine K., Oulkheir S., EL Haloui N. E., Attarassi B. (2009).** Facteurs de virulence et épidémiologie lies au *Pseudomonas aeruginosa*, *Revue Tunisienne d'Infectiologie*. 2: 7 – 14.
- 11-Emerson J., Rosenfeld M., McNamara S., Ramsey B., Gibson R.L. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 34: 91-100.
- 12-Fagherazzi-Pagel H. (2006).** Maladies émergentes et réémergentes chez l'homme, *Veille*, 17-28.
- 13-Feldman M., Bryan R., Rajan S., Sheffler L., Brunnet S., Tang H., Prince A. (1998)** Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun* : 43-51.

Références bibliographiques

- 14-Feuilloy M.G.J., Chapalain A., Rossignol G., Lesouhaitier O., Merieau A., Geoffroy V., Guerillon J., Meyer J.M., Orange N. (2007).** Comparative study of seven fluorescent *Pseudomonas* clinical isolates. *Revue canadienne de microbiologie* 54 : 19- 27.
- 15-Harris A.D., Smith D., Johnson A. J., Bradham D.D., Roghmann M-C. (2002).** Risk Factors for Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* among Hospitalized. *Patients Clinical Infectious Diseases* 34: 340 –345.
- 16-Hoge R., Pelzer A., Rosenau F., Wilhelm S. (2010).** Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*, current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, édition A. Méndez-Vilas. 383-375.
- 17-Hoiby N., Krogh Johansen H., Moser C., Song Z., Ciofu O., Kharazmi A. (2001).** *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect* 3: 23 - 35.
- 18-Høiby N., Ciofu O., Johansen HK., Song ZJ., Moser C., Jensen PØ., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Bjarnsholt T. (2011).** The clinical impact of bacterial biofilms. *Int J Oral Sci.* (2): 55-65.
- 19-Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. (2011)** Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* (4): 322-32.
- 20-Husson M., Hamze M., Verhille S., Izard D. (2000).** *Pseudomonas et Burkholderia*. Paris: ESKA.
- 21-Imperi F., Mettrick A .K ., Shirley M., Tiburzi F., Draper C .R., Visca P., Lamont L. I (2008).** Iron Transport and Signaling in Pseudomonads in *Pseudomonas* Model Organism, Pathogen, Cell Factory (Bernd H. A. Rehm, édition 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim) pp 129-166.
- 22-Jagger K.S., Bahner R.D., Warren L. R (1983).** Protease Phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Cystic Fibrosis, *Journal of Clinical Microbiology* 17 (1): 55-59.
- 23-Janda J. M ., Atang-Nomo S., Bottone J. E., Desmond P. E.(1980).** Correlation of Proteolytic Activity of *Pseudomonas aeruginosa* with Site of Isolation. *Journal of Clinical Microbiology*, Oct. 12 :626-628.
- 24-Kerstens I., Huys G., Van Duffel H., Vancanneyt M., Kersters K., Verstraete W. (1996).** Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 80: 266 -276.

