

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

**ACHACHE Hadjer & BOUKOUCHA Nadjat**

Pour l'obtention du diplôme de

**MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES**

**Spécialité : Microbiologie fondamentale**

**Thème**

**Lutte contre *Pseudomonas aeruginosa*  
responsable des infections  
nosocomiales**

Soutenu le 02/Juillet/2025 :

Devant le Jury composé de

Président	ARABI Abed	MCA	U. Mostaganem
Encadrant	DJIBAOUI Rachid	Professeur	U. Mostaganem
Examinatrice	BOUABSA Foufa	MCB	U. Mostaganem

Année universitaire 2024/2025

# Remerciements

*Nous rendons tout d'abord grâce à **Allah** de nous avoir accordé la santé, la force, la patience et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce travail.*

*Nous témoignons ensuite notre profonde gratitude à **nos familles**, pour leur soutien, leur amour inconditionnel, leurs prières et leurs encouragements tout au long de notre vie.*

*Nous adressons également notre sincère reconnaissance à notre encadreur, **Professeur DJIBAOUI Rachid**, qui a été pour nous un véritable père académique, par son accompagnement constant, ses conseils avisés et son soutien précieux tout au long de ce projet. Qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect.*

*Nos remerciements s'adressent chaleureusement aux **membres du jury** pour l'attention qu'ils ont portée à ce travail, ainsi que pour les remarques enrichissantes qu'ils ont formulées.*

*Nous sommes reconnaissantes à **Mme BOUABSA Foufa**, notre examinatrice, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'évaluer ce mémoire.*

*Nous exprimons une gratitude particulière à notre président de jury, **M. Arabi Abed**, pour sa contribution à notre formation, sa grande disponibilité et le partage de son savoir avec générosité.*

*Nous n'omettons pas de citer **Mme TAHALAYTI Amina** pour son soutien et sa bienveillance au cours de la réalisation de ce mémoire.*

*Nos sincères remerciements vont également à **M. SOUANE Abdelkader** pour l'aide qu'il nous a apportée, ainsi qu'au **Dr ATIA Yahia** pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail.*

*Nous tenons à saluer l'ensemble des **enseignants et responsables pédagogiques** de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'**Université de Mostaganem**, pour la qualité de leur enseignement et de l'encadrement qu'ils nous ont dispensés durant tout notre parcours universitaire.*

*Enfin, nous n'oublions pas toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont apporté leur part à l'aboutissement de ce travail, que ce soit par leur aide, leurs encouragements ou leur expertise, ou même par un mot aimable ou un simple sourire.*

***Hadjer et Nadjet***

# Dédicaces

(11- 88) ﴿ وَمَا تَوْفِيقِي إِلَّا بِاللَّهِ عَلَيْهِ تَوَكَّلْتُ وَإِلَيْهِ أُنِيبُ ﴾

*Avec tout le respect et la reconnaissance que je porte dans le cœur, je dédie ce modeste travail à ceux qui me sont chers.*

*À mon cher père, mon précieux, à celui qui, malgré la distance, est toujours resté tout près de mon cœur. Aucun mot ne saurait exprimer l'amour profond et la gratitude infinie que je ressens pour toi, ni la reconnaissance que je te dois pour les innombrables sacrifices consacrés à mon éducation. À mon pilier, mon support, à qui je dois ma vie, ma réussite et tout mon respect.*

*À ma chère mère, mon paradis. Aucune parole ne saurait contenir l'immensité de l'amour et de l'affection que je te porte. Je te suis infiniment reconnaissante pour chaque instant où tu as été là pour moi, sans jamais faillir. Ton amour inconditionnel est ma plus grande force.*

*À ma sœur Linda, dont la force extérieure dissimule une profonde tendresse. Ta foi en moi et ton exemple de rigueur sont un trésor inestimable dans ma vie.*

*À ma sœur Amina, "Ma Luna" La personne à qui je confierais mes silences, celle à qui je peux tout dire, même mes vérités les plus enfouies, sans jamais craindre d'être jugée.*

*À ma sœur Hanane, celle qui transforme chaque situation en mission secrète. Qu'Allah t'accorde une santé solide et une énergie toujours aussi malicieuse que tes plans.*

*À mon adorable petite nièce Alaa, qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.*

*À mes grands-parents, qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard.*

*À mes très chers amis, pour leur présence sincère et constante, pour avoir été mes piliers dans les moments difficiles et mes complices de fête dans les instants de joie.*

*Et tout particulièrement à Souad, sœur d'une autre mère, celle qui m'a appris que ni les années, ni les circonstances, ni même la distance ne changent les vraies amitiés, ni les cœurs pleins de bonté.*

*Et à Nawel, ma partenaire de crime et de fous rires, celle qui prouve que, quel que soit la situation, un éclat de rire peut tout traverser.*

*Merci pour cette belle amitié.*

*À une âme précieuse, qui occupe une place singulière dans ma vie, et qui se reconnaîtra sans que son nom soit cité, à "A", dont un regard suffit à tout apaiser. Je rends grâce à Allah d'avoir permis que nos chemins se croisent.*

*À toutes celles et ceux qui, de près ou de loin, m'ont accompagnée, et m'ont offert un mot, un regard ou un geste porteur d'espoir.*

*Et à moi-même,*

*Pour toutes ces fois où j'ai gardé la tête haute, même lorsque le poids était lourd à porter.*

*Pour les doutes, les silences, les fatigues traversées sans bruit.*

*Pour chaque larme essuyée, chaque nuit blanche encrée, chaque échec transformé en leçon.*

*Pour ma persévérance, ma force tranquille, mon courage discret... et ce sourire que je n'ai jamais laissé tomber.*

*Hadjer*

# Dédicaces

*Je dédie ce travail à ma chère mère, dont l'amour, les prières et le soutien ont été la lumière qui a éclairé mon chemin. Tu as été la source de ma force et de ma réussite.*

*Merci du fond du cœur.*

*À mon père adoré, pour sa patience, sa sagesse et son appui indéfectible, qui m'ont permis d'avancer avec confiance malgré les obstacles.*

*Je te suis profondément reconnaissante.*

*À mes frères et sœurs, pour leur affection, leur spontanéité et leur présence réconfortante qui m'ont soutenue tout au long de ce parcours.*

*À mes chères amies, compagnes de route et de souvenirs précieux, merci pour votre amitié sincère, vos sourires et vos encouragements constants.*

*Vous avez marqué cette étape de votre présence inestimable.*

*Et enfin, à mes professeurs, que je remercie chaleureusement pour leurs efforts, leurs conseils et la qualité de leur enseignement.*

*Votre encadrement a été fondamental dans mon développement intellectuel et personnel.*

*Nadjet*

## الملخص

تُعد العدوى المرتبطة بالمستشفيات مشكلة صحية عامة خطيرة، خاصةً بسبب تزايد مقاومة *Pseudomonas aeruginosa* للمضادات الحيوية. يهدف هذا العمل إلى تقييم النشاط المضاد للميكروبات لعدة مستخلصات طبيعية، بما في ذلك مستخلصات نباتية (*Lawsonia inermis* و *Allium sativum*)، و 13 عزلة فطرية (أحدها تم تحديده كـ *Aspergillus sp.*)، بالإضافة إلى العسل، ضد سلالتين من *P. aeruginosa*، إحداهما مرجعية (ATCC 27853) والأخرى سريرية (I<sub>1</sub>). أظهرت النتائج أن مستخلصات *A. sativum* و *L. Inermis* هي الوحيدة التي أعطت نشاطاً مضاداً للميكروبات بشكل ملحوظ. بلغ قطر مناطق التثبيط 20.6 مم بالنسبة لـ *Aspergillus sp.* للسلالة المرجعية و 20 مم للسلالة السريرية، مع تركيز مثبط أدنى (MIC) بلغ 25 ملغ/مل وتركيز قاتل أدنى (MBC) بلغ 50 ملغ/مل. أظهر مستخلص *A. sativum* مناطق تثبيط بقطر 22.1 مم (ATCC) و 9.8 مم (I<sub>1</sub>)، مع MIC و MBC قدرهما 25% و 50% على التوالي. أما مستخلص *L. inermis* فقد أظهر مناطق تثبيط بقطر 13.3 مم (ATCC) و 12.4 مم (I<sub>1</sub>)، مع MIC و MBC متساويين بلغ كل منهما 7.5 ملغ/مل. وقد تم تسجيل نسبة MBC/MIC تساوي 1 لكل من *A. sativum* و *L. inermis*، مما يدل على فعالية قاتلة للبكتيريا. كما أظهرت عملية الزرع المشتركة للـ *Pseudomonas aeruginosa* مع *Aspergillus sp.* زيادة في إنتاج البيوسيانين لدى السلالة المرجعية (من 1.758 إلى 2.527 ميكروغرام/مل)، في حين انخفض قليلاً لدى السلالة السريرية (من 0.734 إلى 0.666 ميكروغرام/مل). تشير هذه النتائج إلى الإمكانيات العلاجية الواعدة لهذه المستخلصات الطبيعية ضد السلالات المقاومة المتعددة من *P. aeruginosa*، وتبرز الحاجة إلى المزيد من الدراسات التطبيقية *in vivo* وفي السياق السريري.

## الكلمات المفتاحية:

*Pseudomonas aeruginosa*، العدوى المرتبطة بالمستشفيات، مقاومة المضادات الحيوية، *Allium sativum*، *Lawsonia inermis*، *Aspergillus sp.*، النشاط المضاد للبكتيريا، البيوسيانين.

## Abstract

Nosocomial infections represent a major public health issue, particularly due to the increasing antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. This study focused on evaluating the antimicrobial activity of several natural extracts, including plant extracts (*Lawsonia inermis*, *Allium sativum*), 13 fungal isolates (one identified as *Aspergillus* sp.), and honey, against two *P. aeruginosa* strains : a reference strain (ATCC 27853) and a clinical isolate (I<sub>1</sub>). The results revealed that only the extracts of *A. sativum*, *L. inermis*, and *Aspergillus* sp. exhibited significant antimicrobial activity. For *Aspergillus* sp., inhibition zones measured 20,6 mm (ATCC strain) and 20 mm (I<sub>1</sub> Isolate), with a MIC of 25 mg/mL and an MBC of 50 mg/ml. *A. sativum* showed inhibition zones of 22,1 mm (ATCC strain) and 9,8 mm (I<sub>1</sub> Isolate), with MIC and MBC values of 25% and 50%, respectively. *L. inermis* showed inhibition zones of 13,3 mm (ATCC strain) and 12,4 mm (I<sub>1</sub> Isolate), with both MIC and MBC values of 7,5 mg/ml. A CMB/MIC ratio of 1 was observed for *A. sativum* and *L. inermis*, indicating marked bactericidal activity. Moreover, co-culture with *Aspergillus* sp. led to an increase in pyocyanin production in the ATCC strain (from 1,758 to 2,527 µg/ml), while a slight decrease was observed in the I<sub>1</sub> isolate (from 0,734 to 0,666 µg/ml). These results suggest a strong potential for these natural extracts as therapeutic alternatives against multidrug-resistant *P. aeruginosa* strains and justify further research for *in vivo* and clinical applications.

## Keywords :

*Pseudomonas aeruginosa*, nosocomial infections, antibiotic resistance, *Allium sativum*, *Lawsonia inermis*, *Aspergillus* sp., antibacterial activity, pyocyanin.

## Résumé

Les infections nosocomiales représentent un problème de santé publique majeur, notamment en raison de la résistance accrue de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques. Ce travail a porté sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de plusieurs extraits végétaux (dont ceux de *Lawsonia inermis*, *Allium sativum*), de 13 isolats fongiques (dont un identifié comme *Aspergillus* sp.), ainsi que du miel, contre deux souches de *P. aeruginosa* : une souche de référence (ATCC 27853) et une isolat clinique (I<sub>1</sub>). Les résultats ont révélé que seuls les extraits d'*A. sativum*, *L. inermis* et *Aspergillus* sp. ont exercé une action antimicrobienne significative. Pour *Aspergillus* sp., les diamètres d'inhibition étaient de 20,6 mm (souche ATCC) et 20 mm (isolat I<sub>1</sub>), avec une CMI de 25 mg/ml et une CMB de 50 mg/ml. L'extrait d'*A. sativum* a montré des diamètres d'inhibition de 22,1 mm (souche ATCC) et 9,8 mm (isolat I<sub>1</sub>), avec des CMI/CMB respectivement de 25 % et 50 %. L'extrait de *L. inermis* a présenté des diamètres de 13,3 mm (souche ATCC) et 12,4 mm (isolat I<sub>1</sub>), avec une CMI et une CMB identique de 7,5 mg/ml. Un rapport CMB/CMI égal à 1 a été observé pour *A. sativum* et *L. inermis*, indiquant une activité bactéricide marquée. Par ailleurs, la co-culture avec *Aspergillus* sp. a entraîné une augmentation de la production de pyocyanine pour la souche ATCC (de 1,758 à 2,527 µg/ml), tandis qu'elle diminuait légèrement chez l'isolat I<sub>1</sub> (de 0,734 à 0,666 µg/ml). Ces résultats suggèrent un fort potentiel de ces extraits naturels en tant qu'alternatives thérapeutiques contre les souches multirésistantes de *P. aeruginosa*, et justifient des recherches futures en vue d'une application *in vivo* et clinique.

## Mots-clés

*Pseudomonas aeruginosa*, infections nosocomiales, antibiorésistance, *Allium sativum*, *Lawsonia inermis*, *Aspergillus* sp., activité antibactérienne, pyocyanine,

## Liste des abréviations

**A** : Absorbance

**A** : *Allium*

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADP** : Adénosine diphosphate

**AES** : Accidents d'exposition au sang

**API** : Appareils et Procédés d'Identification

**AS** : Extrait d'*Allium sativum*

**ATCC**: *American Type Culture Collection*

**BLSE** :  $\beta$ -lactamases à spectre large

**C** : Cytosine

**CAUTI** : Catheter-Associated Urinary Tract Infection

**CLSI** : Clinical and Laboratory Standards Institute

**CMB** : Concentration minimale bactéricide

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**CTIN** : Comité technique national Français des Infections nosocomiales

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**DO** : Densité optique

**E** : *Echerichia*

**ECDC** : European Centre for Disease Prevention and Control

**EF** : Extrait fongique

**EHPAD** : Établissement d'hébergement pour personnes âgées dépendantes

**ELI** : Extrait de *Lawsonia inermis*

**EMD** : Elite médicaux diagnostic

**EUCAST** : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**f** : Facteur de conversion

**fig** : Figure

**G** : Guanine

**GLASS** : Global Antimicrobial Resistance Surveillance System

**HAS** : Haute Autorité de Santé

**I** : Isolat

**IAS** : Infections associées aux soins

**ISO** : International organization for standardization

**IU**: infection urinaire

**IUN** : Infections urinaires liées aux soins

**K** : *Klebsiella*

**L** : *Lawsonia*

**L.** : Linné

**LB** : Luria-Bertani

**LPS** : Lipopolysaccharides

**m** : masse

**Mb** : Méga base

**McF** : McFarland

**MH** : Mueller Hinton

**N** : Normalité

**NE** : Non entérobactéries

**P** : *Pseudomonas*

**PC** : Pneumonies communautaires

**pH** : Potentielle d'hydrogène

**PLA** : Phospholipase A

**PLB** : Phospholipase B

**PLC** : Phospholipase C

**PLD** : Phospholipase D

**Q** : quantité de pyocyanine

**R** : Rendement

**S** : *Staphylococcus*

**SAIV** : *Staphylococcus aureus* intermédiaire à la vancomycine

**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

**SARV** : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine

**SASM** : *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline

**SCV** : Small colony variants

**sp** : specie

**SPF** : Service public fédéral Santé publique

**tpm** : Tour par minute

**TTC** : Triphenyltetrazolium

**UFC** : Unité formant colonie

**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine

**VRS** : Virus respiratoire syncytial

**WHO** : World health organisation



## Liste des tableaux

---

N°	Titre	Page
<b>Tableau 1.</b>	Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
<b>Tableau 2.</b>	Caractères biochimiques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
<b>Tableau 3.</b>	Comparaison entre souches sensibles et souches multirésistantes de <i>P. aeruginosa</i> .	29
<b>Tableau 4.</b>	Résultats des tests biochimiques (API 20NE) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	51
<b>Tableau 5.</b>	Valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) de différents extraits testés vis-à-vis les <i>P. aeruginosa</i> .	52
<b>Tableau 6.</b>	Résultats de la CMI de l'extrait fongique vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i>	55
<b>Tableau 7.</b>	Résultats de la CMI de l'extrait d' <i>Allium sativum</i> vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i> .	55
<b>Tableau 8.</b>	Résultats de la CMI de l'extrait de <i>Lawsonia inermis</i> vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i> .	55
<b>Tableau 9.</b>	Évaluation du rapport d'activité antimicrobienne (CMB/CMI) des extraits vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i> .	56
<b>Tableau 10.</b>	Évaluation de la production de la pyocyanine en fonction du temps.	61

## Liste des figures

N°	Titre	Page
Figure 1.	Microorganismes isolés d'infections nosocomiales	7
Figure 2.	Types d'infections nosocomiales	9
Figure 3.	Facteurs de virulence chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Figure 4.	Modèle de formation d'un biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
Figure 5.	Mode d'action des antibiotiques	25
Figure. 6.	L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance	27
Figure 7.	Stratégies et cibles bactériennes utilisées pour lutter contre la résistance aux antibiotiques	31
Figure 8.	Mise en culture de <i>P. aeruginosa</i> sur des milieux sélectifs.	35
Figure 9.	Inoculation des galeries biochimiques API 20 NE.	37
Figure 10.	Différentes espèces végétales utilisées en expérimentation.	38
Figure 11.	Protocole d'extraction des métabolites secondaires du champignon par macération.	39
Figure 12.	Protocole d'extraction du jus frais d'ail.	40
Figure 13.	Protocole d'extraction méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i> par macération.	41
Figure 14.	Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits.	43
Figure 15.	Protocole de la détermination de la CMI.	45
Figure 16.	Aspect macroscopique des isolats de <i>P. aeruginosa</i> sur milieu king A	48
Figure 17.	Aspect macroscopique des isolats de <i>P. aeruginosa</i> sur milieu king B.	48
Figure 18.	Isolats de <i>P. aeruginosa</i> sur milieu king A sous lumière UV.	49
Figure 19.	Observation microscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> après colocation de Gram x 1000.	49
Figure 20.	Test de l'oxydase	50
Figure 21.	Résultats biochimiques des galeries API 20 NE.	50
Figure 22.	Effet antagoniste du champignon C5 vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i> .	51
Figure 23.	Effet antimicrobien de différents extraits testés vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i> .	53
Figure 24.	Concentration minimale inhibitrice de l'extrait fongique vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i> .	57
Figure 25.	Concentration minimale inhibitrice de l'extrait de <i>A. sativum</i> vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i>	57
Figure 26.	Concentration minimale inhibitrice de l'extrait de <i>L. inermis</i> vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i> .	57
Figure 27.	Résultats de la CMB des trois extraits vis-à-vis <i>P. aeruginosa</i> .	58
Figure 28.	Aspect macroscopique de <i>Aspergillus</i> sp. identifié sur milieu Sabouraud	59
Figure 29.	Aspect microscopique de <i>Aspergillus</i> sp. identifié avec ou sans coloration au bleu de lactophénol.	59
Figure 30.	Co-culture de <i>P. aeruginosa</i> et <i>Aspergillus</i> sp. en milieu LB liquide.	62
Figure 31.	Extraction liquide-liquide de la pyocyanine par chloroforme.	62
Figure 31.	Réextraction liquide-liquide de la pyocyanine par l'acide chlorhydrique.	62
Figure 33.	Évaluation de la quantification de la production de la pyocyanine en fonction de temps.	63

# Table des Matières

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	

Introduction .....	1
--------------------	---

## Partie bibliographique

### Chapitre I. Les infections nosocomiales

1. Définition .....	5
2. Épidémiologie .....	5
3. Origine et Mode de transmission .....	6
3.1. Origine .....	6
3.2. Mode de transmission .....	6
3.2.1. Transmission par contact .....	6
3.2.2. Transmission aérienne .....	6
3.2.3. Transmission par voie sanguine (hématogène) .....	7
3.2.4. Transmission par voie digestive / oro-fécale .....	7
3.2.5. Transmission croisée via le personnel hospitalier .....	7
4. Germes responsables des infections nosocomiales .....	7
4.1. <i>Enterobacter</i> .....	8
4.2. <i>Escherichia coli</i> .....	8
4.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	8
4.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
4.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	9
5. Les types des infections nosocomiales .....	9
5.1. L'infection urinaire .....	10
5.2. Pneumopathies nosocomiales .....	10
5.3. Infections du site opératoire .....	10
5.4. La bactériémie .....	11
5.5. Gastro-entérites à <i>Clostridium difficile</i> .....	12
6. Facteurs de risque .....	12
6.1. Les facteurs liés au patient .....	12
6.2. Les facteurs liés aux soins médicaux .....	12
6.3. Les facteurs environnementaux .....	12
7. Prise en charge des infections nosocomiales .....	13
8. Prévention .....	13

## Chapitre II. *Pseudomonas aeruginosa*

---

1. Définition	15
2. Taxonomie	15
3. Écologie et réservoirs de <i>P. aeruginosa</i>	16
4. Caractéristiques microbiologiques	16
5. Génome	17
6. Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	18
6.1. Flagelle	19
6.2. Pili type IV	19
6.3. Lipopolysaccharides	19
6.4. Exotoxine A	19
6.5. Elastase	20
6.6. Phospholipases	20
6.7. Pyocyanine et pyoverdine	20
6.8. Le biofilm	21
7. Facteurs favorisant l'implantation de <i>P. aeruginosa</i>	21
8. Infections causées par <i>P. aeruginosa</i>	22

## Chapitre III. Profils de résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*

---

1. Définition	24
2. Les cibles bactériennes des antibiotiques	24
3. L'antibiorésistance	25
3.1. Résistance naturelle (intrinsèque)	25
3.2. Résistance acquise	25
4. Multirésistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
4.1. Mécanismes de multirésistance	26
4.1.1. Imperméabilité de la membrane externe	26
4.1.2. Pompes à efflux multidrogues	26
4.1.3. Production d'enzymes inactivantes	26
4.1.4. Modification des cibles	26
4.1.5. Biofilm	26
4.2. Épidémiologie de la résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
4.2.1. Prévalence et tendances	27
4.2.2. Facteurs favorisant la dissémination	28
4.3. Conséquences cliniques de la résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
4.3.1. Échec thérapeutique	28
4.3.2. Augmentation de la morbidité et de la mortalité	28
4.3.3. Allongement de la durée d'hospitalisation	28
4.3.4. Coûts économiques accrus	28
4.4. Comparaison entre souches sensibles et souches multirésistantes	29
5. Surveillance et prévention de la résistance	29
5.1. Surveillance	29

5.1.1. Surveillance microbiologique.....	29
5.1.2. Systèmes de notification.....	30
5.2. Prévention.....	30
5.2.1. Bon usage des antibiotiques.....	30
5.2.2. Mesures d'hygiène et contrôle des infections.....	30
5.2.3. Recherche et développement.....	30
6. Alternatives naturelles aux antibiotiques contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	30

## Partie expérimentale

### Chapitre IV. Matériel et méthodes

1. Objectif.....	34
2. Origine des isolats de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
3. Confirmation de l'identification des isolats de <i>P. aeruginosa</i> .....	34
3.1. Revivification des isolats .....	34
3.2. Examen macroscopique des isolats .....	35
3.3. Examen microscopique des isolats .....	35
3.4. Tests biochimiques .....	35
4. Évaluation de l'activité anti <i>Pseudomonas</i> .....	38
4.1. Évaluation de l'activité antagoniste des isolats fongiques contre <i>P. aeruginosa</i> .....	39
4.1.1. Extraction des métabolites secondaires fongiques.....	39
4.2. Préparation d'extrait d' <i>Allium sativum</i> .....	40
4.3. Extraction hydro-méthanolique de <i>L. inermis</i> .....	40
4.4. Détermination du rendement d'extraction.....	40
5. Préparation des dilutions des extraits à tester .....	42
6. Préparation de l'inoculum .....	42
7. Ensemencement des inoculums et dépôt des disques .....	42
8. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB).....	44
9. Identification de l'espèce fongique la plus performante.....	45
9.1. Étude macroscopique .....	45
9.2. Étude microscopique .....	46
10. Évaluation de la stimulation de <i>P. aeruginosa</i> par <i>Aspergillus sp</i> via la pyocyanine.....	46
10.1. Mise en place de la co-culture.....	46
10.1.1. Extraction et quantification de la pyocyanine.....	46

### Chapitre V. Résultats et discussion

1. Revivification et confirmation des isolats microbiens étudiés .....	48
1.1. Examen macroscopique .....	48
1.2. Examen microscopique .....	49
1.3. Tests biochimiques de confirmation .....	49
1.3.1. Test de l'oxydase.....	49

1.3.2. Galerie API 20 NE.....	50
2. Évaluations des activités anti- <i>Pseudomonas</i> .....	51
2.1. Présélection de l'espèce fongique et l'extraction de ses métabolites secondaires .....	51
2.2. Rendement d'extraits d' <i>Allium sativum</i> et <i>L. inermis</i> .....	52
2.3. Activité antimicrobienne des extraits .....	52
2.4. Détermination de la CMI et de la CMB de différents extraits.....	54
3. Identification de l'espèce fongique étudiée.....	59
4. Évaluation de la stimulation de <i>P. aeruginosa</i> par <i>Aspergillus sp</i> via la pyocyanine.....	60
Conclusion.....	65
Références bibliographiques	
Annexes	



# **Introduction**

Actuellement les infections nosocomiales constituent un véritable problème de santé publique, en raison de leur gravité, liée à la multirésistance des germes impliqués (**Dia et al., 2008**). Les bactéries sont les agents pathogènes les plus fréquemment responsables de ces infections. *P. aeruginosa* est une bactérie, capable de provoquer diverses infections opportunistes graves chez les individus. Elle est responsable de 11 % des infections nosocomiales, entraînant des taux de mortalité et de morbidité élevés. Elle est responsable d'infections chirurgicales et de plaies, d'infections urinaires, de pneumonies, de mucoviscidose et de bactériémies (**Khan et al., 2015**).

*Pseudomonas aeruginosa* a une tendance à développer une résistance multiple aux antibiotiques. Cette résistance multiple résulte d'une combinaison de mécanismes intrinsèques et acquis qui limitent les options thérapeutiques, notamment les pompes à efflux, comme MexAB-OprM, réduisent la concentration intracellulaire des antibiotiques. Elle produit également des enzymes telles que les  $\beta$ -lactamases à spectre large et les carbapénémases, capables d'hydrolyser de nombreuses  $\beta$ -lactamines. Des mutations dans les gènes de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV peuvent conférer une résistance aux quinolones. Enfin, la formation de biofilms protège les bactéries et augmente leur tolérance aux traitements (**Lister et al., 2009 ; Poole, 2005 ; Jacobs et al., 2003**).

En effet, l'exploration d'autres alternatives naturelles comme les métabolites des végétaux et des champignons pourrait fournir des solutions directes à divers problèmes de santé (**Hu et Chua, 2025**).

Les champignons filamenteux, en particulier ceux du genre *Aspergillus*, se révèlent être des producteurs prometteurs de métabolites secondaires bioactifs. Plusieurs études ont démontré que certains extraits fongiques d'*Aspergillus* sp. possèdent une activité antibactérienne significative contre *P. aeruginosa* (**Shady et al., 2023**). En plus Les champignons marins, évoluant dans des conditions extrêmes telles que la salinité élevée, la pression hydrostatique et l'absence de lumière, pourraient présenter des mécanismes biochimiques inédits. Leur relative sous-exploration par rapport aux champignons terrestres en fait un domaine de recherche émergent et prometteur (**Hasan et Ansari, 2015**).

*Lawsonia inermis*, plante médicinale largement utilisée en phytothérapie traditionnelle, a montré un potentiel intéressant en tant qu'agent antimicrobien. Plusieurs études ont mis en évidence son efficacité contre divers pathogènes, notamment *Pseudomonas aeruginosa*. Cette

activité serait liée à la richesse de cette plante en composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les tanins et les naphthoquinones, notamment la lawsone (**Habbal et al., 2005**).

*Allium sativum* (l'ail) est reconnu non seulement pour son utilisation culinaire, mais aussi pour ses propriétés antimicrobiennes, notamment contre *Pseudomonas aeruginosa*. En particulier, des extraits aqueux ou alcooliques d'ail, riches en composés organosulfurés comme l'allicine, l'ajoène et divers disulfures, ont démontré une activité inhibitrice contre la croissance de *P. aeruginosa* (**Bhatwalkar et al., 2021**)

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie pathogène dont la virulence repose sur une panoplie de facteurs lui permettant de coloniser l'hôte, d'échapper au système immunitaire et de provoquer des dommages tissulaires importants (**Lau et al., 2004**). Parmi ces facteurs, la pyocyanine occupe une place essentielle. Ce pigment phénazinique à activité redox est impliqué dans la production de stress oxydatif, la perturbation des fonctions cellulaires et la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (**Hall et al., 2016 ; O'Malley et al., 2004**).

Sa biosynthèse peut être modulée par des interactions environnementales, notamment lorsqu'elle est exposée à des composés bioactifs. Effectivement, certaines perturbations induites par des extraits végétaux ou des métabolites fongiques, comme ceux sécrétés par des espèces du genre *Aspergillus*, peuvent influencer l'expression de ce facteur de virulence, soit en l'inhibant, soit en la stimulant, selon les conditions de cohabitation et la nature des métabolites impliqués (**Nazik et al., 2020 ; Mowat et al., 2010**).

Notre travail se base sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits végétaux et fongiques contre *P. aeruginosa* pour identifier des moyens de lutte contre les souches multirésistantes de cette espèce bactérienne. Cette étude vise à répondre à une problématique liée à la menace croissante que représente cette bactérie opportuniste dans le contexte des infections nosocomiales et des échecs thérapeutiques.

Le présent manuscrit se divise en deux grandes parties. La première est la partie bibliographique qui se compose de trois chapitres qui sont les infections nosocomiales, *P. aeruginosa* et profils de résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*.

La deuxième est la partie expérimentale qui se compose d'un chapitre du matériel et méthodes et le chapitre des résultats et discussion. Le document s'achève par une conclusion qui reprend les points forts de cette étude.



