RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MÉDÉA

FACULTÉ DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Par :

- **CHENGAB Oussama**
- **BOUDISSA Halim**

Thème :

Évaluation de l'aptitude de formation de biofilm des souches bactériennes isolées des pus et leur inhibition par des agents antimicrobiens

Soutenue publiquement le : 02/07/2025., Devant le jury composé de :

Mm CHAOUATI Karima	**M.A.A**	U.Médéa	Présidente
Mm ZERGOUG Amina	**M.C.A**	U.Médéa	Examinatrice
Mm HOCIENI Amina	**M.C.A**	U.Médéa	Encadreur

Année universitaire : 2024 - 2025

Remerciements

*Avant tout, nous remercions le bon **DIEU ALLAH**, tout puissant qui nous a donné la patience et le courage pour accomplir ce modeste travail.*

*En second lieu, d'abord remercier grandement ma promotrice, **Mm HOCEINI Amina**, pour toute son aide conseillère et de nous orienter dans cette démarche scientifique. Je vous remercie pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail. J'ai eu le grand plaisir de travailler sous votre direction.*

*Nous tenons à remercier les membres du jury : **Mm CHAOUATI Karima**, qui nous a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire, ainsi que **Mm ZERGOUG Amina,** qui a acceptée d'examiner ce travail.*

Nous tenons également à exprimer mes profondes gratitudes à tous les membres du laboratoire EL-CHIFAA Médéa et pour leur accueil, leur encadrement, leur disponibilité et leur soutien tout au long de cette recherche et à tous les membres de laboratoire de SNV techniciens et ingénieurs. Que Dieu récompense chacun d'eux pour leurs efforts et leur bienveillance.

Un merci tout particulier à tous les membres de l'administration et les Enseignantes de département de science de la nature et de la vie qui ont participé le long de ces 5 années à notre formation et pour leurs très grands dévouements.

Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Dédicace

J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail à :

♥ *À ma très chère mère* ***FATMA****,*

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

♥ *À mon très cher père* ***RABAH****,*

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour ; l'estime. Le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

À mes frères ***ISLAM****,* ***MOHAMED EL-AMINE****,* ***AYOUB*** *et Ma sœur* ***MERIEM****, en témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affectation que je porte pour vous. Vous êtes toujours dans mon cœur. Je vous remercie d'être l'épaule sur laquelle je peux toujours compter*

À tous les membres de la familles ***CHENGAB***

À toutes les membres de la familles ***KERKOUB***

À mes meilleurs amis : ***HALIM****,* ***MOHAMED****,* ***HOCINE****,* ***FATAH****,* ***ABDELHAFID****,* ***ADEL****,* ***MOHAMED****.*

Et mes chers collèges,

Et tout qui m'aide et compulse ce modeste travail

Enfin, je remercie mon binôme, ***HALIM****, qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail.*

OUSSAMA

Dédicace

J'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail :

*A ma très chère mère **AIDA**, qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi.*

*A mon très cher père **BOUDJEMAA**, pour ses encouragements, son soutien, surtout pour son amour et son sacrifice afin que rien n'entrave le déroulement de mes études.*

*A mes frères **MILOUD, AHMED, DJAMEL** et **Mes chères sœurs**,*

*A l'innocence : **LAMISE, BILAL, QUSAY, MAYARE, RIHAME, YACINE, BISANE, RACHA, ISHAQ**, les Jumeaux **ANES&ANIS**.*

*A mes meilleurs amis : **OUSSAMA, MOHAMED, HOCINE, FARES,***

FATHI, FATEH, AYOUB, RAHIM, SOUHAIB.

Et mes chers collèges,

Et tout qui m'aide et compulse ce modeste travail

*Enfin, je remercie mon binôme, **OUSSAMA**, qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail.*

HALIM

Résumé

Les infections suppuratives posent un réel défi thérapeutique en raison de la formation de biofilm par les bactéries pathogènes. Cette étude vise à évaluer la capacité des souches bactériennes isolées de pus à former des biofilms et leur inhibition par des bactéries thermophiles.

Une analyse a été menée sur 186 prélèvements cytobactériologiques de pus ont été analysés au laboratoire "El-Chifaa" (Médéa) entre janvier 2024 et avril 2025, dont 97 (52,2%) étaient positifs. Onze souches bactériennes ont été identifiées en utilisant CHROMagar™, des tests microscopiques (coloration de Gram), biochimiques (catalase, coagulase) et phénotypiques. La formation de biofilm a été évaluée par la méthode du Rouge Congo (CRA) et par analyse en microplaques. L'activité antimicrobienne des souches thermophiles a également été testée.

Les résultats ont révélé que 58,8% des cas positifs étaient des hommes, indiquant une nette prédominance masculine. Sur le plan bactériologique, *Staphylococcus aureus* était le plus prevalent (20,6%), suivi de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Streptococcus spp*. (18,6% chacun). Concernant la formation de biofilms, le test CRA a montré que 63,6% des isolats bactériens pouvaient former des biofilms, avec une efficacité particulière observée chez *K. pneumoniae*, *E. coli* et *S. aureus*. L'analyse a également révélé que les souches thermophiles (A, A5, D, H2, P) présentaient une activité inhibitrice marquée contre *Staphylococcus* et *K. pneumoniae*, tandis que leur effet était moins prononcé contre *E. coli* et *P. aeruginosa*.

L'étude confirme le rôle des biofilms dans la résistance aux antibiotiques et met en évidence le potentiel des bactéries thermophiles comme source de composés antimicrobiens. Les méthodes intégrées améliorent la précision de détection, ouvrant de nouvelles perspectives pour les applications biotechnologiques.

Les mots clés : infections suppuratives, Biofilms, Bactéries pathogènes, Bactéries thermophiles, Activité antimicrobienne.

Abstract

Suppurative infections are often aggravated by the ability of bacteria to form biofilms, which increases resistance to antibiotics. This study aimed to evaluate the biofilm-forming ability of bacterial isolates from pus samples and their inhibition by thermophilic bacteria.

A total of 186 pus samples were analyzed at El-Chifaa Laboratory (Médéa) between January 2024 and April 2025, with 97 samples (52.2%) testing positive. Eleven bacterial strains were identified using CHROMagar™, microscopic tests (Gram staining), biochemical tests (catalase, coagulase), and phenotypic assays. Biofilm formation was assessed using the Congo Red Agar (CRA) method and microplate analysis. The antimicrobial activity of thermophilic strains was also tested.

Results revealed that 58.8% of positive cases were male, indicating clear male predominance. Bacteriologically, *Staphylococcus aureus* showed the highest prevalence (20.6%), followed by *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Streptococcus spp*. (18.6% each). Regarding biofilm formation, CRA testing showed that 63.6% of bacterial isolates could form biofilms, with particular efficiency observed in *K. pneumoniae*, *E. coli* and *S. aureus*. Analysis also revealed that thermophilic strains (A, A5, D, H2, P) exhibited marked inhibitory activity against *Staphylococcus* and *K. pneumoniae*, while their effect was less pronounced against *E. coli* and *P. aeruginosa*.

The study confirms the role of biofilms in antibiotic resistance and highlights the potential of thermophilic bacteria as a source of antimicrobial compounds. Integrated methods improve detection accuracy, opening new prospects for biotechnological applications.

Keywords : Suppurative infections, Biofilms, Pathogenic bacteria, Thermophilic bacteria, Antimicrobial activity.

الملخص:

تمثل الالتهابات القيحية تحديًا سريريًا كبيرًا، حيث تعزز تكوين الأغشية الحيوية مقاومة البكتيريا للعلاج. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم قدرة البكتيريا المعزولة من الصديد على تكوين الأغشية الحيوية واختبار تأثير البكتيريا المحبة للحرارة في تثبيطها.

تم جمع 186 عينة من القيح في مختبر الشفاء (المدية) بين يناير 2024 وأبريل 2025، وكانت 97 عينة (52.2%) إيجابية. تم تحديد 11 سلالة بكتيرية باستخدامCHROMagar™ ، واختبارات مجهرية (تلوين جرام)، وكيميائية حيوية (كاتالاز، تخثر)، واختبارات ظاهرية. تم تقييم تكوين الأغشية الحيوية بطريقة الأحمر الكونغو (CRA) والتحليل في صفائح دقيقة. كما اختبر النشاط المضاد للميكروبات لسلالات محبة للحرارة.

كشفت النتائج أن 58.8% من الحالات الإيجابية كانت بين الذكور، مما يشير إلى هيمنة واضحة لهذه الفئة. من الناحية البكتريولوجية، سجلت المكورة العنقودية الذهبية أعلى معدل انتشار بنسبة 20.6%، تليها الزائفة الزنجارية والكلبسيلة الرئوية والعقديات بنسبة متساوية بلغت 18.6% لكل منها. فيما يخص تكوين الأغشية الحيوية، أظهرت نتائج اختبار الأحمر الكونغو أن 63.6% من العزلات البكتيرية تمتلك القدرة على تكوين الأغشية الحيوية، مع تفوق ملحوظ للكلبسيلة الرئوية والإشريكية القولونية والمكورة العنقودية الذهبية في هذه الخاصية. كما أظهر التحليل أن السلالات المحبة للحرارة (A, A5, D, H2, P) تمتلك نشاطاً مثبطاً واضحاً ضد المكورة العنقودية والكلبسيلة الرئوية، بينما كان هذا التأثير أقل وضوحاً ضد الإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية.

تؤكد الدراسة دور الأغشية الحيوية في مقاومة المضادات وتسلط الضوء على إمكانات البكتيريا المحبة للحرارة كمصدر لمركبات مضادة للميكروبات. الطرق المدمجة تعزز دقة الكشف، مما يفتح آفاقًا جديدة في التطبيقات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: الالتهابات القيحية، الأغشية الحيوية، البكتيريا الممرِضة، البكتيريا المحبة للحرارة، النشاط المضاد للميكروبات.

Listes d'abréviations :

AC : Abcès Cérébral

ADH : Arginine Dihydrolase

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AH : Abcès Hépatique

AHL : N-acylhomosérines lactones

ARN : Acide Ribonucléique.

BCP : BromoCrésol Pourpre

BFRT : Biofilm Ring Test

BGN : Bactéries à Gram Négatif

BHIB : Bouillon infusion cœur cervelle

CLSI : Clinical and laboratory standards institute

CV : Cristal Violet

°C : Degré Celsius

DO : Densités optiques

ECBP : Examens cytobactériologiques de pus

EPS : Substances polymères extracellulaires

H2O2 : Peroxyde d'hydrogène

H2S : Hydrogène Sulfuré

IC : Infection Cutanée

IOSR : International Organization of Scientific Research

LPS : Lipopolysaccharide

MBL : Métallo-bêta-lactamases

MH : Muller Hinton

OM : Otite Moyenne

OMA : Otite Moyenne Aiguë

PAL : Phosphatase Alcaline

PBS : phosphate-buffered saline

PH : potentiel d'Hydrogène

PIA : Polysaccharide Intercellular Adhesion

PLV : leucocidine de Panton-Valentine

RCA : Rouge Congo Agar.

Listes d'abréviations

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

TCP : Plaque de culture de tissus

TM : Méthode en Tube

TSST-1 : Toxine du choc toxique staphylococcique

TTM : Thermus thermophilus medium.

UFC : Ultimate Fighting Championship

Listes des figures :

Figure I.1 : Phases de l'inflammation **04**
Figure I.2 : Accumulation de pus dans la cavité inflammatoire **05**
Figure I.3 : Ulcère chronique à *P. aeruginosa* **06**
Figure I.4 : Zones nécrotiques et pus verdâtre à P. *aeruginosa* **06**
Figure I.5 : Origine et évolution de l'infection bactérienne **07**
Figure I.6 : La thermophile dans les trois domaines du vivant **21**
Figure I.7 : Applications Biotechnologie des thermophiles **22**
Figure I.8 : Principales étapes de la formation des biofilms **27**
Figure I.9 : Formation de biofilm en microplaque **29**
Figure I.10 : Culture sur la gélose Rouge Congo **30**
Figure II.1 : Prélèvement de pus par écouvillonnage **34**
Figure II.2 : Microplaques de titration (96 puits) **40**
Figure III.1 : Taux de positivité global **42**
Figure III.2 : Répartition des prélèvements selon le sexe **43**
Figure III.3 : Répartition des prélèvements positifs selon le sexe **44**
Figure III.4 : Répartition des principales bactéries isolées. **45**
Figure III.5 : Culture de *S. aureus* dans milieu Chapman. **47**
Figure III.6 : Résultat de Gram de *S. aureus* (Gram positive). **47**
Figure III.7 : Résultat du test catalase (positif). **48**
Figure III.8 : Résultat de test de la coagulase chez *S. aureus* **48**
Figure III.9 : L'aspect macroscopique des souches **51**
Figure III.10 : Coloration de gram des souches thermophiles sous microscope optique au grossissement X100, X40. **53**
Figure III.11 : L'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches bactérienne **55**
Figure III.12 : La production de slime chez les souches. **59**

Listes des tableaux :

Tableau I.1. Facteurs et propriétés (caractéristiques**)** impliqués dans la formation des biofilms **28**

Tableau III.2 : Identification des souches bactériennes par CHROMagar™ Orientation **46**

Tableau III.3 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude**.** **49**

Tableau III.4 : Observation morphologique des souches **52**

Tableau III.5 : Résultats de coloration de gram. **54**

Tableau III.6 : L'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches bactérienne **56**

Tableau III.7 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA. **59**

Tableau III.8 : Résultats de la technique de microplaque de titration **61**

TABLE DES MATIERES

Table des matières

Résumé

Abstract

الملخص

Listes d'abreviations

Listes des figures

Listes des tableaux

Introduction Generale 1

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 01 : Généralités sur les suppurations

I.1.Définition 3

I.2.Historique 3

I.3.Formation du pus 4

I.4.Formes 4

I.4.1. Abcès 4

I.4.1.1. Définition 4

I.4.1.2. Phases de l'abcès 4

I.4.1.2.1. Phase inflammatoire 4

I.4.1.2.2. Phase de collection 5

I.4.1.3. Localisation 5

I.4.1.3.1. Superficielle 5

I.4.1.3.2. Profonde 5

I.4.2. Plaie 5

I.4.2.1. Définition 5

I.4.2.2. Différents types de plaies 5

I.4.2.2.1. Aiguës ou chroniques 5

I.4.2.2.2. Ouvertes ou fermées 6

I.5. Infections 6

I.5.1. Origine de l'infection bactérienne 6

I.5.2.1. Endogène 6

I.5.2.2. Exogène 6

I.5.3. Facteurs de risques des suppurations 7

I.5.3.1. Facteurs locaux 7

I.5.3.2. Facteurs généraux 8

I.5.4. Infections liées à la suppuration 8

I.5.4.1. Infections cutanées suppuratives 8
I.5.4.2. Infection du pied diabétique 8
I.5.4.3. Infection du site opératoire 8
I.5.4.4. Suppuration buccodentaire 9
I.5.4.4.1. Abcès parodontal 9
I.5.4.4.2. Cellulite cervico-faciale 9
I.5.4.5. Abcès hépatique (AH) 9
I.5.4.6. Abcès cérébral 10
I.6. Étiologie bacterienne 10
I.6.1. Les bactéries à Gram positif 10
I.6.1.1. *Staphylococcus* 10
I.6.1.1.1. Staphylocoques à coagulase positive « Staphylococcus aureus » 10
I.6.1.1.1.1. Caractères bactériologiques 11
I.6.1.1.1.2. Pouvoir pathogène 11
I.6.1.1.2. Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN) 12
I.6.1.1.2.1. Caractères bactériologiques 12
I.6.1.1.2.2. Pouvoir pathogène 12
I.6.1.2. *Streptococcus* 12
I.6.1.2.1. Streptococcus pyogenes (groupe A) 12
I.6.1.2.1.1. Caractères bactériologiques 13
I.6.1.2.1.2. Pouvoir pathogène 13
I.6.2. Les bactéries à Gram négatif 13
I.6.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* 13
I.6.2.1.1. Caractères bactériologiques 14
I.6.2.1.2. Pouvoir pathogène 14
I.6.2.2. *Acienetobacter baumannii* 14
I.6.2.2.1. Caractères bactériologiques 14
I.6.2.2.2. Pouvoir pathogène 15
I.6.2.3. Les Entérobactéries 15
I.6.2.3.1. Escherichia coli 15
I.6.2.3.1.1. Caractères bactériologiques 15
I.6.2.3.1.2. Pouvoir pathogène 16
I.6.2.3.2. Groupe KES (*Klebsiella, Enterobacter et Serratia*) 16
I.6.2.3.2.1. *Klebsiella pneumoniae* 16
I.6.2.3.2.1.1. Caractères bactériologiques 16

I.6.2.3.2.1.2. Pouvoir pathogène 17
I.6.2.3.2.2. *Enterobacter cloacae* 17
I.6.2.3.2.2.1. Caractères bactériologiques 17
I.6.2.3.2.2.2. Pouvoir pathogène 18
I.6.2.3.2.3. *Serratia marcescens* 18
I.6.2.3.2.3.1. Caractères bactériologiques 18
I.6.2.3.2.3.2. Pouvoir pathogène 18
I.6.2.3.3. Groupe PMP (*Proteus, Morganella et Providencia*) 18
I.6.2.3.3.1. Caractères bactériologiques 19
I.6.2.3.3.2. Pouvoir pathogène 19
PARTIE 02 : Les Bacteries Thermophiles
I.1. Définition 20
I.2. Phylogénie des thermophiles 20
I.3. L'activité antimicrobienne des thermophiles 21
I.4. Biotechnologie des thermophiles 22
PARTIE 03 : Biofilm
I.1. Définition 23
I.2. Historique 23
I.3. Composition et organisation du biofilm 23
I.3.1. Composition d'un biofilm 23
I.3.1.1. Les microorganismes 24
I.3.1.2. La matrice 24
I.3.2. Organisation d'un biofilm 24
I.4. Les étapes de formation de Biofilm 24
I.4.1. Film de conditionnement ou le film primaire 25
I.4.2. Transport des bactéries vers son support (surface) 25
I.4.3. Adhésion réversible 25
I.4.4. Adhésion irréversible 25
I.4.5. Formation de micro-colonies 26
I.4.6. Maturation du biofilm 26
I.4.7. Dispersion du biofilm 26
I.5. Facteurs qui favorisent la formation du biofilm 27
I.5.1. Les caractéristiques du support ou surface 27
I.5.2. Les caractéristiques du milieu 27
I.5.3. Les caractéristiques de la cellule 28

I.6.Quorum Sensing 28
I.7. Les méthodes de détection de biofilm 29
I.7.1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) 29
I.7.2. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA) 29

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODE 32
II.1. MATERIEL 32
II.1.1. Verreries 32
II.1.2. Appareillage 32
II.1.3. Milieux de culture 32
II.1.4. Autres produits consommables 32
II.1.5. Autres matériels 32
II.2. METHODE 33
II.2.1. Période et lieu d'étude 33
II.2.2. Objectifs d'étude 33
II.2.2. Collecte des données 33
II.2.3. Prélèvement 33
II.2.4. Isolement et purification des souches bactériennes 34
II.2.5. Identification des souches selon les critères de bergey's 34
II.2.5.1. Examen macroscopique 35
II.2.6. Isolement et identification de *Staphylococcus aureus* 35
II.2.6.1. Examen microscopique 35
II.2.6.2. Identification biochimique 36
A. Recherche de la catalase 36
B. Recherche de la coagulase en tube 36
II.2.7. Conservation des souches 37
II.3. Revivification et identification des souches thermophiles 37
II.3.1. Enrichissement et ensemencement 37
II.3.2. Identification phénotypique des souches thermophiles 37
A. Examen macroscopique 37
B. Examen microscopique après coloration de Gram 38
II.4. Recherche des activités antimicrobiennes des thermophiles sur milieu solide (technique des cylindres d'agar) 38
II.5. La recherche de la capacité de formation de Biofilm 39
II.5.1. La méthode du Rouge Congo 39

II.5.2. Méthode de microplaques de titration à 96 puits.....39

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Donnees epidemiologiques.....42
III.1.1. Taux de positivité global.....42
III.1.2. Répartition selon le sexe.....43
III.1.3. Taux des prélèvements positifs selon le sexe.....43
III.2. Donnees bacteriologiques.....44
III.2.1. Répartition des principales bactéries isolées.....44
III.3. Identification des souches bacteriennes.....46
III.3.1. L'aspect macroscopique.....46
III.3.2. Identification de *Staphylococcus aureus*.....47
III.3.2.1. Aspect macroscopique.....47
III.3.2.2. Aspect microscopique.....47
III.3.2.3. Résultats de l'identification biochimique.....48
Test de catalase.....48
Test de coagulase en tube.....48
III.3.3. Donnees cliniques et origine des souches isolees.....48
III.4. Étude phenotypique des souches thermophiles.....50
III.4.1. Observation macroscopique.....50
III.4.2. Observation microscopique.....52
III.4.3. L'activité antimicrobienne des souches thermophiles.....54
III.4.4. L'aptitude de formation de biofilm.....58
III.4.4.1. Technique Rouge Congo.....58
III.4.4.2. Technique de microplaque de titration.....60
CONCLUSION.....63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE
ANNEXES

Introduction générale

Les infections suppuratives demeurent un enjeu clinique majeur et fréquent, représentant une cause importante de morbidité dans de nombreux contextes médicaux **(Kumar *et al.*, 2020)**. La formation de pus constitue un signe caractéristique de ces infections, généralement provoquées par des bactéries pyogènes. Ce processus résulte de l'accumulation de leucocytes morts, de bactéries, de débris cellulaires et de tissu nécrosé au site de l'infection **(Gill et Sharma, 2019)**.