Références bibliographiques

- 25-Kessler E., Safrin M., Gustin J.K., Ohman D.E. (1998).** Elastase and the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides, the journal of biological chemistry 273(46): 30225- 30231.
- 26-Kida Y., Higashimoto Y., Inoue H., Shimizu T., Kuwano K. (2008).** A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF- κ B through protease-activated receptors Cellular Microbiology 10(7), 1491–1504.
- 27-Kohler T., Curty L. K., Barja F., Van D. C., Pechere J.C. (2000).** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J. Bacteriol. 182: 5990-5996.
- 28-Krall R., Sun J., Pederson K.J., Barbieri J.T. (2002).** In vivo rho GTPase activating proteins activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. Infect Immun 70 (1): 360-367.
- 29-Lynn, W. A. and D.T. Golenbock (1992)** Lipopolysaccharide antagonists. Immunol. Today 13: 271-276.
- 30-Malloy L. J, Veldhuizen R A.W., Thibodeaux B.A., O’Callaghan R.J., Wright J.R (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical fonctions. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 3- 46.
- 31-Marquart M E., Caballero A .R., Chomnawang M., Thibodeaux B A., Twining S.,O’Callaghan R J. (2005).** Identification of a Novel Secreted Protease from *Pseudomonas aeruginosa* that Causes Corneal Erosions, Investigative Ophthalmology and Visual Science 46 (10): 3761-3768.
- 32-Mérens A., Delacoura E., Plésiat P., Cavallo J-D., Katy Jeannot. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* et résistance aux antibiotiques, Revue Francophone Des Laboratoires 435: 49 - 62.
- 33-Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallez M., Van eldere J., Glupczynski Y., Van laethem Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., Tulkens P.M., Van bambeke F. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* : résistance et options thérapeutiques à l’aube du deuxième millénaire, Clinical Microbiology and Infection. 305-316.
- 34-O’Toole G.A., Kolter R. (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol, 30(2): 295 - 304.
- 35-Ratledge C., Dover L.G. (2000).** Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu Rev Microbiol 54: 881-941.
- 36-Ron, E.Z., Rosenberg E. (2001)** Natural roles of biosurfactants. Environ Microbiol 3: 229-236.

Références bibliographiques

- 37-Ruimy R., Andremont A. (2004).** Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Réanimation* 13, pp 176–184.
- 38-Sawada H., Kanaya S., Tsuda M., Suzuki F., Azegami K., Saitou N. (2002).** A phylogenomic study of the OCTase genes in *Pseudomonas syringae* pathovars: the horizontal transfer of the argK-tox cluster and the evolutionary history of OCTase genes on their genomes. *J Mol Evol* 54: 437-457.
- 39-Sissoko T M ., (2006).** Infections urinaires à Bamako : aspects épidémiologiques, bactériologiques et cliniques. Thèse Docteur en Pharmacie.
- 40-Soberon-Chavez G., Lepine F., Deziel E. (2005).** Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68: 718 -725.
- 41-Sonawane A., Jyot J., Ramphal R. (2006).** *Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease iv but not in adhesion to respiratory mucins activity, *Infection and Immunity* 74(12): 7035–7039.
- 42-Stallwood B., Shears J., Williams P.A., Hughes K.A. (2005).** Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas sp.* from maritime Antarctica. *J Appl Microbiol* 99: 794-802.
- 43-Talon D., Thouverez M., Bertrand X. (2006).** Role des *Pseudomonas* et apparentés dans les infections nosocomiales. XVIIe Congrès national de la SFHH. 22-24.
- 44-Tremblay J., Déziel E. (2010).** Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* 11: 587-610.
- 45-Van Delden C., Iglewski B.H. (1998).** Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.* 4: 551-560.
- 46-Veron M. (1983).** Biologie de *Pseudomonas aeruginosa*, *Médecine et Maladies Infectieuses*, 13 (6): 352- 356.
- 47-Wall D., Kaiser D. (1999).** Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* 32: 1-10.
- 48-Walsh U.F., Morrissey J.P., and O'Gara F. (2001).** *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Curr Opin Biotechnol* 12: 289-295.
- 49-Williams J.B., Dehnbostel. J., Blackwell S.T. (2010).** *Pseudomonas aeruginosa*: Host defence in lung diseases, *Respirology* 15: 1037–1056.

Annexe 1

Tab. De lecture de la galerie miniaturisée Api 20 NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min incoloré rose-rouge	
			réduction des Nitrates en azote	Zn / 5 min rose incolore	
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRYPTOPHANE)	JAMES / immédiat incoloré vert pâle / jaune rose	
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUCOSE)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β -glucosidase) (ESCULINE)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,8	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- β D- galactopyranoside	0,22	β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β D- Galactopyranosidase)	incoloré	jaune
GLU	D-glucose	1,56	assimilation (GLUCOSE)	transparence	trouble
ARA	L-arabinose	1,4	assimilation (ARABINOSE)	transparence	trouble
MNE	D-mannose	1,4	assimilation (MANNOSE)	transparence	trouble
MAN	D-mannitol	1,36	assimilation (MANNITOL)	transparence	trouble
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-ACÉTYL-GLUCOSAMINE)	transparence	trouble
MAL	D-maltose	1,4	assimilation (MALTose)	transparence	trouble
GNT	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GLUCONATE)	transparence	trouble
CAP	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
ADI	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADipique)	transparence	trouble
MLT	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
CIT	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
PAC	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