# Chapitre I. Les infections nosocomiales

Épidémiologie, agents pathogènes,  
transmission, prise en charge et  
prévention



### Chapitre I : Infections nosocomiales.

#### 1. Définition

Selon l'origine étymologique, se basant sur le terme latin « nosocomium » qui signifie hôpital, une infection nosocomiale est définie, comme le souligne avec précision le Petit Larousse : « une infection contractée lors d'un séjour en milieu hospitalier ».

Le comité technique national Français des Infections nosocomiales (**CTIN**) donne la définition suivante : « 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 » (**Hamza, 2010**). Quand l'état infectieux du patient à son admission n'est pas connu, on considère habituellement que l'infection est nosocomiale si elle se manifeste après une période d'hospitalisation d'au moins 48 heures ou bien une durée qui dépasse la période d'incubation de l'infection. « Si une infection se produit sur le site opératoire, la période généralement reconnue est de 30 jours, ou un an si une prothèse ou un implant a été inséré, suite à l'intervention (**Gachot et Coriat, 2019**).

Actuellement ces infections nosocomiales constituent un véritable problème de santé publique, de leur gravité du fait de la multirésistance des germes impliqué (**Dia et al., 2008**).

Selon l'**Organisation mondiale de la santé** : une infection nosocomiale, également appelée infection hospitalière, peut être définie de la manière suivante : Infection contractée à l'hôpital par un patient hospitalisé pour une autre raison que cette infection. Infection qui se manifeste chez un patient admis à l'hôpital ou dans un autre établissement de santé, et chez qui cette infection n'était ni présente ni en phase d'incubation au moment de l'admission. Cette définition englobe les infections acquises à l'hôpital qui se manifestent après la sortie, ainsi que les infections professionnelles chez le personnel de l'établissement.

#### 2. Épidémiologie

Selon **SPF (2021)** On distingue :

- Les **infections associées aux soins** (IAS) comprenant les infections nosocomiales ainsi que les infections liées aux soins en dehors de l'hôpital (EHPAD, soins à domicile...);
- Les **infections nosocomiales** à proprement parler, regroupant toutes les infections survenant au moins 48 heures après l'admission à l'hôpital. Cette définition exclut les pathologies en incubation et présentes à l'admission. Ce délai est porté à 30 jours en cas d'intervention chirurgicale et à 1 an en cas de mise en place d'un matériel étranger (par exemple, prothèse orthopédique). Une infection associée à un geste invasif peut être considérée comme nosocomiale quel que soit son délai d'apparition, même très bref, après le geste (par exemple, bactériémie survenant dans les suites immédiates d'un cathétérisme).

### 3. Origine et Mode de transmission

#### 3.1. Origine

On peut classées les infections nosocomiales selon leur origine en deux catégories : Exogènes et Endogènes :

- Endogène : Causées par les propres germes (flore intestinale, flore digestif)
- Exogènes : transmise de l'environnement hospitalier, le personnel, le matériel ou d'autre patients.

#### 3.2. Mode de transmission

Les infections nosocomiales peuvent être transmises de plusieurs façons. La connaissance précise de ces modes est essentielle pour mettre en place des mesures de prévention efficace :

##### 3.2.1. Transmission par contact

**a. Contact direct :** C'est le mode de transmission le plus fréquent. Transmission d'un agent infectieux d'une personne à une autre par contact physique direct, souvent via les mains du personnel soignant, comme la transmission de *Staphylococcus aureus* (y compris SARM) d'un patient colonisé à un autre patient, et de *Clostridium difficile* par contact avec les mains contaminées (Pittet *et al.*, 2009).

**b. Contact indirect :** c'est une transmission via un objet ou une surface contaminée, tel que les cathéters, sondes urinaires, scopes, thermomètres, lits non désinfectés (Ducel *et al.*, 2002).

##### 3.2.2. Transmission aérienne

**a. Par gouttelettes ( $\leq 5$  microns) :** Transportées sur une courte distance (1 à 2 mètres).

Les gouttelettes émises lors de la toux, éternuement ou parole, peuvent contaminer les muqueuses du soignant ou du patient (cas des infections à virus respiratoires (grippe, Virus respiratoire syncytial (VRS), *Streptococcus pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae*) (Garner, 1996).

**b. Par aérosols ( $\leq 1$  micron) :** Restent en suspension dans l'air pendant plusieurs heures avec une pénétration profonde dans les voies respiratoires (cas de *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose) et *Aspergillus* spp. (Champignon opportuniste en milieu hospitalier) (WHO, 2004).

### 3.2.3. Transmission par voie sanguine (hématogène)

Survient lors de manipulations invasives à savoir l'injections intraveineuses, pose de cathéters, transfusions sanguines, et accidents d'exposition au sang (AES) notamment les virus (VIH, hépatites B et C) (Burke, 2003).

### 3.2.4. Transmission par voie digestive / oro-fécale

Résulte souvent d'un manque d'hygiène des mains après contact avec des matières fécales. Toucher un objet ou un aliment contaminé peut aboutir à une ingestion accidentelle du pathogène comme *Clostridium difficile* et des entérobactéries multirésistantes (HAS, 2019).

### 3.2.5. Transmission croisée via le personnel hospitalier

Le personnel peut devenir vecteur asymptomatique de certains agents pathogènes comme *Staphylococcus aureus* au niveau des narines (McDonald et al., 2018).

## 4. Germes responsables des infections nosocomiales

Les agents pathogènes responsables des infections nosocomiales sont les bactéries, les virus et les champignons parasites (fig.1).

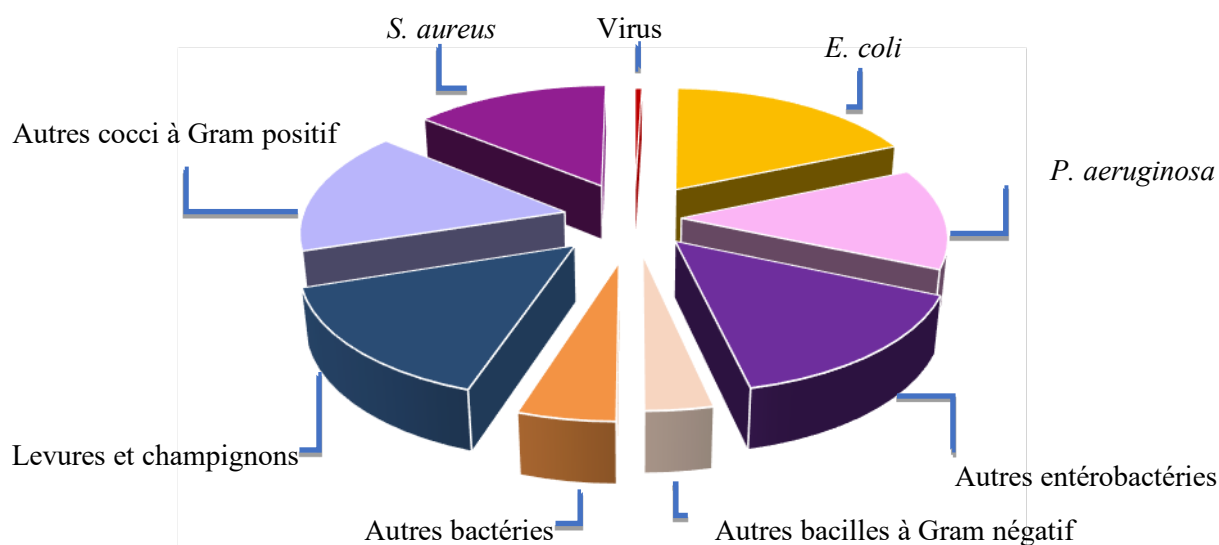


Figure 1. Microorganismes isolés d'infections nosocomiales (Berthelot, et al., 2005).

Les bactéries sont les agents pathogènes les plus fréquemment responsables des infections nosocomiales. Certaines appartiennent à la flore naturelle du patient (**Khan et al., 2015**). Seuls 52 % de ces infections nosocomiales ont été microbiologiquement investiguées (**Dia et al. 2008**).

### 4.1. *Enterobacter*

Le genre *Enterobacter* appartient à la famille des entérobacteriaceae, au sein de l'ordre des entérobacterales, et certaines de ses espèces sont apparues ces dernières années comme d'importants agents pathogènes nosocomiaux. Les espèces d'*Enterobacter* peuvent provoquer de nombreuses infections, généralement associées à des dispositifs ou procédures invasifs, et figurent parmi les principales étiologies des infections nosocomiales du sang (**Álvarez-Marín et al., 2021**).

### 4.2. *Escherichia coli*

*E. coli* est un agent pathogène nosocomial émergent qui pose problème dans les établissements de santé. *E. coli* est une bactérie anaérobie facultative à Gram négatif et à oxydase négative. Elle est responsable de nombreuses maladies, notamment les infections urinaires, les septicémies, les pneumonies, les méningites néonatales, les péritonites et les gastro-entérites. Les facteurs de virulence responsables de sa pathogénicité sont principalement les endotoxines et les capsules (**Khan et al., 2015**).

### 4.3. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* est une bactérie Gram négatif omniprésente à la surface des muqueuses animales ou dans l'environnement (eau, sol, etc.). Chez l'homme, *K. pneumoniae* est concentrée dans le tube digestif et, en petite quantité, dans le nasopharynx, par où elle peut pénétrer dans la circulation sanguine ou d'autres tissus, et provoquer une infection. Avant l'avènement des antibiotiques, *K. pneumoniae* était un agent pathogène essentiel des pneumonies communautaires (PC), en particulier chez les diabétiques et les alcooliques. Avec l'avènement des antibiotiques, elle est devenue une cause majeure d'infections d'origine médicale dans les hôpitaux et un facteur de risque d'infections communautaires graves (**Wang et al., 2020**).

### 4.4. *Staphylococcus aureus*

La bactérie à Gram positif appelée *Staphylococcus aureus* est un agent pathogène important sur le plan médical, responsable de diverses infections humaines, allant des

infections cutanées superficielles relativement bénignes aux infections tissulaires profondes et aux bactériémies. *S. aureus*, en particulier les souches résistantes aux antibiotiques, est principalement associé à une morbidité et une mortalité élevée dans les infections nosocomiales. Les infections à *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) représentent un fardeau important pour les soins de santé dans le monde entier, avec une mortalité et morbidité plus élevés que ceux du *S. aureus* sensible à la méthicilline (SASM). Ce pathogène est connu pour sa capacité à développer une résistance aux agents antimicrobiens couramment utilisés, tels que le *S. aureus* intermédiaire à la vancomycine (SAIV) et le *S. aureus* résistant à la vancomycine (SARV) (Kong *et al.*, 2016).

### 4.5. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* est responsable de 11 % des infections nosocomiales, entraînant des taux de mortalité et de morbidité élevés. C'est un organisme Gram négatif non fermenteur, responsable de maladies, notamment chez les personnes immunodéprimées. Ses sites de colonisation sont les reins, les voies urinaires et les voies respiratoires supérieures. Il est responsable d'infections chirurgicales et de plaies, d'infections urinaires, de pneumonies, de mucoviscidose et de bactériémies (Khan *et al.*, 2015).

## 5. Les types des infections nosocomiales

La localisation de l'infection peut fluctuer selon l'équipe de soins, le personnel engagé pour le service, les thérapies administrées et les actions préventives déployées. Les lieux d'infection courants incluent les infections urinaires, les infections respiratoires, les infections postopératoires et les bactériémies (Hamza, 2010).

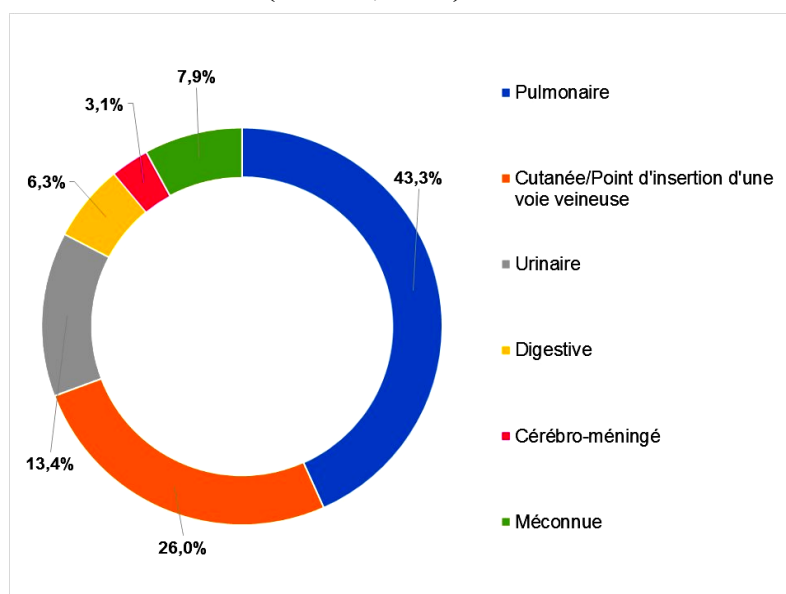


Figure 2. Types d'infections nosocomiales (Andriamiharisoa *et al.*, 2019).

### 5.1. Infection urinaire

C'est l'infection la plus fréquemment associée aux soins. Elle représente jusqu'à 40% de l'ensemble des infections acquises à l'hôpital. Elle a une importance capitale en néphropathologie et constitue un enjeu de santé publique majeur en raison de l'augmentation de la mortalité et des dépenses additionnelles qu'elle occasionne. Les patients porteurs de sondes urinaires, ceux ayant des hospitalisations prolongées ainsi que les patients âgés atteints de maladies affaiblissantes courent un risque accru d'attraper des infections urinaires liées aux soins (IUN). Au cours de la recherche, il a été souvent repéré des bacilles Gram négatifs parmi les microorganismes isolés dans les milieux de culture, *E. coli*, *Klebsiella Pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* étant les plus fréquents. On a également observé ce phénomène dans plusieurs séries à l'échelle internationale (**Lazrak, 2014**).

### 5.2. Pneumopathies nosocomiales

La pneumonie nosocomiale se manifeste chez divers groupes de patients. Les patients sous assistance respiratoire dans les unités de soins critiques sont les plus préoccupants, avec un taux de pneumonie atteignant 3% quotidiennement. Un taux de fécondité important est lié à la pneumonie liée à la ventilation, bien que le risque imputable soit complexe à définir en raison de la forte comorbidité des patients. Les micro-organismes peuvent s'installer dans l'estomac, les voies respiratoires supérieures et les bronches, ce qui entraîne une infection pulmonaire (pneumonie) : ils sont généralement de nature endogène (provenant du système digestif ou du nez et de la gorge), mais peuvent également être exogènes, souvent issus d'appareils respiratoires contaminés. La pneumonie peut être définie en fonction de critères cliniques et radiologiques couramment accessibles mais non spécifiques : des opacités récentes et en progression du tissu pulmonaire, des crachats purulents et l'apparition récente d'une fièvre. L'exactitude du diagnostic s'améliore lorsque des échantillons microbiologiques quantitatifs sont recueillis grâce à des techniques spécifiques de bronchoscopie protégée. Les éléments de risque identifiés pour l'infection incluent le type et la durée de la ventilation, l'efficacité des soins respiratoires, le niveau de gravité de la condition du patient (défaillance d'organe) ainsi que l'usage préalable d'antibiotiques (**Ducel et al., 2002**).

### 5.3. Infections du site opératoire

Une infection du site opératoire est une contamination qui se produit à un endroit dans le champ de la chirurgie suite à une intervention. L'infection du site chirurgical incisionnel est classifiée en infection superficielle et infection profonde en fonction de l'étendue de l'infection,

soit limitée à la peau et aux tissus sous-cutanés (infection superficielle du site chirurgical), ou englobant les tissus plus profonds tels que les couches fasciales et musculaires de la paroi corporelle (infection profonde du site chirurgical). Une infection du site opératoire se définit comme une infection qui survient n'importe où dans la zone chirurgicale, sauf lorsque les tissus de la paroi corporelle ont été sectionnés. Exemples : abcès au sein de l'abdomen survenant suite à une chirurgie abdominale, empyème consécutif à une intervention thoracique, ainsi qu'une ostéomyélite ou infection des articulations se manifestant après une opération orthopédique (**Kirby et Mazuski, 2009**).

Ces maladies comprennent ce que l'on appelle les infections nosocomiales, c'est-à-dire celles qui ne sont pas présentes lors de l'admission à l'hôpital. Si aucun implant n'a été installé (comme une prothèse valvulaire cardiaque, un greffon vasculaire non humain, un cœur artificiel ou une prothèse articulaire), une infection pourrait se manifester dans les 30 jours suivant l'intervention. En revanche, si un implant a été placé et que l'infection est en rapport avec la coupure, elle peut survenir jusqu'à un an après (**Fournel, 2017 ; Anderson, 2011**).

Pour toutes les chirurgies confondues, l'incidence des ISO serait entre 5,2 et 14,8 % (**Abalo et al., 2010**).

Le personnel chirurgical porteur de *S. aureus* est reconnu comme une source de *S. aureus* provoquant des infections exogènes au niveau du site opératoire (**Anderson, 2011**).

### 5.4. La bactériémie

La bactériémie correspond à la présence de bactéries dans le courant sanguin normalement stérile (**Azeem et al., 2018**). Les bactéries peuvent pénétrer dans le sang par de multiples voies. Une bactériémie sans source évidente est considérée comme primaire ; une bactériémie secondaire peut survenir par dissémination à partir d'une infection, généralement une pneumonie ou une infection urinaire (IU), ou par l'intermédiaire de dispositifs médicaux contaminés. Une bactériémie transitoire, causée par des interventions mineures telles que des nettoyages dentaires, peut survenir, mais elle est généralement éliminée du sang peu après son introduction. Les infections sanguines peuvent être causées par de nombreux microbes, notamment des bactéries soient responsables de plus de 90 % des cas. Elles peuvent être classées en infections par des espèces Gram-positives ou Gram-négatives (**Holmes et al., 2021**).

### 5.5. Gastro-entérites à *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* est une bactérie anaérobie sporulée, Gram positif, responsable de colites infectieuses d'origine nosocomiale et communautaire, souvent après une antibiothérapie. Elle produit deux principales toxines (toxine A et toxine B) responsables des lésions intestinales (McDonald *et al.*, 2017).

## 6. Facteurs de risque

Les infections nosocomiales sont influencées par plusieurs types de facteurs de risque, qu'il convient de distinguer selon leur origine :

### 6.1. Facteurs liés au patient

Incluent l'âge avancé (notamment au-delà de 60 ans), les extrêmes d'âge (comme les nouveau-nés prématurés), le sexe masculin dans certaines études, ainsi que la présence de comorbidités telles que le diabète, les pathologies cardiovasculaires, l'insuffisance rénale ou les états d'immunodépression (cancer, VIH, corticothérapie). La dénutrition et l'exposition antérieure à des traitements antibiotiques figurent également parmi les éléments qui augmentent la vulnérabilité des patients aux infections contractées à l'hôpital (Chen *et al.*, 2023).

### 6.2. Facteurs liés aux soins médicaux :

Ces facteurs sont particulièrement déterminants. Il s'agit principalement de la durée d'hospitalisation prolongée, de la réalisation d'actes invasifs (pose de cathéters, sondes urinaires, intubation, ventilation mécanique), des interventions chirurgicales, de l'usage répété d'antibiotiques à large spectre et de l'admission en unités de soins intensifs ou de réanimation. Ces interventions compromettent les barrières naturelles de défense de l'organisme et exposent davantage les patients aux agents pathogènes (Ogunтоми *et al.*, 2025).

### 6.3. Facteurs environnementaux :

Au sein des établissements de santé les facteurs environnementaux jouent un rôle non négligeable. Parmi eux figurent la promiscuité entre patients, le surpeuplement des services, le sous-effectif du personnel soignant, l'insuffisance de ventilation ou d'hygiène des locaux, ainsi que le mauvais respect des protocoles de prévention et de contrôle des infections. La présence de bactéries multirésistantes dans l'environnement hospitalier accentue également le risque de transmission croisée (Tarekegn *et al.*, 2024).

### 7. Prise en charge des infections nosocomiales :

Selon Mermel *et al.* (2009) la prise en charge de ces infections repose sur deux grands principes :

**a. L'ablation du matériel infecté** ou son changement s'il est indispensable ; on changera alors dans l'idéal de site d'insertion pour les dispositifs intravasculaires ;

**b. Le traitement anti-infectieux**, majoritairement antibiotique.

Pour ce dernier, la connaissance de l'épidémiologie bactérienne et de l'écologie bactérienne locale du service de réanimation est indispensable. En effet, elle permet de mettre en place une antibiothérapie probabiliste plus efficace, d'une part en réduisant le risque de prescrire un antibiotique inadapté pour traiter une bactérie résistante, d'autre part en diminuant la pression de sélection exercée par des antibiotiques à large spectre, dont le risque est de favoriser l'émergence de bactéries résistantes.

### 8. Prévention

La prévention des infections nosocomiales repose principalement sur des mesures combinées d'hygiène, de gestion des dispositifs médicaux et de vigilance quant à l'utilisation des antibiotiques. Il est essentiel d'appliquer une stratégie multimodale qui intègre plusieurs interventions : dépistage et décolonisation (exemple. portage nasal de *S. aureus*), désinfection des surfaces, hygiène des mains, utilisation rigoureuse de barrière stériles lors de la pose de dispositifs (cathéters et sondes), suivi de protocoles de nettoyage renforcé (exemple. produits sporicides contre *Clostridium difficile*), et utilisation de surfaces et textiles antimicrobiens (cuivre/argent) pour réduire la charge microbienne environnementale. Leur application en ensemble « bundling » permet de réduire significativement les infections associées aux cathéters (jusqu'à 82 %) (Sartelli *et al.*, 2024).

Actuellement Les infections nosocomiales représentent un enjeu majeur de santé publique, car Ces infections, contractées en dehors de l'infection initiale à l'admission, posent un réel problème en raison de leur fréquence, de leur gravité, et de leur impact sur la durée d'hospitalisation ainsi que sur les coûts médicaux. Elles sont souvent causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques, rendant leur traitement complexe. La problématique principale réside donc dans la prévention efficace de ces infections, la maîtrise des pratiques d'hygiène, et la gestion des résistances bactériennes afin de protéger les patients et améliorer la qualité des soins (Al-hajje *et al.*, 2012).

# Chapitre II. *Pseudomonas aeruginosa*

Biologie, pathogénicité et impact  
clinique



**Chapitre II : *Pseudomonas aeruginosa*.**

**1. Définition**

L'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* dont le nom latin fait référence à « couvert de rouille », précédemment désignée sous le terme « bacille pyocyanique » une appellation tiré du grec pour désigner pus et bleu foncé. Elle a été identifiée en 1882 par **Gessard**, un pharmacien de l'armée française. Le genre *Pseudomonas* a été établi par **Migula** en 1900. Il s'agit de l'espèce la plus célèbre et la plus répandue, et également la plus pathogène du genre *Pseudomonas*. Elle représente l'espèce type de ce genre (**Solbi, 2013**).

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie polyvalente sur le plan métabolique, capable de provoquer diverses infections opportunistes graves chez les individus atteints de maladies sous-jacentes sévères. Ces infections se distinguent par une réaction neutrophile vigoureuse qui cause de graves lésions aux tissus de l'hôte et montrent fréquemment une résistance aux antibiotiques, conduisant à un taux de mortalité élevé. De plus, le traitement des infections durables est entravé par une résistance adaptative, liée à l'état de croissance de la bactérie chez le patient, notamment à sa capacité de se développer sous forme de biofilm (**Gellatly et Hancock, 2013**).

**2. Taxonomie**

*Pseudomonas aeruginosa*, est une bactérie à Gram négatif classée dans le phylum Pseudomonadota (anciennement Proteobacteria), la classe Gammaproteobacteria, l'ordre Pseudomonadales, et la famille Pseudomonadaceae.

**Tableau 1.** Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* (**Chaker, 2012**).

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

### 3. Écologie et réservoirs de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* est l'espèce la plus importante du genre *Pseudomonas* en raison du grand nombre d'infections qu'elle cause ainsi que de la morbidité et de la mortalité qui y sont rattachées. Elle possède la capacité de s'adapter à divers environnements, notamment humides, et peut y survivre de longues périodes tout et en produisant d'un arsenal de facteurs de virulence et de résistance.

*P. aeruginosa* est un microorganisme omniprésent, majoritairement hydrophile, que l'on retrouve dans des milieux humides comme les sols, les végétaux et les eaux : eaux douces usées ou non polluées, eaux stagnantes et courantes ainsi que l'eau de mer. Il a été démontré que cette bactérie fait partie de la flore transitoire de l'homme : flore intestinale, cutanée, pharyngée ; le taux de portage est corrélé à la durée du séjour à l'hôpital (Verdial *et al.*, 2023).

Cette bactérie peut contaminer divers équipements hospitaliers tels que les endoscopes, les nébulisateurs, les machines de dialyse, les bains-marie et les solutions antiseptiques. Il a également été prouvé que les patients et le personnel médical peuvent représenter un réservoir et une source potentielle de *P. aeruginosa*, en particulier lorsque les mesures d'hygiène générales ne sont pas bien respectées ou ne sont pas appliquées du tout (Cabrolier *et al.*, 2014 ; Patrick *et al.*, 1989).

Chez les individus immunodéprimés notamment ceux qui sont atteints de cancer, ayant subi une greffe ou hospitalisés en soins intensifs, *Pseudomonas aeruginosa* figure parmi les agents infectieux les plus préoccupants. Sa colonisation, en particulier du tractus gastro-intestinal ou des voies respiratoires, précède souvent les infections invasives telles que les bactériémies et les pneumonies. Cette colonisation est facilitée par la rupture des barrières muqueuses, l'induction d'une dysbiose par les antibiotiques à large spectre, ainsi que l'usage de matériels médicaux (sondes, respirateurs). Le taux d'infection est significativement plus élevé chez les patients colonisés, et la mortalité peut dépasser 30% en cas d'infection à *P. aeruginosa* multirésistante dans ce groupe à risque (Vincent *et al.*, 2009).

### 4. Caractéristiques microbiologiques

*P. aeruginosa* est un bacille ubiquitaire de Gram négatif non sporulant, qui présente une forme droite ou légèrement courbée. Elle mesure de 1 à 5 µm et une largeur de 0,5 à 1 µm. Malgré le fait que ce microbe, qui possède un métabolisme oxydatif non fermentaire (tableau 2) et qui est aérobic stricte, plusieurs de ses isolats ont démontré la possibilité de se développer en environnement anaérobic. *P. aeruginosa* est une bactérie mobile grâce à son flagelle

monotriche polaire. Elle présente une réaction positive aux tests de catalase et d'oxydase. Il s'agit d'une bactérie mésophile capable de se développer sur un large spectre de température, allant de 4 à 45°C, avec une température optimale de croissance située entre 30 et 37 °C. L'identification morphologique de *P. aeruginosa*, comme pour l'ensemble du genre *Pseudomonas*, est facilitée par la production de pyocyanine, un pigment bleu-vert diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le terme bacille pyocyanique (Elmeskini, 2011).

**Tableau 2.** Caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa* (Oulymata, 2007).

Test	ADH	ONPG	CC	CS	GEL	H2S	IND	MAL	PDA	LDC	ODC	URE	NIT	GLU	LAC	VP	ESC
Résultat	+	-	+	+	+	-	-	-	+/-	-	-	+	+	-	-	-	-

Légende : (+) : Caractère positif (-): Caractère négatif (+/-): caractère inconstant  
 ADH : Arginine déshydrogénase ; ONPG: Bêta galacto-D pyranoside ; CC : Citrate de Christensen ; CS : citrate de Simmons ; Gel :Gélatinase ; H2S : Hydrogène sulfuré ; IND : Indole ; MAL :Malonate ; PDA : Phényl alanine désaminase ; LDC : Lysine décarboxylase ; ODC :Ornithine décarboxylase ; URE :Uréase ; NIT : Nitrate réductase ; VP : Réaction de Voges Proskauer pour la mise en évidence de la production d'acétoïne ; TDA : Tryptophane désaminase ; GLU : Glucose ; LAC : Lactose ; ESC : esculine.

## 5. Génome

Le génome de *P. aeruginosa* est constitué d'un unique chromosome circulaire d'environ 6,3 Mb. Il se distingue par une teneur en bases guanine + cytosine (G+C) particulièrement élevée, avoisinant les 66,6 % (Stover *et al.*, 2000).

Le génome étendu de *P. aeruginosa*, l'un des plus vaste parmi les bactéries à Gram négatif entièrement séquencées, témoigne d'une remarquable diversité génétique et fonctionnelle (Silby *et al.*, 2011).

Le génome contient notamment un grand nombre de gènes codant pour des protéines de la membrane externe impliquées dans des fonctions essentielles telles que l'adhésion, la motilité, l'efflux d'antibiotiques, l'export des facteurs de virulence, ainsi que la détection de signaux environnementaux via des systèmes à deux composants. Cette abondance de systèmes de régulation et de transport est en accord avec la grande plasticité métabolique de la bactérie. Une proportion significative de son génome est responsable du codage des transporteurs et des enzymes métaboliques permettant l'assimilation de différents nutriments. (Winsor *et al.*, 2016).

De plus, environ 8% du génome est dédié à des gènes régulateurs, ce qui confère à *P. aeruginosa* une capacité d'adaptation remarquable a des environnements complexes et changeants (Stover *et al.*, 2000).

### 6. Facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* produit une multitude de facteurs de virulence qui lui confèrent la capacité de persister tant chez les divers hôtes que dans l'environnement. Ces éléments de virulence jouent un rôle crucial à travers les différentes phases du processus infectieux, facilitant ainsi la colonisation de son hôte par *P. aeruginosa*. Cela inclut spécifiquement des éléments qui participent à l'adhésion, à la mobilité et la colonisation de l'hôte. Les structures macromoléculaires qui sont généralement présentes à la surface bactérienne, telles que les flagelles, les pili de type IV, les fimbriae et les alginate, sont appelées adhésines bactériennes. Les LPS (lipopolysaccharides) contribuent également à ce processus d'adhésion de *P. aeruginosa*. Des toxines et des protéases entraînant des dommages aux tissus qui favorisent également la prolifération et la propagation bactérienne dans les tissus de l'hôte : L'élastase, l'exotoxine A, les phospholipases C, les rhamnolipides ainsi que les exoenzymes sont secrétées par le système de sécrétion de type III (Jurado-martin *et al.*, 2021).