Les infections pyogènes peuvent avoir une origine endogène ou exogène **(Khanam *et al.*, 2018)**, et leurs localisations sont multiples. Elles peuvent se manifester sous forme de lésions superficielles telles que les escarres, les ulcères et les furoncles, ou bien affecter des tissus profonds comme dans les cas d'ostéomyélite, de spondylodiscite ou d'infections d'origine digestive **(Cattoir *et al.*, 2016)**. Leur gravité varie selon la profondeur, l'étendue de la suppuration et la nature de l'agent pathogène impliqué. Le pus figure parmi les échantillons les plus fréquemment analysés dans les laboratoires de microbiologie clinique, car il permet l'identification précise de l'agent infectieux **(Mukherjee *et al.*, 2020)**.

Parmi les principaux agents pathogènes responsables de ces infections figurent *Staphylococcus aureus*, les entérocoques et plusieurs entérobactéries comme *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*., *Proteus spp*., ainsi que *Pseudomonas aeruginosa*, tous connus pour leur capacité à induire des réactions purulentes sévères **(Kumar *et al.*, 2020)**.

On a identifié les sources thermales comme des habitats naturels propices à l'établissement de bactéries thermophiles, ces microbes qui résident principalement dans les sources chaudes et qui peuvent vivre et persister à des températures élevées. Cependant, elles ont été peu explorées en raison des difficultés liés à leur isolement et leur maintien en culture pure **(Panda *et al.*, 2013).** L'Algérie renferme de multiples sources d'eaux chaudes naturelles, généralement situées dans les zones montagneuses ou à proximité des zones volcaniques.

Par ailleurs, la capacité de certaines souches à former des biofilms structures multicellulaires organisées et fortement adhérentes constitue un défi thérapeutique majeur. Les bactéries au sein d'un biofilm peuvent présenter une résistance accrue, de 10 à 1000 fois supérieure, aux antibiotiques et aux désinfectants, comparativement à leur forme planctonique **(Tremblay *et al*., 2014).**

Les objectifs de ce travail peuvent être résumés dans les points suivants :

- L'isolement et l'identification phénotypique d'une collection des souches bactériennes isolées à partir des pus.
- Identification phénotypique des souches thermophiles isolées à partir des sources hydrothermales
- L'évaluation de l'activité antibactérienne des souches thermophiles vis-à-vis les souches bactériennes isolées à partir des pus selon la technique des cylindres d'agar.
- Evaluation l'aptitude de formation de biofilm.

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

Partie 01 :
Généralités sur les suppurations

I.1.Définition :

Le pus est un fluide dense et visqueux, produit au cours de la réponse inflammatoire de l'organisme face à une infection, principalement d'origine bactérienne. Il résulte de l'accumulation de leucocytes en cours de dégénérescence, de débris cellulaires, de micro-organismes pathogènes, ainsi que de résidus tissulaires nécrosés **(Sharma et al., 2021 ; Grace et al., 2020).**

Sur le plan médical, il est qualifié d'« exsudat purulent » et se manifeste aussi bien dans les infections superficielles (plaies, furoncles) que profondes (abcès). L'aspect macroscopique du pus (couleur, consistance, odeur) varie en fonction de sa composition et du type de bactérie impliquée. Ainsi, certaines souches, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, peuvent produire des pigments comme la pyocyanine, responsables d'une coloration verdâtre **(David, 2005 ; Afshan et Shahid, 2013).**

Dans la majorité des cas, le pus est inodore ; toutefois, certaines bactéries anaérobies sont capables de générer une odeur fétide caractéristique **(Afshan et Shahid, 2013).** Par ailleurs, il peut présenter une consistance très visqueuse selon les conditions locales de l'infection **(Pisetsky, 2011).** La détection de pus dans une lésion constitue un signe clinique majeur d'infection locale, avec un risque potentiel de dissémination systémique en cas de pénétration dans la circulation sanguine **(Afshan et Shahid, 2013 ; Grace *et al.*, 2020).**

I.2.Historique :

L'histoire médicale du pus révèle une évolution significative dans la compréhension de son rôle. Pendant l'Antiquité, le pus était souvent considéré comme bénéfique à la cicatrisation des plaies, une idée résumée par l'expression latine « pus bonum et laudabile », suggérant qu'un pus blanc et inodore annonçait une guérison favorable **(Freiberg, 2017).** Cette conception trouve ses racines dans les écrits d'Hippocrate et fut largement diffusée par Galien, bien que ce dernier prônât plutôt le drainage et l'assèchement des plaies infectées.

Cette vision erronée s'est maintenue durant des siècles, notamment en chirurgie, où la présence de pus était interprétée comme un signe de pronostic favorable. Ce n'est qu'au XIX^{e} siècle, grâce aux travaux fondamentaux d'Ignaz Semmelweis, Louis Pasteur et Joseph Lister, que cette notion a été remise en question. Le développement de la théorie microbienne, de l'asepsie et des pratiques antiseptiques a permis d'établir que le pus est en réalité un marqueur d'infection, et non un indicateur de guérison **(Freiberg, 2017).**

Dès lors, le concept de « pus louable » a été progressivement abandonné dans la littérature médicale, jusqu'à sa disparition quasi totale au début du XXe siècle. Des publications ultérieures, notamment en 2014, insistent désormais sur la distinction entre infections purulentes et non purulentes dans les recommandations de prise en charge des infections cutanées, soulignant ainsi le changement radical de paradigme dans l'interprétation clinique du pus **(Freiberg, 2017).**

I.3.Formation du pus :

En général, le pus indique une infection et une inflammation **(Khanam *et al*., 2018)**. Lorsque l'organisme identifie une infection, il déploie des neutrophiles, qui sont un type de globule blanc, pour éliminer les bactéries.

I.4.Formes :

I.4.1. Abcès :

I.4.1.1. Définition :

C'est un nodule enflammé causé par une infection. L'affrontement entre les cellules immunitaires de l'organisme et les bactéries provoque la nécrose de certaines cellules, créant ainsi une consistance fluide au centre (**Pierrick ,2013).**

I.4.1.2. Phases de l'abcès :

I.4.1.2.1. Phase inflammatoire :

Le processus des événements vasculaires, comme la vasodilatation, l'arrivée de sang et la traversée de liquides, substances et cellules à travers la paroi des vaisseaux, y compris la congestion, l'œdème et la diapédèse.

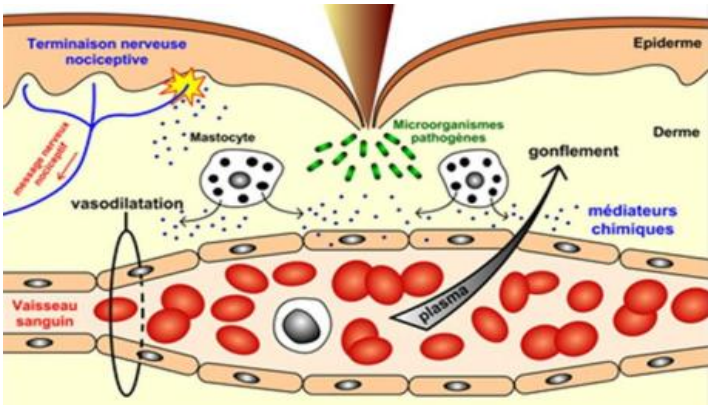


Figure I.1 : Phases de l'inflammation (**Ketty**, **2011).**

I.4.1.2.2. Phase de collection :

C'est une formation de pus qui est distribuée, puis rassemblée dans une cavité enflammée. Le pus accumulé doit être évacué. Ceci peut se produire de manière spontanée, par l'ouverture de l'abcès à la surface cutanée.

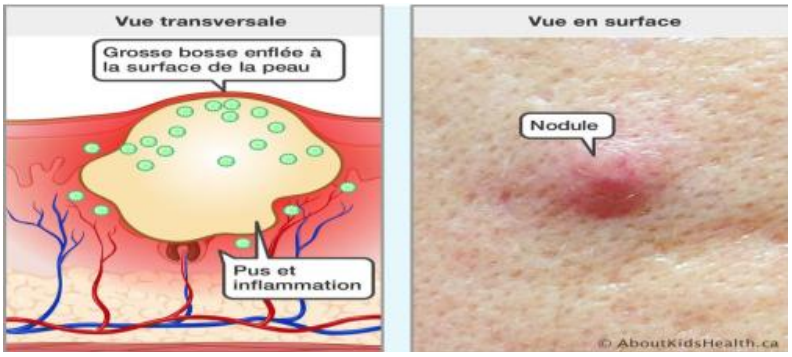


Figure I.2 : Accumulation de pus dans la cavité inflammatoire (**Sickkids staff,2015).**

I.4.1.3. Localisation :

I.4.1.3.1. Superficielle :

On les localise généralement davantage dans les régions riches en poils ou au sein des glandes sébacées (panaris, furoncle) (**Fitch *et al*., 2007)**

I.4.1.3.2. Profonde :

On les retrouve dans tous les organes, leur gravité étant liée à des soucis de compression, aux complications pour leur nettoyage et aux impacts sur le fonctionnement de l'organe (**Chandesris *et al*., 2005).**

I.4.2. Plaie :

I.4.2.1. Définition :

Une plaie représente une violation de l'intégrité des tissus biologiques, tels que la peau, les muqueuses et les tissus organiques.

I.4.2.2. Différents types de plaies :

I.4.2.2.1. Aiguës ou chroniques :

Les plaies aiguës sont celles qui se cicatrisent sans complication dans un laps de temps déterminé. Ces dernières peuvent être de nature chirurgicale (une incision réalisée lors d'une intervention) ou résulter d'un traumatisme (mécanique, chimique, physique) **(Dealey ,2005) (Berthe *et al*.,2018).**



Figure I.3 : Ulcère chronique à *P. aeruginosa* (**Morand, 2017).**

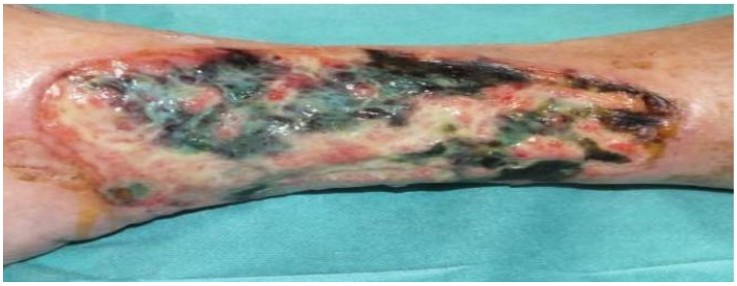


Figure I.4 : zones nécrotiques et pus verdâtre à P. *aeruginosa* (**Morand, 2017).**

I.4.2.2.2. Ouvertes ou fermées :

Les plaies ouvertes sont celles dont les tissus ou organes sous-jacents sont exposés et qui restent ouvertes sur l'environnement extérieur. Elles surviennent suite à un traumatisme, une brûlure ou lorsque des blessures initialement refermées s'ouvrent secondairement en raison d'une infection. En ce qui concerne les plaies fermées, elles surviennent sans aucune exposition des tissus et organes sous-jacents (**Lorenz et Longaker**, **2003).**

I.5. Infections :

I.5.1. Origine de l'infection bactérienne :

I.5.2.1. Endogène :

Si les bactéries de la flore commensale du patient sont déplacées vers une blessure tissulaire ou un lieu d'intervention chirurgicale, elles peuvent entraîner des infections. On les appelle pathogènes opportunistes, ce qui souligne que ces microorganismes habituellement inoffensifs peuvent profiter d'une défaillance temporaire ou durable de nos défenses antimicrobiennes pour provoquer une maladie **(Wilson, 2021 ; Grollier *et al*., 2004).**

I.5.2.2. Exogène :

En ce qui concerne les infections exogènes, elles concernent des bactéries qui s'introduisent dans l'organisme d'un patient provenant de son environnement. On peut contracter ces bactéries directement ou indirectement en venant en contact avec une personne malade, un professionnel de la santé, un équipement contaminé, une surface ou tout autre élément vecteur. Les patients ayant des coupures ouvertes, portant des dispositifs

implantés et ceux dont le système immunitaire est affaibli, sont particulièrement vulnérables au risque accru d'infections exogènes **(Wilson, 2021 ; Salabert, 2008).**

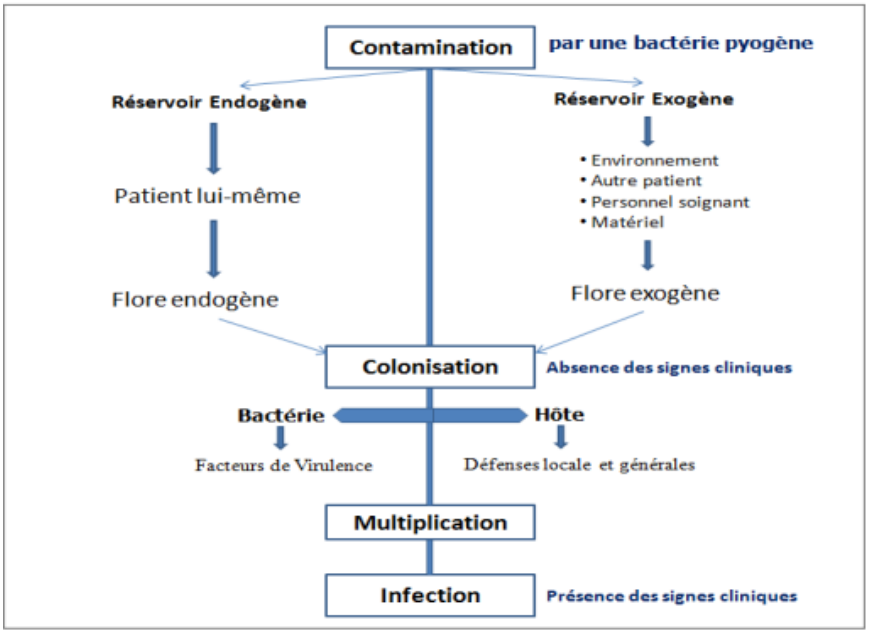


Figure I.5 : Origine et évolution de l'infection bactérienne **(Wilson, 2021).**

I.5.3. Facteurs de risques des suppurations :

L'évolution de la maladie suppurative chez un individu contaminé est largement liée à des facteurs propres à l'hôte, même si certaines caractéristiques de l'entité elle-même ont une incidence sur ce phénomène **(Suranigi *et al*., 2021 ; Senn *et al*., 2017).**

Tous les patients ne réagissent pas de la même manière, il convient de différencier les facteurs de risque qui sont communs à tous les patients de ceux qui sont propres à chaque patient. Dans le domaine de la chirurgie des traumatismes, la sévérité de la lésion et du traumatisme des tissus mous constitue un risque additionnel pour le développement d'infections après l'intervention chirurgicale **(Militz, 2018).**

Deux types de facteurs favorisent l'infection suppurative **(Bassole, 2014 ; Transdisciplinaires, 2008).**

I.5.3.1. Facteurs locaux :

- Proximité et hygiène insatisfaisante.
- Infusion.
- La rupture de la barrière kératinocytaire, le changement du pH cutané et l'élimination de la flore commensale résidente contribuent à l'altération de la peau.
- Utilisation locale de la corticothérapie.