Annexe2
Tableau d'identification de galerie api 20NE

API 20 NE	V7.0	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLL _a	ARA _a	MNE _a	MAN _a	NAG _a	MAL _a	GNT _a	CAP _a	ADL _a	MLT _a	CIT _a	PIC _a	OX
<i>Achromobacter denitrificans</i>		93	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	86	20	96	99	94	93	100
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>		81	0	0	1	0	0	1	0	99	0	90	1	1	1	100	81	94	99	98	96	100
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>		2	0	8	0	1	1	1	0	67	70	1	1	1	1	20	98	80	100	99	87	0
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>		1	0	14	0	0	0	96	0	1	0	0	0	0	0	0	99	2	99	81	1	0
<i>Acinetobacter junii/johnsonii</i>		1	0	0	0	1	0	0	0	24	8	2	0	0	0	0	99	4	96	70	0	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>		3	0	0	0	2	0	0	0	11	1	0	1	1	0	0	70	20	46	1	96	0
<i>Acinetobacter radiorisistens</i>		2	2	0	2	0	0	0	0	19	2	0	0	2	0	0	97	100	2	2	97	0
<i>Aeromonas hydrophila/caviae</i>		99	89	99	78	1	89	97	98	99	80	78	99	98	99	95	84	1	99	97	1	99
<i>Aer. salmon. ssp. mesocidale/ochromogenes</i>		100	21	9	0	0	2	93	0	66	0	93	50	2	21	2	0	0	2	0	0	100
<i>Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida</i>		100	0	57	96	0	100	99	18	84	1	0	96	84	99	99	0	1	99	1	0	100
<i>Aeromonas sobria</i>		100	86	96	86	0	1	99	99	100	12	99	99	99	100	100	93	0	99	81	0	100
<i>Alcaligenes faecalis 1</i>		1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3	77	7	100	97	97	98
<i>Alcaligenes faecalis 2</i>		78	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	99	73	91	100	69	73	100
<i>Bergeyella zoohelcum</i>		0	0	0	0	99	0	74	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	99
<i>Bordetella avium</i>		0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	99	100	100	100	95
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		76	0	0	0	96	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	94	85	91	80	100
<i>Brevundinonas diminuta/Oligella urethralis</i>		1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	1	99	93	0	100
<i>Brevundinonas vesicularis</i>		16	0	0	0	0	98	12	34	72	1	1	3	10	72	1	1	1	40	0	0	98
<i>Burkholderia cepacia</i>		89	0	24	1	1	46	70	72	100	75	99	96	99	8	97	99	93	100	99	99	91
<i>Burkholderia pseudomallei</i>		100	0	0	98	0	5	100	0	100	0	99	100	100	0	100	100	99	100	99	94	100
<i>Chromobacterium violaceum</i>		97	1	99	100	0	0	100	0	100	0	96	10	97	0	100	75	0	100	96	0	97
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	81	1	0	70	98	99	22	55	12	37	1	0	66	1	0	1	1	12	12	99
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		0	83	1	0	5	99	95	93	86	1	80	76	70	61	0	0	1	0	25	0	99
<i>Comamonas testosteroni/Pseudomonas</i>		75	0	0	6	4	0	4	1	11	3	3	4	1	2	42	55	38	87	32	3	98
<i>Delfia acidovorans</i>		96	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	76	0	0	99	71	89	99	28	83	100
<i>Grimontia hollise</i>		100	100	91	0	0	0	0	3	10	67	98	0	24	1	41	0	0	94	0	0	100
<i>Mannheimia haemolytica / Pasteurella betelae</i>		95	0	2	0	0	2	0	85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	85
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>		21	0	0	0	76	0	0	0	21	40	0	0	1	0	7	0	5	75	8	0	99