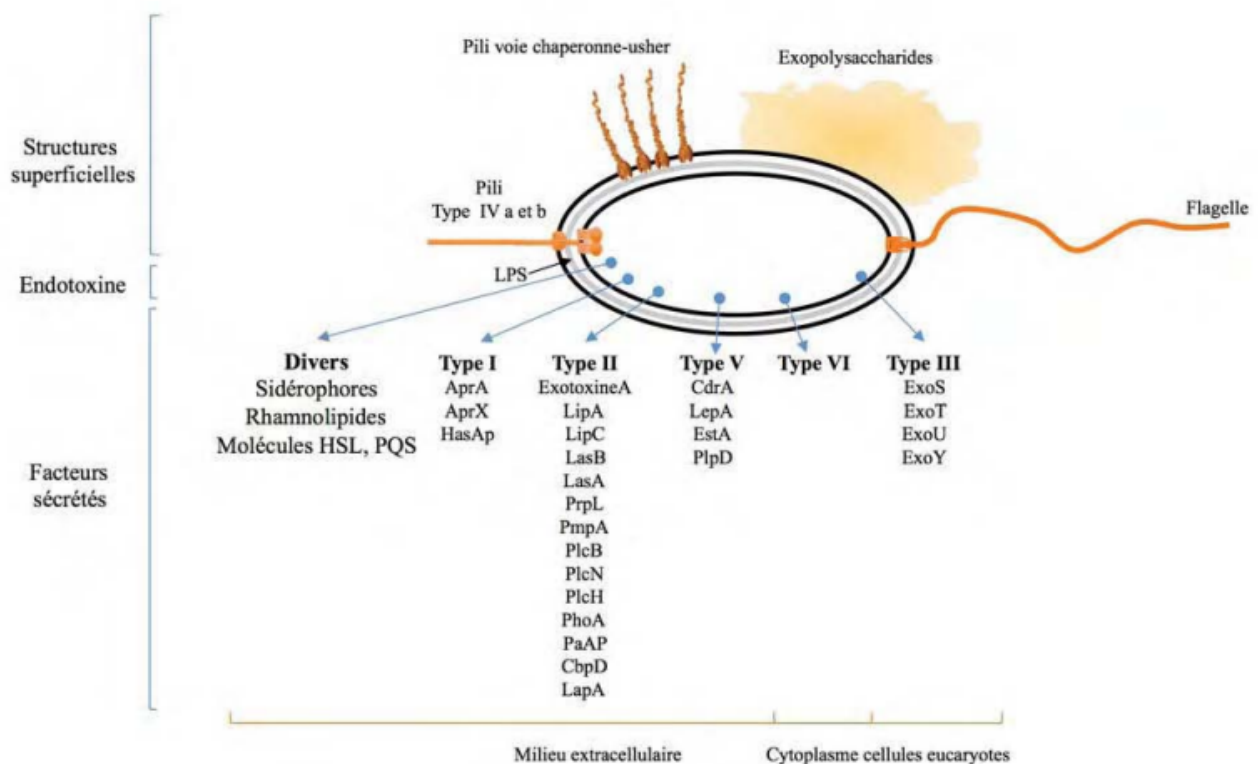


Figure 3. Facteurs de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa* (De Bentzmann et Plésiat, 2011).

### 6.1. Flagelle

Le flagelle joue un rôle dans la motilité de la bactérie, favorise l'absorption des nutriments et semble avoir un rôle indirect dans l'attachement cellulaire. Il est désormais bien établi qu'il joue un rôle dans la pathogenèse puisque les souches dépourvues de flagelles présentent une virulence significativement réduite. Il participe également à l'adhésion aux cellules épithéliales respiratoires (**Bricha *et al.*, 2009**).

### 6.2. Pili type IV

Les pili de type IV sont des extensions polaires de surface qui se retrouvent en multiples exemplaires à la surface de la bactérie. Ils participent à la motilité de type « twitching », qui facilite le mouvement sur une surface solide par l'allongement et le rétrécissement des pili, et également à la motilité de type « swarming » (**Asikyan *et al.*, 2008**).

Les pili de type IV interagissent avec les zones glycosylées des glycosphingolipides asialo-GM1 et asialo-GM2, qui se trouvent à la surface de la membrane des cellules épithéliales pulmonaires (**Comolli *et al.*, 1999**).

### 6.3. Lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS), qui se trouvent dans la membrane externe des bactéries Gram négatif, sont d'un côté réputé pour leur fonction protectrice contre la lyse induite par le sérum et, de l'autre côté, pour leurs activité endotoxique. Ils participent également à l'activation de la réponse inflammatoire et aux interactions avec les tissus hôtes.

Les LPS se composent de trois parties distinctes :

- Le lipide A, également connu sous le nom d'endotoxine, est à l'origine d'une surexcitation du système immunitaire qui peut entraîner un choc septique et éventuellement la mort.
- Le cœur oligosaccharidique.
- l'antigène O, qui est une région polysaccharidique changeante (**Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011**).

### 6.4. Exotoxine A

Il se compose de deux parties : une partie ADP-ribosyltransférase qui entrave la synthèse des protéines des cellules hôtes en agissant sur le facteur EF-2 des eucaryotes. Le second domaine interagit spécifiquement avec le récepteur situé à la surface de l'hôte, facilitant ainsi la translocation dans la cellule cible (**Le Berre, 2006**).

### 6.5. Elastase

L'activité élastasique de *Pseudomonas aeruginosa* découle de l'effet synergique de deux protéases libérées (LasA et LasB). LasB dégrade directement l'élastine, tandis que LasA intensifie cette activité en altérant la structure du substrat. Ensemble, ces facteurs contribuent de manière significative à la virulence de *P. aeruginosa* (Kessler *et al.*, 1993). Elle joue un rôle pivot dans sa virulence en décomposant la matrice extracellulaire, les protéines du surfactant pulmonaire et diverses molécules immunitaires, y compris les cytokines et les immunoglobulines. Cette détérioration favorise la propagation des bactéries, l'altération des tissus et l'évasion du système immunitaire (Smith et Iglewski, 2003).

### 6.6. Phospholipases

*P. aeruginosa* génère diverses phospholipases qui rompent les liaisons phosphodiester présentes dans les glycerophospholipides. En fonction de l'activité enzymatique, *P. aeruginosa* produit quatre types de phospholipases : la phospholipase A (PLA), B (PLB), C (PLC) et D (PLD). La virulence de cette bactérie est influencée par la sécrétion de diverses phospholipases dans l'environnement extracellulaire. Elles perturbent la membrane des cellules hôtes et causent la mort cellulaire en bloquant la réponse oxydative des neutrophiles et en induisant la libération de molécules inflammatoires (Chaker, 2012).

### 6.7. Pyocyanine et pyoverdine

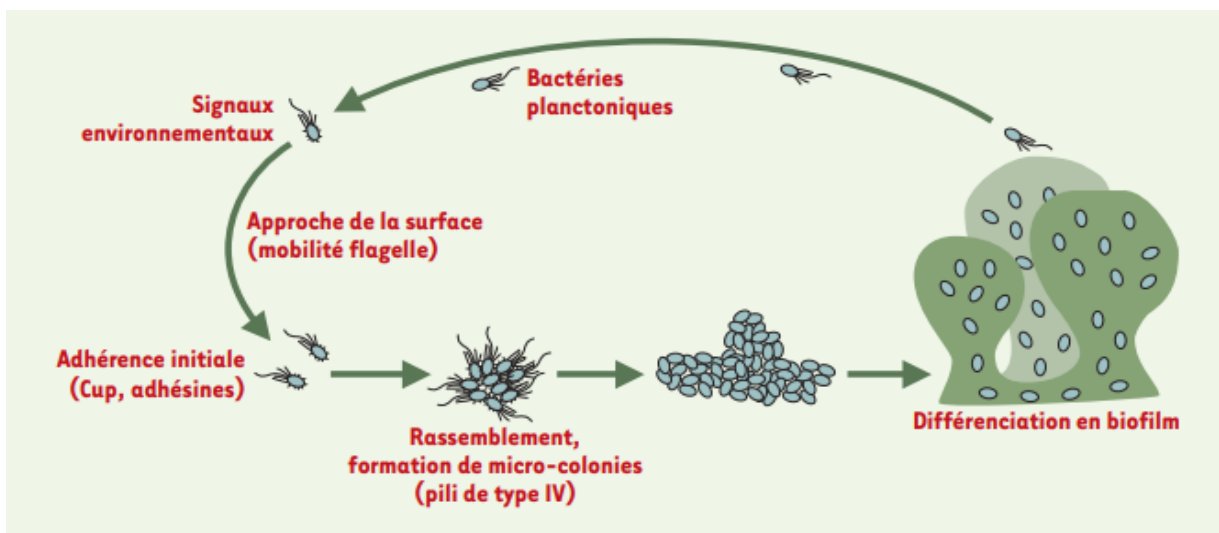
L'intérêt pour le *P. aeruginosa* est particulièrement marqué du fait de sa capacité à produire divers pigments, tels que la pyocyanine (bleu-vert), la fluorescéine (jaune, vert et fluorescente), la pyomélanine (marron clair) et la pyorubrine (rouge-marron) (Jayaseelan *et al.*, 2013). La pyocyanine, un pigment bleu-vert hydrosoluble, fait partie de la famille des phénazines et est largement produite par des cultures actives de *P. aeruginosa*. Son action d'inhibition est attribuée à son potentiel redox distinctif. Au cours de la respiration, la pyocyanine est réduite, ce qui génère de radicaux superoxydes toxique en réduisant l'oxygène (El-Shouny *et al.*, 2011).

La pyoverdine, un sidérophore synthétisé par *Pseudomonas aeruginosa*, On attribue généralement cette observation à sa fonction dans l'acquisition du fer et/ou la maîtrise d'autres facteurs de virulence (Djibaoui et Bensoltane, 2005).

### 6.8. Le biofilm

Le biofilm est un agrégat complexe de bactéries enfermées dans une matrice auto-générée de substances polymères extracellulaires et est l'une des stratégies clés pour la survie des espèces face à des modifications imprévues de conditions de vie (comme les variations de température et la disponibilité en nutriments). Dans un biofilm (fig. 4), les bactéries peuvent échapper aux réactions de défense de l'hôte et résister aux thérapies antimicrobiennes (Fux *et al.*, 2005).

*Pseudomonas aeruginosa* configure des biofilms complexes enveloppés dans une matrice constituée d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire, de protéines et de lipides. La formation se déroule en quatre étapes clés : adhésion initiale, développement de microcolonies, maturation en structures tridimensionnelles, et dispersion ; processus régulé notamment par le quorum sensing. Ces biofilms agissent comme une défense efficace contre les antibiotiques, contribuant à la persistance des infections résistantes (Haidar *et al.*, 2024).



**Figure 4.** Modèle de formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* (Filloux, 2003).

### 7. Facteurs favorisant l'implantation de *P. aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie opportuniste qui peut devenir en agent pathogène chez l'homme lorsque certaines conditions spécifiques sont réunies :

- **Rupture de la barrière de l'épiderme** : Lorsque la barrière cutanée est altérée, le risque d'infection s'intensifie considérablement. On constate cela en particulier chez les patients souffrant de brûlures, d'ulcères cutanés, de plaies, de dermatoses ou d'intertrigos.
- **Modification de la flore commensale** : Une altération de la flore cutanée ou digestive, fréquemment due à un traitement antibiotique qui n'agit pas contre *P. aeruginosa*, peut favoriser la colonisation, surtout en affaiblissant la barrière muqueuse.

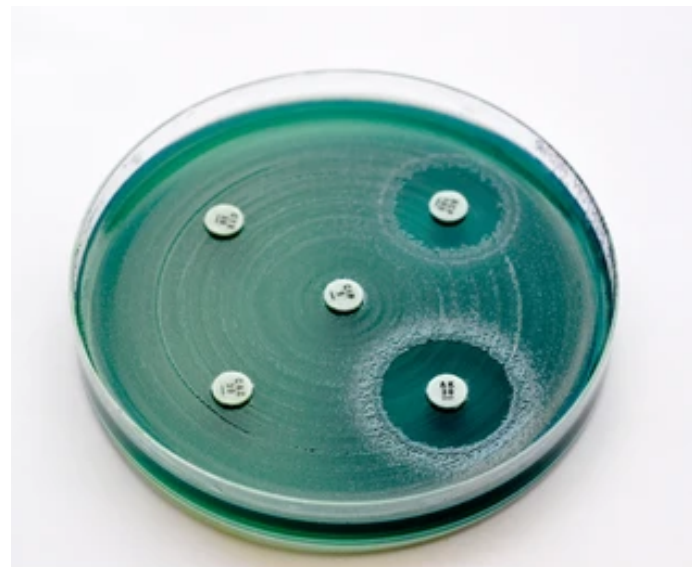
- **Présence de dispositifs médicaux ou matériels étrangers :** L'emploi de dispositifs tels que les lentilles de contact, les sondes urinaires, les cathéters ou les sondes endotrachéales crée des surfaces propices à l'adhérence bactérienne.
- **Affaiblissement de l'hôte :** Les patients fragilisés, comme les personnes atteintes par le cancer, admises en soins intensifs ou immunodéprimées, sont particulièrement vulnérables au risque d'infection.
- **Caractéristiques particulières des souches bactériennes** Certaines souches présentent des mutations qui renforcent leur pouvoir pathogène et les rendent résistantes à plusieurs antibiotiques, compliquant ainsi leur éradication (**Nail et Akres, 2002**).

### 8. Infections causées par *P. aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est un agent pathogène opportuniste associé à diverses infections aiguës et chroniques, notamment chez les patients immunodéprimés ou hospitalisés. Dans le cas des infections respiratoires, plus spécifiquement chez les individus atteints de la mucoviscidose, la bactérie envahit les voies pulmonaires en formant des biofilms mucoïdes riches en alginate. ce qui entraîne une inflammation chronique, une obstruction bronchique progressive et une résistance importante aux thérapies antimicrobiennes (**Rossi et al., 2022**). Dans le système urinaire, *P. aeruginosa* est fréquemment responsable d'infections associées aux sondes vésicales (CAUTI), où elle forme des biofilms adhérant aux parois du cathéter, renforcés par la présence d'ADN extracellulaire, contribuant ainsi aux infections persistantes et récidivantes (**Cole et al., 2014**). Sur les plaies, en particulier chez les patients atteints de brûlures, *P. aeruginosa* utilise des pigments toxiques tels que la pyocyanine pour perturber les cellules hôtes, détruire les tissus et induire une nécrose locale, tout en favorisant la survenue de bactériémies secondaires sévères. Par ailleurs, chez les individus immunodéprimés ou en soins intensifs, cette bactérie peut entraîner des infections invasives telles que des bactériémies, des endocardites, des méningites postopératoires ou des kératites, avec un taux de mortalité élevé si un traitement ciblé et rapide n'est pas administré. Finalement, *P. aeruginosa* est l'un des agents les plus souvent associés aux infections nosocomiales liées aux dispositifs médicaux (cathéters, sondes, respirateurs), grâce à sa capacité d'adhérer aux surfaces inertes et à y former des biofilms denses qui résistent aux antibiotiques et aux procédures de désinfection (**Haidar et al., 2024**). Cette polyvalence infectieuse, appuyée par une vaste gamme de facteurs de virulence et de mécanismes de résistance, positionne *P. aeruginosa* comme un danger clinique significatif dans le milieu hospitalier.

# Chapitre III.

**Profils de résistance aux  
antibiotiques chez  
*Pseudomonas aeruginosa***



## Chapitre III : Profils de résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*.

### 1. Définition

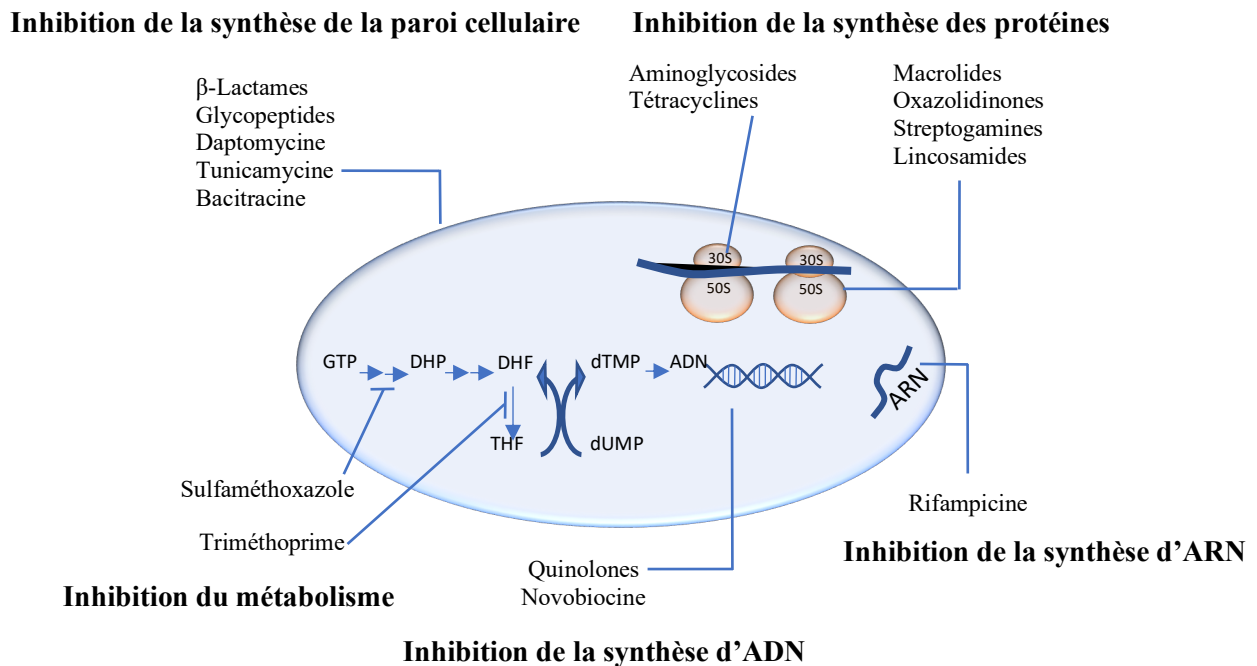
Les antibiotiques sont des traitements destinés à prévenir et à lutter contre les infections causées par des bactéries. Ils interviennent en éliminant les bactéries ou en freinant leur développement, donnant ainsi au système immunitaire de l'individu la capacité de les détruire (WHO, 2023).

Comme l'indique Misery (2019), les antibiotiques, qu'ils soient d'origine naturelle, semi-synthétique ou entièrement synthétique, sont des agents antimicrobiens indispensables pour le traitement des infections bactériennes.

- **Antibiotiques naturels** : générés par des micro-organismes comme *Streptomyces* ou *Penicillium*,
- **Antibiotiques semi-synthétiques** : transformation chimique d'antibiotiques naturels afin d'augmenter leur efficacité ou d'étendre leur spectre d'action.
- **Antibiotiques synthétiques** : élaborés chimiquement en laboratoire, sans origine naturelle.

### 2. Les cibles bactériennes des antibiotiques

Les antibiotiques agissent en ciblant des fonctions cellulaires précises au sein des bactéries, conduisant ainsi à leur inhibition ou leur destruction. Parmi les principales cibles bactériennes comprennent (fig. 5) : la synthèse de la paroi cellulaire (Kohanski *et al.*, 2010). La synthèse protéique est également une cible majeure, avec des antibiotiques qui interviennent sur différentes sous-unités du ribosome bactérien (Davies et Davies, 2010). De plus, des molécules telles que les quinolones peuvent freiner la synthèse des acides nucléiques (Hooper, 2000). Finalement, certains antibiotiques altèrent la membrane cytoplasmique des bactéries (à l'image des polymyxines), ce qui entraîne une dégradation de l'intégrité membranaire et conduit à la mort cellulaire (Kohanski *et al.*, 2010).



**Figure 5.** Mode d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).  
 DHP : Dihydroptéroate ; DHF : Dihydrofolate ; THF : Tétrahydrofolate.

### 3. L'antibiorésistance

#### 3.1. Résistance naturelle (intrinsèque)

La résistance naturelle fait référence à la capacité innée d'une bactérie à résister à l'effet d'un antibiotique, sans avoir été exposée auparavant (Nikaido, 2009).

#### 3.2. Résistance acquise

La résistance acquise se produit lorsque des bactéries initialement sensibles développent une résistance grâce à des mutations génétiques ou par l'acquisition de gènes de résistance via des éléments mobiles tels que les plasmides ou les transposons (Davies et Davies, 2010).

### 4. Multirésistance de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie opportuniste particulièrement craintes dans les hôpitaux, à cause de sa tendance à développer une résistance multiple aux antibiotiques. Cette résistance multiple résulte d'une combinaison de mécanismes intrinsèques et acquis qui limitent les options thérapeutiques (Botelho et al., 2019).

#### 4.1. Mécanismes de multirésistance

Certains mécanismes ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigés contre les fonctions cellulaires, impliquées dans le transport de ces substances (fig. 6).

##### 4.1.1. Imperméabilité de la membrane externe

La membrane externe de *P. aeruginosa* présente une faible perméabilité, ce qui limite l'entrée de plusieurs antibiotiques, y compris les  $\beta$ -lactamines et les aminoglycosides (Poole, 2004).

##### 4.1.2. Pompes à efflux multidrogues

Ces systèmes expulsent activement les antibiotiques hors de la cellule, diminuant leur concentration intracellulaire. La famille MexAB-OprM constitue l'un des principaux systèmes d'efflux associés à la résistance contre les quinolones, les  $\beta$ -lactamines et les chloramphénicol (Poole, 2005).

##### 4.1.3. Production d'enzymes inactivant les antibiotiques

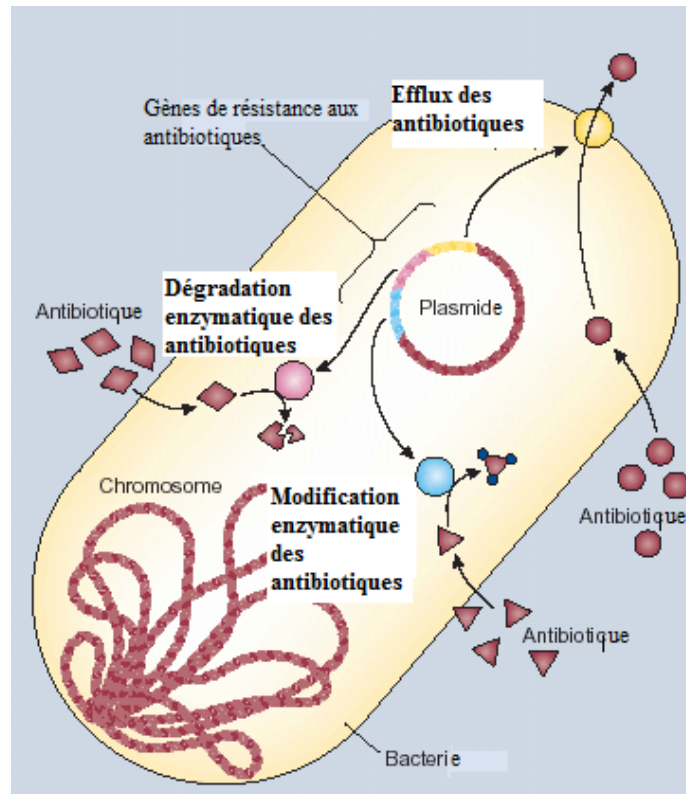
*P. aeruginosa* a la capacité de produire des  $\beta$ -lactamases à spectre large (BLSE) et des carbapénémases, des enzymes qui ont la faculté d'hydrolyser une large gamme de  $\beta$ -lactamines, y compris les carbapénèmes, rendant ainsi le traitement particulièrement complexe (Lister *et al.*, 2009).

##### 4.1.4. Modification des cibles

Selon Jacobs *et al.* (2003), les modifications dans les gènes responsables de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV peuvent donner une résistance aux quinolones.

##### 4.1.5. Biofilm

La formation de biofilms, des communautés bactériennes préservées dans une matrice extracellulaire, accroît la résistance aux antibiotiques et encourage la persistance des infections (Mulcahy *et al.*, 2014).



**Figure. 6.** L'efflux, la destruction et la modification des antibiotiques comme modes de résistance (Levy et Marshall, 2004).

#### 4.2. Épidémiologie de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie opportuniste causant de graves infections nosocomiales, notamment chez les patients immunodéprimés, en soins intensifs ou possèdent des dispositifs médicaux invasifs. La question de la résistance aux antibiotiques devient de plus en plus inquiétante au niveau mondial (Tumbarello *et al.*, 2019).

##### 4.2.1. Prévalence et tendances

La prévalence des souches multirésistantes de *P. aeruginosa* varie selon les régions, mais une tendance générale à la hausse est observée, particulièrement dans les hôpitaux d'Amérique, d'Europe et d'Asie (WHO, 2023).

D'après le rapport 2023 de l'Organisation mondiale de la santé (WHO), *P. aeruginosa* est classé parmi les agents pathogènes prioritaires dans la recherche de nouveaux antibiotiques, du fait de sa forte résistance, particulièrement aux carbapénèmes, qui sont des antibiotiques utilisés en dernière instance. En Europe, la résistance de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes a en moyenne atteint 15-20 %, avec des taux nettement plus élevés dans certains pays (ECDC, 2022).

#### 4.2.2. Facteurs favorisant la dissémination

Plusieurs facteurs ayant un impact sur la dissémination, y compris :

- L'usage massif et parfois inapproprié d'antibiotiques dans les hôpitaux crée une pression de sélection favorisant l'émergence de souches résistantes.
- Le potentiel de *P. aeruginosa* à former des biofilms contribue à la persistance et à la transmission des souches résistantes.
- L'échange d'équipements médicaux et l'insuffisance de mesures d'hygiène appropriée peuvent accélérer la propagation des infections nosocomiales (Tacconelli *et al.*, 2022).

#### 4.3. Conséquences cliniques de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa*

L'augmentation de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques rend la gestion des infections, en particulier dans les environnements hospitaliers, beaucoup plus difficile.

##### 4.3.1. Échec thérapeutique

L'existence de la multirésistance limite les alternatives de traitement efficaces, conduisant fréquemment à des soins prolongés ou moins appropriés et augmentant le risque d'échec thérapeutique (Tacconelli *et al.*, 2022).

L'existence de la multirésistance limite les options de traitement efficaces, entraînant souvent des soins prolongés ou moins adaptés, et augmentant le risque d'échec thérapeutique.

##### 4.3.2. Augmentation de la morbidité et de la mortalité

Les infections dues à des souches résistantes sont liées à un taux accru de complications graves, comme la septicémie, la pneumonie nosocomiale ou les infections urinaires compliquées, ainsi qu'à une mortalité nettement plus importante (Kaye *et al.*, 2021).

##### 4.3.3. Prolongation de la durée d'hospitalisation

Le traitement des infections résistantes est souvent plus compliqué et moins performant, engendre une durée d'hospitalisation plus longue ainsi qu'une augmentation des coûts associés (Tumbarello *et al.*, 2019).

##### 4.3.4. Coûts économiques accrus

L'utilisation d'antibiotiques de derniers recours, généralement plus onéreux et parfois plus nocifs, ainsi que les complications associées aux infections, augmentent la charge financière des systèmes de santé (Smith et Coast, 2019).

#### 4.4. Comparaison entre souches sensibles et souches multirésistantes

Les souches sensibles demeurent généralement exposées à une vaste gamme d'antibiotiques traditionnels, permettant ainsi un traitement prompt et performant. Les souches multirésistantes, grâce à divers mécanismes qui leur confèrent une certaine résistance face aux traitements existants, rendent la gestion clinique plus complexe et amplifient le risque de complications sévères (Tacconelli *et al.*, 2022 ; Lister *et al.*, 2009). La prolongation de la présence dans le milieu hospitalier, particulièrement grâce à la création de biofilms, facilite la diffusion des souches résistantes et l'expansion des résistances (Mulcahy *et al.*, 2014).

**Tableau 3.** Comparaison entre souches sensibles et souches multirésistantes de *P. aeruginosa*. (Schwartz *et al.*, 2024).

	Souches sensibles	Souches multirésistantes
<b>Sensibilité aux antibiotiques</b>	Répondent adéquatement aux traitements conventionnels ( $\beta$ -lactamines, aminoglycosides, quinolones)	Résistantes à au moins trois classes majeures d'antibiotiques
<b>Mécanismes de résistance</b>	Absence ou faible expression des mécanismes (pompes à efflux, enzymes inactivantes)	Accumulation de mécanismes : $\beta$ -lactamases, pompes à efflux suractivées, mutations des cibles
<b>Traitement</b>	Protocoles antibiotiques standards, généralement efficaces.	Utilisation d'antibiotiques de dernière ligne, combinaisons thérapeutiques, parfois échecs thérapeutiques
<b>Infections associées</b>	Infections plus faciles à contrôler, guérison plus rapide	Infections persistantes, récurrentes, généralement liées à l'hôpital, biofilms courants.
<b>Impact clinique</b>	Morbidité et mortalité plus faibles	Morbidité, mortalité, durée d'hospitalisation et coûts plus élevés
<b>Transmission</b>	Moins de risque de propagation dans les établissements de santé	Capacité accrue de propagation, particulièrement dans les environnements hospitaliers.

### 5. Surveillance et prévention de la résistance

#### 5.1. Surveillance

##### 5.1.1. Surveillance microbiologique

L'observation régulière des profils de sensibilité des bactéries isolées dans les hôpitaux facilite la détection précoce de l'apparition et de la propagation des souches résistantes. Elle se base sur des antibiogrammes normalisés (CLSI, EUCAST) et des bases de données à l'échelle nationale ou mondiale (GLASS, ECDC) (WHO, 2023).

### 5.1.2. Systèmes de notification

Des systèmes de surveillance comme le Système Mondial de Surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens (GLASS) de l'WHO ou le réseau européen EARS-Net livrent des informations épidémiologiques cruciales pour guider les stratégies de lutte contre la résistance (WHO, 2023 ; ECDC, 2022).

## 5.2. Prévention

### 5.2.1. Bon usage des antibiotiques

Il est crucial d'exceller dans la prescription des antibiotiques, notamment l'antibiothérapie spécifique fondée sur un diagnostic exact, afin de réduire la pression sélective sur les bactéries et de freiner l'émergence des résistances (Dyar *et al.*, 2017).

### 5.2.2. Mesures d'hygiène et contrôle des infections

Pour restreindre la propagation nosocomiale, il est essentiel d'appliquer rigoureusement les précautions standards, de pratiquer l'hygiène des mains, de désinfecter les surfaces et le matériel médical, et d'isoler les patients porteurs de souches multirésistantes (Siegel *et al.*, 2007).