I.5.3.2. Facteurs généraux :

- Déficits immunitaires de nature congénitale ou acquise.
- Diabète mal contrôlé.
- Utilisation de la corticothérapie systémique **(Bassole, 2014 ; Transdisciplinaires, 2008).**

I.5.4. Infections liées à la suppuration :

I.5.4.1. Infections cutanées suppuratives :

Il existe plusieurs manifestations cliniques des infections cutanées (IC). Ils sont classés et nommés en fonction du type et de la profondeur du tissu infecté (épiderme, derme, hypoderme) ou de la structure cutanée touchée **(Rasigad et Tristan, 2019).**

Toute lésion de la peau (traumatisme, brûlure, incision chirurgicale, escarre, ulcère) a le potentiel de subir une surinfection et provoquer une infection cutanée secondaire. Bien que *S. aureus* et *S. pyogenes* soient souvent impliqués, on peut aussi trouver des entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* ou encore des anaérobies **(Rasigad et Tristan, 2019).**

Les infections cutanées comprennent des affections superficielles telles que l'impétigo, ainsi que des infections plus profondes comme la cellulite, la folliculite, les ulcères et les blessures infectées **(Gonzalez *et al*.,2019 ; Ustin et Malangoni, 2011).**

I.5.4.2. Infection du pied diabétique :

Selon le groupe de travail international sur le pied diabétique, il définit cette condition comme une infection, une ulcération ou la dégradation des tissus du pied chez une personne souffrant de diabète, qu'il soit présent ou déjà identifié, généralement associée à une neuropathie et/ou à une affection artérielle périphérique au niveau des membres inférieurs. Le pied diabétique est une complication affaiblissante du diabète du fait de son impact sur les nerfs et vaisseaux périphériques, touchant près de 50% des patients atteints de diabète de type 1 ou 2 **(Kaluarachchi *et al*., 2020).** L'infection du pied diabétique se manifeste par des symptômes bien visibles tels que la chaleur, les douleurs, le gonflement, l'écoulement purulent et la gangrène **(Cahn, 2014).**

I.5.4.3. Infection du site opératoire :

L'otite moyenne (OM) représente une problématique de santé significative, présentant un taux d'incidence et de prévalence élevé dans les pays développés ainsi que dans les pays en voie de développement. L'OM est définie comme une pathologie continue, marquée par

une inflammation de l'oreille moyenne révélée par la présence d'un liquide dans l'oreille moyenne. Elle peut être aiguë, persistante ou récurrente, avec suppuration ou sans **(Ofogbu *et al*., 2016 ; Shirai et Preciado, 2019).**

I.5.4.4. Suppuration buccodentaire :

I.5.4.4.1. Abcès parodontal :

On définit un abcès parodontal comme une concentration de pus localisée dans la paroi gingivale d'un espace parodontal. Souvent observé chez les patients ayant déjà souffert de poches parodontales, il progresse rapidement, ravageant les tissus parodontaux et manifestant des signes clairs tels que l'inflammation de la gencive accompagnée d'un gonflement localisé. Les abcès parodontaux constituent la troisième situation d'urgence dentaire la plus fréquente qui nécessite une intervention, du fait de leur apparition rapide et de la douleur qu'ils engendrent **(Yousefi *et al*., 2020).**

L'abcès parodontal est principalement attribué à des bactéries anaérobies Gram négatif dans le domaine de la microbiologie **(Yousefi *et al*., 2020).**

I.5.4.4.2. Cellulite cervico-faciale :

Les infections de cellulites cervico-faciales, qui présentent diverses manifestations cliniques, constituent un ensemble d'infections courantes. L'infection dentaire est généralement la porte d'entrée des cellulites cervico-faciales. Les cellulites formées de cette manière ont donc la caractéristique d'être des infections profondes, dérivant d'un abcès ostéo-sous-périosté, qui se propage secondairement vers les tissus cellulo-graisseux du visage, mais également vers les tissus profonds et musculaires **(Bertolus, 2011).**

I.5.4.5. Abcès hépatique (AH) :

L'abcès hépatique, bien que rare, est une maladie d'une grande portée clinique et potentiellement fatale. Il est caractérisé par une accumulation suppurative encapsulée dans le tissu hépatique infecté par des bactéries. La pathogenèse a connu une évolution significative au fil du temps, à cause des progrès de la médecine et de l'emploi de plus en plus régulier de techniques invasives **(Ribeiro Da Costa *et al*., 2020).**

Les symptômes d'un AH sont non spécifiques. On rapporte souvent la fièvre, les douleurs au ventre et l'hypotension **(Ribeiro Da Costa *et al*., 2020).**

Dans l'AH, les bactéries à Gram négatif, comme *E. coli* et *K. pneumoniae*, sont les plus couramment identifiées **(Ribeiro Da Costa *et al*., 2020).**

I.5.4.6. Abcès cérébral :

L'abcès cérébral (AC) représente une problématique de santé mondiale, marquée par un taux élevé d'incidence et de mortalité. L'AC est une suppuration intracrânienne dynamique et focalisée, représentant une urgence sévère qui menace la vie. Il débute en tant que zone localisée et évolue en un ensemble confiné de substances pustuleuses **(Castellar-Leones *et al*., 2013).**

Les individus souffrant d'un abcès cérébral manifestent souvent un ou plusieurs symptômes, tels que la fièvre, les céphalées, la méningisme, une diminution de l'état de conscience ou des signes neurologiques localisés, y compris les crises épileptiques, les troubles de l'équilibre, la dysphagie ou encore les déficits sensorimoteurs localisés **(Castellar-Leones *et al*., 2013).**

Une diversité considérable d'agents pathogènes est capable de causer un AC. Les agents pathogènes les plus fréquents sont les streptocoques. Lors de traumatismes ou chez les patients ayant déjà subi des procédures neurochirurgicales, on observe couramment la présence de cocci aérobies Gram-positifs, mais on peut aussi rencontrer des bacilles Gram-négatifs tels que *Klebsiella, Pseudomonas*, *E.coli* et *Proteus* **(Castellar-Leones *et al*., 2013).**

I.6. Étiologie bactérienne :

Pour approfondir notre compréhension de la suppuration et des infections bactériennes en général, il est essentiel de rappeler les caractéristiques des diverses bactéries responsables.

I.6.1. Les bactéries à Gram positif :

I.6.1.1. *Staphylococcus :*

Le genre *Staphylococcus* englobe à la fois des organismes commensaux et des agents infectieux chez l'homme et les animaux. *S. aureus* et *S. epidermidis*, spécifiquement, sont à l'origine de multiples infections humaines et ont évolué une résistance croissante aux antibiotiques ces dernières années **(Moller *et al*., 2019)**.

I.6.1.1.1. Staphylocoques à coagulase positive *« Staphylococcus aureus » :*

Le *Staphylococcus aureus*, également appelé staphylocoque à coagulase positive, est une bactérie pyogène classée dans le genre *Staphylococcus* au sein de la famille des *Staphylococcaceae*. Il peut se transformer en agent pathogène opportuniste et causer diverses infections acquises dans un environnement hospitalier ou communautaire **(Lee *et al*., 2018)**, comme des suppurations superficielles et profondes. C'est également la bactérie la plus

fréquemment isolée dans les infections des plaies dues à des objets étrangers **(Grosjean *et al*., 2011).**

C'est un organisme ubiquitaire, habitant de manière commensale sur la peau et les muqueuses, qui colonise naturellement environ 60 % des individus de façon intermittente et entre 20 et 40 % de la population de manière chronique et épisodique dans d'autres flores **(Moller *et al*., 2019 ; Grosjean *et al*., 2011).**

I.6.1.1.1.1. Caractères bactériologiques :

Il s'agit d'une coque à coloration Gram positive, qui se manifeste sous la forme de regroupements ayant l'apparence de grappes de raisin. Il a un diamètre de 0,5 à 1 µm, ne produit pas de spores, n'a pas de capsule et est immobile **(Grosjean *et al*., 2011)**.

Il se développe en conditions d'aéro-anaérobiose. Il arrive fréquemment que les colonies présentent une hémolyse sur gélose au sang. Il génère un pigment jaune orangé dans la majorité des milieux courants ou sélectifs. Les milieux solides appropriés comprennent la gélose nutritive et la gélose de Chapman **(Grosjean *et al*., 2011).**

Plusieurs tests biochimiques servent à reconnaître le *S. aureus* selon la production de coagulase et de désoxyribonucléase, la présence d'antigènes spécifiques ou encore la capacité à fermenter le mannitol. La méthode traditionnelle du test de coagulase en tube est utilisée pour différencier *S. aureus* des autres staphylocoques, également connus sous le nom de staphylocoques à coagulase négative **(Grosjean *et al*., 2011 ; Bagnoli *et al*., 2018).**

I.6.1.1.1.2. Pouvoir pathogène :

S. aureus devient pathogène lorsqu'il se propage dans l'organisme suite à la rupture de la barrière cutanée (par exemple, brûlure, blessure, cathéter…) **(Aubry et gaüzére, 2022).**

Les infections par le staphylocoque doré se manifestent comme des infections suppuratives, soit superficielles, soit sous forme d'abcès répandus dans divers organes **(Grosjean *et al*., 2011 ; Jean et Anne, 2019)**.

Les infections cutanéo-muqueuses superficielles comme les folliculites, les furoncles et les impétigos sont celles qui se présentent le plus souvent. Ces infections peuvent entraîner des complications par une dissémination hématogène, et la bactérie devient alors l'agent responsable de la bactériémie **(Vincenot *et al.*, 2008)**.

Divers éléments contribuent à la fréquence et à la gravité des infections à *S. aureus*, tels que l'aspect ubiquitaire de la bactérie, sa résistance multiple aux antibiotiques, sans oublier les facteurs de virulence. En effet, le staphylocoque est capable de sécréter des facteurs d'adhésion, des enzymes de résistance et diverses toxines comme la leucocidine de

Panton-Valentine (PLV) qui cause des infections nécrosantes, la TSST-1 (toxine du choc toxique staphylococcique) ainsi que la formation du biofilm **(Grosjean *et al.*, 2011 ; Bagnoli *et al.*, 2018 ; Sharma *et al.*, 2021).**

I.6.1.1.2. Staphylocoques à Coagulase Négative (SCN) :

Les SCN, qui sont des bactéries ubiquitaires, Ils constituent un élément naturel de la flore de l'organisme **(Grosjean *et al.*, 2011)**. On distingue surtout cinq espèces : *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lugdunensis* et *Staphylococcus chromogenes* **(GHEIT, 2011)**.

I.6.1.1.2.1. Caractères bactériologiques :

Les caractères morphologiques et culturels des staphylocoques blancs sont identiques à ceux de *S. aureus* **(Grosjean *et al.*, 2011 ; Bergon, 2016)**. Les SCN, qui sont des bactéries à coagulase négative, ont la capacité de fermenter le glucose. Ils n'ont généralement pas la capacité de fermenter le mannitol. On retrouve un grand nombre d'enzymes, à l'image de la phosphatase alcaline (PAL) et de l'arginine dihydrolase (ADH) **(GHEIT, 2011 ; Randriamampionona, 2018).**

I.6.1.1.2.2. Pouvoir pathogène :

Les SCN, communément appelés « staphylocoques blancs », sont généralement considérés comme des bactéries opportunistes pathogènes à l'origine d'infections suppuratives et de bactériémies en milieu hospitalier **(Bergon, 2016 ; Barbier, 2015).**

I.6.1.2. *Streptococcus* :

Le genre *Streptococcus* regroupe des organismes en forme de cocci, à Gram positif, et disposés en chaînes. Ils sont des commensaux, des agents pathogènes et opportunistes pour l'homme et les animaux, à l'origine de nombreuses infections, comme les infections de la peau et des plaies **(Haenni *et al.*, 2018)**.

I.6.1.2.1. *Streptococcus pyogenes* (groupe A) :

Le *Streptococcus pyogenes*, également appelé streptocoque de groupe A et anaérobie aérotolérant, est un agent pathogène à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité importants **(Jean et Anne, 2019 ; Wijesundara *et al.*, 2021 ; Bassetti *et al.*, 2018).** Il s'agit d'un organisme strictement humain, commensal de l'oropharynx et rarement présent sur la peau **(Grosjean *et al.*, 2011).** L'infection se propage par voie aérienne lors d'un contact proche avec un patient ou un porteur asymptomatique, ou par contact direct **(Jean et Anne, 2019).**

I.6.1.2.1.1. Caractères bactériologiques :

Sous le microscope, *S. pyogenes* se présente comme des cocci Gram-positifs parfaitement ronds qui sont disposés en chaînes **(Spellerberg et Brandt, 2016).** Comparable à la structure cellulaire des espèces de *Staphylococcus* **(In Riedel *et al.*, 2019)**. Il est immobile, sans capsule et dépourvu de spores **(Grosjean *et al.*, 2011).**

Pour détecter *S. pyogenes* dans des prélèvements cliniques, on examine des boîtes de gélose au sang frais à la recherche de colonies β-hémolytiques. Après 24 heures d'incubation à une température de 35-37°C, les colonies de *S. pyogenes* présentent généralement une forme en dôme, avec une surface lisse ou légèrement humide et des contours bien définis. Elles affichent une couleur blanc-grise et possèdent un diamètre supérieur à 0,5 mm, entourées d'une zone de β-hémolyse **(Spellerberg et Brandt, 2016).**

Les colonies β-hémolytiques montrent une morphologie caractéristique de *S. pyogenes*, et le test de catalase donne un résultat négatif. Pour identifier cette bactérie, des tests de laboratoire simples et rapides peuvent être mis en œuvre **(Spellerberg et Brandt, 2016).**

I.6.1.2.1.2. Pouvoir pathogène :

Les infections à *S. pyogènes* peuvent évoluer vers des infections suppuratives sévères ou vers des complications qui ne sont pas suppuratives **(Wijesundara *et al.*, 2021 ; Proft et Loh, 2020)].** Cette bactérie peut provoquer des infections cutanées superficielles telles que l'impétigo, l'érysipèle et la dermo-épidermite, qui évoluent rapidement. Elle peut également être responsable de surinfections des plaies **(Grosjean *et al.*, 2011 ; Jean et Anne, 2019).**

I.6.2. Les bactéries à Gram négatif :

I.6.2.1. *Pseudomonas aeruginosa :*

P. aeruginosa est un pathogène notable appartenant à la famille des Pseudomonadaceae **(Wu *et al.*, 2011)**. Il est responsable de 10 % à 20 % des infections dans la majorité des cas d'infections nosocomiales. Parmi les infections les plus sévères, on note des infections cutanées et des tissus mous, des otites externes malignes ainsi que des bactériémies **(Bassetti *et al.*, 2018).**

Il s'agit d'une bactérie ubiquitaire qui peut survivre dans l'environnement, notamment dans les milieux humides et hospitaliers. Il est possible de trouver P. aeruginosa dans l'environnement immédiat du patient. Il peut appartenir à la flore transitoire de l'homme

(cutanée, pharyngée et intestinale), et il a été démontré que sa présence s'intensifie avec la durée du séjour à l'hôpital **(Grosjean *et al.*, 2011).**

I.6.2.1.1. Caractères bactériologiques :

P. aeruginosa est un bacille petit à Gram négatif, mesure entre 1 et 3 µm de longueur et entre 0,5 et 1 µm de largeur. Il se déplace grâce à un flagelle polaire, généralement en ligne droite, il n'a pas de spores et peut être parfois capsulé **(Grosjean *et al.*, 2011 ; Tijani, 2019).**

Cette bactérie est aérobie stricte, elle se développe bien à 37°C, même si elle peut prospérer à des températures aussi hautes sur des milieux de culture ordinaires. De plus, elle est capable de résister à des fluctuations de pH allant de 5,6 à 9, avec un niveau de pH optimal se situant autour de 7,2. On utilise divers types de milieux pour la culture du *P. aeruginosa* tels que les géloses nutritives ordinaires, le milieu de MacConkey, BCP et la gélose au cétrimide (un milieu sélectif qui empêche la croissance d'autres bactéries) **(Grosjean *et al.*, 2011 ; Tijani, 2019).**

P. aeruginosa fait partie des bactéries non fermentantes (elles ne peuvent pas fermenter les glucides). Les caractéristiques biochimiques qui soutiennent l'identification incluent un résultat positif pour les tests d'oxydase, de catalase, de nitrate réductase et de gélatinase **(Wu *et al.*, 2011).**

I.6.2.1.2. Pouvoir pathogène :

P. aeruginosa est une bactérie opportuniste pathogène à l'origine d'infections nosocomiales et communautaires, qu'elles soient endogènes ou exogènes. Elle possède de nombreux facteurs de virulence qui lui confèrent la capacité d'adhérer, de persister dans un milieu défavorable, de sécréter des enzymes et des toxines qui causent des dommages aux tissus, ainsi que la formation de biofilm qui favorise l'adhésion bactérienne et l'évasion immunitaire **(Grosjean *et al.*, 2011 ; Tijani, 2019 ; Wu *et al.*, 2011).**

I.6.2.2. *Acienetobacter baumannii* :

I.6.2.2.1. Caractères bactériologiques :

A. baumannii est un bacille ou coccobacille Gram-négatif, dépourvu de mobilité, de courte longueur et pouvant adopter une forme cocci (=coccoïde). Quelques souches possèdent une capsule, mais elles non sporulées **(Grosjean et al., 2011)**.

Cette bactérie se développe à 37 °C, mais elle peut également croître à 41 et 44 °C sur des milieux solides tels que la gélose nutritive, BCP ou gélose Mac Conkey. A. baumannii

crée des colonies arrondies, lisses et aux bords réguliers, d'un diamètre de 2 à 3 mm **(Grosjean *et al.*, 2011)**.

I.6.2.2.2. Pouvoir pathogène :

A. baumannii est connu pour être à l'origine de diverses infections, principalement nosocomiales, comme les infections du site chirurgical ou les bactériémies **(Grosjean, *et al.*, 2011)**. Il est aussi capable de provoquer des infections de plaies et suppuratives (abcès) dans n'importe quelle partie du corps, y compris les poumons, la peau et les tissus mous **(Wong *et al.*, 2017)** . Ces infections peuvent se propager de manière épidémique, surtout dans les unités de soins intensifs et les services de réanimation **(Grosjean *et al.*, 2011).**

I.6.2.3. Les Entérobactéries :

Il existe plus de 53 genres et plus de 170 espèces au sein de la famille des Enterobacteriaceae. Sur ces 26 genres, une association avec des infections chez l'homme a déjà été établie **(Mlaga *et al.*, 2017)**. On trouve ces micro-organismes en abondance dans l'environnement, notamment dans le sol, l'eau, ainsi que chez les humains et les animaux **(Winn *et al.*, 2006)**. Les entérobactéries représentent le principal groupe de bactéries isolées dans les échantillons cliniques (par ex. le pus) et sont associées à une grande variété d'infections communautaires et hospitalières **(Coque *et al.*, 2008 ; Lutgring et Limbago, 2016)]**. On observe fréquemment les entérobactéries suivantes dans les pathologies humaines :

I.6.2.3.1. *Escherichia coli* :

Escherichia coli est l'espèce type du genre Escherichia, nommée ainsi pour rendre hommage au médecin allemand Theodor Escherich **(Mainil, 2003)**. Il s'agit d'une bactérie commensale présente dans le système digestif des humains et des animaux. Elle constitue à elle seule la plus grande partie de la flore bactérienne aérobie intestinale (espèce aérobie dominante) **(Kaper *et al.*, 2004 ; Dicks *et al.*, 2018).**

I.6.2.3.1.1. Caractères bactériologiques :

E. coli, également appelée colibacille, appartient à la famille des entérobactéries. Il s'agit d'une bactérie fine et allongée aux extrémités arrondies qui est un bacille Gram-négatif, non sporulant et mesurant entre 2 et 4 µ de long pour 0,4 à 0,6 µ de large. Elle est mobile grâce à une ciliature péritriche **(Clave, 2012 ; Oulymata, 2007)**.

Ce germe est aéro-anaérobie facultatif, il peut être cultive facilement in vitro sur des milieux ordinaires comme la gélose nutritive, la gélose Hektoen et le BCP **(Grosjean *et al.*, 2011)**. Sur milieux solides, après une période de 18 à 24 heures, les colonies sont arrondies,

lisses, brillantes et homogènes, avec des bords bien définis et un diamètre variant de 2 à 3 mm **(Clave, 2012 ; Oulymata, 2007)**.