<i>Moraxella lacunata</i>		90	0	0	0	0	0	99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	99
<i>Moraxella spp</i>		94	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	17	1	0	1	1	99
<i>Myroides spp</i>		0	1	0	0	94	1	99	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	100
<i>Octobacterium anthraci</i>		80	0	0	0	84	1	0	1	82	75	90	20	75	76	94	94	4	99	47	1	99
<i>Oligella ureolytica</i>		71	0	0	0	99	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	96	95	26	96
<i>Pasteurella aerogenes</i>		100	0	97	0	100	0	0	100	99	75	97	1	80	99	97	0	0	96	0	0	77
<i>Pasteurella multocida</i>		96	96	1	0	0	0	0	10	1	0	2	1	1	2	1	0	1	1	0	0	86
<i>Pasteurella pneumotropica</i>		100	61	26	0	85	0	0	83	6	1	6	0	6	3	6	0	1	6	0	0	84
<i>Pasteurella spp</i>		96	1	2	2	1	1	1	4	19	1	1	1	1	1	1	0	1	13	1	0	87
<i>Photobacterium damsela</i>		99	0	94	99	99	2	0	11	11	0	6	0	1	6	0	0	0	63	0	0	100
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		99	99	98	98	0	0	0	86	94	0	12	0	77	98	99	77	0	94	0	0	99
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		96	0	0	80	20	1	92	1	99	1	1	89	84	1	97	98	91	98	99	1	98
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		27	0	0	80	1	1	99	1	99	71	97	89	85	1	99	99	10	99	99	16	99
<i>Pseudomonas luteole</i>		78	0	13	71	1	100	90	98	99	99	99	88	12	76	85	62	1	94	94	1	2
<i>Pseudomonas mendocina</i>		100	0	0	94	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	99	100	0	100	100	0	100
<i>Pseudomonas erythrobium</i>		0	0	0	0	1	0	11	1	100	99	99	100	0	84	99	88	2	99	99	0	1
<i>Pseudomonas putida</i>		3	0	1	88	1	0	0	1	99	96	97	5	2	1	97	99	1	100	99	93	99
<i>Pseudomonas stutzeri</i>		94	0	0	1	1	0	1	0	98	1	10	67	0	75	87	87	1	99	85	1	100
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>		90	0	0	0	95	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	3	1	0	100
<i>Ralstonia pickettii</i>		92	0	1	1	3	0	1	0	96	95	1	10	14	0	99	86	62	99	98	16	99
<i>Rhizobium radiobacter</i>		98	0	0	0	65	99	1	99	100	100	100	100	99	99	90	2	0	100	0	1	99
<i>Shewanella putrefaciens group</i>		96	0	1	0	1	71	95	0	6	11	0	0	95	10	1	71	1	90	2	0	100
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		0	0	1	0	95	100	1	99	99	91	99	0	99	99	0	0	0	1	0	0	99
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>		0	0	0	0	1	100	0	100	100	1	99	10	100	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>		10	0	0	0	1	97	1	90	99	83	75	15	64	95	94	9	3	61	45	1	73
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		97	1	0	0	0	99	99	87	84	3	95	2	98	99	2	1	0	99	98	0	7
<i>Vibrio alginolyticus</i>		98	93	93	0	0	65	91	10	76	1	16	75	57	74	76	1	0	99	1	0	99
<i>Vibrio cholerae</i>		99	100	99	0	0	1	99	99	88	0	90	78	75	97	98	1	0	99	97	1	100
<i>Vibrio metschnikovii</i>		0	60	84	0	0	7	100	50	100	0	71	99	99	99	99	17	0	99	60	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		99	99	100	1	6	1	98	97	90	81	82	99	91	98	90	0	1	99	21	1	99
<i>Vibrio vulnificus</i>		100	95	95	0	1	95	99	99	9	0	10	9	1	6	28	0	0	96	91	0	100
<i>Wautersia pauca</i>		1	0	0	0	23	0	1	0	1	1	0	1	0	1	89	89	86	99	96	14	98
<i>Weeksella virosa/Empedobacter brevis</i>		12	5	0	0	0	1	100	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	3	1	0	98