### 5.2.3. Recherche et développement

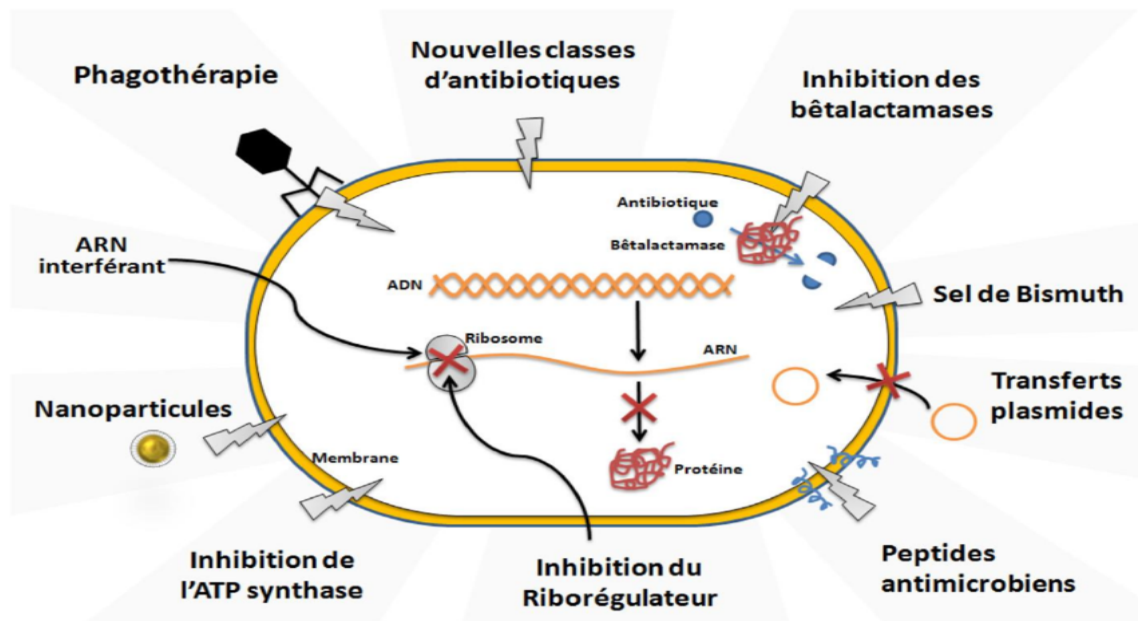
L'investissement dans l'exploration de nouveaux antibiotiques, ainsi que dans des traitements alternatifs tels que les phages, les inhibiteurs de pompe d'efflux ou les agents anti-biofilms, est essentiel pour combattre la résistance (Tacconelli *et al.*, 2022).

## 6. Alternatives naturelles aux antibiotiques contre *Pseudomonas aeruginosa*

L'apparition et la propagation de plus en plus importante de bactéries résistantes aux antibiotiques mettent en doute l'efficacité de ces thérapies, tant pour l'homme que pour les animaux. Effectivement, l'exploration d'autres alternatives (fig. 7) peut fournir des solutions directes à divers problèmes de santé, y compris : les alternatives naturelles (végétaux et champignons), la thérapie par phages (phagothérapie), l'application des nanotechnologies dans la lutte antimicrobienne, les inhibiteurs du quorum sensing ainsi que les peptides antimicrobiens et d'autres méthodes expérimentales (Hu et Chua, 2025).

Les alternatives naturelles issues des végétaux et des champignons représentent une source importante de composés bioactifs capables d'agir contre *Pseudomonas aeruginosa*. Ces composés naturels ont la capacité d'inhiber différents mécanismes de virulence, tels que la

création de biofilm, l'émission de facteurs toxiques comme la pyocyanine, ou encore les systèmes de détection par quorum sensing qui contrôlent l'expression des gènes pathogènes. Au lieu de provoquer directement un effet bactéricide, ces composés entravent généralement la communication entre les bactéries, ce qui limite leur coordination des mécanismes infectieux et diminue le risque de développement de résistances (Shariati *et al.*, 2024). Cette approche naturelle, basée sur la richesse chimique des végétaux et champignons, reste une voie prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies antivirulentes ciblant les infections nosocomiales (Chadha *et al.*, 2022).



**Figure 7.** Stratégies et cibles bactériennes utilisées pour lutter contre la résistance aux antibiotiques (Lemaoui *et al.*, 2017).

# Partie expérimentale



# Chapitre IV. Matériel et Méthodes



### Chapitre IV. Matériel et méthodes

#### 1. Objectif

Ce présent travail vise à évaluer l'activité antimicrobienne d'extraits issus de différentes sources afin de lutter contre la progression de l'antibiorésistance de *Pseudomonas aeruginosa*, en particulier des souches cliniques responsables des infections nosocomiales. Pour atteindre cet objectif des extraits d'origines suivantes ont été utilisés :

- **Origine végétale** : les plantes utilisées dans cette expérience sont ; le henné "*Lawsonia inermis*", L'ail "*Allium sativum*", les feuilles d'olivier sauvage "*Olea europaea* subsp. *Europea* var. *sylvestris*", les graines de fenouil "*Foeniculum vulgare* mill", le Jujubier sauvage ou Jujubier de Palestine "*Ziziphus spina-christi*" et la sauge de Balansae "*Salvia balansae*".
- **Origine fongique** : 13 isolats fongiques utilisés d'origine marine fournis par le laboratoire de Microbiologie et de Biologie végétale de l'Université Abdelhamid Ibn Badis (Mostaganem).
- **Origine apicole** : les produits apicoles essayés dans ce travail est le miel.

#### 2. Origine des isolats de *Pseudomonas aeruginosa*

Deux isolats de *Pseudomonas aeruginosa* ont été utilisés dans cette étude. L'isolat clinique (I<sub>1</sub>) a été fourni par le laboratoire d'analyse médicales (EMD : Elite médicaux diagnostic), tandis que la souche de référence (ATCC27853) a été fournie par le laboratoire de recherche de Microbiologie et Biologie Végétale (université de Mostaganem).

#### 3. Confirmation de l'identification des isolats de *P. aeruginosa*

##### 3.1. Revivification des isolats

L'ensemencement est effectué sur deux milieux de culture King A et King B (fig. 8), (annexe n° 1) ; par des isolats conservés sur un milieu incliné. Les boîtes ensemencées sont incubées en aérobie à 37°C pendant 48 heures

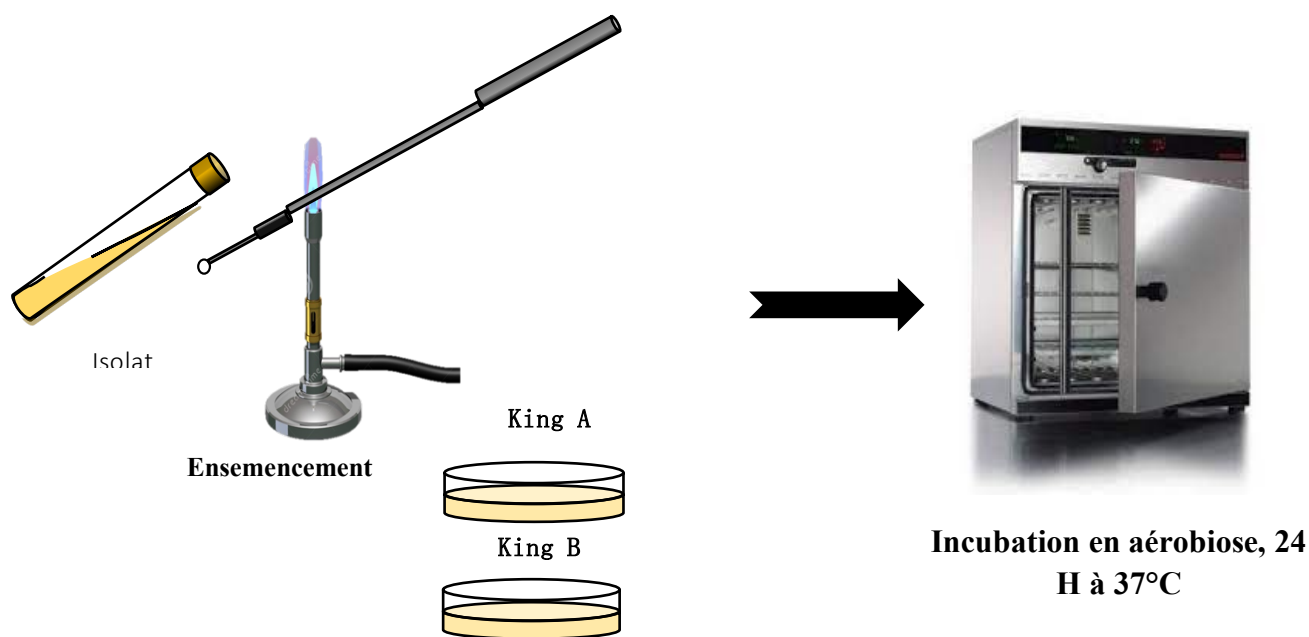


Figure 8. Mise en culture de *P. aeruginosa* sur des milieux sélectifs.

### 3.2. Examen macroscopique des isolats

Les colonies des isolats sont observées à l'œil nu pour étudier leurs aspects macroscopiques (la forme, la taille, l'opacité, la rugosité, la consistance ....etc) (Arabi, 2018).

### 3.3. Examen microscopique des isolats

Ce test permet d'examiner la morphologie, le Gram et l'agencement des cellules bactériennes après une coloration de Gram. Un frottis bactérien est préparé sur une lame porte objet ensuite coloré par une coloration de Gram (voir annexe n° 2) et observé au microscope.

### 3.4. Tests biochimiques

➤ **Le test d'oxydase** : permet une identification présomptive de certaines bactéries qui produisent l'enzyme cytochrome oxydase. Le principe consiste à appliquer sur les disques de N-diméthyl-paraphénylene diamine, quelques colonies bactériennes à l'aide d'une pipette Pasteur stérile (annexe 2). On obtient instantanément une coloration violette si la réaction est positive (Hafezi et khamar, 2024).

➤ **Galerie API 20 NE**

Les galeries API (annexe 2) ou également appelées galeries de tests biochimiques miniaturisés se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique. Chaque tubule est ouvert à son

extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières. Chaque tube contient un substrat défini (ONPG, ADH, GEL...) et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment, la galerie utilisée (fig. 9) dans notre travail est de type API 20 NE (**BioMérieux, 2006**).

L'inoculum de ce test est préparé à partir d'une culture jeune, dont on a prélevé à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie et la mélangé dans un tube à essai contenant 5 ml de la suspension medium d'API.

Tout d'abord les galeries sont préparées, l'atmosphère de la boîte d'incubation est humidifiée par le mouillage du fond d'environ 3 ml d'eau distillée stérile. Les codes des isolats et la date sont mentionnés sur la languette latérale de la boîte.

Les suspensions bactériennes préparées sont versées dans les tubules pour certains tests, et dans les cupules des tubes dans d'autres (selon le substrat). Pour les tests en anaérobiose, les cupules sont remplies par l'huile de paraffine stérile après le remplissage des tubules par la suspension bactérienne pour créer une atmosphère anaérobie.

La lecture des résultats est réalisée après incubation des galeries pendant 24 h à une température de 37 °C en notant si la réaction est positive ou négative séparément pour chaque test par le changement de couleur due à l'indicateur coloré présent dans le substrat après l'ajout ou non des révélateurs.

L'interprétation des résultats se fait par comparaison à l'aide d'un tableau des caractères spécifiques pour chaque type de galeries (annexe n° 3).

### Calcul du profil numérique

Ce profil est calculé en introduisant les résultats des tests biochimiques trouvés dans le site **lab.UPBM.org** (annexe n°3).

Enfin, les isolats identifiés sont conservés au réfrigérateur (4 °C) dans des tubes à essai contenant un milieu en géloses inclinées pour des tests ultérieurs.

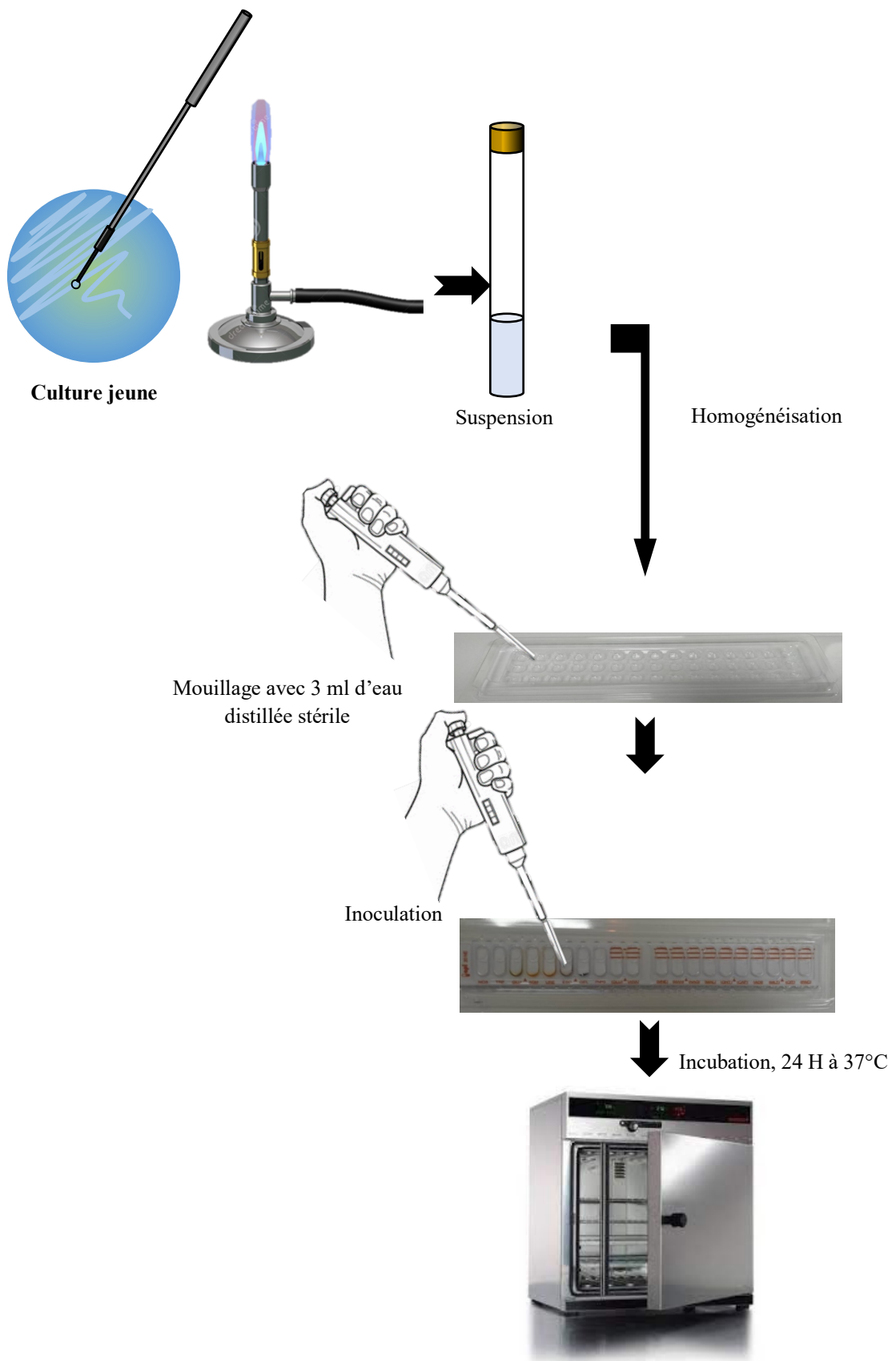


Figure 9. Inoculation des galeries biochimiques API 20 NE.

### 4. Évaluation de l'activité anti *Pseudomonas*

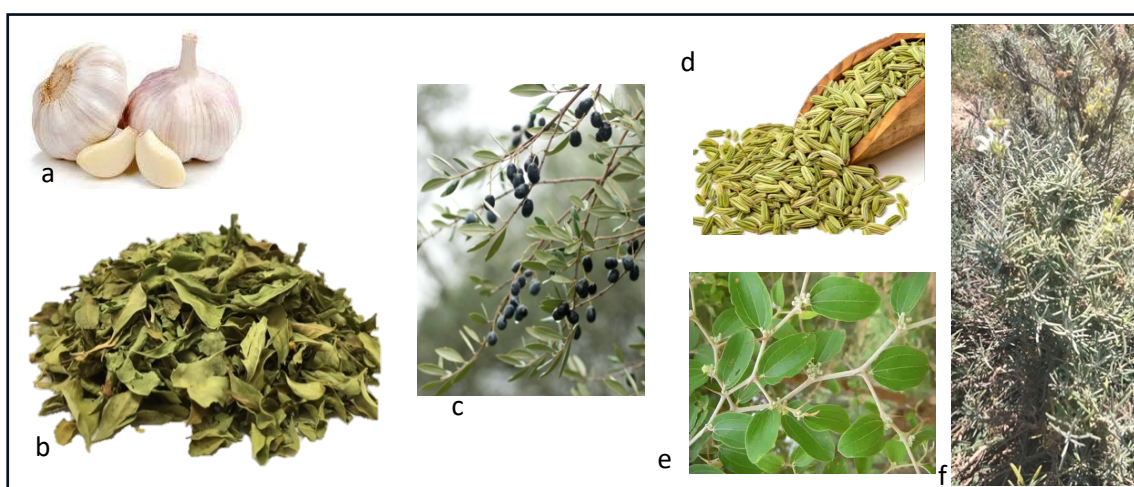
#### Matériel biologique

Les extraits ayant fait l'objet de l'expérimentation sont issus d'*Aspergillus sp* et des plantes suivantes (fig. 10) :

- a. L'ail (*Allium sativum*) : à l'état frais a été acheté du marché de Mostaganem.
- b. Le henné (*Lawsonia inermis*) : La matière végétale a été obtenue du marché sous forme de feuilles séchées, c'est le henné connu pour son usage esthétique et rituel ; apprécié pour ses propriétés colorantes, fortifiantes et embellissantes pour les cheveux. Une quantité de henné a subi ensuite un broyage et un tamisage pour l'obtention d'une poudre fine et homogène.
- c. Feuilles d'olivier sauvage "*Olea europaea* subsp. *Europea* var. *sylvestris*"
- d. Graines de fenouil "*Foeniculum vulgare* mill"
- e. Jujubier sauvage "*Ziziphus spina-christi*"
- f. *Salvia balansae*

(**NB** : Les extraits de henné et d'ail ont été préparés à partir de plantes achetées localement, alors que les extraits des autres plantes ont été fournis par le Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale, Mostaganem)

- Un produit de l'apiculture (Miel) a été testé dans cette étude contre *P. aeruginosa*.



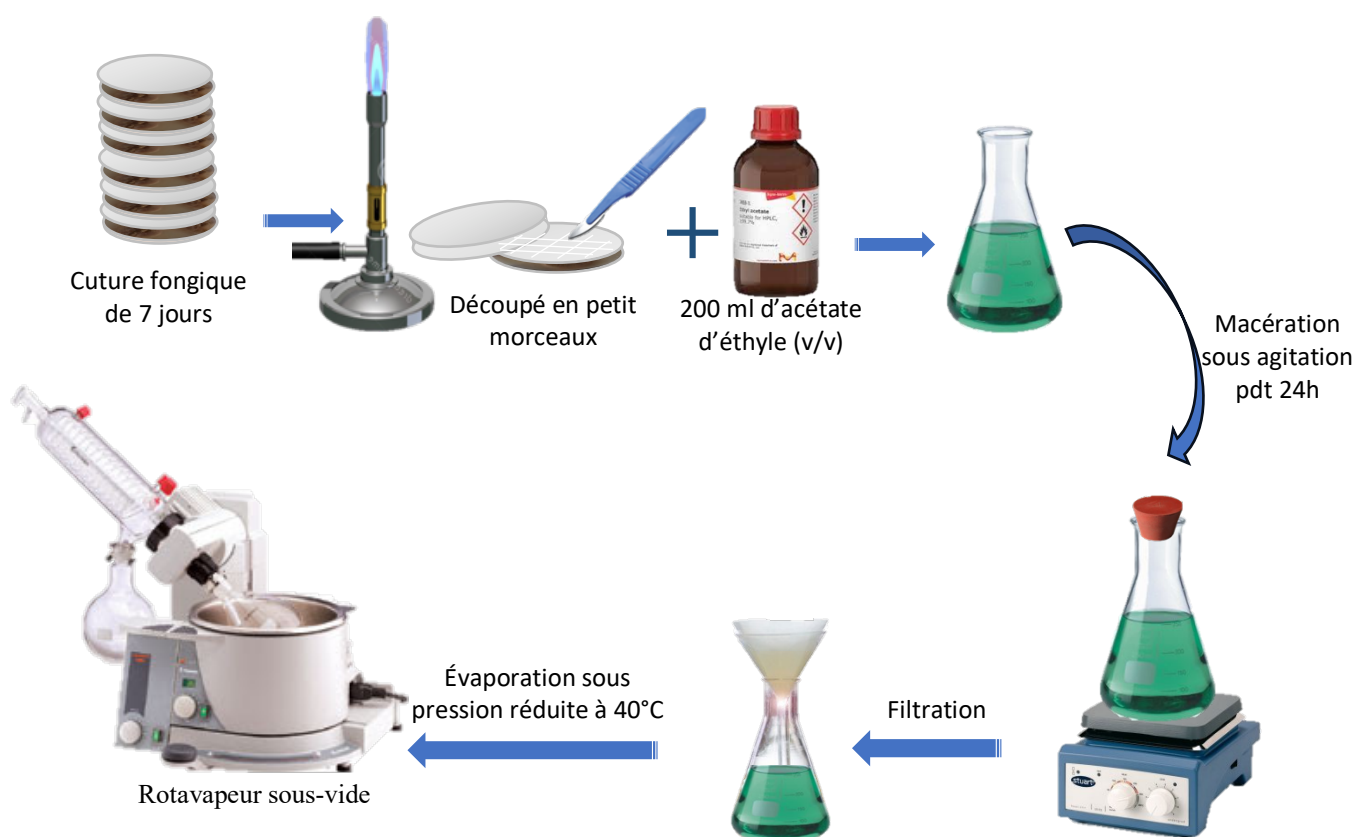
**Figure 10.** Différentes espèces végétales utilisées en expérimentation.

### 4.1. Évaluation de l'activité antagoniste des isolats fongiques contre *P. aeruginosa*.

Chaque isolat fongique parmi les 13 isolats étudiés a été ensemencé en ligne sur un milieu Mueller Hinton (MH, annexe 1), puis incubé 7 jours à 25 °C. Ensuite, les deux isolats de *P. aeruginosa* ont été ensemencés perpendiculairement au champignon. Après 24 heures d'incubation à 37°C, on mesure la distance d'inhibition entre les la ligne du champignon et *Pseudomonas* pour évaluer l'effet antagoniste (Hussaini *et al.*, 2023).

#### 4.1.1. Extraction des métabolites secondaires fongiques

Après avoir identifié le champignon qui a montré une interaction importante avec *Pseudomonas*, il est ensemencé en 10 boîtes de Pétri sur le milieu MH et incubé à 28 °C pendant 7 jours. Ensuite, la culture fongique est découpée et macérée dans de l'acétate d'éthyle pendant 24 heures sous agitation (fig. 11).



**Figure 11.** Protocole d'extraction des métabolites secondaires du champignon par macération.

### 4.2. Préparation d'extrait d'*Allium sativum*

Les ampoules de 150 g d'ail frais ont été épluchées, nettoyés et écrasés (fig. 12). Ensuite l'extrait a été filtré à l'aide d'un tissu de mousseline, puis la partie liquide extraite a été stérilisée par des filtres millipore 0,22 µm (Lattab, 2018). Pour éviter toutes transformations des composés, l'extrait de l'ail est préparé le jour même des expériences à cause de son instabilité.

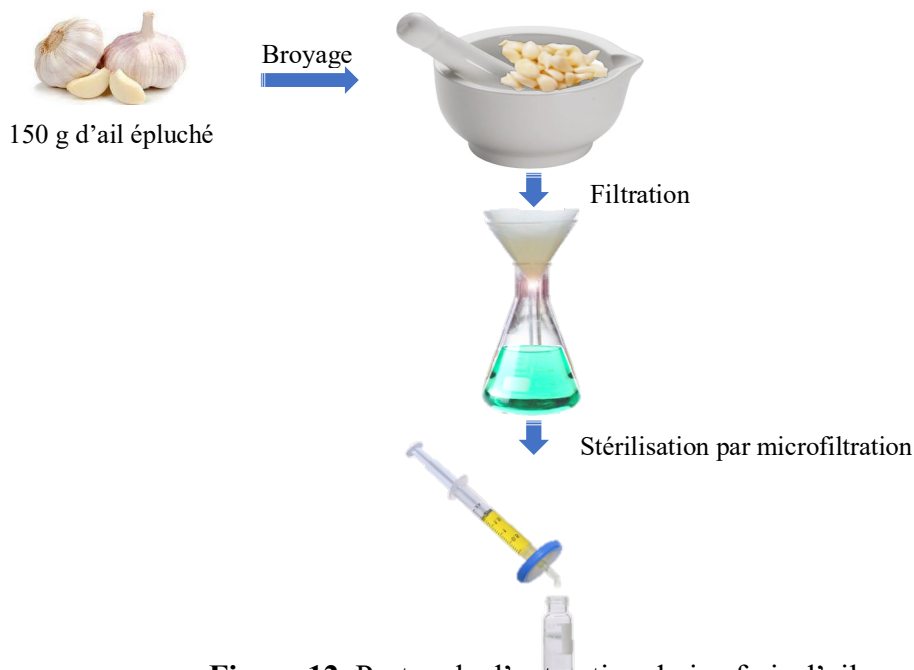


Figure 12. Protocole d'extraction du jus frais d'ail.

### 4.3. Extraction hydro-méthanolique de *L. inermis*

L'extraction a été réalisée en macérant 20 g de poudre de *L. inermis* dans 200 ml de méthanol à 70°, avec agitation pendant 72 heures à température ambiante (fig. 13). Après filtration, le solvant a été éliminé par évaporation sous pression réduite à 40°C (Triveni *et al.*, 2016).

### 4.4. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est le rapport entre le poids d'extrait et le poids de la plante sèche à traiter. Il est exprimé en pourcentage suivant la formule donnée par (Valle Ortiz, 2025).

$$R (\%) = \frac{m_{\text{extrait}}}{m_{\text{plante}}} \times 100$$

Où :

R est le rendement en %.

$m_{\text{extrait}}$  : la masse de l'extrait en gramme.

$m_{\text{plante}}$  : la masse de la plante extraite en gramme.



Figure 13. Protocole d'extraction méthanolique de *Lawsonia inermis* par macération.

### 5. Préparation des dilutions des extraits à tester

A partir des solutions mères des dilutions ont été préparées (m/v) dont les concentrations finales allant de 1 à 100% selon le type d'extrait testé. Une quantité d'extrait est pesée puis dissoute dans un microtube contenant un volume d'eau distillée stérile et homogénéisé à l'aide d'un agitateur vortex.

### 6. Préparation de l'inoculum

L'inoculum de *P. aeruginosa* est préparé à partir d'une culture jeune (fig. 14). Des colonies sont prélevées avec un écouvillon stérile, mises dans 9 ml d'eau physiologique, puis la suspension est ajustée à une turbidité de 0,5 McFarland (environ  $1 \text{ à } 2 \times 10^8$  UFC/ml) en mesurant la densité optique à 625 nm avec un spectrophotomètre UV-visible (CLSI, 2023).

### 7. Ensemencement des inoculums et dépôt des disques

La technique d'évaluation de l'activité antimicrobienne utilisée (fig. 14) consiste à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition autour d'extraits appliqués sur des disques déposés sur une gélose ensemencée de microorganismes. Cette méthode de diffusion sur gélose, classique pour tester la sensibilité bactérienne, implique la préparation de boîtes de Petri avec gélose Mueller Hinton, l'application des extraits sur des disques, puis l'incubation à 37°C pendant 24 heures. La taille de la zone d'inhibition est ensuite mesurée pour déterminer le degré de sensibilité des microorganismes, allant de résistants à extrêmement sensibles selon des seuils précis de diamètre (Moreira *et al.*, 2005 ; WHO, 2005).

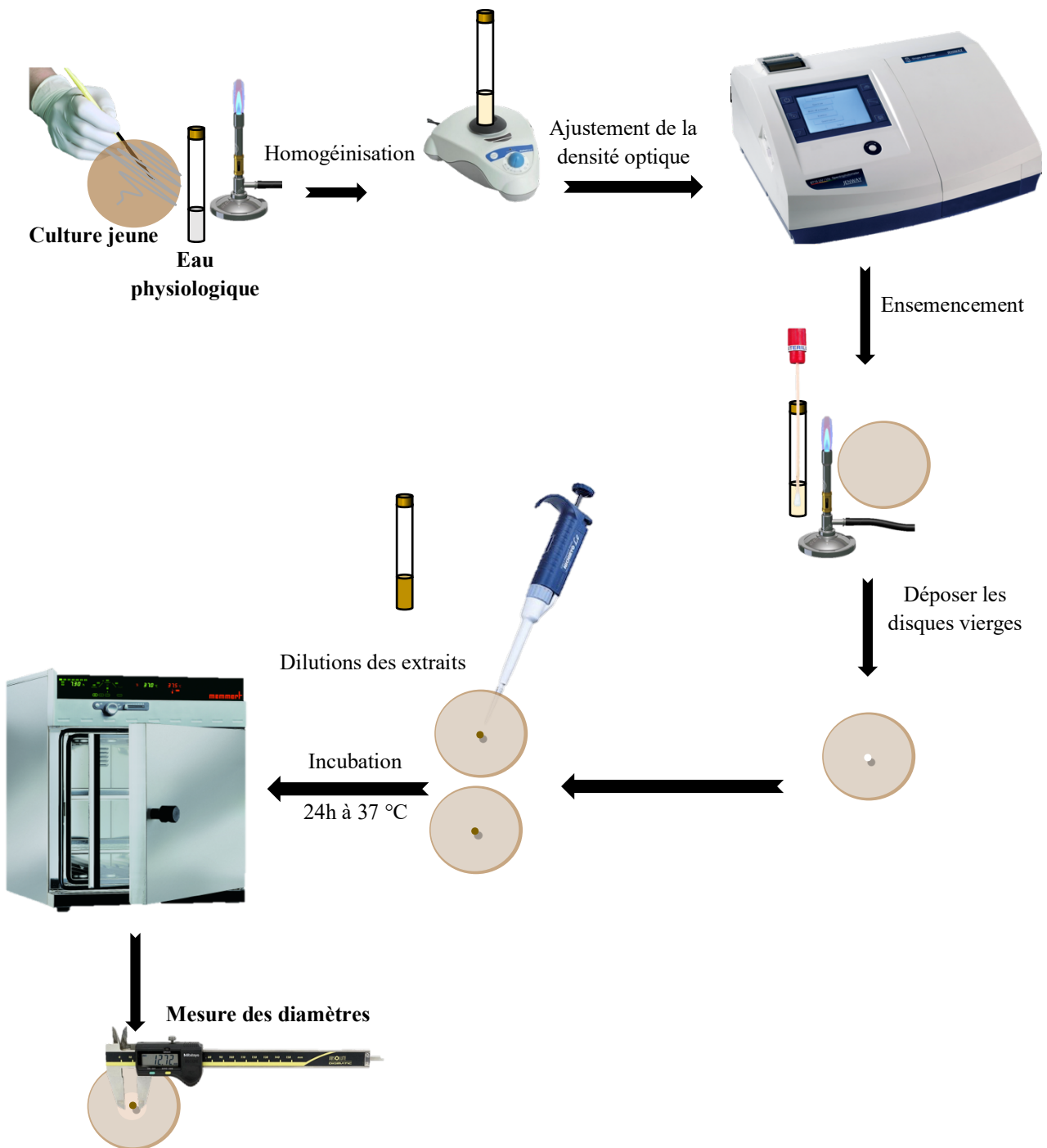


Figure 14. Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits.