I.6.2.3.1.2. Pouvoir pathogène :

E. coli est composée de clones commensaux ainsi que d'autres agents pathogènes. Bien que les *E. coli* commensaux soient rarement responsables de maladies, elles peuvent le devenir chez les immunodéprimés. Certains clones d'*E. coli* sont adaptées à des niches pathogènes et provoquent une variété de maladies en acquérant des caractéristiques de virulence spécifiques **(Kaper *et al*., 2004)**. Les colibacilles pathogènes sont aussi à l'origine de différentes infections purulentes **(Perrière, 1992)** et d'infections post-opératoires (plaies chirurgicales). Il est possible que toutes ces infections s'accompagnent de bactériémies **(Gadou, 2019 ; Philippe, 2019).**

Le lipopolysaccharide (LPS) est présent uniquement dans la couche externe de la membrane externe des bactéries Gram-négatives et joue plusieurs fonctions biologiques **(Merino *et al*., 2016)**.

I.6.2.3.2. Groupe KES (*Klebsiella, Enterobacter et Serratia*) :

I.6.2.3.2.1. *Klebsiella pneumoniae* :

Le genre *Klebsiella* comporte cinq espèces dont l'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*. Il s'agit d'une bactérie commensale chez l'homme et les animaux, elle est à l'origine d'infections communautaires et nosocomiales, de bactériémies, d'infections au lieu de la chirurgie et d'autres infections chez les patients hospitalisés **(Avril, *et al*., 2000 ; Iliaquer, 2010).** Il est également possible que *K. pneumoniae* soit à responsable d'infections opportunistes **(Seifi *et al*., 2016 ; Ashurst et Dawson, 2021).**

K. pneumoniae se trouve couramment dans la nature et est ubiquitaire, occupant le tube digestif et l'appareil respiratoire de l'homme comme une bactérie commensale. Elle végète sur la peau, les muqueuses, les voies respiratoires supérieures et chez les animaux **Avril *et al*., 2000)**.

I.6.2.3.2.1.1. Caractères bactériologiques :

Les Klebsielles sont des petits bacilles à Gram-négatifs, immobiles, possèdent généralement une capsule. Elles possèdent une culture très facile sur l'ensemble des milieux courants. Sur les milieux classiques d'isolement des entérobactéries (Hektoen, MacConkey), les colonies sont positives au lactose, bombées, muqueuses et parfois filantes à l'aide d'une anse de platine, atteignant un diamètre de 3 à 4 mm **(Sougakoff et Trystram ., 2003).**

I.6.2.3.2.1.2. Pouvoir pathogène :

K. pneumoniae utilise plusieurs facteurs de virulence, y compris le polysaccharide capsulaire, le lipopolysaccharide, les fimbriae de type 1 et type 3, les protéines de membrane externe ainsi que les éléments nécessaires pour l'acquisition du fer et l'exploitation des sources d'azote. *K. pneumoniae* utilise ces facteurs de virulence non seulement pour survivre et esquiver les défenses immunitaires lors de l'infection, mais également dans le processus de formation du biofilm **(Li *et al.*, 2014 ; Murphy et Clegg, 2012)].**

K. pneumoniae a la capacité de produire une dense couche de biofilm extracellulaire qui favorise l'adhésion bactérienne aux surfaces vivantes ou non-vivantes, protégeant la pénétration des antibiotiques et diminuant leurs effets **(Vuotto *et al.*, 2014).**

Ce pathogène est à l'origine d'abcès pulmonaires, de pleurésies purulentes **(Gadou, 2019)**, d'infections chirurgicales (chirurgie digestive) et gynécologiques, d'infections cutanées suppuratives (comme les ulcères), d'infections ostéoarticulaires, ainsi que de bactériémies et de choc endotoxique **(Grosjean *et al.*, 2011)**.

I.6.2.3.2.2. *Enterobacter cloacae :*

Enterobacter cloacae est une espèce type du genre *Enterobacter* qui colonise fréquemment les patients hospitalisés, en particulier ceux sous traitement antibiotique. Elle est responsable d'un large éventail d'infections, telles que la bactériémie, les infections de la peau et des tissus mous, ainsi que diverses suppurations **(Dorsey *et al.*, 2013 ; Mezzatesta *et al.*, 2012).** Cela peut entrainer des épidémies nosocomiales en raison de sa colonisation sur le matériel chirurgical et certaines solutions antiseptiques **(Dickson *et al.*, 2018)**.

E. cloacae est ubiquitaire et peut être découvert sur la peau et les tissus de l'homme, et il est reconnu comme un agent pathogène opportuniste **(Weitz, 2017)**.

I.6.2.3.2.2.1. Caractères bactériologiques :

L'Enterobacter est un bacille aéro-anaérobie facultatif non sporulant de Gram négatif, mesurant généralement entre 0,6 et 1 µm de diamètre et 1,2 et 3 µm de longueur. Il est mobile grâce à ses flagelles péritriches et est doté de pilus de classe 1 **(Hart, 2006)**.

E. cloacae est une bactérie aéro-anaérobie facultative qui peut se développer sur des milieux ordinaires à une température de 37°C. Les colonies présentent un aspect classique des entérobactéries, caractérisé par l'absence de pigments.

I.6.2.3.2.2.2. Pouvoir pathogène :

E. cloacae est parmi les souches bactériennes qui produisent divers facteurs de virulence, tels que les toxines hémolytiques et leucotoxiques ainsi que la cytotoxine membranaire **(Krzymińska *et al.*, 2009 ; Paraje *et al.*, 2005)]**. Cela peut également entraîner une variété d'infections comme les abcès cérébraux, les infections des plaies et les bactériémies **(Gadou, 2019)**.

I.6.2.3.2.3. *Serratia marcescens* :

S. marcescens (espèce type de Serratia) est un agent pathogène opportuniste majeur chez l'homme, Provoquant des infections mortelles telles que la bactériémie **(Mahlen, 2011)**.

On la trouve naturellement dans le sol et l'eau, et elle génère un pigment rouge à température ambiante. Autrefois perçue comme non pathogène, cette espèce s'est transformée en un agent pathogène opportuniste majeur identifié dans les épidémies hospitalières au fil des dernières décennies **(Ghaith *et al.*, 2018)**.

I.6.2.3.2.3.1. Caractères bactériologiques :

S. marcescens est une bactérie à Gram-négatif mobile, sous la forme d'un court bâtonnet bacilliforme **(Slonczewski *et al.*, 2020)**.

C'est un organisme aéro-anaérobie facultatif, réputé pour la pigmentation rouge qu'il génère (attribuable à la prodigiosine). Les colonies mesurent entre 1 et 2 mm de diamètre, sont rondes et présentent des marges opaques. On peut facilement cultiver *S. marcescens* sur des milieux ordinaires tels que la gélose nutritive ou Hektoen à 37°C **(Slonczewski *et al.*, 2020)**.

I.6.2.3.2.3.2. Pouvoir pathogène :

S. marcescens contient une hémolysine, plusieurs protéases et nucléases, ainsi qu'une capsule polysaccharidique **(Anderson *et al.*, 2017)**. Une des caractéristiques notables de ce microbe en tant qu'agent infectieux hospitalier est sa résistance inhérente et acquise à une multitude d'antibiotiques. Un grand nombre d'isolats cliniques de cet organisme portent des marqueurs génétiques chromosomiques et plasmidiques qui spécifient une résistance à une large gamme d'antibiotiques, y compris les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) ou les métallo-bêta-lactamases (MBL) **(Mahlen, 2011)**.

I.6.2.3.3. Groupe PMP (*Proteus, Morganella et Providencia*) :

Les genres de bactéries *Proteus*, *Morganella* et *Providencia* (PMP) font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Actuellement, le genre *Morganella* ne comprend qu'une

seule espèce : *Morganella morganii*. On recense deux espèces dans le genre Providencia : *P. alcalifaciens* et *P. stuartii* **(Leulmi, 2015)**.

Actuellement, le genre Proteus englobe cinq espèces nommées : *P. mirabilis, P. vulgaris* et *P. penneri*, qui sont largement distribués dans l'environnement naturel, notamment dans les eaux polluées et les sols. En plus, deux autres espèces peuvent également être identifiées : *Proteus hauseri* et *Proteus myxofaciens* **(Leulmi, 2015)**.

I.6.2.3.3.1. Caractères bactériologiques :

Les PMP sont des BGN mobiles qui se présentent sous forme de bacilles, ils sont très mobiles, non-capsulés, non sporulés **(Gadou, 2019 ; Leulmi, 2015).**

Les Proteus se cultivent facilement sur des milieux simples à 37°C. La majorité des souches se croissent sur une gélose nutritive et une gélose au sang. Ils envahissent la gélose en créant des vagues concentriques (swarming) ; cette caractéristique est associée à leur capacité de mobilité **(Gadou, 2019)**.

Morganella est aéro-anaérobie facultative (à l'instar de toutes les entérobactéries), se développe sur des milieux ordinaires et forme des grosses colonies sur un milieu solide. Les espèces appartenant au genre *Providencia* sont toutes des aéro-anaérobies facultatives **(Leulmi, 2015)**.

I.6.2.3.3.2. Pouvoir pathogène :

P. mirabilis a la capacité de provoquer variées infections chez l'homme, y compris celles liées aux plaies **(Sullivan *et al.*, 2013 ; Armbruster *et al.*, 2017),** les infections de la peau (comme les abcès) et les infections de l'oreille **(Sbiti *et al.*, 2017)**.

M. morganii est associé aux infections des voies hépato-biliaires, ainsi qu'aux infections de la peau et des tissus mous. Elle provoque des infections opportunistes chez les patients qui ont un immunodéprimé **(Leulmi, 2015)**.

P. stuartii se trouve le plus souvent chez les patients hospitalisés souffrant d'infections urinaires. Cependant, cette bactérie a aussi été isolée dans des plaies, des brûlures et en cas de bactériémie, ce qui indique également de la virulence de cette espèce **(Leulmi, 2015)**

Partie 02 :

Les bactéries thermophiles

I.1. Définition :

Plusieurs propositions de définitions existent pour définir thermophile. Le plus reconnu est celui de Thomas D Brock, un microbiologiste connu pour sa découverte des microbes thermophiles. D'après cette définition, les organismes qualifiés de thermophiles ont une température optimale de croissance qui supérieure à 60°C **(Alain *et al*., 2010).**

Les thermophiles sont définis comme des organismes pouvant se développer à des températures élevées (> 40°C) **(DiGiacomo *et al*., 2022).** Pour ce qui est des thermophiles extrêmes, ils prospèrent à des températures encore supérieures, optimalement à 70°C ou plus **(Straub *et al*., 2018).** Cette capacité à s'épanouir dans des environnements chauds est le résultat d'adaptations moléculaires et cellulaires particulières. Cette dernière définition est intéressante puisqu'elle établit 4 sous-catégories parmi les thermophiles :

- **Les thermophiles modérés :** dont les conditions optimales de croissance se situent entre 55 et 65°C.
- **Les thermophiles extrêmes :** dont la température optimale de croissance est comprise entre 65 et 80°C.
- **Les hyperthermophiles :** dont la température optimale de croissance est supérieure à 80°C.
- **Les hyperthermophiles extrêmes** : dont la température optimale de croissance est supérieure à 105°C **(Alain *et al*., 2010).**

I.2. Phylogénie des thermophiles :

L'analyse de l'ARN ribosomal à travers des études phylogénétiques a révélé l'existence de trois domaines de la vie : Bacteria, Archaea et Eucarya.

Selon nos connaissances actuelles, au sein les eucaryotes, la température maximale de croissance observée est d'environ 50°C pour les plantes et les animaux, de 60°C pour les algues unicellulaires, entre 60-62°C pour les champignons microscopiques et jusqu'à 70°C pour les protozoaires. Il existe un grand nombre d'hyperthermophiles chez les procaryotes, dont de nombreux sont rattachés aux archées. Le microorganisme le plus hyperthermophile connu à ce jour, a la capacité de se reproduire à une température maximale de 113°C et ne peut se développer en dessous de 90°C. On a aussi signalé la croissance d'archées à des températures atteignant même 121 ou 122°C **(Woese *et al*., 1990).**

Les Archaea les plus extrêmes, appartenant aux genres Pyrobaculum, Pyrodictium, Pyrococcus et Methanopyrus, comprennent l'espèce Pyrococcus abyssi ou « la boule de feu

des abysses ». Cette dernière a été isolée dans une cheminée de source hydrothermale à une profondeur de 2000 m au nord du bassin Fidjien dans l'océan Pacifique. Son optimum de croissance se situe à 96°C. Tandis que Thermotoga maritima et Aquifex pyrophilus se développent respectivement à des températures de 90°C et 95°C **(Hickey et Singer, 2004).**

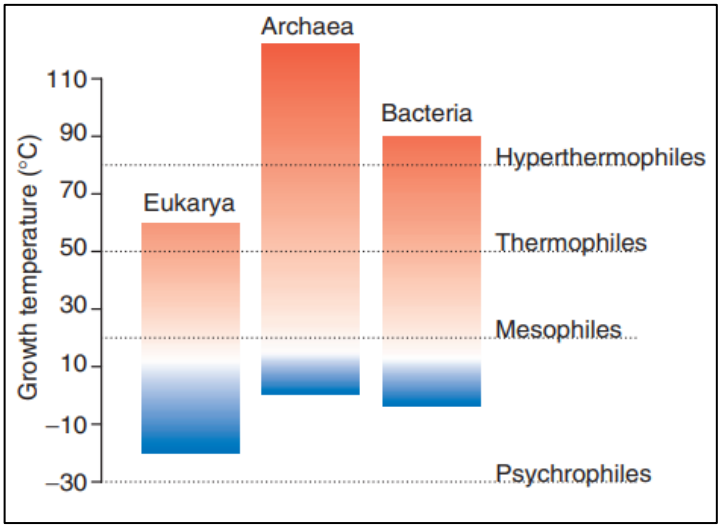


Figure I.6 : La thermophile dans les trois domaines du vivant **(Hickey et Singer, 2004).**

I.3. L'activité antimicrobienne des thermophiles :

L'activité antimicrobienne des thermophiles est intéressant et pertinent dans le domaine de la microbiologie et de la biotechnologie. Les thermophiles sont des micro-organismes qui se développent dans des conditions de chaleur haute, généralement entre 45°C et 80°C, voire au-delà. Plusieurs éléments essentiels attribuent leur capacité antimicrobienne : Métabolites secondaires, Protéines antimicrobiennes, Compétition pour les ressources, Génétique et mécanismes de résistance.

- **Thermocidines :** Un type de peptides antimicrobiens générés par plusieurs espèces thermophiles.
- **Bactériocines :** Protéines produites par des bactéries thermophiles capables d'éliminer ou inhiber la croissance d'autres bactéries.
- **Antibiotiques naturels :** Quelques thermophiles sont capables de produire des antibiotiques uniques qui ne se retrouvent pas chez les mésophiles **(Allouche *et al.*, 2010).**

Plusieurs études ont permis l'isolement et l'identification de bactéries thermophiles dotées d'une activité antimicrobienne notable, provenant de différentes régions géographiques.

En Arabie Saoudite, des isolats issus de sources thermales ont démontré une activité antagoniste marquée contre divers pathogènes humains, notamment *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Shigella flexneri* **(Alrumman *et al.*, 2018).**

En Indonésie, des bactéries thermophiles isolées de sources chaudes situées dans l'ouest de Sumatra ont été identifiées et caractérisées pour leurs composés bioactifs et leur potentiel antimicrobien **(Octarya *et al.*, 2022).** Une autre étude réalisée dans le nord de Sumatra a également mis en évidence des souches thermophiles présentant des propriétés antimicrobiennes prometteuses **(Ginting *et al.*, 2023).**

I.4. Biotechnologie des thermophiles :

Les thermophiles trouvent leur application dans plusieurs processus se déroulant à haute température et touchant divers domaines tels que la chimie, la pharmacie, l'agroalimentaire ou encore la biologie moléculaire.

L'étude des thermophiles est largement guidée par les applications biotechnologiques, deux types différents d'applications peuvent être identifiées. La première s'appuie sur l'usage direct des organismes, tandis que la seconde met l'accent sur leurs biomolécules, y compris les enzymes, les protéines, les lipides, les osmolytes (thermolytes) et une grande diversité de métabolites secondaires.

Les enzymes provenant de microorganismes prélevés dans des sources thermales ont une grande promesse, grâce à leur capacité à demeurer stables à haute température et à leur résistance à la dénaturation en pression, attributs dus à la piézophilie ou à la piézotolérance de leurs hôtes **(Alain *et al.*, 2010).**

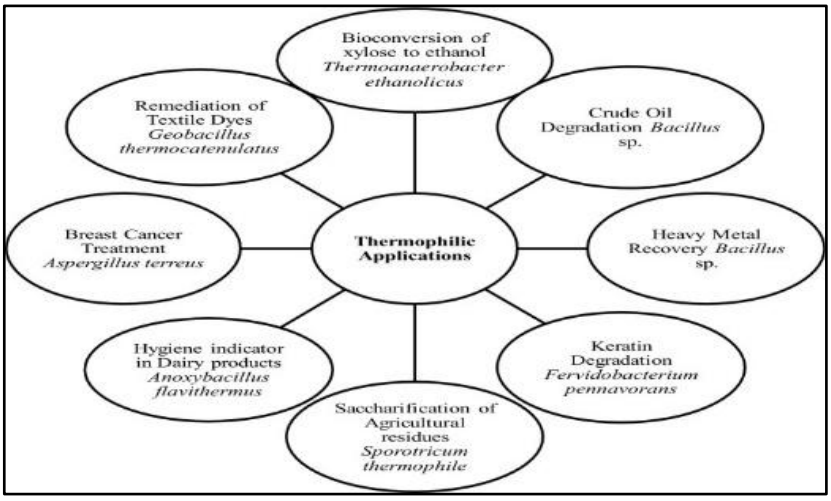


Figure I.7 : Applications Biotechnologie des thermophiles **(Mehta *et al.*, 2016).**

Partie 03 :

Biofilm

I.1. Définition :

Les biofilms sont des groupes de microorganismes confinés dans une matrice de substances polymères extracellulaires (EPS) qu'ils produisent eux-mêmes et qui adhèrent à des surfaces vivantes ou non vivantes (tels que les sols, les sédiments, les minéraux, etc.). Un biofilm peut inclure une ou plusieurs espèces. Il est estimé que 20 à 80 % des micro-organismes présents sur la planète se trouvent sous forme de biofilms **(Yin *et al.*, 2020)**.

La variété des biofilms serait l'un des facteurs essentiels de leur résistance aux agents antimicrobiens et autres attaques **(Singh *et al.*, 2002)**.

I.2. Historique :

Antonie Van Leeuwenhoek (1680) a découvert le biofilm au 17e siècle lorsqu'il a observé, grâce à sa création du microscope, la présence de microorganismes (animalcules) issus d'un échantillon prélevé en grattant ses propres dents (**Roux et Ghigo, 2006**).

Zobell (1943) a démontré que, dans l'environnement marin, le nombre de bactéries adhérant à un substrat dépasse largement celui des bactéries en suspension dans la phase liquide.