Annexe 3

Table.1. Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Remarques
		S	R	S	R	
Ticarcilline	75 µg	≤ 16	> 16	≥ 22	< 22	Cf. règles (1) à (4).
Ticarcilline/ac. clavulanique	75/10 µg	≤ 16/2	> 16/2	≥ 22	< 22	
Pipéracilline	75 µg	≤ 16	> 16	≥ 18	< 18	
Pipéracilline/tazobactam	75/10 µg	≤ 16/4	> 16/4	≥ 19	< 19	
Imipénème	10 µg	≤ 4	> 8	≥ 22	< 17	Une résistance isolée aux carbapénèmes correspond à une imperméabilité sélective associée à une hydrolyse par la céphalosporinase constitutive de l'espèce. Cette résistance n'est pas croisée avec les autres bêta-lactamines.
Méropénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 22	< 15	
Doripénème	10 µg	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19	
Aztréonam	30 µg	≤ 1	> 16	≥ 27	< 19	Cf. règles (3) à (5).
Ceftazidime	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 19	< 19	Cf. règles (1) à (5).
Céfépime	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 19	< 19	
Cefpirome	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 19	< 19	

Règles de lecture interprétative

Abréviations : TIC, ticarcilline ; TCC, ticarcilline + acide clavulanique ; PIP, pipéracilline ; PTZ, pipéracilline + tazobactam ; AZL, azlocilline ; IPM, imipénème ; ATM, aztréonam ; CFZ, céfopérazone ; CPO, cefpirome ; FEP, céfépime ; CAZ, ceftazidime.

- (1) Interpréter I un résultat S à TCC, PIP, PTZ, AZL, CFZ, CFS si une résistance à haut niveau (CMI > 256 mg/l, disque contact) à TIC est mise en évidence.
- (2) Un résultat TIC^S TCC^{VR} est en relation avec une céphalosporinase inductible ; il n'y a pas lieu de changer la catégorisation de la ticarcilline.
- (3) Interpréter I un résultat S à TIC, TCC, PTZ, CFZ, CFS, CPO, ATM si un phénotype PIP^{VR} CAZ^{VR} et TIC^S est mis en évidence.
- (4) Un résultat TIC^{VR} TCC^{VR} et/ou ATM^{VR} avec une sensibilité conservée aux autres β-lactamines du tableau ci-dessus évoque une résistance par efflux. Etant donné l'absence de données sur les conséquences cliniques, il n'y a pas lieu de changer les catégorisations.
- (5) Une synergie entre TCC et ATM et/ou CAZ et/ou FEP et/ou CPO permet la détection de certaines β-lactamases à spectre étendu (BLSE).

Annexe 3 (suite)

Tabl.1.(suit) Concentrations, diamètres critiques et règles de lecture interprétative pour *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (ng/L)		Diamètres critiques (mm)		Remarques
		S	R	S	R	
Tobramycine	10 µg	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16	Cf. règles (6) et (7).
Amikacine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15	
Isépanicine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15	
Gentamicine	15 µg (10 UI)	≤ 4	> 4	≥ 16	< 16	
Nétilmicine	30 µg	≤ 4	> 4	≥ 19	< 19	
Colistine	50 µg	≤ 2	> 2			En raison de l'absence de corrélation CMI/diamètre, il y a lieu de déterminer la CMI de la colistine en cas d'utilisation thérapeutique (souche multirésistante). Interprétation valable pour polymyxine B.
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22	
Lévofloxacine	5 µg	≤ 1	> 2	≥ 20	< 17	Valable en cas d'utilisation à la posologie maximale
Rifampicine	30 µg	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14	
Fosfomycine	50 µg + 50 µg G6P	≤ 32	> 32	≥ 14	< 14	La résistance acquise à la fosfomycine est homogène. La présence de colonies dans la zone d'inhibition ne doit pas être prise en compte.
Sulfamides	200 µg	≤ 64	> 256	≥ 17	< 12	Interprétation valable uniquement pour les souches isolées des urines.