### 8. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB)

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration d'un extrait capable d'inhiber toute croissance microbienne visible après 18 à 24 heures d'incubation (CLSI, 2023). Pour préparer une solution de 60 mg/ml pour *L. inermis* et 200 mg/ml pour l'extrait fongique, à l'exception de celui de l'ail (100%). Les préparations ont été stérilisées par filtration (filtre millipore 0,22 µm). A partir de cette solution stérile pour chaque extrait préparé, une gamme de concentrations a été préparée dans une microplaque (fig. 15).

Dans chaque puits, 100 µL de bouillon LB (voir annexe 1) stérile ont d'abord été distribués. Ensuite, 100 µL de la solution de l'extrait à tester ont été ajoutés au premier puits de chaque ligne, suivis d'une agitation douce pour homogénéiser. Une série de dilutions géométriques (facteur 2) a été effectuée le long de la rangée, en transférant 100 µL du mélange du puits précédent vers le suivant, jusqu'au le huitième puits, dans lequel 100 µL ont été éliminés pour conserver un volume constant. Finalement, 100 µL d'un inoculum microbien, préalablement ajusté à une densité standard ( $10^6$  UFC/ml), ont été ajoutés à chaque puits, portant le volume final à 200 µl par puits. A la fin de chaque rangé des contrôle positif et négatif ont été effectués. (Pagliara *et al.*, 2021).

Les microplaques ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. La CMI a été définie comme la plus faible concentration de l'agent testé ne montrant un changement de couleur le l'indicateur redox après l'ajout du triphenyltetrazolium (TTC), indiquant une inhibition complète de la croissance bactérienne (Lee *et al.*, 2007).

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en extrait capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Pour sa détermination, des ensemencements en stries sont effectués à partir des puits dépourvus de changement de couleur sur gélose Mueller Hinton puis incubés à 37°C pendant 24 heures (Biyiti *et al.*, 2004).

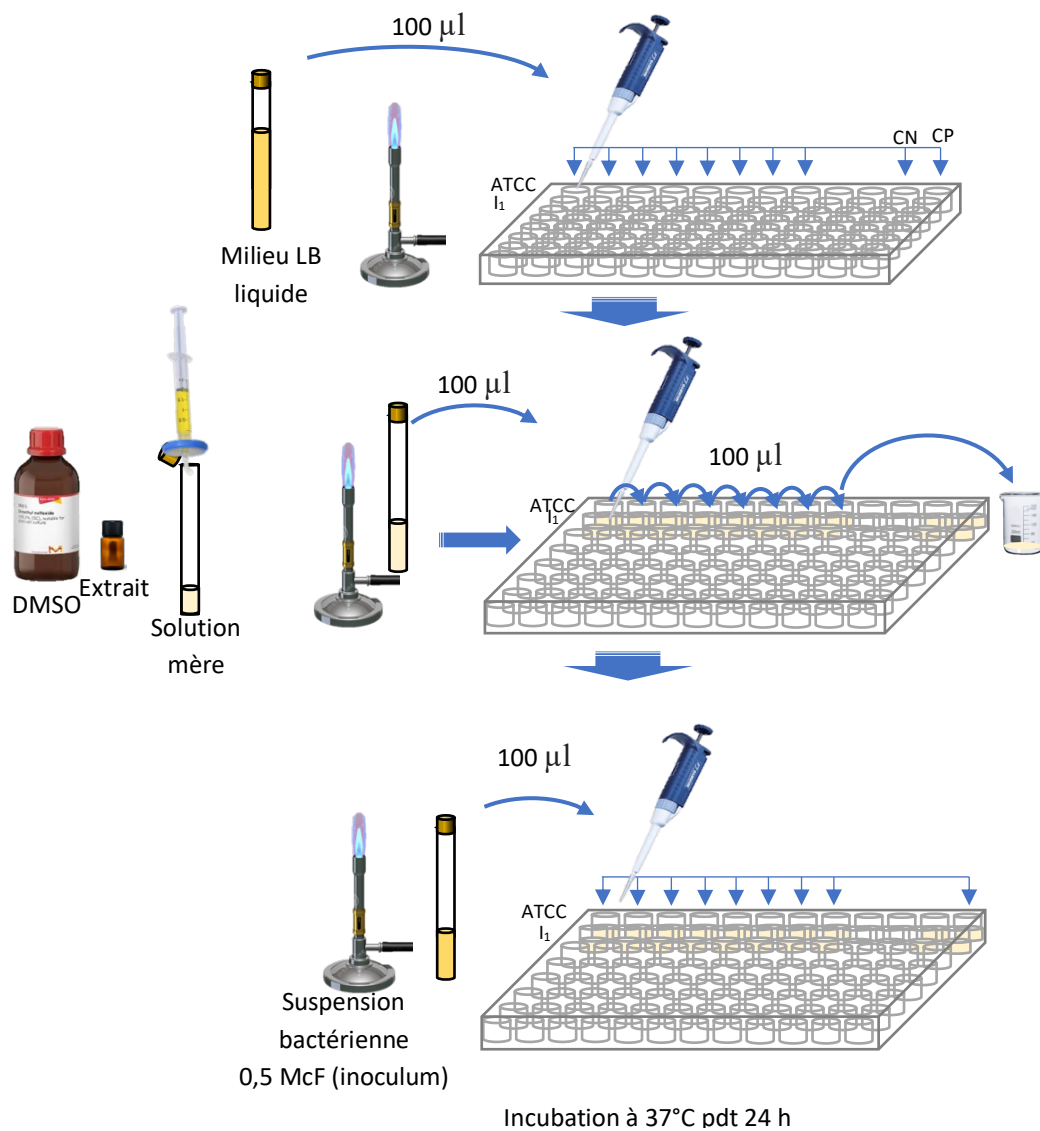


Figure 15. Protocole de la détermination de la CMI.

## 9. Identification de l'espèce fongique la plus performante

### 9.1. Étude macroscopique

Cet examen repose sur l'observation de la morphologie des colonies cultivées sur le milieu Sabouraud à savoir (aspect des colonies, texture, couleur du mycélium aérien, couleur du revers).

### 9.2. Étude microscopique

L'identification microscopique repose sur des critères morphologiques bien définis notamment (aspect des hyphes, vésicules, phialides, conidiophores, conidies), couleur, forme et disposition des phialides, observés au microscope optique après coloration au bleu de lactophénol.

### 10. Évaluation de la stimulation de *P. aeruginosa* par *Aspergillus sp* via la production de la pyocyanine

Les deux isolats de *Pseudomonas aeruginosa*, ont étéensemencées dans 20 ml du milieu LB liquide et incubées par la suite à 37°C. Après 18 heures d'incubation, la densité est ajustée par spectrophotométrie a  $DO_{625} \approx 0,8$  (0,5 McF). L'espèce fongique *Aspergillus sp* est cultivée pendant 7 jours sur gélose Sabouraud à 28°C, et les spores ont été récoltées en ajoutant 5-10 ml de solution saline contenant 0,1% de Tween 80. La solution recueillie a été ajustée à  $10^6$  spores/ml avec un spectrophotomètre a  $DO_{530}$  (Espinel-Ingroff *et al.*, 1991).

#### 10.1. Mise en place de la co-culture

Dans un flacon stérile de 200 ml contenant 50 ml de bouillon LB inoculé de 1 ml de la culture de *P. aeruginosa* et 1 ml de la suspension des spores d'*Aspergillus sp*. L'ensemble est incubé à 30°C pendant 72 heures sous agitation modérée (120 tpm) (Briard *et al.*, 2024).

##### 10.1.1. Extraction et quantification de la pyocyanine

Après la période d'incubation la co-culture a été centrifugée à 10000 tpm pendant 10 min. Un volume de 5ml du chloroforme est ajouté au 5ml de surnageant (v/v). Après l'extraction par le chloroforme, 5 ml de phase organique contenant probablement la pyocyanine est réextraite par 5 ml d'acide chlorhydrique (0,2 N), qui donne une couleur rose. L'absorbance de cette solution a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 520 nm (Bacame-Valenzuela *et al.*, 2020).

La quantité de la pyocyanine produite par *P. aeruginosa* est exprimée en µg/ml selon l'équation suivante (Essar *et al.*, 1990) :

$$Q = A \times f$$

Avec :

Q : quantité de pyocyanine

A : Absorbance

f : facteur de conversion (17,072)

# Chapitre V. Résultats et discussion

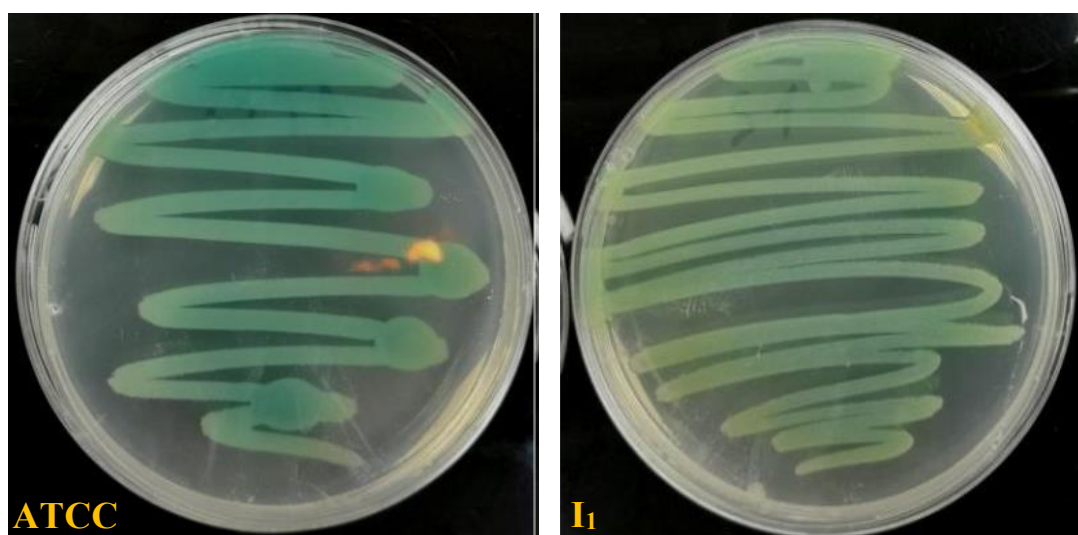


## Chapitre V. Résultats et discussion

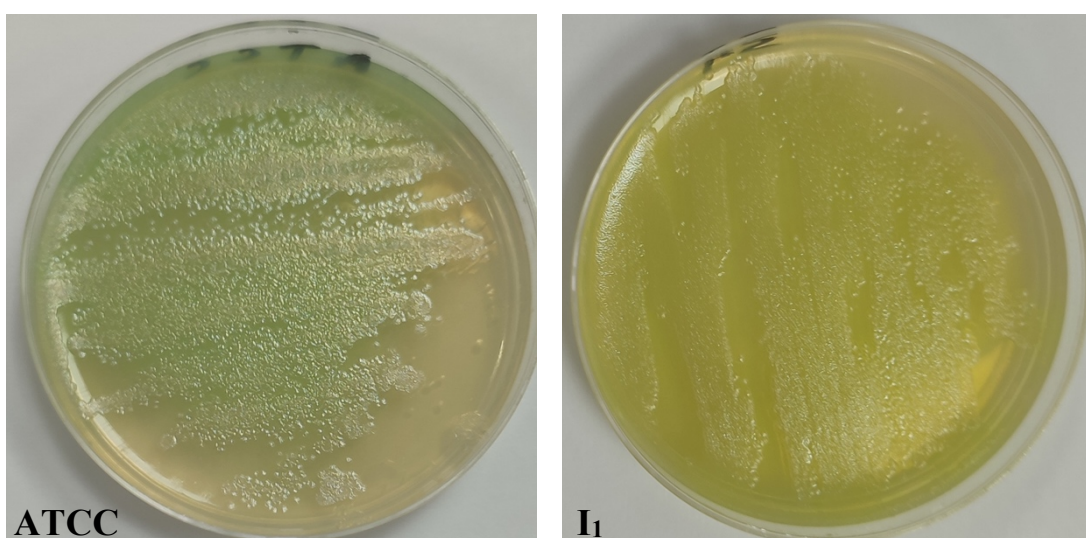
### 1. Revivification et confirmation des isolats microbiens étudiés

#### 1.1. Examen macroscopique

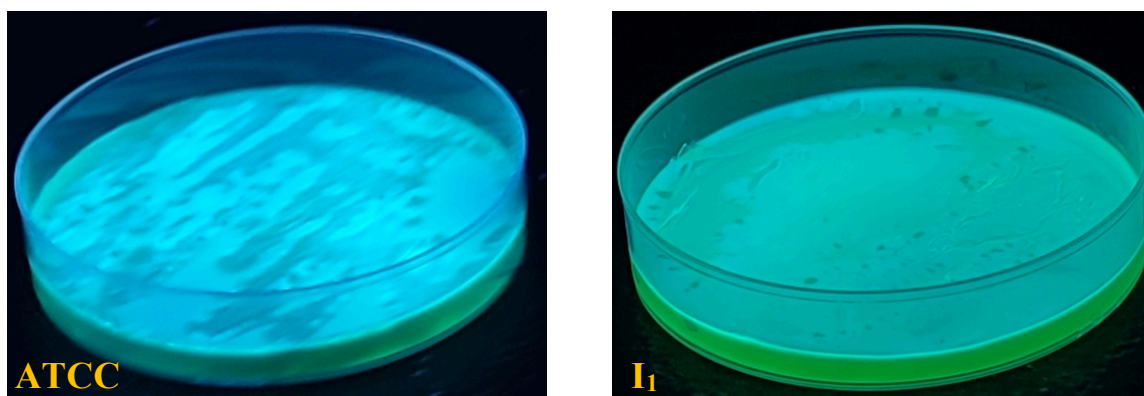
Après incubation à 37°C pendant 24 à 48 h sur gélose King A et King B, l'observation macroscopique (fig. 16 et 17) a révélé la présence de colonies de taille relativement uniforme à contours irréguliers, présentant un aspect irisé ou métallique, de couleur verdâtre et fluorescentes sous UV (fig. 18). Ces mêmes caractères morphologiques des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* ont été également observés et confirmés par **Sharma et al. (2022)**.



**Figure 16.** Aspect macroscopique des isolats de *P. aeruginosa* sur milieu king A.



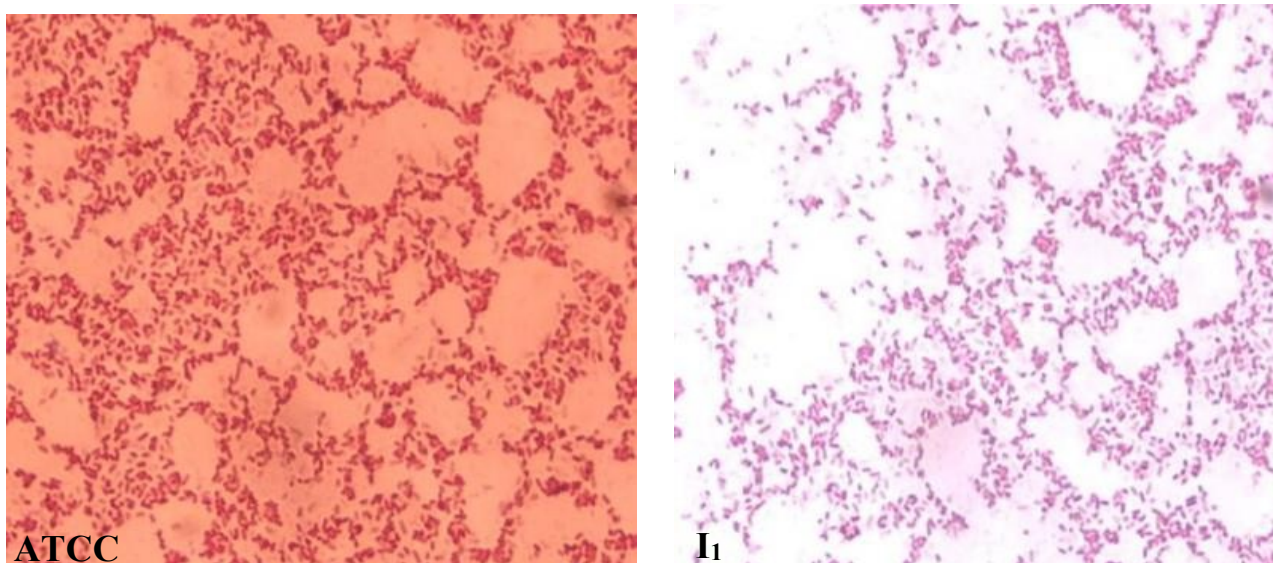
**Figure 17.** Aspect macroscopique des isolats de *P. aeruginosa* sur milieu king B.



**Figure 18.** Isolats de *P. aeruginosa* sur milieu king A sous lumière UV.

## 1.2. Examen microscopique

L'observation microscopique, permet d'étudier l'aspect morphologique des cellules d'une espèce microbienne après coloration. Sous microscope optique et à émergence au grossissement X100, la coloration de Gram, réalisée à partir de colonies distinctes, révèle la présence de bactéries à Gram négatif de couleur rose et de forme bacillaire, Ces caractéristiques confirment la présence de *Pseudomonas aeruginosa* (fig. 19).



**Figure 19.** Observation microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* après colocation de Gram x 1000.

## 1.3. Tests biochimiques de confirmation

### 1.3.1. Test de l'oxydase

Le test de l'oxydase lorsqu'il positif (fig. 20), met en évidence la présence d'une cytochrome oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit. La présence de ce dernier dans les chaînes respiratoires grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction que le cytochrome c (N-méthylé paraphénylène diamine) selon l'équation suivante :

Cytochrome oxydase + réactif réduit → réactif coloré  
L'existence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration violette très foncée (Procop *et al.*, 2020).

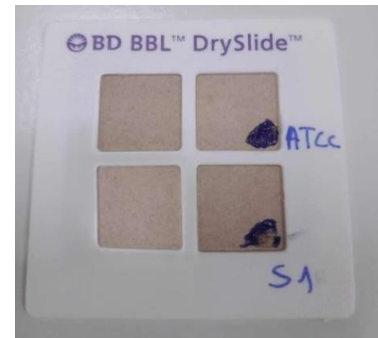


Figure 20. Test de l'oxydase.

### 1.3.2. Galerie API 20 NE

Les résultats obtenus à partir des galeries API 20 NE, sont indiquées dans le tableau 4. Les réactions produites (fig. 21) au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages de couleurs spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Annexe 2).



Figure 21. Résultats biochimiques des galeries API 20 NE.

**Tableau 4.** Résultats des tests biochimiques (API 20NE) de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tests	Bactéries		Tests	Bactéries	
	ATCC	I <sub>1</sub>		ATCC	I <sub>1</sub>
NO <sub>3</sub>	-	-	MNE	-	-
TRP	-	-	MAN	+	+
GLU	-	-	NAG	+	+
ADH	+	+	MAL	-	-
URE	-	+	GNT	+	+
ESC	-	+	CAP	+	+
GEL	+	+	ADI	+	-
PNPG	-	-	MLT	+	+
GLU	+	+	CIT	+	+
ARA	-	-	PAC	-	-

- : Négatif

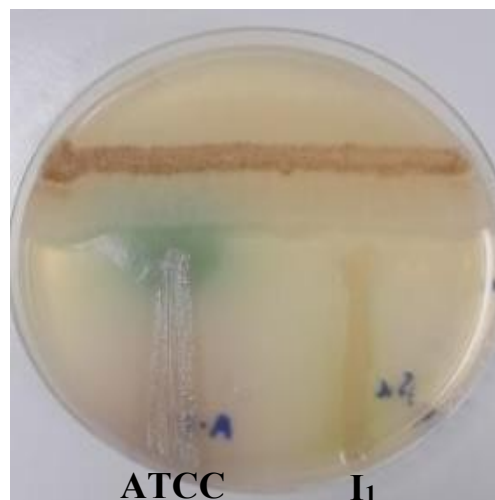
+ : Positif

NO<sub>3</sub>, TRP, GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG, GLU, ARA, MNE, MAN, NAG, MAL, GNT, CAP, ADI, MLT, CIT, PAC (voir annexe 2)

## 2. Évaluations des activités anti-*Pseudomonas*

### 2.1. Présélection de l'espèce fongique et l'extraction de ses métabolites secondaires

Le test de l'antagonisme (fig. 22) à monter que parmi les 9 espèces fongiques testées, seulement le champignon (C5) à légèrement inhiber la croissance et augmenter la production de la pyocyanine et la masse cellulaire des deux isolats de *Pseudomonas aeruginosa* étudiées (ATCC27853 et I1). Nous suggérons que ce faible taux d'inhibition est du probablement à la quantité infime des métabolites secrétés par le champignon. Des travaux de recherches élaborés par **Amly et al. (2021)**, indiquent qu'une concentration de 25% de gelée royale à inhiber la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145, par contre une concentration sous-inhibitrice favorise la production de pyocyanine et la formation de biofilm.



**Figure 22.** Effet antagoniste du champignon C5 vis-à-vis *P. aeruginosa*.

Le test de présélection de l'espèce fongique la plus performante basé sur l'extraction de ses métabolites secondaires, a pour but de déterminer la concentration appropriée pour inhiber la croissance et la production des facteurs de virulence de *P. aeruginosa*.

## 2.2. Rendement d'extraits d'*Allium sativum* et *L. inermis*

L'extraction de 150 g d'ail frais à donner un rendement de 4,6%. Tandis que la macération de 20 g de *Lawsonia inermis* a permis d'obtenir un rendement de 15 %. Des valeurs proches du rendement ont été rapportées par **Lattab (2018)**, pour l'extrait butanolique de deux variétés de *L. inermis* avec des rendements de 12,87 % et 12,31 %. **Sharma et ses collaborateurs (2008)** ont observé un rendement légèrement supérieur, de 18,62 %, pour un extrait méthanolique de *L. inermis* provenant d'Asie.

## 2.3. Activité antimicrobienne des extraits

Ces dernières années, l'intérêt pour les molécules biologiquement actives capable d'éradiquer les microorganismes pathogènes a augmenté (**Sini et al., 2024**). L'activité antibactérienne *in vitro* des extraits végétaux (*Allium sativum*, *Lawsonia inermis*, *Olea europaea subsp. Europea var. sylvestris*, *Foeniculum vulgare mill*, *Ziziphus spina-christi*, *Salvia balansae*), l'extrait fongique et du miel, a été évaluée qualitativement et quantitativement par la présence ou l'absence de zones d'inhibition (fig. 23), de la CMI et la CMB respectivement.

**Tableau 5.** Valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) de différents extraits testés vis-à-vis les *P. aeruginosa*.

Extraits	Diamètre d'inhibition en mm		
	Concentration en pourcentage	Souche ATCC	I <sub>1</sub>
Extrait fongique	10%	20,6	20
<i>Allium sativum</i>	100%	22,1	9,8
<i>Lawsonia inermis</i>	30%	13,3	12,4
<i>Olea europaea</i>	30%	6	6
<i>Foeniculum vulgare mill</i>	30%	6	6
<i>Ziziphus spina-christi</i>	30%	6	6
<i>Salvia balansae</i>	30%	6	6
Miel	100%	6	6

**Tableau 5.** Valeurs des diamètres d'inhibition (en mm) de différents extraits testés vis-à-vis les *P. aeruginosa*.

Cette évaluation par la méthode de diffusion sur disque, a permis d'identifier trois extraits actifs parmi ceux testés. Ces résultats, présentés dans le tableau (5), indiquent que l'extrait fongique (10 %) a montré une forte activité sur les deux souches bactériennes, avec un diamètre d'inhibition de 20,6 mm pour la souche ATCC 27853 et 20 mm pour l'isolat clinique (I<sub>1</sub>), indiquant une efficacité comparable aux résultats trouvées par **Shady et al. (2023)**. Le jus frais d'ail (*Allium sativum*, 100 %) a présenté la zone d'inhibition la plus importante sur la souche ATCC (22,1 mm), mais une activité nettement plus faible sur l'isolat clinique (9,8 mm), suggérant une variabilité de sensibilité entre les souches. Cela est mentionné dans les travaux de **Yadav et ses collaborateurs (2015)**.

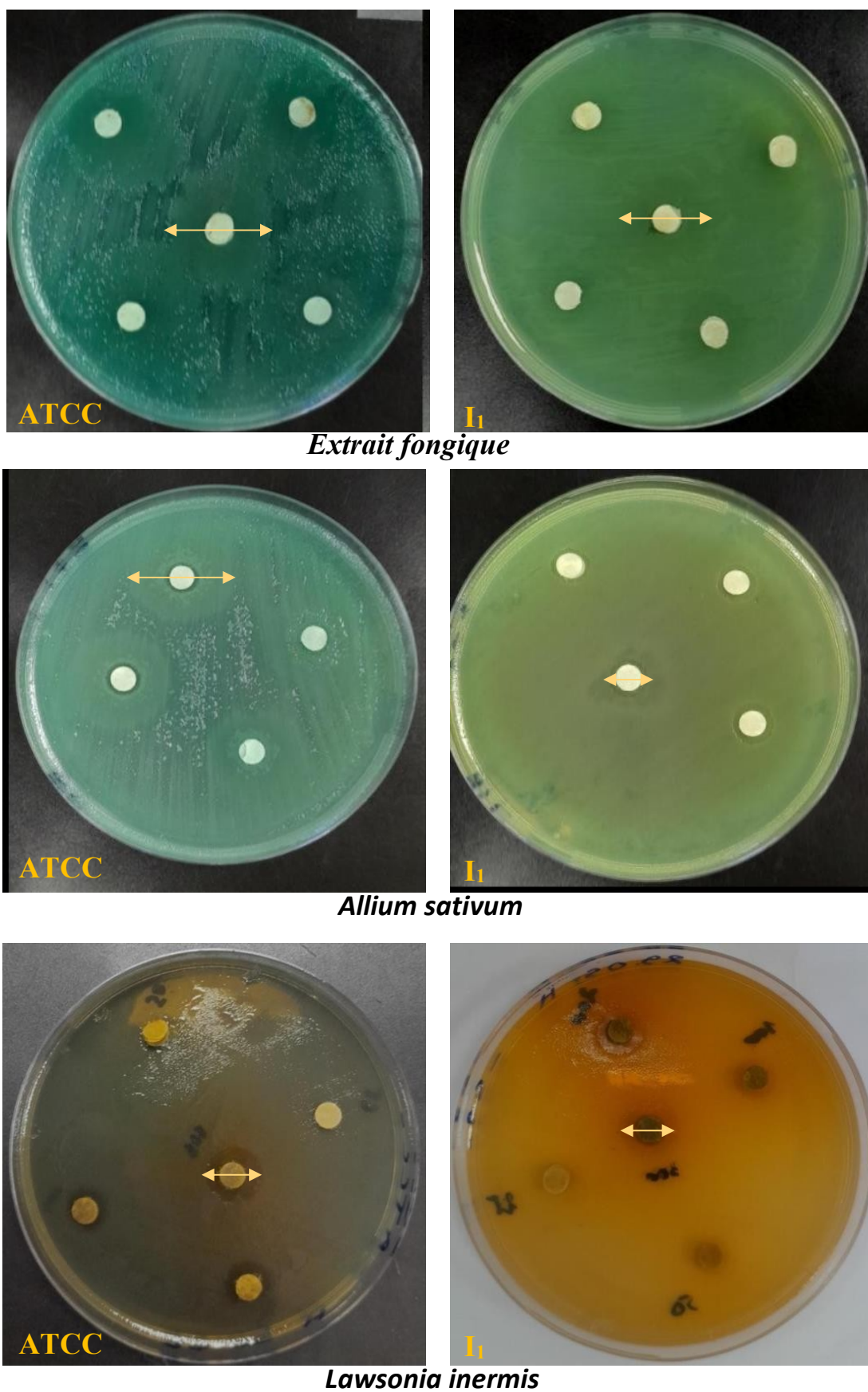


Figure 23. Effet antimicrobien de différents extraits testés vis-à-vis *P. aeruginosa*.

L'extrait de *Lawsonia inermis* à 30 % a quant à lui révélé une activité modérée, avec des zones de 13,3 mm (ATCC) et 12,5 mm (I<sub>1</sub>). Une activité plus importante a été constatée par **Obuotor et al. (2021)** de l'extrait brute de *L. inermis* contre sept souches de *P. aeruginosa* avec des diamètres allant de 17±1,5 à 24±2,6 mm. En revanche, les autres extraits testés, notamment ceux d'*Olea europaea*, *Foeniculum vulgare*, *Ziziphus spina-christi*, *Salvia balansae*, ainsi que le miel brut, ont tous donné des diamètres d'inhibition de 6 mm, correspondant au diamètre du disque lui-même, ce qui traduit une absence d'activité inhibitrice à la concentration testée. Ces résultats suggèrent que seuls certains extraits possèdent des composés bioactifs capables d'inhiber la croissance de *P. aeruginosa*, et que leur efficacité peut varier en fonction de l'origine de la souche bactérienne (**Mombeshora et Mukanganyama, 2019**).

#### 2.4. Détermination de la CMI et de la CMB de différents extraits

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration d'un agent antimicrobien (antibiotique ou antifongique) nécessaires pour inhiber la croissance d'un microorganisme (**Denis et al., 2011**). La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été réalisée en milieu liquide (méthode de microdilution) (fig. 24, 25 et 26)

Étant donné les résultats d'inhibition significatifs obtenus, nous avons envisagé l'évaluation de la CMI. Les résultats sont présentés dans les tableaux (6, 7 et 8).