Jones (1969), qui a étudié les filtres de station d'épuration, a non seulement confirmé la présence d'agrégats microbiens mono ou polymicrobiens, mais aussi l'existence d'une matrice poly-osidique.

Characklis (1973) prouve que des accumulations microbiennes établies dans les tuyaux d'eau de systèmes industriels semblent résister aux produits désinfectants.

En 1978, Costerton et son équipe ont avancé la théorie des biofilms, suggérant que ce style de vie serait celui adopté par la majorité des microorganismes **(Harold *et al.*, 1997 ; Branger, 2007 ; Givskov *et al.*, 2007).**

En 1983, Christensen et al. Ont démontré pour la première fois que les biofilms bactériens étaient capables de se former sur des dispositifs médicaux, notamment à travers l'observation de Staphylococcus epidermidis sur des cathéters **(Christensen *et al.*, 1982).**

I.3. Composition et organisation du biofilm :

I.3.1. Composition d'un biofilm :

Le biofilm est principalement formé de microorganismes et de la matrice qu'ils produisent. Selon l'espèce concernée, les microorganismes constituent de 2 à 5 % de la matrice du biofilm, tandis que la matrice extracellulaire compte pour 50 à 90 % de la masse organique carbonée du biofilm (**Costerton, 1999 ; Sutherland, 2001 ; Donlan, 2002).**

I.3.1.1. Les microorganismes :

Il n'existe que quelques biofilms qui sont constitués d'un seul type de microorganisme. Ce phénomène est davantage associé aux conditions environnementales qu'à la nature intrinsèque des microorganismes. Tandis que les biofilms naturels sont généralement constitués de plusieurs sortes de microorganismes : bactéries, protozoaires, algues, champignons, chaque groupe réalise des fonctions métaboliques spécifiques **(Branger *et al*., 2007 ; Alnnasouri, 2010).**

I.3.1.2. La matrice :

- L'eau : reste l'élément prédominant du biofilm.
- EPS : composants essentiels du biofilm qui peuvent constituer jusqu'à 85% de sa masse totale.
- Débris de cellules (protéines, acides nucléiques).
- Résidus issus du métabolisme cellulaire.
- Résidus provenant des substances en contact avec les surfaces (produits alimentaires)

(Branger *et al.*, 2007 ; Bellifa, 2014).

I.3.2. Organisation d'un biofilm :

Le biofilm est constitué de regroupements de micro-organismes, qui sont séparés par des « canaux aqueux » facilitant le transport de fluides. Ces canaux favorisent l'approvisionnement en nutriments pour les bactéries tout en permettant l'élimination de leurs déchets de dégradation. Le biofilm n'est pas un milieu uniforme, puisqu'il comporte des zones où la concentration en oxygène ou en nutriments varie (ce qui se traduit par des valeurs de pH distinctes). Les régions centrales des agrégats bactériens sont habituellement anaérobies et déficientes en nutriments, tandis que celles se trouvant à proximité des canaux ou de la frontière entre le biofilm et le liquide présentent une meilleure oxygénation et une plus grande richesse nutritive **(Roux et Ghigo, 2006).**

I.4. Les étapes de formation de Biofilm :

Il semble que les bactéries déclenchent la création d'un biofilm en réaction à une contrainte environnementale (**Annous *et al*., 2009**)**,** comme l'insuffisance en oxygène et en nutriments ou la présence d'un traitement (**Vu *et al*., 2009**).

Les biofilms ont la capacité de se former sur une multitude de surfaces, y compris les tissus organiques, les équipements médicaux ou tout autre élément présent dans le sol ou les environnements aquatiques. On identifie généralement plusieurs étapes de formation du biofilm **(figure I.8) (Talaro, 2008).**

I.4.1. Film de conditionnement ou le film primaire :

La première phase de formation s'effectue en quelques minutes, elle est très brève. Le film est constitué de dépôts de particules provenant du milieu environnant sous forme de matières minérales (sel, glucides, lipides, etc.). Ce dispositif est utilisé pour modifier les propriétés physicochimiques de la surface dans le but de créer un microenvironnement propice à l'adhérence stable des bactéries, ce qui permet d'éviter leur approche **(Squinazi, 2013) ; (Bezoui, 2016)**.

I.4.2. Transport des bactéries vers son support (surface) :

Le transport de microorganismes vers la surface à partir du milieu ou du biofilm en phase de dispersion dépend de plusieurs éléments tels que la nature, les déplacements (sédimentation, mouvement brownien) et l'environnement. Le chimiotactisme, qui est un élément biologique, se définit comme la combinaison des mouvements des flagelles d'une cellule ou des récepteurs spécifiques réactifs aux changements de concentration des nutriments présents **(Bezoui, 2016)**.

I.4.3. Adhésion réversible :

Initialement, les cellules bactériennes en phase planctonique s'associent à une surface biotique ou abiotique soit par l'intermédiaire d'un transport passif (par exemple : sédimentation), soit via un transport qui implique spécifiquement certaines structures de la surface de la bactérie **(Goetz et *al*.,2016).**

Cela entraînera une adhérence réversible associée à un lien faible entre les cellules bactériennes et la surface déclenchée, lorsque les microorganismes atteignent le support à une certaine distance. Ce processus implique des forces non covalentes ou des interactions de faible intensité, telles que les forces de Van der Waals et les liaisons électrostatiques **(Goetz et *al*.,2016).**

I.4.4. Adhésion irréversible :

En seconde étape, grâce à la production d'exo-polymères par les bactéries qui consolide leur attachement au support, l'adhésion devient irréversible **(Branger, 2007).** Dans cette situation, on observe des interactions intenses et de proximité qui se manifestent dès que l'écart devient inférieur à 3 nm. Ces interactions englobent des phénomènes tels que les forces hydrophobes, acido-basiques de Lewis, la création d'un dipôle, les liens covalents ainsi que les interactions hydrogène **(Malek et *al*., 2013).**

I.4.5. Formation de micro-colonies :

Suite au processus d'adhésion, Les bactéries fixées croissent et se reproduisent soit par scission binaire, soit par division inégale. Cela entraîne une multiplication cellulaire et une colonisation de la surface, menant à l'activation de seconds messagers, à la communication entre les cellules et à la sécrétion préliminaire de la matrice EPS **(Guzmán-Soto *et al*., 2021).** Ces EPS ont une importance capitale dans la défense des biofilms face aux agressions extérieures, qu'elles soient de nature mécanique, physique, chimique ou cellulaire, ainsi que dans la fixation des cellules à la surface **(Mogha et *al*., 2014).**

I.4.6. Maturation du biofilm :

Par la suite, une prolifération exponentielle de biofilm entraîne une augmentation bénéfique de son épaisseur, menant à la constitution d'un film hétérogène tridimensionnel **(Costerton et *al*., 1995).** La formation de canaux aqueux est une caractéristique du biofilm mature qui entraîne la dissociation des microorganismes. Cela facilite la distribution d'oxygène et de nutriments aux parties enfouies du biofilm et l'élimination des déchets. Le biofilm se forme et devient macroscopique, à mesure qu'il s'épaissit dans des conditions optimales **(Filloux et Vallet, 2003).**

I.4.7. Dispersion du biofilm :

La phase finale de formation sous l'influence du vieillissement du biofilm. On distingue deux types de dispersion : La dispersion passive se réalise à travers des flux ou les forces de cisaillement, et on distingue trois types qui sont : l'érosion (qui correspond à un détachement localisé des cellules individuelles), le relargage (qui se caractérise par un détachement à grande échelle des bactéries) et l'abrasion (qui résulte de la collision des particules). L'activation de la dispersion est réalisée par les signaux environnementaux (azote, carbone…) cela est réalisé par divers facteurs tels que la physiologie des cellules elles-mêmes et la modification des caractéristiques de surface **(Bezoui, 2016).**

La figure ci-dessous montre les différentes étapes de formation de biofilm :

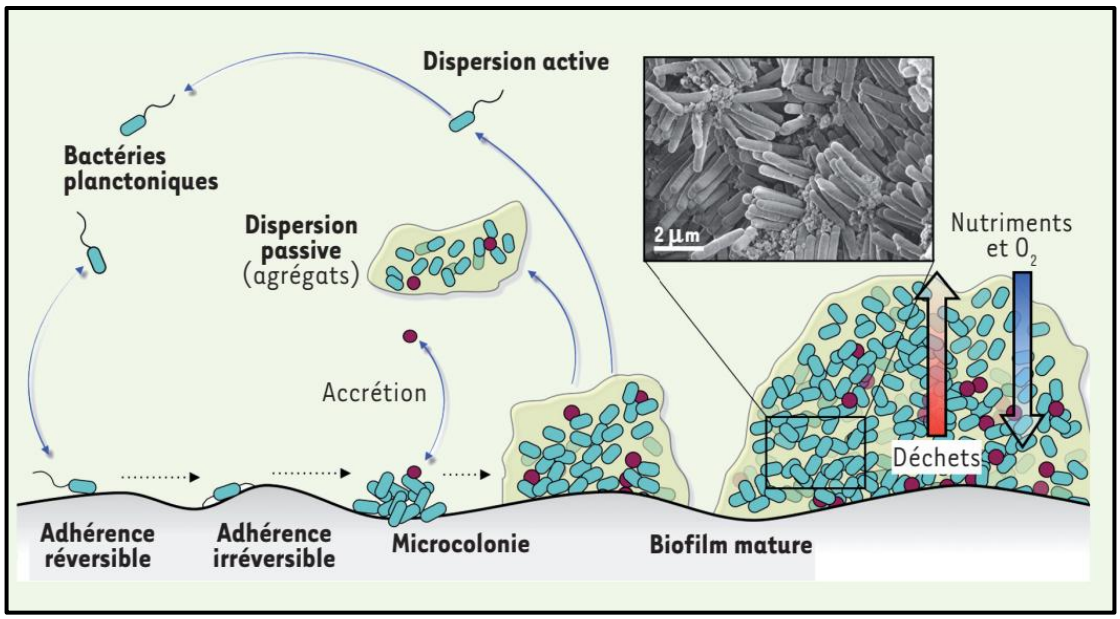


Figure I.8 : Principales étapes de la formation des biofilms **(Lebeaux et Ghigo, 2012).**

I.5. Facteurs qui favorisent la formation du biofilm :

I.5.1. Les caractéristiques du support ou surface :

La rugosité de surface, l'hydrophobicité, la charge de surface et l'existence de films de conditionnement sont des facteurs physicochimiques qui peuvent influencer l'adhérence bactérienne et la vitesse de développement des biofilms sur un substrat. Des recherches ont démontré que plus une surface ou une bactérie présente des caractéristiques hydrophobes, plus l'adhésion est intense. De ce fait, les aspérités des surfaces non vivantes qui encouragent l'adhésion bactérienne et la croissance du biofilm à cause de forces de cisaillement moindres et d'une surface étendue pour l'accrochage des cellules bactériennes sur des surfaces plus inégales. La charge de surface est par la suite affectée par le milieu de culture, l'âge des bactéries, le pH et la force ionique, et varie entre les différentes espèces bactériennes. Enfin, la présence de film de conditionnement est due à l'adsorption de molécules nutritives sur les surfaces des matériaux. Ce processus entraîne des transformations des caractéristiques physicochimiques des surfaces, ce qui influence par la suite l'adhérence bactérienne **(Muhammad *et al*., 2020)**.

I.5.2. Les caractéristiques du milieu :

Le développement et la structuration d'un biofilm requièrent des équipements enzymatiques spécifiques et des structures particulières, dont l'activation est influencée par des éléments environnementaux cruciaux comme les variations de niveaux d'oxygène susceptibles d'influencer la croissance de biofilms sur différentes espèces bactériennes, la température et les conditions de carence en nutriments qui imposent un stress aux micro-

organismes et initient le processus de formation du biofilm. Toutefois, si les niveaux de nutriments restent constamment faibles, les biofilms ne peuvent pas se développer **(Bezoui, 2016) ; (Samrot *et al*., 2021).**

I.5.3. Les caractéristiques de la cellule :

La production d'EPS influence aussi la fixation des cellules bactériennes, tout comme les flagelles, pili, fimbriae et adhérences non-fimbriated qui aident les cellules à établir un premier contact physique avec les substrats. L'hydrophobicité est une autre variable qui contribue à diminuer les forces répulsives entre la surface bactérienne et le substrat de colonisation. Ce facteur est influencé par l'environnement, le rythme de croissance et les différentes espèces bactériennes **(Muhammad *et al*., 2020)**.

<table>
<tr><th>Propriétés du support ou surface</th><th>Propriétés du milieu</th><th>Propriétés des cellules</th></tr>
<tr><td>Texture, rugosité, présence d’aspérités</td><td>Vitesse du flux, présence d’un flux laminaire ou non</td><td>Hydrophobicité de la surface des cellules</td></tr>
<tr><td>Hydrophobicité</td><td>Ph</td><td rowspan="2">Présence de flagelles, fimbriae, pili, …</td></tr>
<tr><td>Présence préalable d’un film protéique recouvrant la surface</td><td>Température</td></tr>
<tr><td rowspan="2"></td><td>*Cations (Ca^{2+}, Na^{2+}, Fe^{3+}…) *[Fer], [nutriments]
*Sources de carbone disponibles *Disponibilité du milieu en oxygène</td><td rowspan="2">Rôle de structures polymériques</td></tr>
<tr><td>Présence d’agents antimicrobiens</td></tr>
</table>

Tableau I.1. Facteurs et propriétés (caractéristiques**)** impliqués dans la formation des biofilms **(Chalvet, 2009).**

I.6.Quorum Sensing :

Durant les dernières années, on a mis en lumière une forme de régulation exceptionnelle chez les bactéries, qui correspond à un mode de communication entre bactéries de la même espèce **(Filloux et Vallet, 2003)** Ce mécanisme, connu sous le nom de quorum sensing, est une communication chimique qui implique la génération, l'émission, la détection et la réaction à de petites molécules analogues aux hormones dénommées auto-inducteurs **(Christopher et Bassler, 2007)**.

Un premier dispositif s'appuie sur des polypeptides pour les bactéries gram-positives, tandis qu'un second est assuré par les N-acylhomosérines lactones (AHL) pour les bactéries gram-négatives **(Seghir *et al*., 2016)**.

I.7. Les méthodes de détection de biofilm :

Il y a plusieurs techniques pour identifier la formation d'un biofilm, telles que : la méthode de Plaque de culture de tissus (TCP), la méthode en Tube (TM), la culture sur milieu rouge Congo (RCA).

I.7.1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) :

La méthode de plaque de culture de tissus (TCP) permet une estimation quantitative de la formation du biofilm **(Bellifa, 2014).**

Des biofilms d'une seule espèce peuvent être cultivés sur des substrats en polystyrène en utilisant des microplaques de 96 puits. Après une culture de 18 heures dans le milieu Bouillon infusion cœur cervelle (BHIB), on procède à l'inoculation des puits d'une microplaque de 96 puits avec des bactéries. Par la suite, les microplaques sont placées en incubation pendant une durée de 24 heures à une température de 37°C. Les puits subissent trois lavages avec une solution de tampon phosphate salin (PBS) **(Figure I.9).** Les biofilms créés par l'attachement des bactéries sessiles sont colorés à l'aide de Cristal Violet (CV) à une concentration de 0,1%. Selon l'interprétation des densités optiques (DO) du biofilm, les bactéries sont catégorisées de la manière suivante : non formatrices du biofilm, formation modérée, fortement à la formatrice du biofilm **(Mathur *et al.*, 2006 ; ; Bellifa, 2014).**

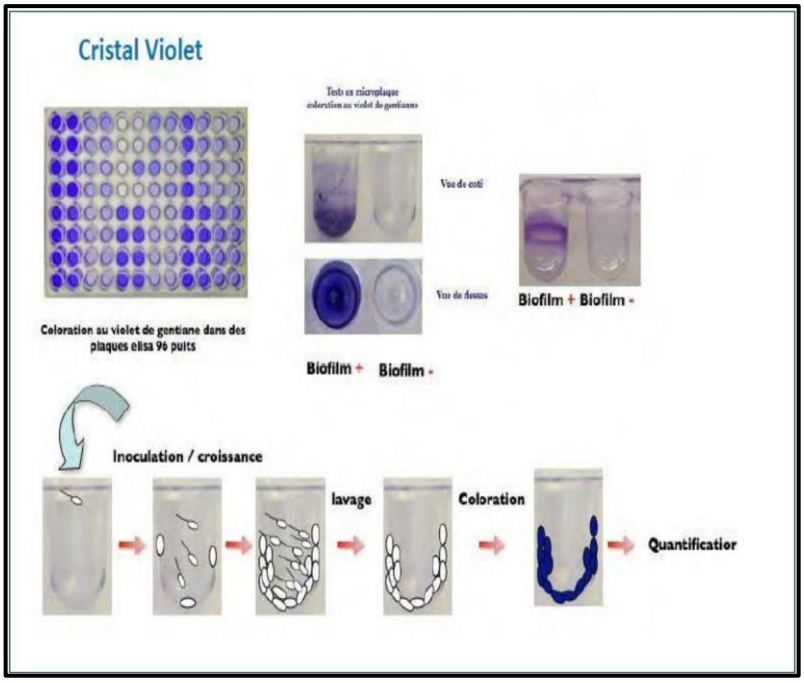


Figure I.9 : Formation de biofilm en microplaque **(Bellifa, 2014)**

I.7.2. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA) :

La gélose Rouge Congo est un milieu plus approprié pour identifier les souches qui produisent du slime **(Nagaveni *et al.*, 2010 ; Kara Turki, 2014) (Figure).** Sur ce substrat,

les souches qui produisent le Polysaccharide Intercellular Adhesion (PIA) forment des colonies de couleur noire, tandis que les souches PIA négatives créent des colonies de teinte rouge. Les souches présentant un phénotype variable génèrent des colonies avec un centre noir et une bordure rouge ou un centre rouge et une bordure noire **(Mathur *et al*., 2006 ; Rewatkar et Wadher, 2013 ; Bellifa, 2014).**

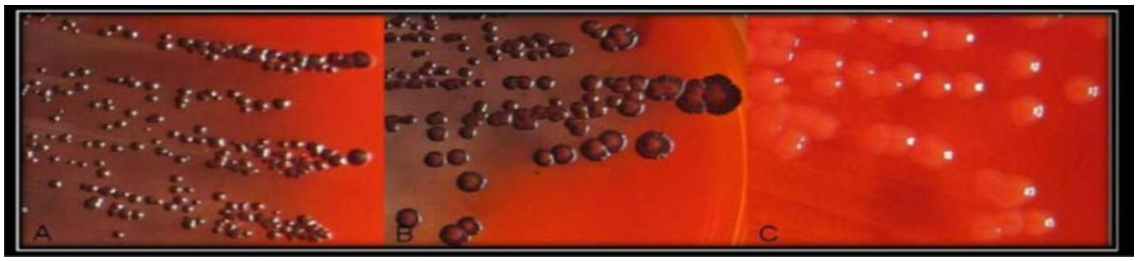


Figure I.10 : Culture sur la gélose Rouge Congo **(Hou *et al*., 2012).**
(A) : RCA-positive souche de *S. epidermidis* (colonies noires), **(B) :** RCA-positive souche de *S. aureus* (colonies noires), **(C) :** RCA-négative souche de *P. aeruginosa* (colonies rouges

Chapitre II :
Matériels et méthodes

II. Matériel et Méthode :

II.1. Matériel :

II.1.1. Verreries :

Erlenmeyer, Bécher, Flacons en verre, Tubes à essai, Pipette pasteur, Lame/ Lamelle.