Règles de lecture interprétative (suite)

Abréviations : G, gentamicine ; T, tobramycine ; N, nétilmicine ; A, amikacine ; I, isépanicine.

(6)- Se conformer aux diamètres critiques de chaque molécule pour l'interprétation, si une diminution des diamètres d'inhibition (< 20 mm, évoquant une résistance non enzymatique, est observée pour l'ensemble des aminoglycosides.

(7)- Interpréter A^S B^S en résultat A^S B^S et G^S et T^{RS} N^{RS} évoquant la production d'une AAC (6')-I.

Table. 2. Concentrations et diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques (se reporter aux recommandations pour certaines espèces ou certains groupes bactériens,

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
PENICILLINES					
Pénicilline G	6 µg (10 UI)	≤ 0,25	> 2	≥ 29	< 18
Ampicilline	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 21	< 16
Ampicilline/sulbactam	10/10 µg	≤ 2/8	> 8/8	≥ 21	< 16
Amoxicilline	25 µg	≤ 2	> 8	≥ 23	< 16
Amoxicilline/ac. clavulanique	20/10 µg	≤ 2/2	> 8/2	≥ 23	< 16
Ticarcilline	75 µg	≤ 8	> 16	≥ 24	< 22
Ticarcilline/ac. clavulanique	75/10 µg	≤ 8/2	> 16/2	≥ 24	< 22
Pipéracilline	75 µg	≤ 4	> 16	≥ 22	< 18
Pipéracilline/tazobactam	75/10 µg	≤ 4	> 16	≥ 22	< 18
Sulbactam		≤ 8	-		
CARBAPENEMES					
Imipénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 24	< 17
Méropénème	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 22	< 15
Ertapénème	10 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 28	< 26
Doripénème	10 µg	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19
MONOBACTAME					
Aztréonam	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 23	< 21

Table.2.(suite) - Concentrations et diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques (se reporter aux recommandations pour certaines espèces ou certains groupes bactériens,

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
CEPHALOSPORINES (Voie parentérale)					
Céfazoline		≤ 1	> 2		
Céfalotine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
Céfamandole	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 22	< 15
Céfuroxime	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 25	< 22
Céfoxitine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 22	< 15
Céfotétan	30 µg	≤ 4	> 32	≥ 23	< 17
Céfotiam	30 µg	≤ 4	> 32	≥ 22	< 15
Céfopérazone	30 µg	≤ 4	> 32	≥ 21	< 14
Céfotaxime	30 µg	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
Ceftriaxone	30 µg	≤ 1	> 2	≥ 26	< 23
Ceftazidime	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 21	< 19
Céfépime	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 21	< 19
Cefpirome	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 21	< 19
Latamoxef	30 µg	≤ 4	> 32	≥ 23	< 17
Cefsulodine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 22	< 14
CEPHALOSPORINES (Voie orale)					
Céfadroxil	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
Céfalexine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
Céfradine	30 µg	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
Céfaclor	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 22	< 16
Céfatrizine	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 22	< 15
Loracarbef	10 µg	≤ 2	> 8	≥ 23	< 15
Céfuroxime-axétil	10 µg	≤ 1	> 4	≥ 26	< 20
Céfotiam-héxétil	10 µg	≤ 1	> 2	≥ 22	< 19
Céfixime	10 µg	≤ 1	> 2	≥ 25	< 22
Cefpodoxime-proxétil	10 µg	≤ 1	> 2	≥ 24	< 21

Table.2.(suite) - Concentrations et diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques

(se reporter aux recommandations pour certaines espèces ou certains groupes bactériens,