Ces résultats montrent une variation de la sensibilité de *P. aeruginosa* (souche ATCC et isolat clinique I<sub>1</sub>) vis-à-vis des trois extraits testés : l'extrait fongique, l'extrait de *A. sativum* et l'extrait de *L. inermis*. De manière générale, les extraits ont exercé une activité antibactérienne significative contre *P. aeruginosa*.

Pour l'extrait fongique, la valeur de la CMI était la même pour les deux bactéries (25 mg/ml). Des travaux similaires réalisés par **Salem et al. (2022)**, montrent qu'un ont montré un excellent effet anti-*Pseudomonas* avec une CMI de 3,9 µg/ml. Cette variabilité pourrait être due aux choix du solvant utilisé pour l'extraction.

L'isolat I<sub>1</sub> apparaît plus sensible que la souche ATCC à l'extrait d'*A. sativum* avec des valeurs de CMI de 25% et 50%, respectivement. En comparaison avec les résultats de **Yadav et al. (2015)**, une CMI comprise entre 4 à 16% été enregistré pour l'ail de province de l'Inde contre *P. aeruginosa*.

En effet, une valeur de 7,5 mg/ml a été déterminée comme la CMI des deux bactéries vis-à-vis de *L. inermis*. Ces résultats indiquent que *P. aeruginosa* était plus sensible à l'extrait méthanolique, en comparaison avec les résultats rapportés par **Ali et al. (2016)**.

Cette différence d'activité pourrait être attribuée à l'influence de la région d'origine de la plante et aux facteurs géoclimatiques qui agissent sur la composition chimique et la richesse en biomolécules ayant un effet antimicrobien.

**Tableau 6.** Résultats de la CMI de l'extrait fongique vis-à-vis *P. aeruginosa*

	Concentration en mg/ml							
Bactéries	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,56	0,78
ATCC	-	-	-	+	+	+	+	+
I <sub>1</sub>	-	-	-	+	+	+	+	+

**Tableau 7.** Résultats de la CMI de l'extrait d'*Allium sativum* vis-à-vis *P. aeruginosa*.

	Concentration en %							
Bactéries	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78
ATCC	-	-	+	+	+	+	+	+
I <sub>1</sub>	-	-	-	+	+	+	+	+

**Tableau 8.** Résultats de la CMI de l'extrait de *Lawsonia inermis* vis-à-vis *P. aeruginosa*.

	Concentration en mg/ml							
Bactéries	30	15	7,5	3,5	1,87	0,93	0,47	0,23
ATCC	-	-	-	+	+	+	+	+
I <sub>1</sub>	-	-	-	+	+	+	+	+

Les résultats obtenus dans la présente étude mettent en évidence l'efficacité antibactérienne variable des trois extraits testés ; l'extrait fongique (EF), l'extrait d'*Allium sativum* (AS), et l'extrait de *Lawsonia inermis* (ELI) vis-à-vis les deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* étudiées.

Selon **Sanogo et al. (2016)**, le rapport CMB/CMI permet de préciser le mode d'action d'une substance antimicrobienne testée. Ainsi, l'extrait est considéré comme bactéricide quand la CMB est égale à la CMI, ou lorsque le rapport CMB/CMI est inférieur ou égal à 4. Il est qualifié

de **bactériostatique** lorsque ce rapport est supérieur à 4, Enfin, lorsque le rapport CMB/CMI est égal à 32, la souche est dite tolérante.

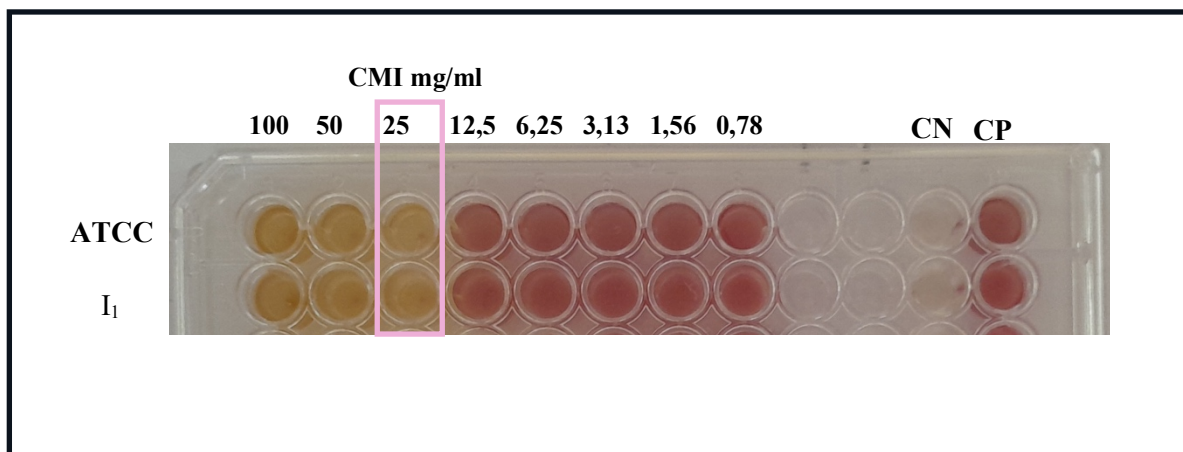
En se référant aux résultats présentés dans le tableau 9, nous constatons d'une part, que l'extrait fongique a montré une activité modérée, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 25 mg/ml et une concentration minimale bactéricide (CMB) de 50 mg/ml (fig. 27), soit un rapport CMB/CMI de 2, ce qui suggère une activité bactéricide à l'égard des deux souches testées. En revanche, les extraits d'*A. sativum* et de *L. inermis* ont montré un rapport CMB/CMI égal à 1 pour les deux souches, traduisant une activité bactéricide franche. Ces résultats suggèrent que les extraits végétaux possèdent une meilleure efficacité antibactérienne que l'extrait fongique dans les conditions testées.

**Tableau 9.** Évaluation du rapport d'activité antimicrobienne (CMB/CMI) des extraits vis-à-vis *P. aeruginosa*.

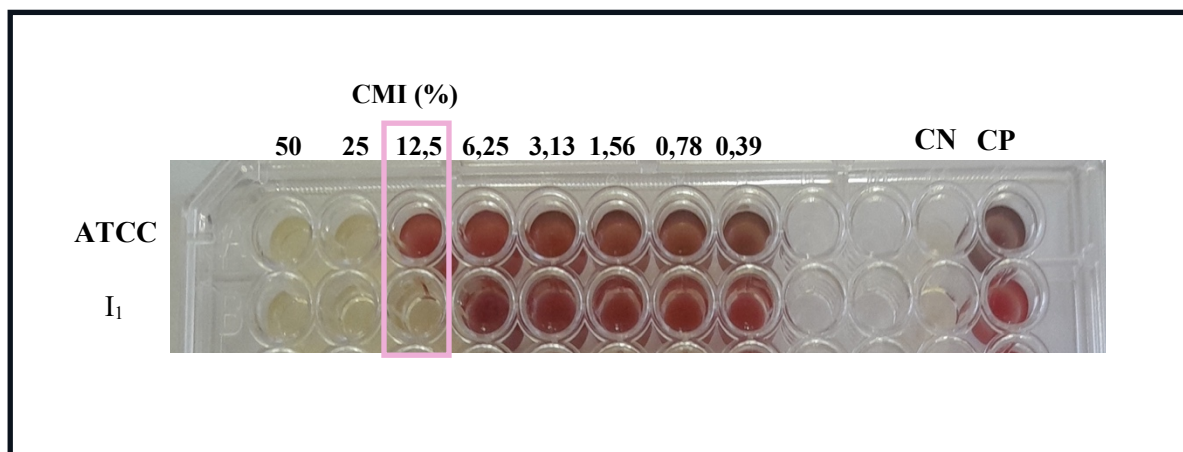
Extraits testés	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
	Souche ATCC				Isolat I <sub>1</sub>			
	CMI	CMB	$\frac{CMB}{CMI}$	Activité	CMI	CMB	$\frac{CMB}{CMI}$	Activité
EF (mg/ml)	25	50	2	Bactéricide	25	50	2	Bactéricide
AS (%)	50	50	1		25	25	1	
ELI (mg/ml)	7,5	7,5	1		7,5	7,5	1	

CMI : Concentration minimale inhibitrice ; CMB : Concentration minimale bactéricide ; EF : Extrait fongique ; AS : Extrait de *Allium sativum* ; ELI : Extrait de *L. inermis*.

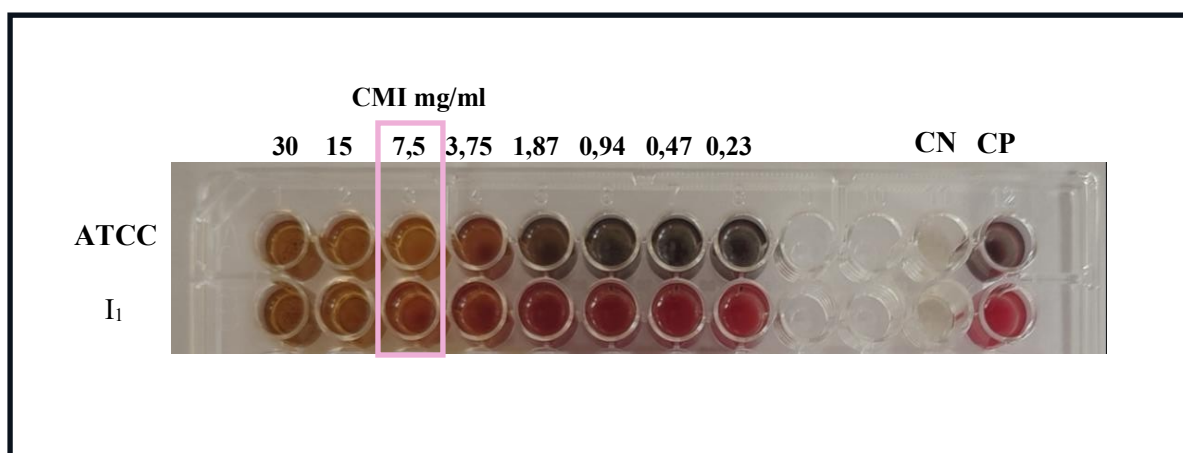
Nos résultats corroborent ceux d'autres travaux, une activité bactéricide, a été démontrée contre *P. aeruginosa*, pour l'extrait de *L. inermis* et le jus frais d'ail, avec des rapports de CMB/CMI égale à 2 et 1 respectivement (**Idris et al., 2023 ; Magrys et al., 2021**). Par ailleurs, dans notre étude, aucune différence significative n'a été observée entre la souche de référence et l'isolat clinique, ce qui indique une sensibilité comparable des deux souches à ces extraits. L'extrait de *L. inermis* se distingue par son activité bactéricide à la plus faible concentration testée, ce qui le positionne comme un candidat prometteur pour le développement d'agents antimicrobiens d'origine naturelle ciblant *P. aeruginosa*.



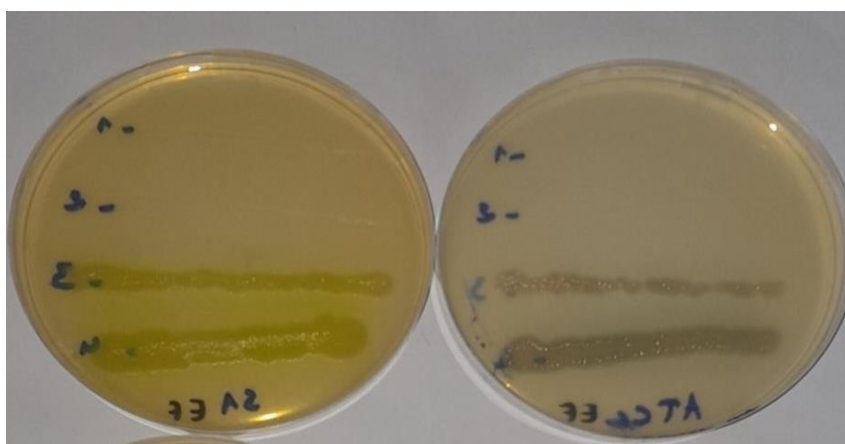
**Figure 24.** Concentration minimale inhibitrice de l'extrait fongique vis-à-vis *P. aeruginosa*.



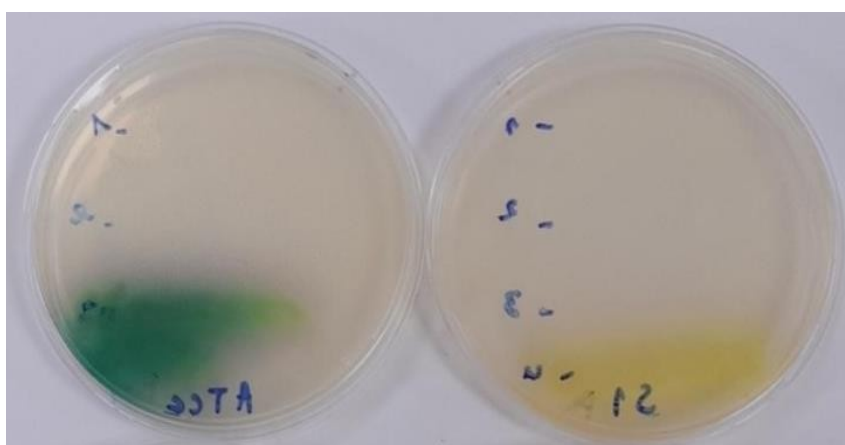
**Figure 25.** Concentration minimale inhibitrice de l'extrait de *A. sativum* vis-à-vis *P. aeruginosa*.



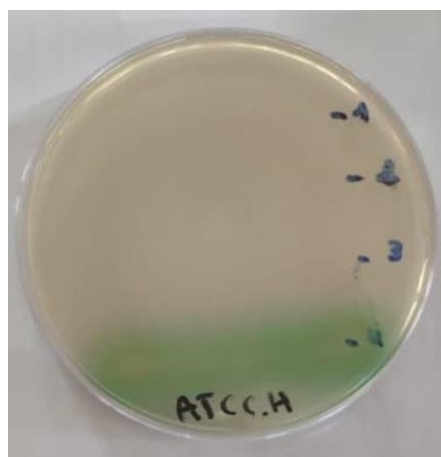
**Figure 26.** Concentration minimale inhibitrice de l'extrait de *L. inermis* vis-à-vis *P. aeruginosa*.



*Extrait fongique*



*Allium sativum*

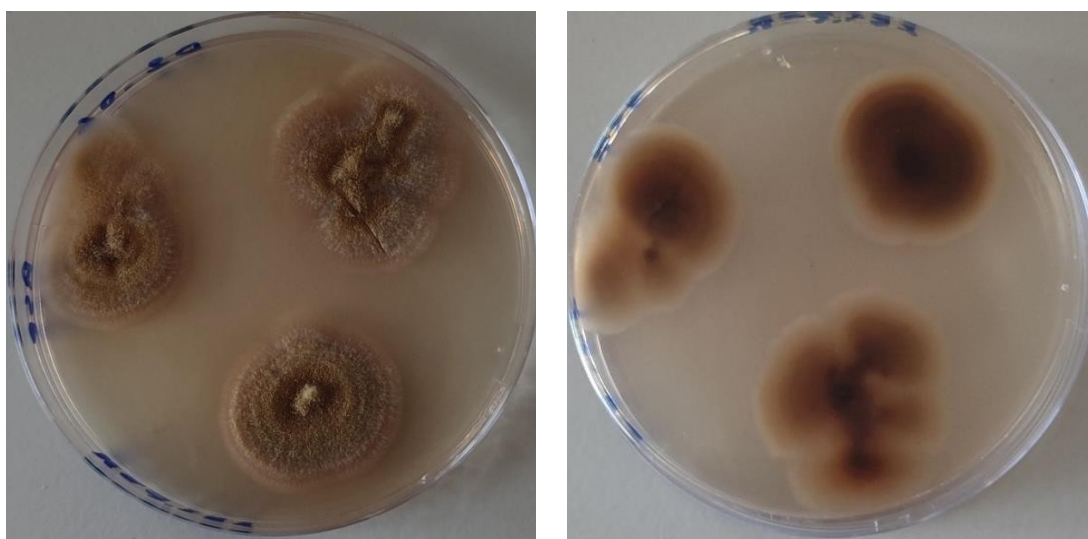


*Lawsonia inermis*

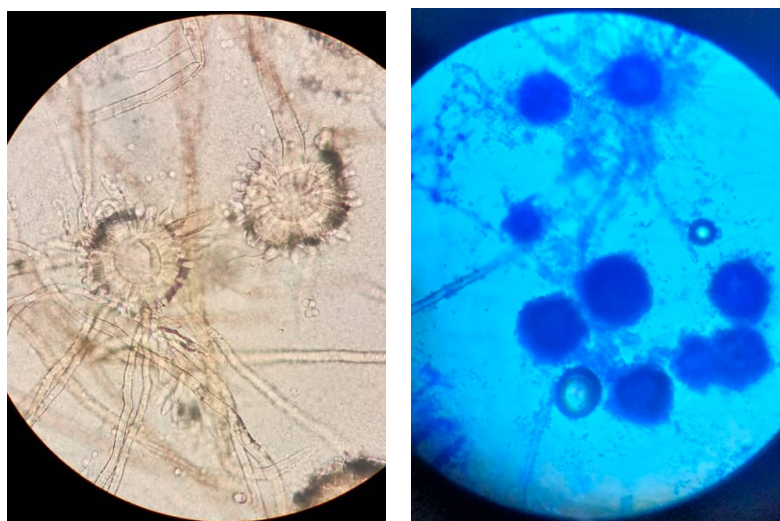
**Figure 27.** Résultats de la CMB des trois extraits vis-à-vis *P. aeruginosa*.

### 3. Identification de l'espèce fongique étudiée

L'identification macroscopique (fig. 28) du champignon cultivé sur gélose Sabouraud (voir annexe 1) a révélé des colonies d'aspect cotonneux à velouté, de forme circulaire, avec une coloration brunâtre et une croissance rapide. Ces caractéristiques sont typiques des champignons du genre *Aspergillus*. En particulier, l'aspect concentrique des colonies, ainsi que leurs textures granuleuses et leurs pigmentations, sont typiquement de ce genre. Bien que l'aspect macroscopique donne une première orientation. L'examen microscopique (fig. 29) avec ou sans coloration au bleu de lactophénol a été réalisé, ce qui confirme nettement l'appartenance de l'espèce fongique étudiée à *Aspergillus* sp.



**Figure 28.** Aspect macroscopique de *Aspergillus* sp. identifié sur milieu Sabouraud



**Figure 29.** Aspect microscopique de *Aspergillus* sp. identifié avec ou sans coloration au bleu de lactophénol.

#### 4. Évaluation de la stimulation de *P. aeruginosa* par *Aspergillus* sp. via la production de la pyocyanine

L'extraction de la pyocyanine à partir de la co-culture (fig. 30) de *Pseudomonas aeruginosa* repose sur les propriétés physico-chimiques de ce pigment phénazinique, notamment sa solubilité dans des solvants organiques comme le chloroforme et sa capacité à changer de couleur selon le pH (Al-madboly *et al.*, 2023).

Après incubation, la centrifugation permet de séparer les cellules et débris du surnageant contenant les métabolites extracellulaires. L'ajout de chloroforme permet l'extraction sélective de la pyocyanine grâce à sa solubilité dans la phase organique (fig. 31).

L'étape de réextraction par l'acide chlorhydrique 0,2 N provoque un changement de pH, entraînant la protonation de la pyocyanine et sa migration dans la phase aqueuse, qui devient alors rose (fig. 32). Ce changement de couleur est caractéristique de la pyocyanine en milieu acide, confirmant sa présence. L'absorbance mesurée à 520 nm par spectrophotométrie UV-visible correspond à la longueur d'onde maximale d'absorption de la forme protonée de la pyocyanine (El-Malhany *et al.*, 2024).

L'analyse des résultats obtenus après 72 heures d'incubation montre une variation significative de la production de pyocyanine selon la souche de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC ou clinique I<sub>1</sub>) et la présence ou non d'*Aspergillus* sp. L'absorbance mesurée à 520 nm reflète directement la concentration de pyocyanine extraite.

Dans tous les cas, une augmentation progressive de l'absorbance (annexe 3) est observée entre 24h et 72h, indiquant une accumulation continue de pyocyanine au cours du temps (fig. 33).

Le pic de production est atteint à 72h, ce qui est conforme à la littérature (Hall *et al.*, 2016 ; Essar *et al.*, 1990), où la production maximale de pyocyanine est souvent observée entre 48 et 72h en milieu liquide.

La souche ATCC produit plus de pyocyanine (1,758 µg/ml à 72h) que l'isolat clinique (I<sub>1</sub>) (0,666 µg/ml à 72h), ce qui est attendu puisque certaines souches cliniques montrent une production réduite, souvent associée à des formes SCV (small colony variants) ou à une régulation altérée du quorum sensing (Wei *et al.*, 2011).

Cette différence est en accord avec les travaux de Lau *et al.* (2004), qui montrent que la virulence et la production de pigments phénaziniques peuvent varier d'une souche à une autre selon leur origine.

Dans notre étude pour la souche ATCC, la co-culture avec *Aspergillus* sp. entraîne une augmentation marquée de la production de pyocyanine à 72h (de 1,758 à 2,527 µg/ml). Cela suggère une stimulation du métabolisme secondaire par des interactions intermicrobiennes.

En revanche, pour l'isolat clinique, la co-culture avec *Aspergillus* sp. ne semble pas induire de stimulation significative : la production est même légèrement inférieure (0,666 contre 0,734 µg/ml), indiquant une possible inhibition, compétition ou absence de réponse métabolique adaptative.

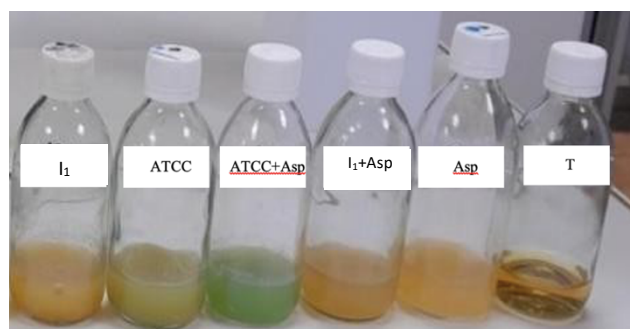
Ces observations corroborent les résultats de **Khalid *et al.* (2023)**, selon lesquels des champignons filamenteux peuvent induire la production de pigments chez *P. aeruginosa* par stress oxydatif, contact physique ou signal chimique. Des études antérieures (**Deveau et Hogan, 2011**) ont également montré que certaines espèces de champignons peuvent moduler l'expression des gènes de virulence via des mécanismes dépendants du quorum sensing.

Nos résultats montrent clairement que la production de pyocyanine est souche-dépendante et modulée par la co-culture avec *Aspergillus* sp. La stimulation observée pour la souche ATCC peut s'expliquer par une réponse adaptative au stress fongique, tandis que la faible réponse chez l'isolat clinique pourrait être liée à des différences génétiques, à une capacité réduite de biosynthèse ou même inhibé par les métabolites fongique (**O'Brien et Fothergill, 2017**).

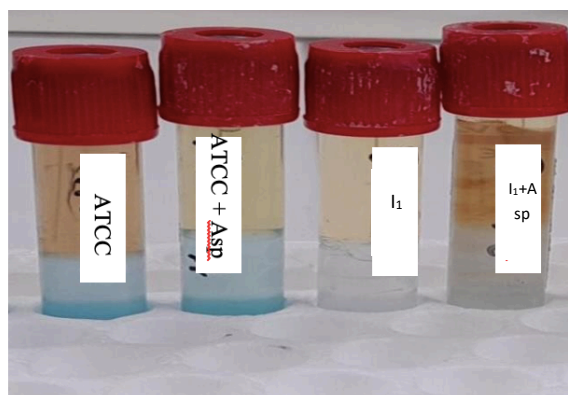
**Tableau 10.** Évaluation de la production de la pyocyanine en fonction du temps.

Microorganisme	Pyocyanine en µg/ml		
	24h	48h	72h
ATCC	0,290	0,717	1,758
ATCC + <i>Aspergillus</i> sp.	0,359	1,212	2,527
I <sub>1</sub>	0,120	0,120	0,734
I <sub>1</sub> + <i>Aspergillus</i> sp.	0,154	0,222	0,666

Cette méthode de quantification, simple et reproductible, est largement utilisée pour quantifier la production de pyocyanine, un marqueur important de la virulence de *P. aeruginosa*. L'utilisation de la formule de **Khalid *et al.* (2023)** permet de convertir directement l'absorbance en concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ), ce qui facilite la comparaison quantitative entre différentes conditions expérimentales ou souches bactériennes. Toutefois, il convient de noter que la spécificité du dosage pourrait être influencée par la présence d'autres pigments ou composés phénoliques dans le surnageant, d'où l'importance d'un contrôle négatif et éventuellement de chromatographies complémentaires pour confirmer la pureté de l'extrait.



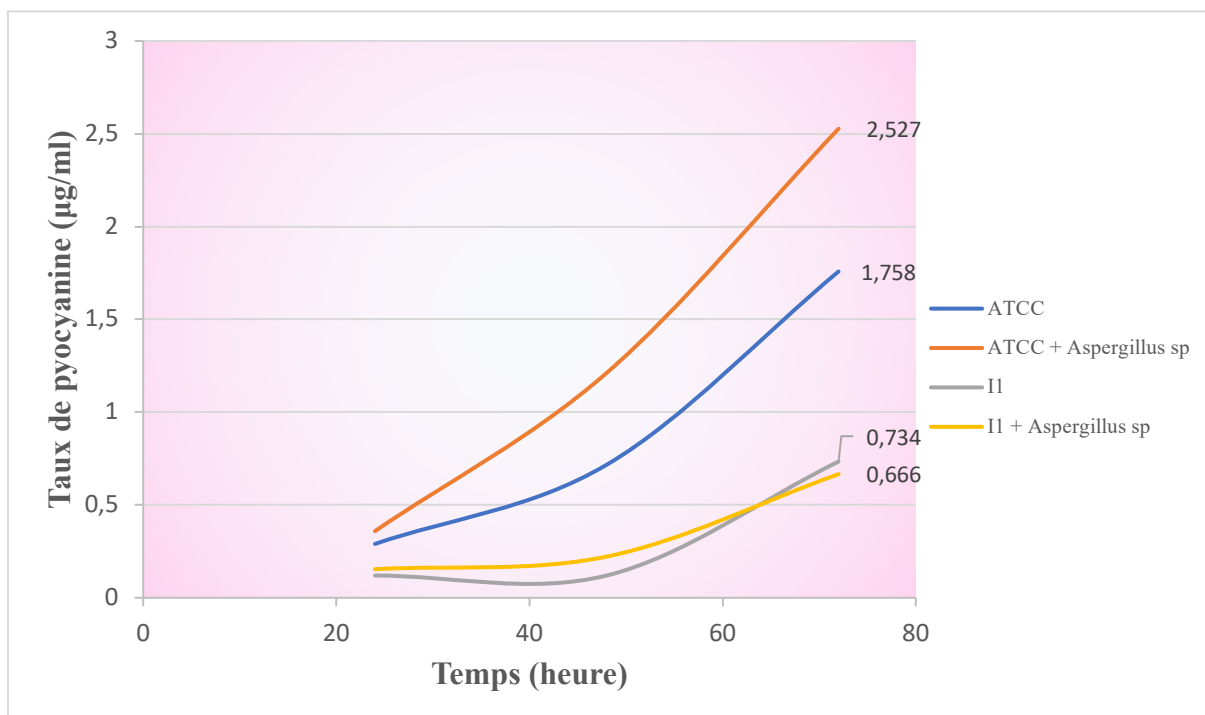
**Figure 30.** Co-culture de *P. aeruginosa* et *Aspergillus* sp. en milieu LB liquide.



**Figure 31.** Extraction liquide-liquide de la pyocyanine par chloroforme.



**Figure 32.** Réextraction liquide-liquide de la pyocyanine par l'acide chlorhydrique.



**Figure 33.** Évaluation de la quantification de la production de la pyocyanine en fonction de temps.



# **Conclusion**

## Conclusion

Ce présent travail vise à évaluer l'activité antimicrobienne d'extraits issus de différentes sources (*Lawsonia inermis*, *Allium sativum*, *Olea europaea* subsp. *Europea* var. *sylvestris*, *Foeniculum vulgare* mill, *Ziziphus spina-christi*, *Salvia balansae*), 13 isolats fongiques marins et du miel, afin de lutter contre la progression de l'antibiorésistance de *Pseudomonas aeruginosa*, en particulier des souches cliniques responsables des infections nosocomiales.

Des examens d'identification confirmatifs de *P. aeruginosa* ont été réalisés. Parallèlement un test d'antagonisme a été effectué avec 13 champignons vis-à-vis deux isolats de *P. aeruginosa*, l'un de référence (ATCC 27853) et l'autre clinique (I<sub>1</sub>). Ce test a permis de sélectionner un seul champignon (C5) identifié comme *Aspergillus* sp présentant un potentiel antagoniste.

L'activité antibactérienne *in vitro* a été évaluée qualitativement, par la présence ou l'absence de zones d'inhibition, et quantitativement, par la détermination de la CMI et de la CMB.

La stimulation de *Pseudomonas aeruginosa* par *Aspergillus* sp. est évaluée par une quantification spectrophotométrique de la production de pyocyanine en conditions de co-culture.

Les résultats de l'activité antimicrobienne contre *Pseudomonas aeruginosa* ont montré que seuls l'extrait fongique d'*Aspergillus* sp ainsi que les extraits végétaux d'*Allium sativum* et de *Lawsonia inermis* ont exercé une action significative. Pour *Aspergillus* sp., les diamètres de zones d'inhibition étaient de 20,6 mm pour la souche ATCC 27853 et de 20 mm pour la souche clinique I<sub>1</sub>, avec des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) et concentration minimale bactéricide (CMB) de 25 mg/ml et 50 mg/ml, respectivement.

L'extrait d'*Allium sativum* a montré des diamètres d'inhibition de 22,1 mm pour la souche (ATCC 27853) et 9,8 mm pour l'isolat clinique I<sub>1</sub>, avec des CMI et CMB de 25 % et 50 % respectivement. Quant à *Lawsonia inermis*, ses extraits ont présenté des diamètres d'inhibition de 13,3 mm pour la souche (ATCC 27853) et 12,4 mm pour l'isolat I<sub>1</sub>, avec des CMI et CMB identiques de 7,5 mg/ml pour les deux souches bactériennes.