II.1.2. Appareillage :

Agitateur, Vortex, Balance, Densitomètre, PH-mètre, Bec bunsen, Autoclaves, Etuve, Bain marie, Réfrigérateur, Lecteur de microplaques (Safas monaco MP96).

II.1.3. Milieux de culture :

Thermus Thermophilus Meduim (TTM), bouillon nutritif, Mueller Hinton, BHIB, gélose a la base de rouge Congo,

II.1.4. Autres produits consommables :

Lugol, Fushine, Violet de gentiane, Alcool, Rouge Congo, L'huile de paraffine, L'eau distillé, PBS, Ethanol, Cristal violet 0.1%, Eau physiologique.

II.1.5. Autres matériels :

Entonnoir, Eprouvette graduée, Spatule, Barreau et tige magnétique, Pince, Anse à platine, Eppendorf, embout, Pissette, Micropipette, Boites de pétri, les écouvillons, portoire, Papier aluminium, Verre de montre, Microplaques de titration (96 puits)

II.2. Méthode :

II.2.1. Période et lieu d'étude :

Les travaux de notre partie expérimentale ont été réalisés au niveau du laboratoire EL-CHIFAA Médéa et du laboratoire pédagogique de la faculté des sciences à l'université de Dr Yahia Farès Médéa pendant la période allant de février à mai 2025.

II.2.2. Objectifs d'étude :

- L'isolement et l'identification phénotypique d'une collection des souches bactériennes isolées à partir des pus.
- Identification phénotypique des souches thermophiles isolées à partir des sources hydrothermales
- L'évaluation de l'activité antibactérienne des souches thermophiles vis-à-vis les souches bactériennes isolées à partir des pus selon la technique des cylindres d'agar.
- Evaluation l'aptitude de formation de biofilm.

II.2.2. Collecte des données :

Les données ont été collectées à partir des :

Registres du service pour la période de rétrospective et lors du travail pour la période prospective de niveau laboratoire EL-CHIFAA Médéa.

Pour chaque patiente, nous avons recueilli diverses informations : l'âge, le sexe, la pathologie associée, le site de prélèvement, l'espèce de bactérie, etc.

- Rétrospective pendant 12 mois, du 1er Janvier au 31 Décembre 2024
- Prospective pendant 4 mois, du 1er Janvier au 30 Avril 2025

II.2.3. Prélèvement :

La méthode d'échantillonnage la plus utilisée est celle de l'écouvillonnage **(Lavigne *et al*., 2007)**. Cette méthode implique le passage d'un écouvillon floqué sur une zone de 1 cm^2 de la plaie, en combinant un mouvement en Z à une rotation, avec l'ajout d'eau physiologique.

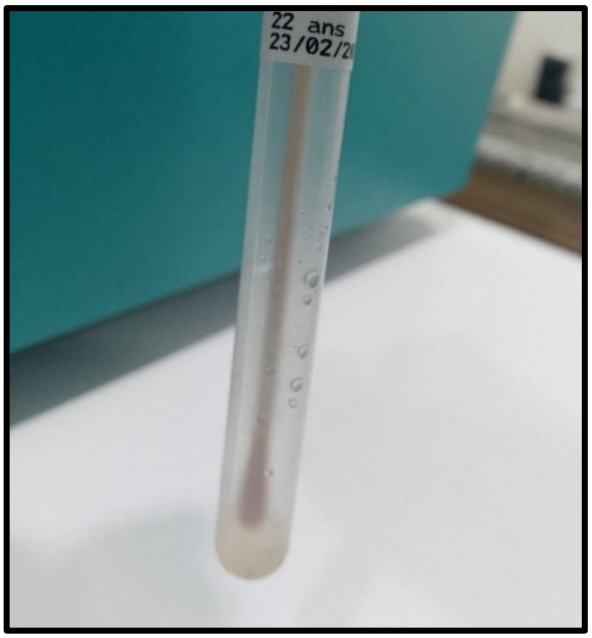


Figure II.1 : Prélèvement de pus par écouvillonnage **(Photo personnelle,2025).**

Les souches ont été identifiées au niveau de laboratoire EL-CHIFAA Médéa.

II.2.4. Isolement et purification des souches bactériennes :

À partir des échantillons recueillis, un isolement de diverses espèces bactériennes présentes, est réalisé sur milieu gélose préalablement coulés en boites de Petri contenant du CHROMagar™ orientation.

L'ensemencement des boîtes est effectué en surface, en stries serrées, puis elles sont incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

Ce milieu chromogène repose sur le principe de la détection d'activités enzymatiques spécifiques exprimées par les différentes espèces bactériennes. Ces enzymes hydrolysent les substrats chromogènes présents dans le milieu, entraînant l'apparition de colorations caractéristiques propres à chaque espèce ou groupe bactérien. Cette différenciation visuelle permet une orientation présomptive rapide des souches isolées.

II.2.5. Identification des souches selon les critères de bergey's :

L'identification des souches a été réalisée selon les critères du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, en tenant compte des caractères morphologiques et biochimiques. Les espèces à Gram négatif ont été référées au Volume 2 (Gammaproteobacteria), tandis que les Gram positifs comme *Staphylococcus* et *Streptococcus* ont été identifiés selon le Volume 3 (Firmicutes) **(Brenner *et al*., 2005 ; De Vos *et al*., 2009).**

II.2.5.1. Examen macroscopique :

L'examen macroscopique des cultures microbiennes, est basé sur la recherche essentiellement des caractéristiques suivantes : la morphologie des colonies (forme et taille), leur transparence ou opacité, la texture de la surface, ainsi que la couleur et l'odeur.

II.2.6. Isolement et identification de *Staphylococcus aureus :*

L'isolement des staphylocoques est effectué sur un milieu Chapman coulé dans une boîte de Pétri au préalable. L'ensemencement, en stries serrées, est réalisé en surface. Les boîtes sont ensuite placées en incubation à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

II.2.6.1. Examen microscopique :

A. Examen après coloration de Gram :

La coloration de Gram est considérée être la méthode de coloration standard en bactériologie. Les bactéries sont classées en Gram-positives ou Gram-négatives selon les caractéristiques structurelles spécifiques de leurs parois cellulaires **(Fauchère et Avril, 2002),** La coloration se réalise en plusieurs étapes :

- Sur une lame de microscope, déposer une goutte d'H2O.
- A l'aide d'une anse stérilisé (passant sous le bec benzène), toucher une colonie pour prélever des bactéries.
- Déposer ce prélèvement au milieu de lame, puis passer la lame dans la petite flamme du bec bunsen pour fixer à la chaleur.
- Déposer quelques gouttes de solution de violer de gentiane (cristal violer) sur le frottis fixé.
- Laisser agir 1 min, puis rincer à l'eau.
- Déposer quelques gouttes de Lugol (un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries) sur le frottis, Laisser agir 1 min et rincer brièvement à l'H2O.
- Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 s). Rincer avec l'eau. L'alcool pénètre dans la bactérie.
- Déposer la fuchsine (ou la safranine) pendant **30 secondes.**
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement 40x puis grossissement 100x avec une goutte d'huile à immersion).

➢ **Lecture :**

Les bactéries à Gram positive apparu avec une coloration violette et les Gram négatif ont une colore rose.

II.2.6.2. Identification biochimique :

A. Recherche de la catalase :

Ce test permet de différencier les **Staphylococcus** (catalase +) des **Streptococcus** (catalase -).

La catalase est une enzyme disposée de décomposer le peroxyde d'hydrogène, produisant ainsi de l'oxygène. Son action directe est mise en évidence au sein de la masse bactérienne. La réaction se fait selon l'équation :

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

Pour effectuer ce test, une colonie d'une culture bactérienne à tester a été émulsionnée sur une lame avec de l'eau oxygénée. La présence de catalase manifeste par apparition d'une mousse manifestant la production de bulles d'oxygène **(Vitolo, 2021).**

B. Recherche de la coagulase en tube :

➢ **Technique :**

L'identification de *Staphylococcus aureus* se fait grâce à la détection de la coagulase. C'est l'unique espèce du genre Staphylococcus qui présente une coagulase.

On prépare une suspension homogène à partir de colonies isolées et identiques sur le milieu Chapman. On mélange alors 1 ml de cette suspension avec 1 ml de plasma humain dans un tube d'hémolyse. Le tube est placé à une température de 37°C pour une incubation et inspecté après un délai de deux heures.

La coagulation se caractérise par la transformation du plasma en une substance solide. Ce test facilite la distinction entre *S. aureus* (Staphylococcus doré) à coagulase positive, *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus epidermidis* (Staphylococcus blanc) à coagulase négative **(Chatane et Ziadi, 2017).**

➢ **Lecture :**

La coagulation se manifeste par la prise en masse du plasma.

II.2.7. Conservation des souches :

Dans notre étude, les isolats confirmés souche bactérienne ont été conservés pour garantir leur stabilité.

Une copie de chaque souche a été placée dans des tubes à essai contenant du bouillon nutritif et est incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. Par la suite, 800 µL de chaque culture ont été aliquotes dans des tubes Eppendorf contenant un bouillon nutritif additionné de 20% de glycérol stérile, et bien homogénéisées les suspensions bactériennes avant d'être stockées puis congelées à une température de -20°C ou supérieure pour conservation long terme.

II.3. Revivification et identification des souches thermophiles :

En 2021, les souches ont été prélevées à partir des sources hydrothermales en Algérie.

II.3.1. Enrichissement et ensemencement :

À partir des souches bactériennes conservées depuis l'année (2021), une quantité a été prélevée à l'aide d'une micropipette et placée dans des tubes Eppendorf contenant 500 µL de TTM liquide **(Annex 1)**, puis incubée dans une étuve à 60°C pendant 24h.

Après 24h, 100 µL des suspensions ont été ensemencées dans des boîtes de pétrie contenant le milieu TTM **(Annex 1)**, puis incubées dans une étuve à 60°C pendant 24h.

II.3.2. Identification phénotypique des souches thermophiles :

Une série d'études à l'échelle macroscopique, microscopique et biochimique a été effectuée sur toutes les souches enrichies en aérobiose.

A. Examen macroscopique :

Pour identifier une souche microbienne, l'étape initiale du diagnostic microbien et du biotypage consiste à observer macroscopiquement des colonies bien isolées. Dans certains cas, cette analyse peut suffire pour identifier le germe en présence, notamment lorsque les colonies présentent des caractéristiques typiques. Les principaux caractères à étudier sont :

- La forme des colonies (rondes, irrégulières, etc.)
- La taille des colonies par la mesure du diamètre
- La couleur de la colonie
- L'élévation (convexe, concave, plate)

- L'opacité (opaque, translucide ou transparente)
- L'aspect de leur surface (lisse, rugueuse, sèche, dentelée, etc.)

B. Examen microscopique après coloration de Gram :(Annex 2)

Repose sur la capacité de différentes bactéries à retenir ou à perdre le colorant cristal violet lors d'un processus de coloration spécifique. Cette technique, mise au point par Hans Christian Gram à la fin du 19e siècle, permet de distinguer deux grands groupes de bactéries: les Gram+ et les Gram-, en fonction de la structure de leur paroi composée de muréine, un peptidoglycane. Chez les bactéries Gram- cette paroi est enveloppée par une membrane externe, tandis que les bactéries Gram+ en sont dépourvues.

II.4. Recherche des activités antimicrobiennes des thermophiles sur milieu solide (technique des cylindres d'agar) :

La méthode des cylindres d'agar a été utilisée afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des souches thermophiles isolées. Cette technique repose sur la diffusion des composés antimicrobiens à partir de cylindres placés sur un milieu gélosé préalablement ensemencé avec des souches bactéries isolées à partir de pus. La présence d'un halo d'inhibition indique une activité antimicrobienne potentielle. Cette méthode a été décrite et utilisée par plusieurs auteurs **(Radhika *et al.*, 2011 ; Kitouni, 2007),** et légèrement modifiée conformément aux recommandations du CLSI (2010).

➢ Technique :

- Cultiver les souches thermophiles sur gélose TTM en stries rapprochées pour obtenir un tapis bactérien.
- Incuber à 60°C pendant 24 - 48 heures.
- Prélever des cylindres d'agar (~6 mm de diamètre) à partir des cultures thermophiles incubées.
- Préparer des boîtes de Pétri contenant 100 ml de Mueller-Hinton mélangés avec 20 ml de suspension bactérienne.
- Déposer délicatement les cylindres d'agar sur la surface des boîtes inoculées.
- Incuber les boîtes à 37°C pour les bactéries pendant 24 à 48 heures.

➢ Lecture :

(+) : Présence d'un halo clair d'inhibition autour du cylindre = activité antimicrobienne positive.

(-) : Absence de zone claire, croissance uniforme jusqu'au bord du cylindre = pas d'activité antimicrobienne.

II.5. La recherche de la capacité de formation de Biofilm :

On a utilisé deux méthodes pour évaluer la capacité des souches à produire du biofilm.

II.5.1. La méthode du Rouge Congo :

La méthode du Rouge Congo est une étude qualitative **(Freeman et *al.*, 1989)**. La gélose Rouge Congo est un milieu très approprié pour identifier les souches qui produisent du slime. Dans ce milieu, les souches qui expriment le PIA (polysaccharide intercellular adhesin) produisent des colonies noires avec un aspect de surface rugueux, tandis que les souches négatives pour PIA donnent des colonies rouges à la surface lisse **(Ziebuhr et *aI*., 2001).**

➢ Technique :

- Préparer la gélose Rouge Congo **(Annex 4).**
- Inoculer une colonie en stries sur la surface d'une boîte de gélose Rouge Congo (RCA).
- Incuber les boites à 37°C pendant 48 heures.

➢ Lecture :

Les souches productrices de biofilm donnent des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices de biofilm.

II.5.2. Méthode de microplaques de titration à 96 puits :

La méthode des microplaques de titration au cristal violet, développée par O'Toole et Kolter (1998), est une technique utilisée pour la formation de biofilms **(Niu et Gilbert, 2004 ; Pierce *et al*., 2008).** Cette méthode permet une évaluation quantitative de la formation de biofilms, car la couleur absorbée est directement liée à la densité du biofilm formé **(Musk *et al*., 2005).** Effectivement, cette technique de coloration propose la possibilité d'observer les cellules qui se fixent à la surface et se colorent en le cristal violet, tandis que les surfaces abiotiques demeurent incolores **(Pratt et Kolter, 1998).**



Figure II.2 : Microplaques de titration (96 puits) **(Photo personnelle,2025).**

➢ Technique

- A partir des colonies isolées, effectuer des cultures d'une nuit dans **BHIB** et incubées dans l'étuve à 37°C.
- Après 24 heures, ajuster le DO des suspensions bactériennes à 0.5 McFarlane (l'équivalent de 108 UFC/ml) à la longueur d'onde 600 nm.
- Inoculer chaque puits de la microplaque de titration (96 puits) avec 200µl de la suspension ajustée.
- Incuber les microplaques à 37°C pendant 24 heures **(Al-Ahmad, 2012)**.
- Laver les microplaques 3 fois par la solution PBS (phosphate-buffered saline pH=7) pour éliminer les cellules bactériennes non adhérentes.
- Sécher les plaques à 60°C pendant 10 min.
- Remplir les puits par le Crystal violet à 0.1% pendant 10 min **(Al-Ahmad, 2012).**
- Laver les microplaques 3 fois par l'eau distillée.
- Laisser les microplaques sécher à 60°C pendant 10 min.
- Introduire dans chaque puit 200µl de l'éthanol et la laisser 15 min.

➢ Lecture :

La lecture de densité optique se fait à l'aide d'un lecteur de microplaques (Safas monaco MP96) à 600 nm **(**Lecteur ELISA**).**

Chapitre III :
Résultats et discussion

III.1. Données épidémiologiques :

III.1.1. Taux de positivité global :

Au niveau du laboratoire EL-CHIFAA Médéa, et sur 186 examens cytobactériologiques de pus (ECBP) demandés durant la période d'étude du 1er janvier 2024 au 30 avril 2025, 97 répondaient aux critères d'infection suppurative, ce qui représente un taux de positivité de 52,2%. Nous observons également que 89 prélèvements sont négatifs, soit 47,8%. **(Figure III.1)**.

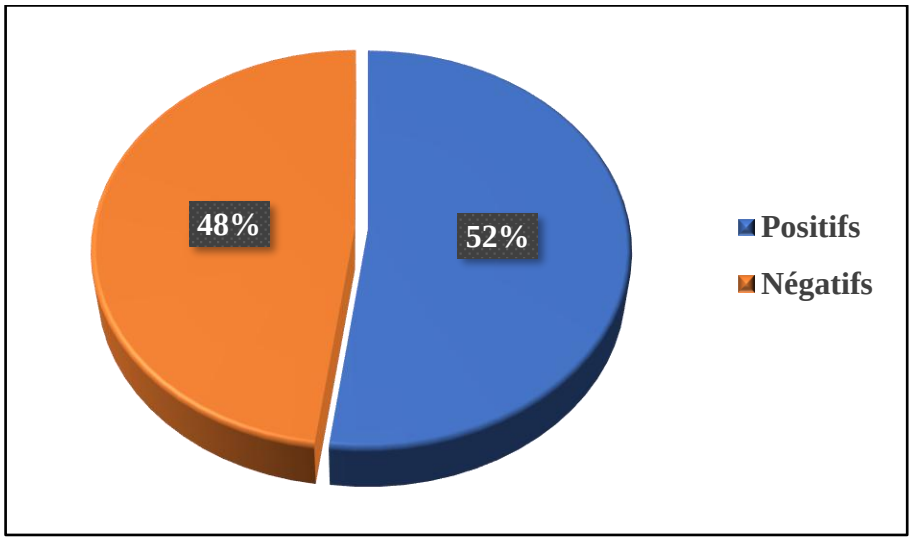


Figure III.1 : Taux de positivité global

Au niveau du laboratoire EL-CHIFAA Médéa, 97 prélèvements se sont révélés positifs à partir de 186 prélèvements de pus réalisés, soit un taux de positivité de 52,2%. Le taux de cultures négatives est de 47,8%.

Nos résultats sont légèrement inférieurs à ceux rapportés par d'autres études régionales et internationales, notamment celle réalisée dans un hôpital universitaire et publié dans l'IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, rapporte un taux de positivité de 60,55 % sur 327 échantillons de pus (**Jadhav., 2021)**. De plus, dans une étude effectuée à Gwalior (Inde) sur 175 patients, le taux de cultures positives était de 58,28 % **(Rajput *et al.*, 2023)**. Une autre étude, **Khanam *et al.*, (2018)**, ont noté un taux de culture positive de 61,8% sur un nombre total de 212 patients.