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
AMINOSIDES					
Streptomycine	500 µg	≤ 250	> 500	≥ 14	< 12
- streptocoques, entérocoques	10 UI	≤ 8	> 16	≥ 15	< 13
- autres bactéries					
Gentamicine	500 µg	≤ 250	> 500	≥ 17	< 11
- streptocoques, entérocoques	15 µg (10 UI)	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
- autres bactéries					
Nétilmicine	30 µg	≤ 2	> 4	≥ 21	< 19
Kanamycine					
- streptocoques, entérocoques	1000 µg	≤ 250	> 500	≥ 14	< 10
- autres bactéries	30 UI	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
Tobramycine	10 µg	≤ 2	> 4	≥ 18	< 16
Amikacine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
Isépanicine	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
Spectinomycine (<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	100 µg	≤ 64	> 64	≥ 20	< 20
PHENICOLES					
Chloramphénicol	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 23	< 19
TETRACYCLINES					
Tétracycline	30 UI	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Oxytétracycline	30 UI	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Doxycycline	30 UI	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Mimocycline	30 UI	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Tigécycline	15 µg	≤ 0,25	> 0,5	≥ 22	< 22

Table.2.(suite) - Concentrations et diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques (se reporter aux recommandations pour certaines espèces ou certains groupes bactériens,

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
MACROLIDES					
Erythromycine	15 UI	≤ 1	> 4	≥ 22	< 17
Dirithromycine	15 µg	< 0,12	> 4	≥ 28	< 16
Azithromycine	15 µg	≤ 0,5	> 4	≥ 22	< 17
Spiramycine	100 µg	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19
KETOLIDES					
Télithromycine	15 µg	≤ 0,5	> 2	≥ 21	< 17
LINCOSAMIDES					
Lincomycine	15 µg	≤ 2	> 8	≥ 21	< 17
Clindamycine	2 UI	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15
STREPTOGRAMINES					
Pristinamycine	15 µg	≤ 1	> 2	≥ 22	< 19
Quinupristine-dalfopristine	15 µg	≤ 0,5	> 2	≥ 25	< 19
OXAZOLIDINONES					
Linézolide	30 µg	≤ 2	> 4	≥ 28	< 24
GLYCOPEPTIDES					
Teicoplanine	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 17	-
Vancomycine	30 µg	< 4	> 8	≥ 17	-
POLYPEPTIDES					
Bacitracine	130 µg	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15
Colistine	50 µg	≤ 2	> 2	≥ 15	< 15
SULFAMIDES-TRIMETHOPRIME					
Sulfamides	200 µg	≤ 64	> 256	≥ 17	< 12
Triméthoprim	5 µg	≤ 4	> 8	≥ 16	< 12
Triméthoprim/sulfaméthoxazole	1,25/23,75 µg	≤ 2/38	> 8/152	≥ 16	< 10

Table.2. (suite) - Concentrations et diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques (se reporter aux recommandations pour certaines espèces ou certains groupes bactériens,

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
NITROFURANES	300 µg	≤ 64	> 64	≥ 15	< 15
QUINOLONES					
Acide oxolinique	10 µg	≤ 2	> 4	≥ 20	< 17
Fluméquine	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 25	< 21
Acide nalidixique	30 µg	≤ 8	> 16	≥ 20	< 15
Acide pipémidique	20 µg	≤ 8	> 16	≥ 19	< 14
Acide piromidique	25 µg	≤ 16	> 32	≥ 20	< 16
FLUROQUINOLONES					
Ciprofloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22
Enoxacine	5 µg	≤ 1	> 2	≥ 22	< 19
Lévofloxacine	5 µg	≤ 1	> 2	≥ 20	< 17
Loméfloxacine	5 µg	≤ 1	> 2	≥ 22	< 19
Moxifloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 24	< 21
Norfloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22
Ofloxacine	5 µg	≤ 0,5	> 1	≥ 25	< 22
Péfloxacine	5 µg	≤ 1	> 4	≥ 22	< 16
Sparfloxacine	5 µg	≤ 1	> 2	≥ 20	< 16

Table.2.(suite) - Concentrations et diamètres critiques pour les diverses classes d'antibiotiques (se reporter aux recommandations pour certaines espèces ou certains groupes bactériens,