En revanche, les extraits d'*Allium sativum* et de *Lawsonia inermis* ont présenté un rapport CMB/CMI égal à 1 pour les deux souches de *P. aeruginosa*, ce qui traduit une activité bactéricide nette. Ces résultats suggèrent que, dans les conditions expérimentales testées, les extraits végétaux manifestent une efficacité antibactérienne supérieure à celle de l'extrait fongique d'*Aspergillus* sp.

## Conclusion

La quantification de la production de pyocyanine varie selon la souche de *P. aeruginosa* et la co-culture avec *Aspergillus* sp. La souche ATCC passe de 1,758 à 2,527 µg/ml en co-culture, indiquant une stimulation métabolique. En revanche, l'isolat clinique I<sub>1</sub> montre une production légèrement réduite (de 0,734 à 0,666 µg/ml), suggérant une absence de réponse ou une inhibition.

Les activités bactéricide et inhibitrice observées suggèrent que ces extraits pourraient constituer une alternative prometteuse ou un complément aux traitements conventionnels, particulièrement face aux souches multirésistantes. Ces résultats encouragent la poursuite des recherches en vue de l'isolement et de la caractérisation des composés actifs, ainsi que leur évaluation dans des modèles *in vivo* et des formulations thérapeutiques innovantes pour un usage clinique futur.

En perspective, ces extraits naturels peuvent également être utilisés pour inhiber certains facteurs de virulence, tels que la formation de biofilm et le quorum sensing. Ce dernier régule la production de pyocyanine qui joue un rôle essentiel dans la virulence de *Pseudomonas aeruginosa*.

Des études approfondies seront nécessaires pour isoler les molécules actives, élucider leurs mécanismes d'action, évaluer leur toxicité, et tester leur efficacité dans des modèles précliniques et cliniques. À long terme, ces extraits pourraient être intégrés dans le développement de nouveaux agents thérapeutiques, désinfectants hospitaliers ou dispositifs médicaux antibactériens.



# Références bibliographiques

### A

- **Abalo, A., Patassi, A., James, Y. E., Walla, A., Sangaré, A., & Dossim, A.** (2010). Risk factors for surgical wound infection in HIV-positive patients undergoing surgery for orthopaedic trauma. *Journal of Orthopaedic Surgery (Hong Kong)*, **18**(2), 224–227. <https://doi.org/10.1177/230949901001800218>
- **Al-Hajje, A., Ezedine, M., Hammoud, H., Awada, S., Rachidi, S., Zein, S., & Salameh, P.** (2012). Aspects actuels des infections nosocomiales au Centre Hospitalier Libanais de Beyrouth. *Eastern Mediterranean Health Journal*, **18**(5), 495–500. <https://www.emro.who.int/emhj-volume-18-2012/issue-5/article-13.html>
- **Al-Madboly, L., Abdelaziz, A., Abo Kamal, R., & El-Deeb, N. M.** (2023). Pseudomonas aeruginosa's greenish-blue pigment pyocyanin: Its production and biological activities. *Microbial Cell Factories*, **22**, 110. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02122-1>
- **Ali, K. S., Al-Hood, F. A., Obad, K., & Alshakka, M.** (2016). Phytochemical screening and antibacterial activity of Yemeni henna (*Lawsonia inermis*) against some bacterial pathogens. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, **11**(2), 24–27. <https://doi.org/10.9790/3008-1102032427>
- **Álvarez-Marín, R., Lepe, J. A., Gasch-Blasi, O., Rodríguez-Martínez, J. M., Calvo-Montes, J., Lara-Contreras, R., Martín-Gandul, C., Tubau-Quintano, F., Cano-García, M. E., Rodríguez-López, F., Rodríguez-Baño, J., Pujol-Rojo, M., Torre-Cisneros, J., Martínez-Martínez, L., Pascual-Hernández, Á., Jiménez-Mejías, M. E., & Spanish Network for Research in Infectious Diseases/Enterobacter spp. Bacteremia Project Group** (2021). Clinical characteristics and outcome of bacteraemia caused by Enterobacter cloacae and Klebsiella aerogenes: more similarities than differences. *Journal of global antimicrobial resistance*, **25**, 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.04.008>
- **Amly, D. A., Hajardhini, P., Jonarta, A. L., Yulianto, H. D. K., & Susilowati, H.** (2021). Enhancement of pyocyanin production by subinhibitory concentration of royal jelly in Pseudomonas aeruginosa. *F1000Research*, **10**, 14. <https://doi.org/10.12688/f1000research.27915.4>
- **Anderson, D. J.** (2011). *Surgical site infections*. *Infectious Disease Clinics of North America*, **25**(1), 135–153. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2010.11.004>
- **Andriamiharisoa, S. N., Rasamimanana, N. G., Rakotomalala, R. S., Randrianirina, H. H., Ralison, F., & Ralison, A.** (2019). Infections nosocomiales : Facteurs de risque de mortalité au sein du service des urgences de Mahajanga. *Revue d'Anesthésie-Réanimation et de Médecine d'Urgence et de Toxicologie*, **11**(2), 25–29.
- **Arabi A.** 2018. Effet antimicrobien des huiles essentielles de Pistacia lentiscus L. sur quelques espèces bactériennes multirésistantes de la microflore digestive humaine. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie. p : 181.
- **Asikyan, M., Shiner, A. C., & Plotnikova, E. G.** (2008). Pseudomonas aeruginosa type IV pili and twitching motility. In J.-L. Ramos (Ed.), *Pseudomonas: Volume 5: A Model System in Biology* (pp. 71–98).
- **Azeem, M., Ul Haq, A., Ilyas, M., Ul Hamid, W., Burhan Hayat, M., Jamal, F., & Khan, M. I.** (2018). Bacteremia after micro-osteoperforation. *International Orthodontics*, **16**(3), 463–469. <https://doi.org/10.1016/j.ortho.2018.06.002>

### B

- **Bacame-Valenzuela, F. J., Pérez-García, J. A., Figueroa-Magallón, M. L., Espejel-Ayala, F., Ortiz-Frade, L. A., & Reyes-Vidal, Y.** (2020). Optimized Production of a Redox Metabolite (pyocyanin) by Pseudomonas aeruginosa NEJ01R Using a Maize By-Product. *Microorganisms*, **8**(10), 1559. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101559>
- **Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H., & Khedher, M.** (2011). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. *Annales de Biologie Clinique*, **69**(4), 393–403.
- **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**(6), 341–348.
- **Bhatwalkar, S. B., Mondal, R., Krishna, S. B. N., Adam, J. K., Govender, P., & Anupam, R.** (2021). Antibacterial properties of organosulfur compounds of garlic (*Allium sativum*). *Frontiers in Microbiology*, **12**, 613077.
- **BioMérieux.** (2006). API® 20NE – Analytical Profile Index system for Gram-negative non-Enterobacteriaceae. In *Manual and Automated Instrumentation for Identification of Enterobacteriaceae and Other Aerobic Gram-Negative Bacilli* (Chap. API 20NE). National Center for Biotechnology Information (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/>

## Références Bibliographiques

---

- **Biyiti, L. F., Meko, D. J. L., & Zollo, P. H. A.** (2004). Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharmacologie et Médecine Traditionnelle en Afrique*, *13*, 11–20.
- **Botelho, J., Grosso, F., & Peixe, L.** (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resistance Updates*, *44*, 100640. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2019.07.002>
- **Briard, B., Fontaine, T., Carre, G., Biguenet, S., Lamoureux, F., Daudé, D., et al.** (2024). Convergent evolution in toxin detection and resistance provides evidence for conserved bacterial-fungal interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *121*(12), e2304382121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2304382121>
- **Burke, J. P.** (2003). Infection control — a problem for patient safety. *The New England Journal of Medicine*, *348*(7), 651–656.

## C

- **Cabrolier, N., Lafolie, J., Bertrand, X.** (2014). Épidémiologie et facteurs de risques des infections liées à *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal des Anti-Infectieux*, *16*(1), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2014.01.001>
- **Chadha, J., Harjai, K., & Chhibber, S.** (2022). Repurposing phytochemicals as anti-virulent agents to attenuate quorum sensing-regulated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Biotechnology*, *15*(6), 1695–1718. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13981>
- **Chaker, H.** (2012). *Régulation de l'adaptation de la bactérie Pseudomonas aeruginosa à son hôte : implication des métabolites du tryptophane* (Thèse de doctorat, Université de Grenoble).
- **Chen, X., Li, Y., & Wang, J.** (2023). Risk factors associated with nosocomial infections: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Hospital Infection*, *123*, 45–58.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** (2023). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—12th ed.* (CLSI document M07-A12).
- **Cole, S. J., Records, A. R., Orr, M. W., Linden, S. B., & Lee, V. T.** (2014). Catheter-associated urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by exopolysaccharide-independent biofilms. *Infection and Immunity*, *82*(5), 2048–2058.
- **Comolli, J. C., Waite, L. L., Mostov, K. E., & Engel, J. N.** (1999). Pili binding to asialo-GM1 on epithelial cells can mediate cytotoxicity or bacterial internalization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, *67*(7), 3207–3214.

## D

- **Davies, J., & Davies, D.** (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 417–433.
- **De Bentzmann, S., & Plésiat, P.** (2011). The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environmental Microbiology*, *13*(7), 1655–1665. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02469.x>
- **Denis F., Ploy M-C., Martin C., BinginÉ., et Quentin R.,** (2011). *Bactériologie médicale* édition Masson, Paris. 640p.
- **Deveau, A., & Hogan, D. A.** (2011). Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* in mixed-species biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(6), 990–1004.
- **Dia, N. M., Ka, R., Dieng, C., Diagne, R., Dia, M. L., Fortes, L., Diop, B. M., Sow, A. I., & Sow, P. S.** (2008). *Résultats de l'enquête de prévalence des infections nosocomiales au CHNU de Fann (Dakar, Sénégal) / Prevalence of nosocomial infections in a university hospital (Dakar, Senegal)*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *38*(5), 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2007.11.001>
- **Djibaoui, D., & Bensoltane, A.** (2005). Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, *4*(7), 697–702. <https://doi.org/10.5897/ajb2005.000-3129>
- **Ducel, G., Fabry, J., & Nicolle, L.** (2002). *Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide* (2nd ed.). World Health Organization. <http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/en/whocdscsreph200212.pdf?ua=1>
- **Dyar, O. J., Tebano, G., & Pulcini, C.** (2017). *Managing responsible antimicrobial use: perspectives across the healthcare system*. *Clinical Microbiology and Infection*, *23*(7), 441–447.

## E

- **El-Shouny, W. A., Al-Baidani, A. R. H., & Hamza, W. T.** (2011). Antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wound infections. *International Journal of Pharmacy and Medical Sciences*, *1*(1), 1–7.

## Références Bibliographiques

---

- El-Malhany, H. A., El-Nasser, S. A. M., & Awad, M. A. (2024). Extraction and characterization of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*: solvent properties and UV–Vis analysis. *Microbial Cell Factories*, 23, 45. <https://doi.org/10.1186/s12934-024-02438-6>
- Elmeskini, M. K. (2011). *Étude épidémiologique des infections à Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Mohammed V, Faculté de Médecine et de Pharmacie – Rabat.
- Espinel-Ingroff, A., Kerkering, T. M., Goldson, P. R., & Shadomy, S. (1991). Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(6), 1089–1094. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.6.1089-1094>
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., & Crawford, I. P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 884–900. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.884-900.1990>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2022). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2021 – 2022 data*.

## F

- Filloux, A., & Vallet, I. (2003). *Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne*. *Médecine / Sciences*, 19(1), 77–83.
- Fournel, L. (2017). *Les infections du site opératoire*. *Revue Francophone de Cicatrisation*, 1, 27–30. [https://doi.org/10.1016/S2468-9114\(17\)30345-6](https://doi.org/10.1016/S2468-9114(17)30345-6)
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>

## G

- Gachot, B., & Coriat, P. (2019). Le risque médico-légal des infections nosocomiales. *Médecine & Droit*, (137–141). <https://doi.org/10.1016/j.meddro.2019.04.001>
- Garner J. S. (1996). Guideline for isolation precautions in hospitals. The Hospital Infection Control Practices Advisory Committee. *Infection control and hospital epidemiology*, 17(1), 53–80. <https://doi.org/10.1086/647190>
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa: New insights into pathogenesis and host defenses*. *Pathogens and Disease*, 67(3), 263–271. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>

## H

- Habbal, O. A., Al-Jabri, A. A., El-Hag, A. H., Al-Mahrooqi, Z. H., & Al-Hashmi, N. A. (2005). In vitro antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* Linn (henna): A pilot study on the Omani henna. *Saudi Medical Journal*, 26(1), 69–72.
- Hafezi, A., & Khamar, Z. (2024). The method and analysis of some biochemical tests commonly used for microbial identification: a review. *Comprehensive Health and Biomedical Studies*, 3(2), e160199. <https://doi.org/10.5812/chbs-160199>
- Haidar, A., Muazzam, A., Nadeem, A., Atique, R., Saeed, H. A., Naveed, A., Sharif, J., Perveen, A., Fatima, H. R., & Samad, A. (2024). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Microbe*, 3, 100078.
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D., & Grant, G. D. (2016). Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel)*, 8(8), 236. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>
- Hamza, R. (2010). *Epidémiologie Des Infections Associées Aux Soins*. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*. 1 Revue Tunisienne d'Infectiologi, Vol.4 : 1 – 4
- Hasan, S. & Ansari, M. I. (2015). *Major bioactive metabolites from marine fungi: A review*. *Bioinformation*, 11(4), 176–181.
- Haute Autorité de Santé (HAS). (2019). *Prévention des infections associées aux soins : hygiène des mains*.
- Holmes, C. L., Anderson, M. T., Mobley, H. L. T., & Bachman, M. A. (2021). *Pathogenesis of Gram-negative bacteremia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(2), e00234-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00234-20>
- Hooper D. C. (2000). Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 31 Suppl 2, S24–S28. <https://doi.org/10.1086/314056>
- Hu, M., & Chua, S. L. (2025). Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Current challenges and emerging alternative therapies. *Microorganisms*, 13(4), 913.

## Références Bibliographiques

- **Hussaini, M. I., Ahmed, H. S., Ahmad, H., Sulaiman, M. A., & Usman, A.** (2023). Preliminary screening for antibacterial activity of endophytic fungi isolated from *Azadirachta indica* and *Mentha piperita* against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Algerian Journal of Biosciences*, *3*(2), 56–60.

/

- **Idris, A. H., Haruna, Z., Iliyasu, M. Y., Sahal, M. R., Inusa, T., Salisu, A., Isma'il, S., Umar, R. D., Kabeer, Z. M., Tahir, H., Musa, H. S., & Umar, A. F.** (2023). *Antibacterial activity of Lawsonia inermis leaf extracts against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa from infected wounds*. *European Journal of Medicinal Plants*, *34*(4), 1–8. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2023/v34i41130>

J

- **Jacobs, M. R., Good, C. E., & Bajaksouzian, S.** (2003). Resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and clinical impact. *Drugs*, *63*(4), 331–338.
- **Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., & Dharmaraj, S.** (2013). Pyocyanin: Production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(4), 1159–1168.
- **Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S.** (2021). *Pseudomonas aeruginosa* : An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal Of Molecular Sciences*, *22*(6), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>

K

- **Kaye, K. S., Pogue, J. M., Tran, T. B., Nation, R. L., & Li, J.** (2021). Clinical implications of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical Infectious Diseases*, *72*(4), 735–742.
- **Kessler, E., Safrin, M., Olson, J. C., & Ohman, D. E.** (1993). *Secreted LasA of Pseudomonas aeruginosa is a staphylolytic protease*. *Journal of Biological Chemistry*, *268* (10). 7503–7508.
- **Khalid, A., Yasir, M., Rehman, M. U., Ahmed, R., Khan, M., Akram, M., & others.** (2023). Enhanced production of pyocyanin in co-culture of *Pseudomonas aeruginosa* and filamentous fungi. *Journal of Applied Microbiology*, *135*(1), 19–27. <https://doi.org/10.1111/jam.15872>
- **Khan, H. A., Ahmad, A., & Mehboob, R.** (2015). *Nosocomial infections and their control strategies*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *5*(7), 509–514.
- **Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R.** (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *7*(5), 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>
- **Kirby, J. P., & Mazuski, J. E.** (2009). *Prevention of surgical site infection*. *Surgical Clinics of North America*, *89*(2), 365–389. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2009.01.001>
- **Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J.** (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(6), 423–435.
- **Kong, C., Neoh, H.-m., & Nathan, S.** (2016). *Targeting Staphylococcus aureus toxins: A potential form of anti-virulence therapy*. *Toxins*, *8*(3), 72.

L

- **Lattab, A.** (2018). Effet des composés naturels sur l'adhérence et la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat, Université de Mostaganem. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem. Algérie. p 215.
- **Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F.** (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in molecular medicine*, *10*(12), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>
- **Lazrak, M. A., El Bardai, G., Jaafour, S., Kabbali, N., Arrayhani, M., & Houssaini, T. S.** (2014). Profil de l'infection urinaire nosocomiale dans un service de néphrologie [Profile of nosocomial urinary tract infection in a nephrology ward]. *The Pan African medical journal*, *19*, 59. <https://doi.org/10.11604/pamj.2014.19.59.4835>
- **Le Berre, R., Faure, K., Nguyen, S., Pierre, M., Ader, F., & Guery, B.** (2006). *Quorum sensing: une nouvelle cible thérapeutique pour Pseudomonas aeruginosa*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *36*(3), 349–357.
- **Lee, S. M., Kim, J. M., Jeong, J., Park, Y. K., Bai, G. H., Lee, E. Y., Lee, M. K., & Chang, C. L.** (2007). Evaluation of the broth microdilution method using 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride for rapidly growing mycobacteria susceptibility testing. *Journal of Korean medical science*, *22*(5), 784–790. <https://doi.org/10.3346/jkms.2007.22.5.784>

## Références Bibliographiques

---

- **Lemaoui, C., Layaida, H., Badi, A., & Foudi, N.** (2017). Stratégies actuelles de lutte contre la résistance aux antibiotiques. *Journal des Anti-infectieux*, **19**(1), 12-19. <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2017.01.003>
- **Levy SB, Marshall B** (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**: 122-129.
- **Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D.** (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*, **22**(4), 582–610.

## M

- **Magryś, A., Olender, A., & Tchórzewska, D.** (2021). Antibacterial properties of *Allium sativum* L. against the most emerging multidrug-resistant bacteria and its synergy with antibiotics. *Archives of microbiology*, **203**(5), 2257–2268. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02248-z>
- **McDonald, L. C., Gerding, D. N., Johnson, S., Bakken, J. S., Carroll, K. C., Coffin, S. E., ... & Wilcox, M. H.** (2018). Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA). *Clinical Infectious Diseases*, **66**(7), 987–994.. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1085>
- **Mermel, L. A., Allon, M., Bouza, E., Craven, D. E., Flynn, P., O'Grady, N. P., Raad, I. I., Rijnders, B. J., Sherertz, R. J., & Warren, D. K.** (2009). Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, **49**(1), 1–45. <https://doi.org/10.1086/599376>
- **Misery, L.** (2019). Les antibiotiques sont dans la nature ! *Dermato Mag*, **7**(4), 302–303. doi:10.1684/dm.2019.212
- **Mombeshora, M., & Mukanganyama, S.** (2019). Antibacterial activities, proposed mode of action and cytotoxicity of leaf extracts from *Triumfetta welwitschii* against *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC complementary and alternative medicine*, **19**(1), 315. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2713-3>
- **Moreira, M., Ponce, A., Del Valle, C. and Roura, S.** (2005) Inhibitory Parameters of Essential Oils to Reduce a Foodborne Pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, **38**, 565-570. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.012>
- **Mowat, E., Rajendran, R., Williams, C., McCulloch, E., Jones, B., Lang, S., & Ramage, G.** (2010). *Pseudomonas aeruginosa* and their small diffusible extracellular molecules inhibit *Aspergillus fumigatus* biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, **313**(2), 96–102.
- **Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K.** (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial Ecology*, **68**(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0369-9>

## N

- **Nail S., Akers M.** (2002). Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals. New York, NY, USA : Kluwer Academic / Plenum Publishers. p 82.
- **Nazik, H., Sass, G., Ansari, S. R., Ertekin, R., Haas, H., Déziel, E., & Stevens, D. A.** (2020). Novel intermicrobial molecular interaction: *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal (PQS) modulates *Aspergillus fumigatus* response to iron. *Microbiology (Reading)*, **166**(1), 44–55.
- **Nikaido, H.** (2009). Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, **78**, 119–146.

## O

- **O'Brien, S., & Fothergill, J. L.** (2017). Adaptive antifungal response in *Pseudomonas aeruginosa* ATCC strains vs clinical isolates: Role of genetic regulation, biosynthetic capacity, and fungal metabolite inhibition. *FEMS Microbiology Letters*, **364**(15), fnx128. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx128>
- **O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M., & Britigan, B. E.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, **287**(1), L94–L103.
- **Obuotor, T.M. ; Adeoti, A.A. ; Shittu, O.B. ; Akinhanmi, T.F. and Kolawole, A.O.** (2021). Antibacterial Activity of Lawsonia Inermis Leaf Extracts on Multidrug Resistant *Pseudomonas* Sp. Implicated in Upper Respiratory Tract Infection. *JoST*. **11**(2): 111-122
- **Ogunтоми, A. S., Adetokunboh, O. O., Mutai, K. K., Yusuf, F. M., & Balogun, M. S.** (2025). The burden and predictors of hospital-acquired infection in intensive care units across Sub-Saharan Africa: Systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, **25**(1), 634. <https://doi.org/10.1186/s12879-025-09450-w>

## Références Bibliographiques

---

- **Oulymata, G.** (2007). *Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à Gram négatif*. Thèse de doctorat, Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

## P

- **Pagliari MM, Anniballi F, Fiore A, et al.** (2021). Preliminary Test-Microdilution in Broth. *Antibiotics (Basel)*, **11**(12):1809. doi:10.3390/antibiotics11121809
- **Patrick, B., Jean-Louis, G., & Michel, S.** (1989). *Bactériologie : Les bactéries des infections humaines, de la biologie à la clinique* (2e éd., Paris : Flammarion. pp. 233–235).
- **Pittet, D., Allegranzi, B., Boyce, J., & WHO Global Patient Safety Challenge, World Alliance for Patient Safety.** (2009). The World Health Organization guidelines on hand hygiene in health care and their consensus recommendations. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, **30**(7), 611–622. <https://doi.org/10.1086/600379>
- **Poole, K.** (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, **10**(1), 12–26.
- **Poole, K.** (2005). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, **37**(3), 162–176.
- **Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M** (2020) *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (Édition 7, illustrée) Éditeur Jones & Bartlett Learning,. ISBN1284322378, 9781284322378

## R

- **Rossi, E., La Rosa, R., Bartell, J. A., Marvig, R. L., Haagenen, J. A. J., Sommer, L. M., Molin, S., & Johansen, H. K.** (2021). *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nature reviews. Microbiology*, **19**(5), 331–342. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00477-5>

## S

- **Salem, S. H., El-Maraghy, S. S., Abdel-Mallek, A. Y., & El-Sayed, M. A.** (2022). The antimicrobial, antibiofilm, and wound healing properties of ethyl acetate crude extract of an endophytic fungus *Paecilomyces* sp. (AUMC 15510) in earthworm model. *Scientific Reports*, **12**, 19239. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23831-4>
- **Sanogo, Y., Guessennd, N., Tra Bi, H. F., Kouadio, N. J., Konan, F., Bamba, M., Danho, N., Bakayoko, A., Yao, K., & Dosso, M.** (2016). Evaluation in vitro de l'activité des écorces de tige de *Anogeissus leiocarpus* (DC) Guill. et Perr. (Combretaceae) sur des bactéries responsables de maladies courantes en Afrique et criblage phytochimique. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **10**(3), 1139–1152. <https://doi.org/10.4314/IJBCS.V10I3.19>
- **Santé publique France (SPF).** (2021). Infections associées aux soins (IAS) et infections nosocomiales – Définitions. Santé publique France. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/infections-associees-aux-soins>
- **Sartelli, M., Marini, C. P., McNelis, J., Coccolini, F., Rizzo, C., Labricciosa, F. M., & Petrone, P.** (2024). Preventing and Controlling Healthcare-Associated Infections: The First Principle of Every Antimicrobial Stewardship Program in Hospital Settings. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, **13**(9), 896. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090896>
- **Schwartz, B., Klammer, K., Zimmerman, J., Kale-Pradhan, P. B., & Bhargava, A.** (2024). Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in clinical settings: A review of resistance mechanisms and treatment strategies. *Pathogens*, **13**(11), 975. <https://doi.org/10.3390/pathogens13110975>
- **Shady, N. H., Sobhy, S. K., Mostafa, Y. A., Yahia, R., Glaeser, S. P., Kämpfer, P., El-Katatny, M. H., & Abdelmohsen, U. R.** (2023). Phytochemical analysis and anti-infective potential of fungal endophytes isolated from *Nigella sativa* seeds. *BMC microbiology*, **23**(1), 343. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03085-4>
- **Shariati, A., Noei, M., Askarinia, M., Khoshbayan, A., Farahani, A., & Chegini, Z.** (2024). *Inhibitory effect of natural compounds on quorum sensing system in Pseudomonas aeruginosa: A helpful promise for managing biofilm community*. *Frontiers in Pharmacology*, **15**, Article 1350391. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1350391>
- **Sharma A, Rathore M, Sharma N, Kumari J, Sharma K.** (2008). Phytochemical Evaluation of *Eucalyptus Citriodora* Hook. and *Lawsonia Inermis* Linn. *Biosci Biotechnol Res Asia*; **6**(2). Available from: <https://www.biotech-asia.org/?p=20125>
- **Sharma, P., Singh, B., & Sharma, N. K.** (2022). Association of multidrug resistance behavior of clinical *Pseudomonas aeruginosa* to pigment coloration. *European Journal of Medical Research*, **27**, 95. <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00752-6>

## Références Bibliographiques

- Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., & Chiarello, L. (2007). Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. 2007 guideline for isolation precautions: Preventing transmission of infectious agents in healthcare settings. *American Journal of Infection Control*, *35*(10 Suppl 2), S65–S164.
- Silby, M. W., Winstanley, C., Godfrey, S. A. C., Levy, S. B., & Jackson, R. W. (2011). Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology*, *12*(5), R51.
- Singh, S. B., & Barrett, J. F. (2006). Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*, *71*(7), 1006–1015.
- Sini A, Bindu TK, Raphael VP, Shaju KS, Sebastian S. (2024). Growth inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by methanol extract of *Bridelia stipularis* and identification of active components using in silico studies. *Future J Pharm Sci*. 1;10:96. doi:10.1186/s43094-024-00668-4
- Smith, R. S., & Iglewski, B. H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(1), 56–60.
- Smith, R., & Coast, J. (2019). The economic burden of antimicrobial resistance: Why it is more serious than current studies suggest. *Applied Health Economics and Health Policy*, *17*(3), 335–337.
- Solbi S. (2013). Effet du repiquage de *Pseudomonas aeruginosa* sur les caractères morphologiques, biochimiques et sensibilité aux ATB. Thèse pour le diplôme d'État de Docteur en Pharmacie: pharmacie .Rabat : Université Mohammed 5 –souissi- . p6-11-12-13.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., ... & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, *406*(6799), 959–964.

T

- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., Ouellette, M., Outtersson, K., Patel, J., Cavalieri, M., Cox, E. M., Houchens, C. R., Grayson, M. L., Hansen, P., Singh, N., & Magrini, N. (2022). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *The Lancet Infectious Diseases*, *22*(2), e52–e57.
- Tarekegn, H., Abate, M., Getachew, M., & Adane, T. (2024). Prevalence, risk factors, and antimicrobial resistance of endemic healthcare-associated infections in Africa: A systematic review and meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*, *24*(1), 158.
- Triveni, A. G., Mendem Suresh Kumar, Shivannavar, C. T., & Gaddad, S. M. (2016). Antibacterial and antibiofilm activities of crude extracts of *Lawsonia inermis* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, *9*(6), 263–265.
- Tumbarello, M., Trecarichi, E. M., De Rosa, F. G., Giannella, M., Giacobbe, D. R., Bassetti, M., Losito, A. R., Bartoletti, M., Tumietto, F., Righi, E., Spanu, T., Marchese, A., & Viale, P. (2019). Impact of antimicrobial resistance on outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *38*(8), 1439–1447.

V

- Valle Ortiz, D. J., Aguila Muñoz, D. G., Cruz López, M. d. C., Cortés Espinosa, D. V., Rosales Castro, M., & Jiménez Montejo, F. E. (2025). Comparison of secondary metabolite extraction methods in *Hamelia patens* Jacq. and their inhibitory effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Metabolites*, *15*(1), 23.
- Verdial, C., Serrano, I., Tavares, L., Gil, S., & Oliveira, M. (2023). Mechanisms of antibiotic and biocide resistance that contribute to *Pseudomonas aeruginosa* persistence in the hospital environment. *Biomedicines*, *11*(4), 1221.
- Vincent, J.-L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., & Reinhart, K. (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, *302*(21), 2323–2329.

W

- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(17), 6278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
- Wei, Q., Tarighi, S., Dötsch, A., Häussler, S., Müsken, M., Wright, V. J., Cámara, M., Williams, P., Haenen, S., Boerjan, B., Bogaerts, A., Vierstraete, E., Verleyen, P., Schoofs, L., Willaert, R., De Groot, V. N., Michiels, J., Vercammen, K., Crabbé, A., & Cornelis, P. (2011). Phenotypic and genome-wide analysis of an antibiotic-resistant

## Références Bibliographiques

---

small colony variant (SCV) of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS one, 6(12), e29276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029276>

- **Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., & Brinkman, F. S. L.** (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* Genome Database. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D646–D653.
- **World Health Organization (WHO).** (2004). *Infection prevention and control of epidemic- and pandemic-prone acute respiratory infections in health care*. World Health Organization.
- **World Health Organization (WHO).** (2005). Antibiotic susceptibility testing by disk diffusion. In *Global Salmonella Surveillance* (Vol. 2) (p. 15). WHO Press.
- **World Health Organization (WHO).** (2023). *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2023*.