Notre taux reste comparable à ceux celui rapporté dans certaine autre étude réalisée au département de microbiologie, institut des sciences médicales Vijayanagar, (Inde), qui

rapporte un taux de positivité de 56 % sur 500 échantillons **(Hanumanthappa *et al*., 2016)**, et proche des 52,2 % que nous avons obtenus.

III.1.2. Répartition selon le sexe :

La population étudiée est majoritairement d'hommes soit 107 hommes (57,5%), et 79 femmes (42,5%). (**Figure III.2**).

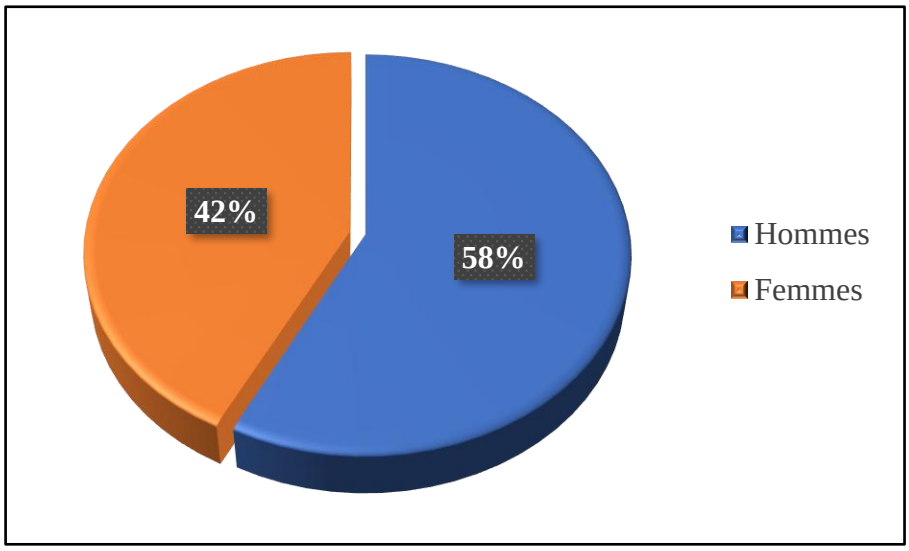


Figure III.2 : Répartition des prélèvements selon le sexe

Dans notre étude, on a noté que parmi les 186 échantillons de pus analysés, 107 proviennent des hommes **(57,5 %)** et 79 proviennent des femmes **(42,5 %)**.

Ces résultats sont similaires à ceux d'une étude réalisée en Inde par **Trojan *et al*. (2016)**, où la majorité des isolats bactériens de pus ont été retrouvés chez les hommes un taux de (60.1%). De même, **Muluye *et al*. (2014)** ont rapporté une prédominance masculine (54,8 %) dans les prélèvements effectués à l'hôpital universitaire de Gondar, en Éthiopie.

III.1.3. Taux des prélèvements positifs selon le sexe :

Sur 97 prélèvements positifs, on a noté une prédominance masculine est observée avec 57 hommes soit une fréquence de 58,8% contre 40 femmes soit une fréquence de 41,2%. **(Figure III.3)**.

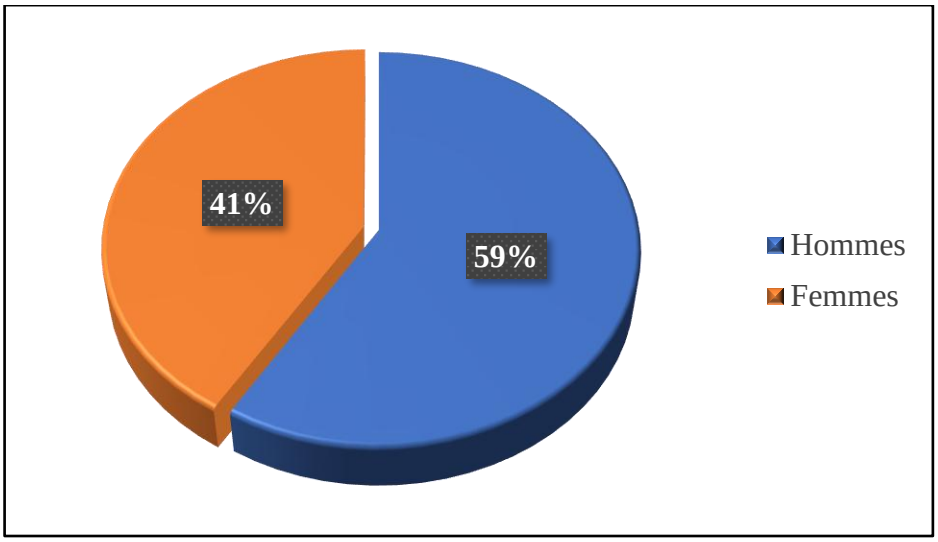


Figure III.3 : Répartition des prélèvements positifs selon le sexe

Dans notre étude, on a observé une prédominance masculine avec une pourcentage de 58,8% contre 41,2% pour les femmes.

Nos résultats sont proches de ceux s'inscrivent dans la tendance observée dans plusieurs études cliniques. En Inde, une étude menée à hôpital tertiaire a mis en évidence que 58,85 % des cas positifs étaient masculins contre 41,15 % de patients féminins **(Gill et Sharma,2019).**

Une autre enquête sud-indienne sur 169 prélèvements positifs rapporte 55,62 % de patients masculins (ratio M/F=1,25) **(Biradar *et al*.2016).**

Enfin, une troisième étude, également en Inde, a relevé une proportion masculine de 58,82 % (ratio M/F=1,43) parmi 102 cultures positives **(Rao *et al*., 2014).** Ainsi, notre sex-ratio (M/F= 1,43) s'aligne étroitement avec ces données et suggère une tendance clinique générale : la prévalence masculine dans les infections suppuratives confirmées par culture.

III.2. Données bactériologiques :

III.2.1. Répartition des principales bactéries isolées :

Parmi 97 cultures positives, nous notons que les prélèvements suppuratifs sont prédominés par *S. aureus* avec un taux de 20,6%, suivi par *P. aerurginosa* (18,6%) et *K. pneumoniae* (18,6%) et *Streptococcus sp* (18,6%). *E. coli* et *Proteus mirabilis* se positionnent respectivement en 5ème et la 6ème place, avec des taux de 14,4% et 9,3%. **(Figure III.4)**

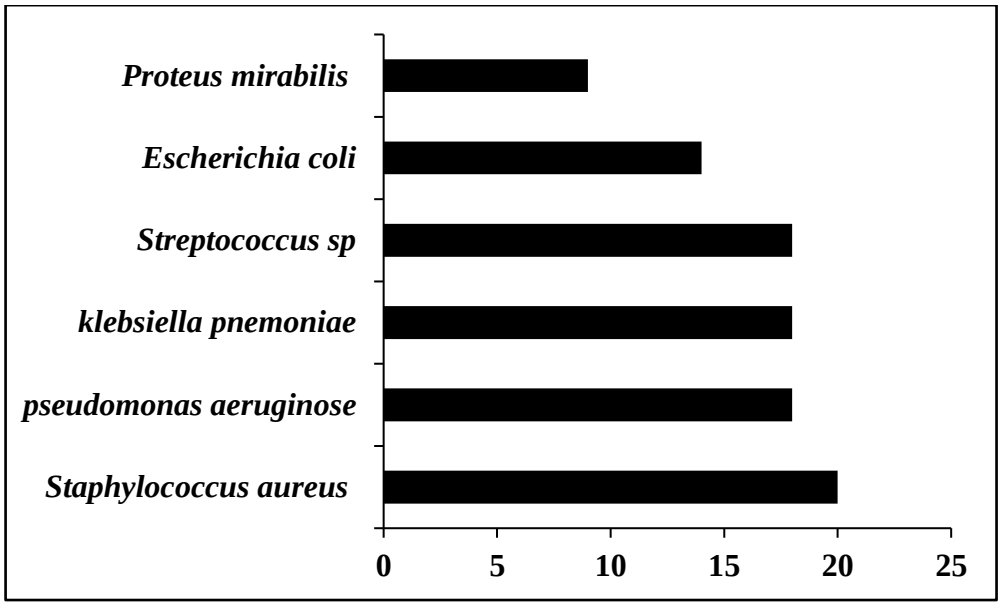


Figure III.4 : Répartition des principales bactéries isolées.

Parmi les 97 cultures positives, *S. aureus* était l'agent prédominant (20,6 %), suivi de *P. aeruginosa, K. pneumoniae* et *Streptococcus spp*. (18,6 % chacun), puis *E. coli* (14,4 %) et *Proteus mirabilis* (9,3 %).

Ces résultats correspondent aux principales tendances relevées dans la littérature. En Arabie saoudite (Riyadh, 2024), *S. aureus* représentait 44,4 % des isolats, avec *E. coli* (13,6 %) et *P. aeruginosa* (12,9 %) **(Khalid *et al*., 2024).**

Une prédominance de bactéries à Gram positif a été observée dans plusieurs études portant sur les infections suppuratives. C'est notamment le cas d'une étude menée entre 2016 et 2020 à l'hôpital public Makour Hamou (Aïn Defla, centre-nord de l'Algérie), qui a rapporté un taux de 66,1 % d'isolats à Gram positif **(Aiza *et al*., 2023).**

Une autre étude menée à Jeddah (2021–2022) retrouve *S. aureus* à 17,1 %, suivi de *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* (13,9 %) et *E. coli* (12,8 %) **(Alharbi et Azzah., 2022).** À la suite. Ces données s'inscrivent dans un cadre comparable à ceux rapportés récemment par **Islam *et al*. (2024)** dans une étude réalisée en Inde au moyen d'analyses de 120 échantillons de pus retrouvés, qui ont identifié *Staphylococcus aureus* (23.07%), *Escherichia coli* (15.39%), *Klebsiella* (15.39%), *Proteus* (15.39%), *Pseudomonas, Enterococci, Citrobacter* et *Enterobacter* (7.69% chacun)**.**

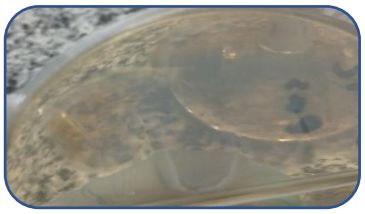
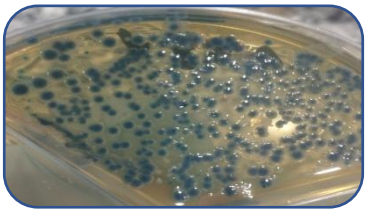
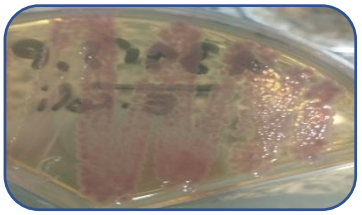
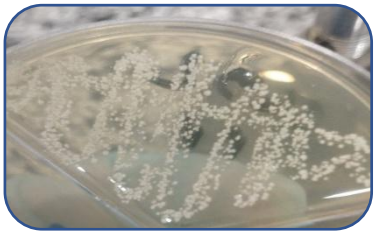
III.3. Identification des souches bactériennes :

III.3.1. L'aspect macroscopique :

Rappelons que, Nous avons employé un milieu CHROMagar™ orientation pour l'isolement et l'identification des souches bactériennes.

Après incubation, l'observation des boîtes de Pétri ensemencées sur le milieu CHROMagar™ Orientation a été réalisée en tenant compte de la couleur, de la taille ainsi que de la morphologie des colonies, conformément aux recommandations du fabricant **(Tableau III.2)**.

Tableau III.2 : Identification des souches bactériennes par CHROMagar™ Orientation

Souches bactériennes	**Nombre d'isolement**	**Souches bactériennes par CHROMagar™ Orientation**	
		Couleur	**Aspect sur gélose**
Pseudomonas aeruginose	3	Translucide, crème et bleu	
Streptococcus sp	1	Petites, translucides à blanches	
Klebsiella pneumoniae	2	Bleu métallique	
Escherichia coli	3	Rose foncé à rougeâtre	
Staphylococcus aureus	2	Doré, opaque et petit	

III.3.2. Identification de *Staphylococcus aureus* :

L'isolement des bactéries du genre Staphylococcus a été mis en culture sur un milieu Chapman. L'identification a été effectuée à l'aide de méthodes traditionnelles (coloration de Gram, test de la catalase et mise en évidence de la coagulase en tube).

III.3.2.1. Aspect macroscopique :

Sur un milieu Chapman, les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent avec leur pigmentation et sont entourées d'un aréole jaune causé par la fermentation du mannitol. Après 24 heures d'incubation à 37°C, ces colonies prennent une forme arrondie avec des bords réguliers de 1 à 2 mm

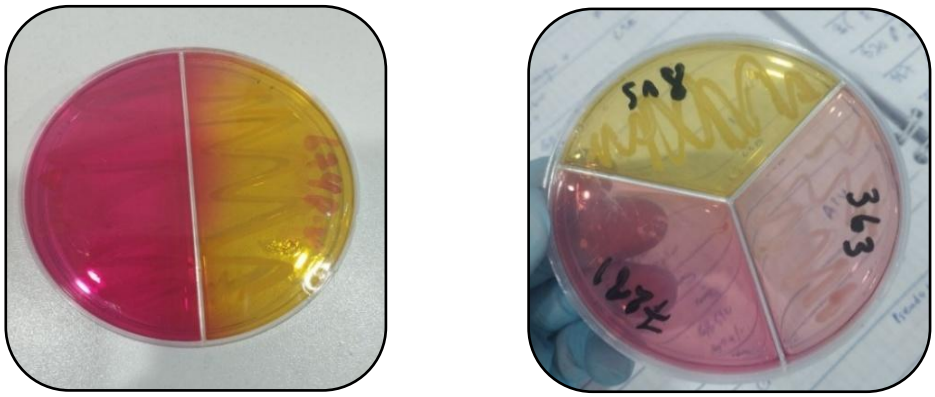


Figure III.5 : Culture de *S. aureus* dans milieu Chapman.

III.3.2.2. Aspect microscopique :

L'examen microscopique après la coloration de Gram de Staphylococcus aureus révèle des Cocci Gram positives, apparaissant en violet et disposées en amas évoquant des grappes de raisin. Cette disposition en amas est caractéristique du genre Staphylococcus.

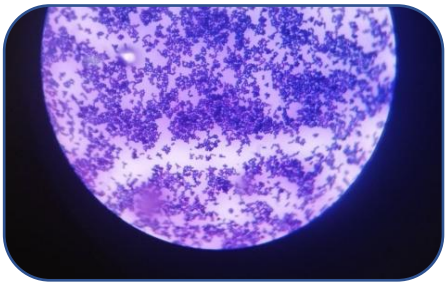


Figure III.6 : Résultat de Gram de *S. aureus* (Gram positive).

III.3.2.3. Résultats de l'identification biochimique :

- **Test de catalase :**

Lorsqu'on ajoute du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur des colonies placées sur une lame, des bulles d'oxygène se manifestent immédiatement (à catalase positive), signalant la présence de l'enzyme catalase qui dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène.

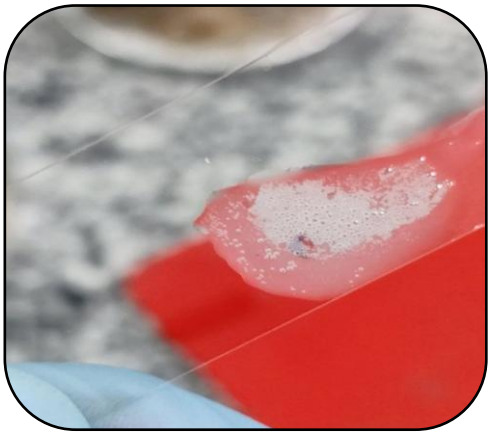


Figure III.7 : Résultat du test catalase (positif).

- **Test de coagulase en tube :**

La mise en évidence de la coagulase libre est constitué un critère essentiel pour différencier les espèces du genre Staphylococcus. Effectivement, c'est seulement l'espèce *S. aureus* qui possède cette enzyme, laquelle a un impact significatif sur la capacité pathogène de la bactérie. Le test repose sur l'utilisation du plasma humain.



Figure III.8 : Résultat de test de la coagulase chez *S. aureus*

III.3.3. Données cliniques et origine des souches isolées :

Un total de 11 souches bactériennes a été isolées à partir de divers prélèvements pathologiques obtenus de patients présentant différentes pathologies.

Le **tableau III.3** présente les espèces isolées, le type de prélèvement, ainsi que les données cliniques associées aux patients (sexe, âge, pathologie, site de prélèvement).

Tableau III.3 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Souches	Espèce	Prélèvement pathologique	Patient			
			Sexe	Age	Pathologie	Site de prélèvement
S1	*Pseudomonas aeruginose*	Pus	Femme	2 ans	/	L'oreille gauche
S2	*Streptococcus sp*	Liquide d'ascite	Femme	70 ans	/	/
S3	*Klebsiella pneumoniae*	Pus	Homme	67 ans	/	Abdomen
S4	*Escherichia coli*	Pus	Femme	31 ans	Sous Levothyrox	Abcès anal
S5	*Klebsiella pneumoniae*	Pus	Homme	61 ans	Diabétique	Pied gauche
S6	*Staphylococcus aureus*	Pus	Femme	58 ans	Diabétique	Abdomen
S7	*Escherichia coli*	Pus	Homme	22 ans	/	Le dos
S8	*Pseudomonas aeruginose*	Pus	Homme	63 ans	/	Pied droite (cheville)
S9	*Pseudomonas aeruginose*	Pus	Homme	34 ans	/	Pied gauche
S10	*Escherichia coli*	Pus	Homme	38 ans	/	/
S11	*Staphylococcus aureus*	Pus	Homme	14 ans	/	Visage

Lors de cette étude, onze souches bactériennes ont été isolées à partir d'échantillons pathologiques, principalement du pus, L'analyse des caractéristiques cliniques et microbiologiques révèle plusieurs tendances intéressantes :

La majorité des prélèvements ont été réalisés sur des patients de sexe masculin (7 hommes, 4 femmes). Les patients avaient un âge compris entre 2 et 70 ans, ce qui indique que les infections purulentes touchent aussi bien les enfants que les personnes âgées.

Deux patients présentaient des facteurs de risque sous-jacents, à savoir le diabète (S5 et S6), et un autre était sous traitement hormonal (Levothyrox) (S4).

Les sites de prélèvement les plus fréquents étaient les membres inférieurs (pied, cheville), suivis de l'abdomen, du dos, du visage, de l'oreille et de la région anale.

Les bactéries les plus fréquemment isolées étaient : *Pseudomonas aeruginosa* (3 cas), *Escherichia coli* (3 cas), *Klebsiella pneumoniae* (2 cas), *Staphylococcus aureus* (2 cas), *Streptococcus sp* (1 cas).

La prédominance des bacilles à Gram négatif (soit 8/11 souches) met en évidence leur rôle majeur dans les infections suppuratives. Ces bactéries opportunistes sont souvent impliquées dans des infections nosocomiales ou associées à des plaies chroniques, en particulier chez les patients à terrain fragile comme les diabétiques.