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)	
		S	R	S	R
DIVERS					
Acide fusidique	10 µg	≤ 2	> 16	≥ 22	< 15
Fosfomycine	50 µg + 50 µg G6P	≤ 32	> 32	≥ 14	< 14
Métronidazole	Comprimé 16 µg	≤ 4	> 4	-	< 21
Nitroxoline	20 µg	≤ 1	> 32	≥ 30	< 12
Rifampicine	30 µg	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14
Mupirocine	5 µg	≤ 2	-	≥ 19	-

Annexe 4

Les milieux de culture

Gélose au cétrimide

Gélose nutritive	28g/l
Cétrimide	0.2g/l
Eau distillé	1L

Gélose nutritive

Gélose nutritive	28g/l
Eau distillé	1L
PH final : 6.8	

Gélose Muller Hinton

Bouillon Muller Hinton	23g/l
Agar	10g/l
Eau distillé	1L

Bouillon cœur cerveau (BHIB) « Fluka »

Bouillon cœur cerveau	37g/l
Eau distillé	1L
PH final : 7,0±0.1	

Bouillon nutritif « BN » (institut Pasteur d'Algérie)

Bouillon nutritif	25g/l
Eau distillé	1L
PH final: 7,0±0.1	

API AUX Medium 7 ml

Sulfate d'ammonium	2 g
Agar	1, 5 g
Solution de vitamines	10,5 ml
Solution d'oligo-éléments	10 ml
Phosphate monosodique	6,24 g
Chlorure de potassium	1,5 g
Eau déminéralisée	qsp 1000 ml
PH final : 7,0-7,2	

Résumé

Nous avons isolé et identifié 04 souches de *P. aeruginosa* responsable d'infections urinaires nosocomiales au niveau du service de réanimation et 08 *P. aeruginosa* et 01 *P. luteola* responsable dans le service d'urologie par la galerie Api 20NE.

La résistance des *P. aeruginosa* aux antibiotiques est réalisée par la méthode de diffusion sur disque, selon la recommandation du CA-SFM.

les *Pseudomonas* isolées de service d'urologie présentent une résistance à 8 antibiotiques parmi les 14 testées, elles ont un pouvoir protéolytique important, le cas des souches U17Ps13, U16Ps12, et R16Ps4.

Il semble qu'il y a une relation entre la multirésistance et l'activité protéolytique toute les deux contribue au processus infectieux mais mal élucidé .

Mot clés : *Pseudomonas aeruginosa*, protease, activité protéolytique, facteur de virulence.

Summary

We have isolated and identified 04 strains of *P. aeruginosa* responsible for nosocomial urinary tract infections in the ICU and 08 *P. aeruginosa* and 01 *P. luteola* responsible in the urology department by Api 20NE gallery.

The resistance of *P. aeruginosa* to antibiotics is performed by the disk diffusion method, as recommended by the CA-SFM.

Pseudomonas isolated from the urology department have a resistance to 8 antibiotics among 14 tested, they have a large proteolytic activity, where strains U17Ps13, U16Ps12 and R16Ps4.

It seems there is a relationship between multidrug resistance and proteolytic activity both contributes to any infectious process but poorly understood.

Key word *Pseudomonas aeruginosa* protease, proteolytic activity, virulence factor.

الملخص:

قمنا بعزل وتحديد 04 من البسودوموناس ايغوجينوزا التهابات المسالك البولية وحدة العناية
المستشفيات و 08 البسودوموناس ايغوجينوزا 01 البسودوموناس ليتيولا قسم المسالك البولية

API20NE

تنفيذ البسودوموناس ايغوجينوزا للمضادات الحيوية طريقة على النحو الموصى به

CA-SFM.

البسودوموناس ايغوجينوزا لمسالك البولية لديها المضادات الحيوية 8 من بين 14 ، لديهم
بروتيني كبير حيث U17Ps13 U16Ps12 R16Ps4

يبدو أن هناك علاقة بين المقاومة للأدوية و بروتين , فهي تساهم في عملية لها
غير مفهومة.

الكلمات المفتاحية: بسودوموناس ايغوجينوزا الأنزيم البروتيني نشاط بروتين، عامل الفيروسسي .