γ

- **Yadav, S., Trivedi, N. A., & Bhatt, J. D.** (2015). Antimicrobial activity of fresh garlic juice: An in vitro study. *Ayu*, 36(2), 203–207. <https://doi.org/10.4103/0974-8520.175548>

# **Annexes**

# Annexe 1

KING A. 55274

MILIEU DE DIFFERENCIATION DE *PSEUDOMONAS*

**BIO-RAD**

**IVD**

## 1- APPLICATION

Le milieu de King A permet la détection de la synthèse de pyocyanine, pigment élaboré spécifiquement par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique). Utilisé en parallèle avec le milieu de King B (détection de la pyoverdine), il permet d'orienter l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2- PRINCIPE

La production de pyocyanine se manifeste en colorant le milieu de culture en bleu. Si les deux pigments – pyocyanine et pyoverdine - sont synthétisés en même temps, le milieu se colore en vert.

## 3- PRESENTATION

- Milieu prêt à l'emploi : 25 tubes de 7 ml

de 55274

co

## 4- COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)

Le milieu King A est préparé selon la formule théorique décrite par King, Ward et Raney (1).

Peptone	20
Agar purifié	12
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anhydre)	10
MgCl <sub>2</sub> (anhydre)	1,4

## 5- CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi : à + 2 - 8°C.  
La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

## 6- UTILISATION

Matériel :

- Matériel fourni : milieu King A

Ensemencement :

Ensemencer en faisant une strie médiane à la surface de la gélose avec une öse de culture pure et fraîche prise dans un bouillon ou sur un milieu gélosé. Replacer la capsule sans la revisser.

Incubation :

Incuber pendant 24 à 48 heures à 30°C. Au-delà, l'incubation à l'étuve est inutile, mais il est possible de conserver les cultures à température ambiante (18-30°C).

Lecture :

Une synthèse de pyocyanine se traduit par une coloration bleue. Une synthèse de pyoverdine et de pyocyanine associée provoque une coloration verte. En cas de doute, il suffit de verser 0,5 ml de chloroforme et de le laisser pendant quelques minutes au contact de la gélose en position inclinée :

la pyocyanine, très soluble dans le chloroforme, colore celui-ci en bleu (virage au rouge en ajoutant quelques gouttes d'un acide fort). Le milieu n'a pas besoin d'être examiné au-delà du 4e jour de culture.

## 7- PERFORMANCES / CONTRÔLE QUALITE DU TEST

- Aspect du milieu prêt à l'emploi : gélose limpide ambree.
- Les performances culturales du milieu King A sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :
- 
- 
- 

	ON EN 24 - 48 H À 30°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Bleue - verte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Bleue - verte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 17934	Bleue - verte
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69.13	Incolore

## 8- CONTRÔLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

## 9- LIMITES D'UTILISATION

- La formation de colonies non pigmentées ne peut pas totalement éliminer la possibilité d'un *Pseudomonas aeruginosa*.
- Il est indispensable de procéder à partir de cultures pures et fraîches pour que les résultats puissent être interprétés.
- Il est nécessaire de faire des tests complémentaires pour une identification d'espèce précise.
- Du fait de leurs exigences nutritionnelles, certains micro-organismes peuvent ne pas se développer sur ce milieu.

## 10- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. KING E.O., WARD M. et RANEY D.E.J., J. Lab. Clin. Méd., 1954, 44, p. 301

Bio-Rad

3, boulevard Raymond  
Poincaré 92430  
Marnes-la-Coquette  
France

Tel.: +33 (0) 1 47 95 60 00



# KING B. 55278

## MILIEU DE DIFFÉRENCIATION DES *PSEUDOMONAS*

**IVD**

### 1- APPLICATION

Le milieu de King B permet la détection de la synthèse de pyoverdine, pigment élaboré par *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres *Pseudomonas*. Utilisé en parallèle avec le milieu de King A (détection de la pyocyanine), Il permet d'orienter l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*.

### 2- PRINCIPE

La présence de sulfate de magnésium fournit les cations nécessaires à l'activation de la pyoverdine qui se manifeste en colorant le milieu de culture en vert-jaune fluorescent. La présence de phosphate permet d'inhiber la production de pyocyanine, pigment spécifique de *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3- PRESENTATION

- Milieu prêt à l'emploi  
25 tubes de 7 ml code 55278

### 4- COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)

La gélose King B est préparée selon la formule théorique décrite par King, Ward et Raney (1).

Peptone	20
Agar purifié	12
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydre)	1,5
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O (anhydre)	1,5

### 5- CONSERVATION

- Milieu prêt à l'emploi : à + 2 - 8°C.
- La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

### 6- UTILISATION

Matériel :

- Matériel fourni : milieu King B

Ensemencement :

Ensemencer en faisant une strie médiane à la surface de la gélose avec une ose de culture pure et fraîche prise dans un bouillon ou sur un milieu gélosé. Replacer la capsule sans la revisser.

Incubation :

Incuber pendant 24 à 48 heures à 30°C. Au-delà, l'incubation à l'échelle est inutile, mais il est possible de conserver les cultures à température ambiante (18-30°C).

Lecture - Interprétation :

Une synthèse de pyoverdine se traduit par une coloration verte fluorescente.

### 7- PERFORMANCES / CONTRÔLE QUALITE DU TEST

- Aspect du milieu prêt à l'emploi : gélose limpide ambrée.
- Les performances culturelles du milieu King B sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

SOUCHES	PIGMENTATION EN 24 - 48H À 30°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Jaune-verte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Jaune-verte
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 17934	Jaune-verte
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CIP 69.13	Jaune-verte faible

### 8- CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis. Chaque lot de produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptations. La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée par le fabricant.

### 9- LIMITES D'UTILISATION

- Certaines souches de *P. fluorescens* ou de *P. putida* (provenant en général de l'eau ou du sol) n'élaborent que lentement la pyoverdine. Il faut alors incuber le milieu à 20°C pendant 2 à 3 semaines. Certaines de ces souches peuvent être apigmentées.
- Du fait de leurs exigences nutritionnelles, certains micro-organismes peuvent ne pas se développer sur ce milieu.
- Il est indispensable de procéder à partir de cultures pures et fraîches pour que les résultats puissent être interprétés.
- Il est recommandé de faire des tests complémentaires pour une identification d'espèce de la souche isolée.

### 10- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. KING E.O., WARD M. et RANEY D.E.J., J. Lab. Clin. Méd., 1954, 44, p. 301.

Bio-Rad

3, boulevard Raymond  
Poincaré 92430 Marnes-  
la-Coquette France

Tel.: +33 (0) 1 47 95 60 00

Fax: +33 (0) 1 47 41 91 3308/2009



**BIO-RAD**

**MUELLER – HINTON**

56137 - 63824 - 63901 - 64884 -

64888 **MUELLER-HINTON + SANG DE MOUTON**

63825 -

63902 **MUELLER-HINTON + SANG DE CHEVAL +  $\beta$**

**NAD**

63524

MILIEU DE CULTURE POUR L'ETUDE DE LA SENSIBILITE AUX AGENTS ANTIMICROBIENS

**IVD**

**1- APPLICATION**

La gélose Mueller-Hinton est un milieu solide standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens par la méthode de diffusion ou de dilution en gélose.

**2- PRINCIPE**

La standardisation du milieu de Mueller-Hinton est nécessaire pour obtenir des résultats fiables au niveau de l'antibiogramme. Celle-ci concerne la composition du milieu avec des concentrations limites de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  et  $\text{ZnCl}_2$ . En effet, il est reconnu que des variations dans les concentrations de cations  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  affectent les résultats obtenus (diamètres et concentrations minimales inhibitrices ou C.M.I.) sur les *Pseudomonas aeruginosa* avec les aminosides et sur les staphylocoques avec la tétracycline<sup>(3, 4, 5, 6)</sup>.

De plus, la faible teneur en thymidine diminue les phénomènes de repousse autour des disques de triméthoprim-sulfamides et de triméthoprim seul.

**3- COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)\***

Le milieu Mueller-Hinton avec ou sans addition de sang de mouton ou de cheval est préparé selon la formule décrite par W.H.O.<sup>(1, 2)</sup>.

Peptones	3,0
Hydrolysate de caséine	17,5
Agar	15
$\text{Ca}^{2+}$	20 - 25 mg/L
$\text{Mg}^{2+}$	10 - 12,5 mg/L
pH final	7,4 $\pm$ 0,2
Suppléments : + 5% sang de mouton (pour le milieu MHB) ou 5% sang de cheval (pour le milieu MHF)	
$\beta$ -NAD (pour le milieu MHF)	20 mg/L

$\beta$ -NAD : Nicotinamide Adenine Dinucléotide

\* formule adaptée pour assurer les meilleures performances du milieu.

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

Mettre 35 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau fraîchement distillée. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.

Stériliser à l'autoclave à 121°C  $\pm$  1°C pendant 15 minutes. Répartir dans des tubes ou dans des flacons stériles.

Au moment de l'emploi, faire fondre le milieu au bain-marie bouillant et répartir en boîtes de Petri rondes l'intégralité du flacon ou des tubes. L'épaisseur de la couche de gélose doit être de 4 mm. Sécher les boîtes 30 min à 37°C. Le volume de Mueller-Hinton permettant d'obtenir exactement une épaisseur de 4 mm est de 25 ml pour une boîte de 90 mm, de 60 ml pour une boîte carrée de 120 mm, de 70 ml pour une boîte ronde de 150 mm.

Au moment de l'emploi (avant la répartition), il est possible d'ajouter :

- 5 % de sang de mouton ou de cheval pour le milieu Mueller-Hinton au sang,
- 5 % de chlorure de sodium (NaCl) pour le milieu Mueller-Hinton hypersalé.

**4- CONSERVATION**

- Milieu prêt à l'emploi : à +2-20°C
- Milieu prêt à l'emploi (à répartir) : à +2-25°C
- Milieu au sang prêt à l'emploi : à +2-8°C
  - Milieu déshydraté : flacon soigneusement fermé dans un endroit sec à +15-25°C. La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

**BIO-RAD**

**SABOURAUD AGAR**

56519 - 56524 -

64494

**GÉLOSE / MILIEU D'ISOLEMENT DES CHAMPIGNONS**

IVD

**1- APPLICATION**

La gélose Sabouraud (Sabouraud Agar) est utilisée pour l'isolement et la culture des champignons. Cette gélose est recommandée pour :

- L'isolement des champignons à partir de prélèvements biologiques ne contenant pas de flore bactérienne associée. Dans le cas de prélèvements présentant une flore polymicrobienne (fongique et bactérienne), il est préférable d'utiliser les milieux :
- Sabouraud + chloramphénicol
- Sabouraud + gentamycine
- La culture des champignons en vue de leur identification.
- Les contrôles de stérilité des produits pharmaceutiques (milieu recommandé par le Codex de la Pharmacopée Française) ou alimentaires. Dans ce dernier cas, il faut laisser les tubes à l'étuve ou à la température du laboratoire pendant 15 jours .

Ce milieu peut également servir de base pour la préparation de milieux enrichis : milieux au sang, milieux vitaminés...

**2- PRINCIPE**

La gélose de Sabouraud, en apportant les éléments indispensables à leur développement (peptones et glucose), favorise la croissance des champignons.

**3- PRÉSENTATION**

- Milieu prêt à l'emploi (à répartir)
- 6 flacons de 100 ml (**SAB**) code 56519
- 25 tubes inclinés de 8 ml code 56524
- Milieu déshydraté
- flacon de 500 g code 64494

Cette gélose est préparée selon la formule théorique du milieu C de la Pharmacopée Européenne (1).

**4- COMPOSITION THÉORIQUE (en g/l d'eau distillée)**

Agar	15
------	----

Préparation du milieu :

Homogénéiser la poudre contenue dans le flacon.

Mettre **42 grammes** de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée stérile. Attendre 5 minutes puis mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Chauffer lentement en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Ajuster si nécessaire le pH à 5,8. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes, répartir en tubes ou en boîtes de Petri.

- Milieu prêt à l'emploi (à répartir) : à + 2 - 8°C.

**5- CONSERVATION**

Le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.

- Milieu déshydraté : flacon soigneusement fermé dans un endroit sec à +15-25°C. La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur le conditionnement.



## BOUILLON LB, FORMULATION LURIA

### PRINCIPE

Le bouillon LB est recommandé en microbiologie moléculaire pour la culture de *Bacillus subtilis*, *Daptobacter* et des souches recombinantes d'*Escherichia coli*. La tryptone et l'extrait de levure apportent les nutriments et cofacteurs utiles à une excellente croissance des souches recombinantes d'*Escherichia coli*. Le chlorure de sodium est présent au vingtième par rapport à la formulation Miller. Cela permet au laboratoire d'ajuster précisément la concentration de sel en fonction de la souche étudiée.

### FORMULE

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Tryptone	10,00
Extrait de levure	5,00
Chlorure de sodium	0,50 pH final à 25°C : 7,0 □ 0,2

### CONSERVATION

Le milieu en flacons se conserve entre 2 et 8°C jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'emballage.

### UTILISATION

Se conformer aux protocoles en vigueur.

La croissance se caractérise par la turbidité du milieu.

### CONTROLE DE QUALITE

	Souche ATCC®	Croissance en 18-24 heures à 35-37°C
<i>Escherichia coli</i>	33526	Bonne à excellente

### BIBLIOGRAPHIE

1. Lennox, E.S. 1955 Transduction of linked genetic character of the host bacteriophage P1. *Virology*. 1:190-206.
2. Luria, S.E. and J.W. Burrous. 1955. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *Journal of Bacteriology*. 74:451-476
3. Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

### PRESENTATION

Code	Description
31261	10 flacons 100 ml
80261	500 g
	Autre présentation : nous consulter

Distribué par :

Z.A de Gesvrine - 4 rue Képler - B.P.4125  
44241 La Chapelle-sur-Erdre Cedex - France  
t. : +33 (0)2 40 93 53 53 | f. : +33 (0)2 40 93 41 00  
commercial@humeau.com



w w w . h u m e a u . c o m

# Annexe 2

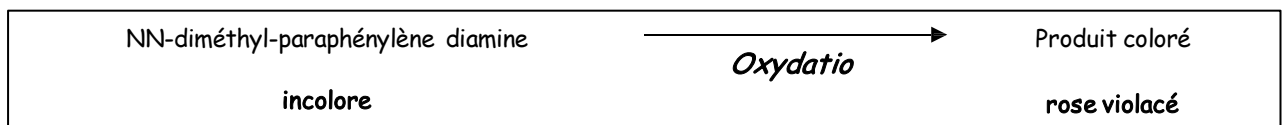
## Coloration de Gram

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Passer 3 fois la lame dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.
- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane (cristal violet) sur le frottis fixé.
- Laisser agir 1 minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.
- Jeter l'excès de colorant dans un bécher.
- Rincer très brièvement en faisant couler de l' $H_2O$  sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).
- Déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis. Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries.
- Laisser agir 1 minute.
- Jeter la solution de Lugol dans un bécher et rincer brièvement à l' $H_2O$  comme précédemment décrit.
- Décolorer en faisant couler la solution de décoloration sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes). La solution de décoloration contient un mélange d'alcool et d'acétone. Les pores de la paroi des Gram<sup>+</sup> sont fermés par la déhydratation à l'alcool. La paroi est alors imperméable et le colorant violet reste dans les bactéries. La membrane des Gram<sup>-</sup> est dissoute par le mélange alcool-acétone. La paroi plus mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration violette.
- Rincer à l' $H_2O$ .
- Contre-colorer en déposant la solution de safranine (rose) pendant 1 minute. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram<sup>-</sup> décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram<sup>+</sup>.
- Rincer à l' $H_2O$ .
- Laisser sécher à l'air.
- Observez les résultats de la procédure de coloration sous immersion dans l'huile. Examiner au microscope, objectif x100

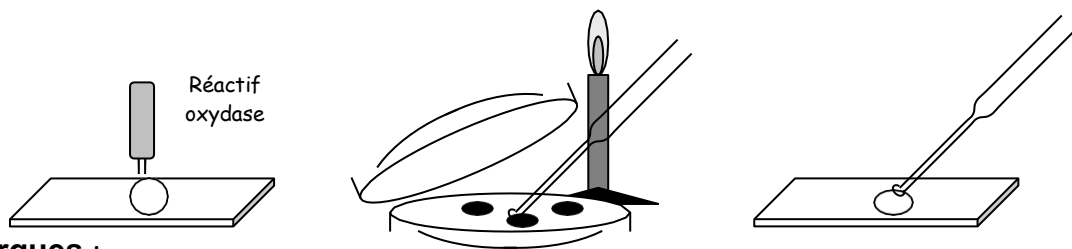
COLMAR

## Test de l'oxydase

**Principe :** Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.



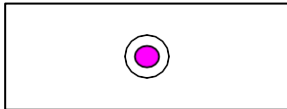
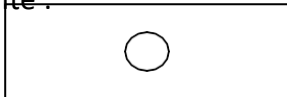
- placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une **pince flambée**,
- déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné,
- avec **une pipette Pasteur** prélever une colonie sur milieu solide (GO) et la déposer doucement sur le disque



### Remarques :

- Ne pas utiliser l'anse métallique pour prélever les bactéries. En effet, le métal peut être recouvert d'un oxyde et donner un résultat faussement positif.
- Le milieu solide ne doit pas contenir d'indicateur de pH, ni de glucides
- Pas de lecture avant 30 secondes environ

### Lecture :

Tâche rose violette	Pas de tâche rose violette
La bactérie possède l'activité oxydase, elle La est dite : <div style="text-align: center; margin: 10px 0;">  </div> <b>Oxydase +</b>	bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite : <div style="text-align: center; margin: 10px 0;">  </div> <b>Oxydase -</b>

**REF 20050****API® 20 NE****BIOMÉRIEUX**

07615 - L - 2019-09

**EN****Rx only****IVD**

## INTENDED USE

API® 20 NE is a qualitative standardized system for the identification of non-fastidious, non-enteric Gram-negative rods (for example, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*). It uses miniaturized tests as well as a specially adapted database.

**Inoculation and reading of the strip are performed manually and the identification is obtained using an identification software.**

**The complete list of those organisms that it is possible to identify with this system is given in the Technical Brochure - Information for Identification Software.**

## PRINCIPLE

**The API® 20 NE strip consists of 20 microtubes containing dehydrated substrates. These microtubes are inoculated with a bacterial suspension that reconstitutes the media.**

**During incubation, metabolism produces color changes that are either spontaneous or revealed by the addition of reagents.**

**The assimilation tests are inoculated with a minimal medium and the bacteria grow if they are capable of utilizing the corresponding substrate. The reactions are read according to the Reading Table and the identification is obtained using an identification software (ATB™ NEW or APIWEB™).**

## CONTENT OF THE KIT

**KIT FOR 25 TESTS**

- 25 API® 20 NE strips
- 25 ampules of API® AUX Medium
- 25 incubation boxes
- 25 result sheets
- 1 package insert provided in the kit or downloadable from [www.biomerieux.com/techlib](http://www.biomerieux.com/techlib).

## COMPOSITION

**Composition of the Strip**

**The composition of the strip is given in the Reading Table of this package insert.**

**Composition of the Media**

<b>API® AUX Medium</b> 7 mL	Ammonium sulphate	2 g
	Agar	1.5 g
	Vitamin solution	10.5 mL
	Trace elements	10 mL
	Monosodium phosphate	6.24 g
	Potassium chloride	1.5 g
	Demineralized water	to make 1000 mL
	Final pH: 7.0-7.2	

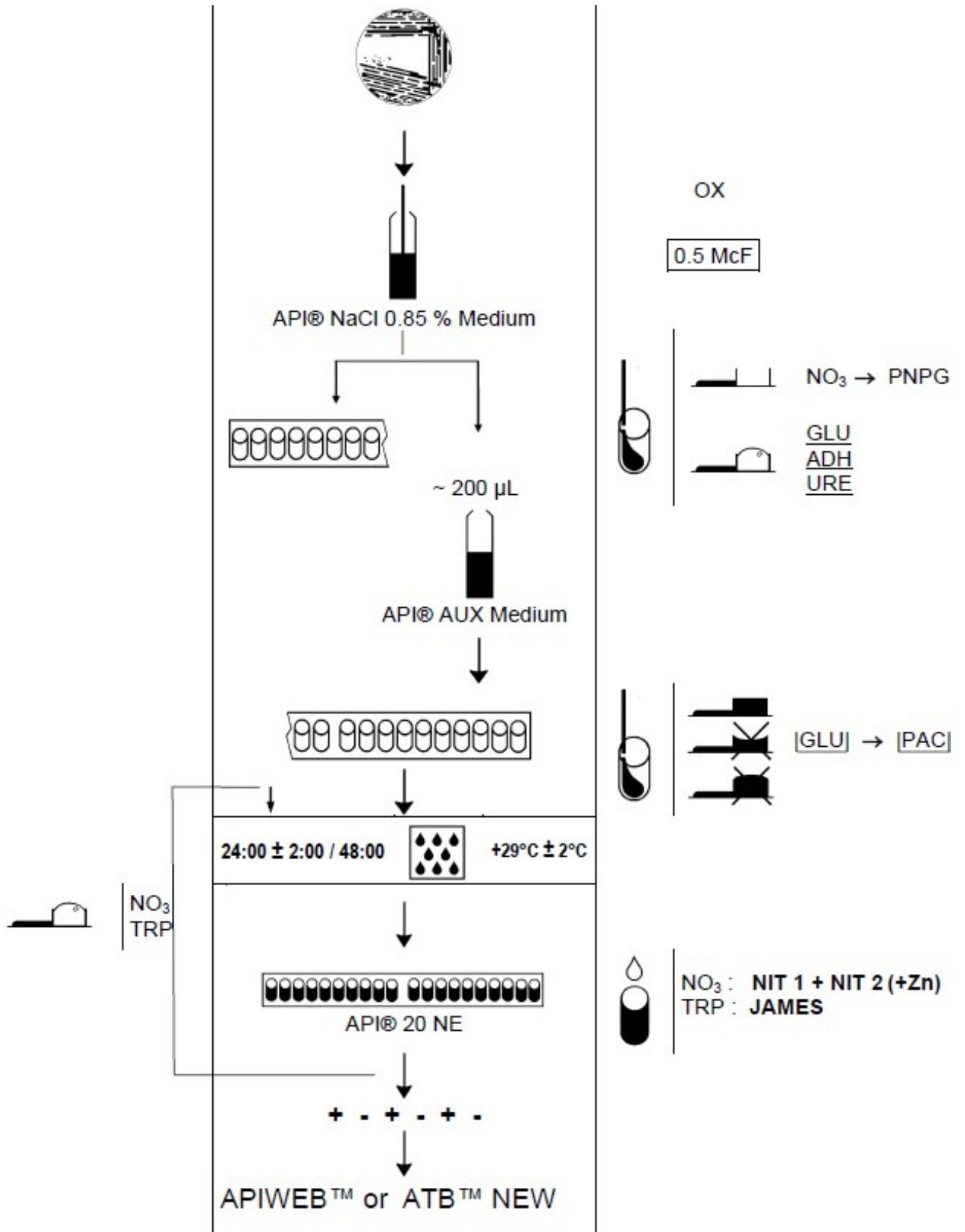
## REAGENTS AND MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

**Reagents**

- API® NaCl 0.85% Medium, 2 mL (Ref. 20070)
- Oxidase (Ref. 55635\*)
- \* **reference not sold in certain countries: use an equivalent reagent.**
- Mineral oil (Ref. 70100)
- McFarland Standard (Ref. 70900), No. 0.5 on the scale
- Reagents:

- † JAMES (Ref. 70542)
- † NIT 1 + NIT 2 (Ref. 70442)
- † Zn (Ref. 70380)

PROCEDURE



## READING TABLE

TESTS	ACTIVE INGREDIENTS	QUANTITY (mg/cupule)	REACTIONS/ ENZYMES	RESULTS	
				NEGATIVE	POSITIVE
NO <sub>3</sub>	Potassium nitrate	0.136	Reduction of nitrates to nitrites	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min</u> Colorless	Pink-red
			Reduction of nitrates to nitrogen	<u>Zn / 5 min</u> Pink	Colorless
TRP	L-Tryptophan	0.2	Indole production (tryptophan)	<u>JAMES/immediate</u> Colorless/Pale green/Yellow	Pink
<u>GLU</u>	D-Glucose	1.92	Fermentation (glucose)	Blue to green	Yellow
<u>ADH</u>	L-Arginine	1.92	Arginine dihydrolase	Yellow	Orange/Pink/Red
<u>URE</u>	Urea	0.76	Urease	Yellow	Orange/Pink/Red
ESC	Esculin	0.56	Hydrolysis (β-glucosidase) (esculin)	Yellow	Grey/Brown/Black
	Ferric citrate	0.072			
GEL	Casein (bovine origin)	0.6	Hydrolysis (protease) (gelatin)	No pigment diffusion	Diffusion of black pigment
PNPG	4-Nitrophenyl-βD-galactopyranoside	0.22	β-Galactosidase (para-nitrophenyl-βD-galactopyranosidase)	Colorless	Yellow
<u>GLU</u>	D-Glucose	1.56	Assimilation (glucose)	Transparent	Opaque
<u>ARA</u>	L-Arabinose	1.4	Assimilation (arabinose)	Transparent	Opaque
<u>MNE</u>	D-Mannose	1.4	Assimilation (mannose)	Transparent	Opaque
<u>MAN</u>	D-Mannitol	1.36	Assimilation (mannitol)	Transparent	Opaque
<u>NAG</u>	N-Acetylglucosamine	1.28	Assimilation (N-acetylglucosamine)	Transparent	Opaque
<u>MAL</u>	D-Maltose	1.4	Assimilation (maltose)	Transparent	Opaque
<u>GNT</u>	Potassium gluconate	1.84	Assimilation (potassium gluconate)	Transparent	Opaque
<u>CAP</u>	Capric acid	0.78	Assimilation (capric acid)	Transparent	Opaque
<u>ADI</u>	Adipic acid	1.12	Assimilation (adipic acid)	Transparent	Opaque
<u>MLT</u>	Malic acid	1.56	Assimilation (malate)	Transparent	Opaque
<u>CIT</u>	Trisodium citrate	2.28	Assimilation (trisodium citrate)	Transparent	Opaque
<u>PAC</u>	Phenylacetic acid	0.8	Assimilation (phenylacetic acid)	Transparent	Opaque
OX	See oxidase test package insert)	-	Cytochrome oxidase	(See oxidase test package insert)	

The quantities indicated may be adjusted depending on the titer of the raw materials used. Certain cupules contain products of animal origin, notably peptones.

## QUALITY CONTROL

The media, strips and reagents are systematically quality controlled at various stages of their manufacture.

# Annexe 3

## Site UPBM

lab.upbm.org

UPBM le Lab' Accueil Site de l'UPBM A propos du Lab' Contact Ressources 12

Retour Activer le mode pédagogique

Code api (optionnel) : Code api

api	ZONE	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARaA	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADJa	MLTa	CITa	PACa	OX
		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

api	ZONE	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARaA	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADJa	MLTa	CITa	PACa	OX
		<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

Vous n'avez pas encore saisi de caractère

© UPBM 2017-2025

api	ZONE	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARaA	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADJa	MLTa	CITa	PACa	OX

api	ZONE	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARaA	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADJa	MLTa	CITa	PACa	OX
		<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Calcul direct 1    Calcul avec exclusion(s) 24    Légende

Les calculs proposent (cliquez sur pour voir les détails du profil) :

1. ***Pseudomonas aeruginosa*** avec une probabilité de 99.2 % (excellente identification)

99.2%

Les taxons ayant une probabilité trop faible (< 5%) sont éliminés.

## Lecture de l'API 20NE de la souche de *P. aeruginosa* ATCC27853

api	ZONE	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARaA	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADJa	MLTa	CITa	PACa	OX

api	ZONE	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLUa	ARaA	MNEa	MANa	NAGa	MALa	GNTa	CAPa	ADJa	MLTa	CITa	PACa	OX
		<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Calcul direct 2    Calcul avec exclusion(s) 20    Légende

Les calculs proposent (cliquez sur pour voir les détails du profil) :

1. ***Pseudomonas aeruginosa*** avec une probabilité de 87.2 % (excellente identification)

87.2%

2. ***Pseudomonas fluorescens*** avec une probabilité de 12.8 % (mauvaise identification)

12.8%

Les taxons ayant une probabilité trop faible (< 5%) sont éliminés.

## Lecture de l'API 20NE de l'isolat de *P. aeruginosa* I<sub>1</sub>

**Valeurs de de l'absorbance de la pyocyanine par spectrophotométrie UV-visible**

<b>Microorganisme</b>	<b>Densité optique</b>		
	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>
<b>ATCC</b>	0.017	0.042	0,103
<b>ATCC + Aspergillus</b>	0.021	0.071	0,148
<b>I<sub>1</sub></b>	0.007	0.007	0.043
<b>I<sub>1</sub> + Aspergillus</b>	0.009	0.013	0.039

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس-مستغانم-  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

تصريح شرفي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية  
لإنجاز البحث

أنا الممضي أدناه،

الطالب(ة): .....عشاش هاجر.....

رقم التسجيل الجامعي:.....202037029886.....

الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم: ...407834359..... والصادرة بتاريخ:

.....22.11.2023.....

عن..... دائرة مستغانم.....

المسجل ب علوم الطبيعة و الحياة / قسم .....البيولوجيا.....

شعبة ..... العلوم البيولوجية..... / التخصص ..... ميكروبيولوجيا أساسية.....

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان: .....

.... « Lutte contre *Pseudomonas aeruginosa* responsable des infections nosocomiales » ....

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية و  
النزاهة الأكاديمية المطلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى  
المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ: ... 28 جوان 2025.....



إمضاء المعني

\* ملحق القرار الوزاري رقم 933 المؤرخ في 28 جويلية 2016 الذي يحدد القواعد المتعلقة بالوقاية من السرقة العلمية ومكافحتها.

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس-مستغانم-  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

تصريح شرفي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية  
لإنجاز البحث

أنا الممضي أدناه،

الطالب(ة): ..... بوكوشة نجاة.....

رقم التسجيل الجامعي: 202038052833.....

الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم: ..206153403.....

..... والصادرة بتاريخ: .....2020.11.09.....

عن..... البيض.....

المسجل ب علوم الطبيعة و الحياة / قسم ..... البيولوجيا.....

شعبة ..... العلوم البيولوجية..... / التخصص ..... ميكروبيولوجيا أساسية.....

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان: .....

.... « Lutte contre *Pseudomonas aeruginosa* responsable des infections nosocomiales » ....

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية و  
النزاهة الأكاديمية المطلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى  
المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ: ... 28 جوان 2025.....



إمضاء المعني

\* ملحق القرار الوزاري رقم 933 المؤرخ في 28 جويلية 2016 الذي يحدد القواعد المتعلقة بالوقاية من السرقة العلمية ومكافحتها.