Les résultats obtenus dans cette étude rejoignent celles rapportées dans plusieurs publications récentes

L'étude menée par **Atlaw *et al.* (2023)** chez des patients atteints d'ulcères du pied diabétique a mis en évidence une prédominance des bacilles à Gram négatif, notamment *Pseudomonas aeruginosa* (18,9 %) et *Escherichia coli* (16,5 %), avec un taux de multirésistance atteignant 92,9 %. Dans notre série, ces deux espèces représentaient également une proportion significative des isolats, en particulier au niveau des membres inférieurs et de l'abdomen, soulignant leur rôle important dans les infections cutanées profondes, notamment chez les patients vulnérables.

Une revue systématique portant sur plus de 4000 isolats issus de plaies infectées dans treize pays africains a montré que *S. aureus* restait le pathogène le plus fréquent (19,9 %), suivi de *P. aeruginosa* (11,8 %). Notre étude montre également la présence de *S. aureus* dans deux cas (S6 et S11), l'un étant diabétique, l'autre présentant une infection au niveau du visage. Cela confirme la prévalence constante de ce germe dans les infections purulentes, qu'elles soient communautaires ou nosocomiales **(Makeri *et al.* 2023).**

III.4. Étude phénotypique des souches thermophiles :

III.4.1. Observation macroscopique :

L'observation des colonies sur milieu solide TTM, après incubation à 60 °C pendant 48 à 72 heures, a permis d'évaluer leurs caractéristiques macroscopiques telles que la forme, l'aspect, la couleur et la taille **(Badis *et al*. 2005).**

Les colonies obtenues sont habituellement de forme ronde ou ovale, grandes ou petites, lisses, bombées, et de couleur jaune ou blanche. Toutefois, une faible diversité a été observée dans leurs aspect macroscopique. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure III.9** et le **tableau III.4**.

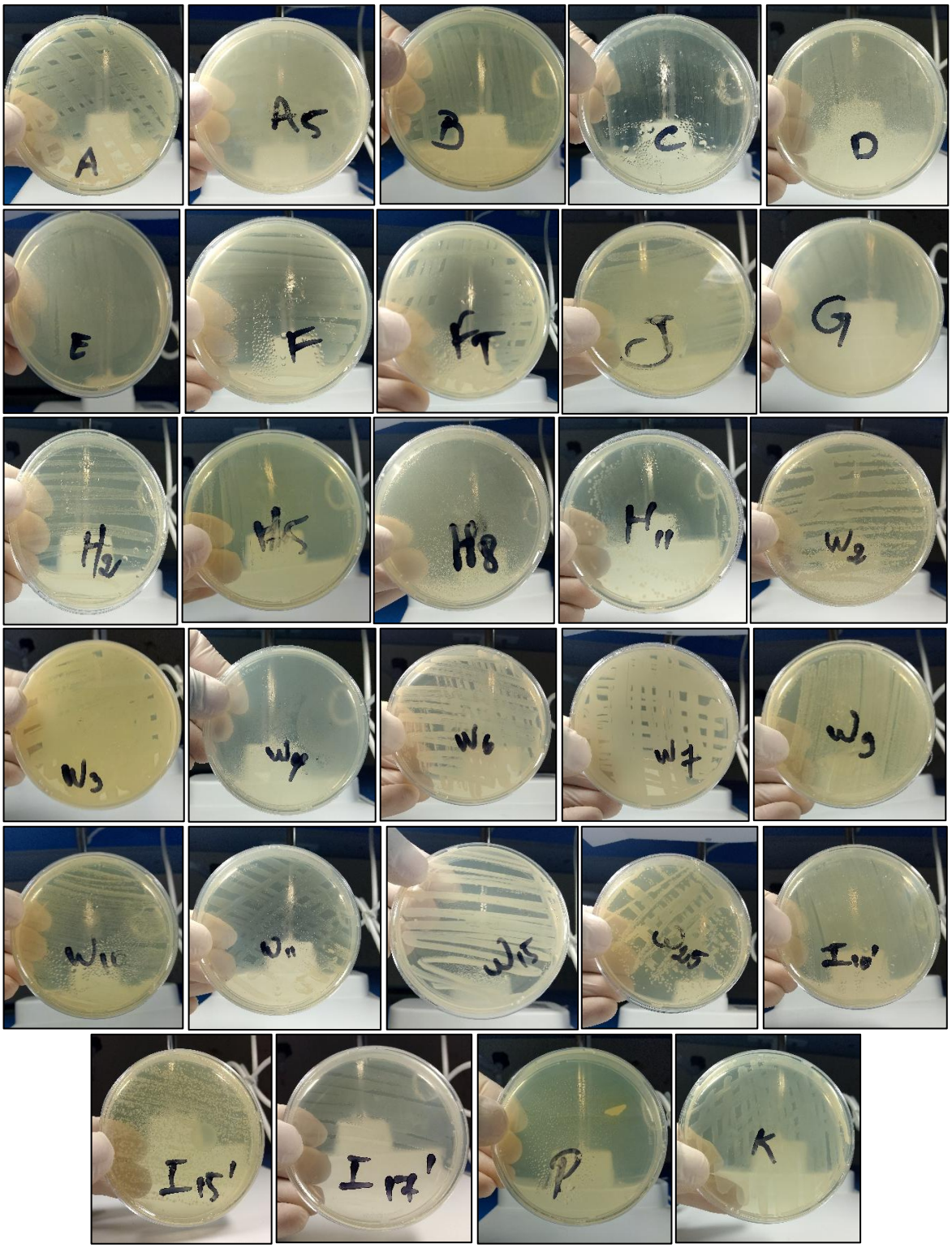


Figure III.9 : L'aspect macroscopique des souches

Tableau III.4 : Observation morphologique des souches

Souches	Forme	Taille	Couleur	Aspect
A	Irrégulier	Moyenne	Jaune	Rugueuse
B	Irrégulier	Moyenne	Blanchâtre	Rugueuse
C	Régulier	Petite	Transparente	Rugueuse
D	Régulier	Petite	Blanchâtre	Rugueuse
E	Régulier	Petite	Jaune	Lisse
F	Régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
Ft	Régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
J	Régulier	Petite	Blanchâtre	Rugueuse
G	Irrégulier	Moyenne	Blanchâtre	Lisse
A5	Régulier	Moyenne	Jaune	Rugueuse
H2	Régulier	Moyenne	Jaune	Lisse
H5	Régulier	Petite	Jaune	Rugueuse
H8	Régulier	Moyenne	Jaune	Lisse
H11	Régulier	Grande	Blanchâtre	Rugueuse
W2	Régulier	Grande	Jaune	Lisse
W3	Irrégulier	Grande	Jaune	Lisse
W4	Régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
W6	Régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
W7	Régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
W9	Ronde	Petite	Jaune	Lisse
W10	Régulier	Petite	Jaune	Rugueuse
W11	Régulier	Petite	Blanchâtre	Lisse
W15	Régulier	Petite	Jaune	Rugueuse
W25	Régulier	Grande	Jaune	Rugueuse
I10	Ronde Régulier	Moyenne	Jaune claire	Lisse
I15'	Régulier	Grande	Jaune	Rugueuse
I17'	Régulier	Moyenne	Blanchâtre	Lisse
P	Régulier	Petite	Jaune	Lisse
K	Régulier	Moyenne	Blanchâtre	Lisse

Après comparaison de l'aspect macroscopique des souches thermophiles avec ce qui a été rapporté lors de leur isolement en 2021, nous avons trouvé des cultures pures avec un aspect macroscopique identique des souches thermophiles revivifiées.

III.4.2. Observation microscopique :

L'observation microscopique a été réalisée sur les souches bactériennes isolées à partir des sources hydrothermales, dans le but de caractériser morphologiques des cellules bactériennes après colorations différentielles de Gram.

Après fixation, les frottis bactériens ont été soumis à une coloration de Gram, ce qui a permis de différencier les bactéries à paroi Gram positive (colorées en violet) des bactéries à paroi Gram négative (colorées en rose). Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure III.10** et le **tableau III.5**.

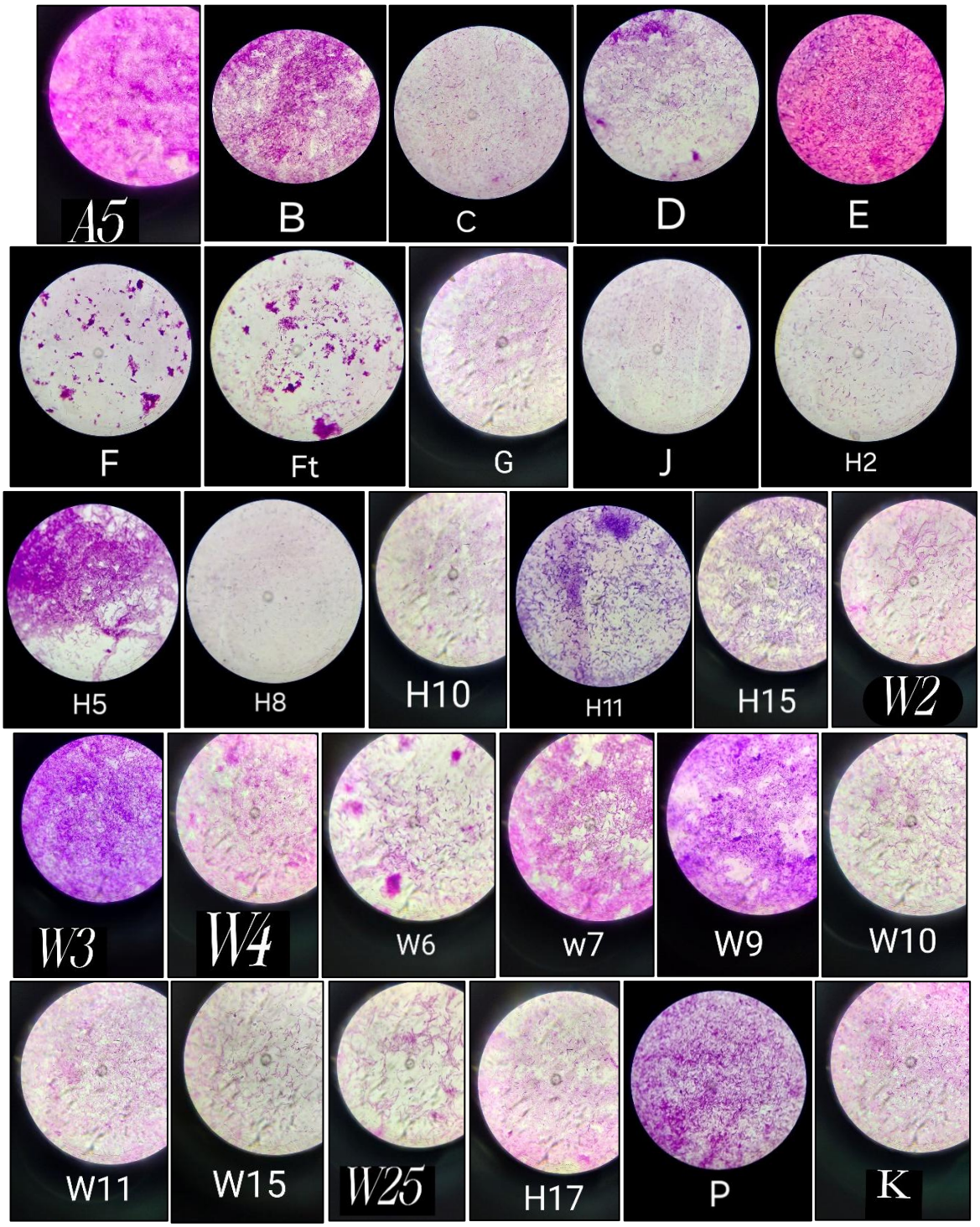


Figure III.10 : Coloration de gram des souches thermophiles sous microscope optique au grossissement X100, X40.

Tableau III.5 : Résultats de coloration de gram.

Souches	Gram	Souches	Gram
A	Positif +	**W3**	Positif +
B	Positif +	**W4**	Positif +
C	Positif +	**W6**	Positif +
D	Positif +	**W7**	Négatif -
E	Positif +	**W9**	Positif +
F	Positif +	**W10**	Positif +
Ft	Positif +	**W11**	Positif +
J	Négatif -	**W15**	Négatif -
G	Positif +	**W25**	Négatif -
A5	Positif +	**I10**	Positif +
H2	Négatif -	**I15**	Positif +
H5	Positif +	**I17**	Positif +
H8	Positif +	**P**	Positif +
H11	Positif +	**K**	Positif +
W2	Négatif -		

L'examen microscopique a révélé les résultats représentés dans le **tableau III.5.** Parmi les 30 souches, 24 sont des bactéries à Gram positif et 6 à Gram négatif. Ces résultats concordent avec ceux trouvés en 2021 confirmant qu'ils s'agissent des souches thermophiles d'intérêt.

La majorité des bactéries isolées des sources thermales en Algérie sont généralement à Gram positif. Une étude similaire a été réalisée par **Larbi, (2015)**, qui a isolé 59 souches bactériennes de différentes sources thermales (Hammam Debagh à Galma, Hammam bouhnifia à Mascar, Hammam Bouhjar à Temouchent, Hammam Rabi à Saida, Hammam Righa à Ain Defla), dont 44 isolats étaient des bacilles Gram positif.

III.4.3. L'activité antimicrobienne des souches thermophiles :

Les résultats de l'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches bactériennes isolées à partir des pus « *Pseudomonas aeruginose*, *Streptococcus sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, et *Staphylococcus aureus* » sont présentés dans la **figure III.11** et **tableau III.6.**

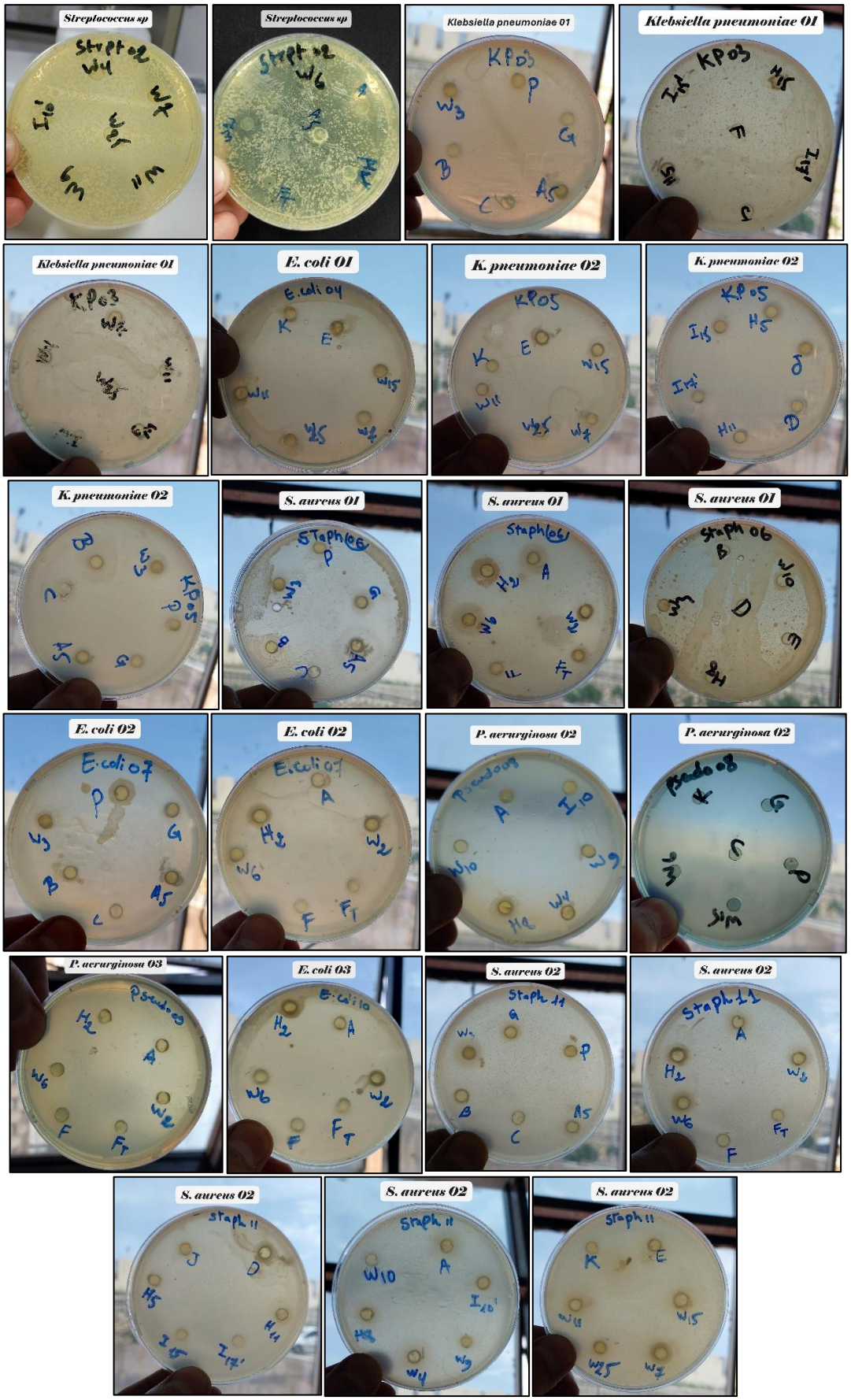


Figure III.11 : L'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches bactérienne

Tableau III.6 : L'activité antimicrobienne des souches thermophiles contre les souches bactérienne

Les souches tests	*P. aerurginosa* 01	*Streptococcus sp*	*K. pneumoniae* 01	*E. coli* 01	*K. pneumoniae* 02	*S. aureus* 01	*E. coli* 02	*P. aerurginosa* 02	*P. aerurginosa* 03	*E. coli* 03	*S. aureus* 02
A	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
B	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
D	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Ft	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A5	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
H2	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
H5	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
H8	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
H11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
W2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W3	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
W4	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
W6	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+
W7	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
W9	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
W10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W11	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
W15	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
W25	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
I10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I15'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I17'	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
P	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+
K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ce tableau met en évidence l'importance de tester diverses souches pour identifier celles qui ont une activité antibactérienne efficace contre des micro-organismes spécifiques.
D'après nos résultats, la capacité à présenter une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* a été détectée chez les souches (A, A5, D, H2, H8: *Paenibacillus spp*, W6, P, et W7:*Bacillus coagulans*), contre *Pseudomonas aeruginosa* chez les souches (F, A5, H8: *Paenibacillus spp.*, A, B, W4:*Paenibacillus panacisoli*, et W6), et contre *K. pneumoniae* chez les souches (W3, W4: *Paenibacillus panacisoli* , W6, W7: *Bacillus coagulans*, W11, et W15: *Brevibacillus brevis*,), ce qui suggère une meilleure efficacité globale contre ce micro-organisme.
La plupart des souches testées n'ont pas montré d'activité antibactérienne contre *E. coli* sauf les souches (H2, W7: *Bacillus coagulans*, W3, W9, W11 et W25) et aucun effet contre *Streptococcus sp* à l'exception des souches (H8 : *Paenibacillus spp*, W2, W15 : *Brevibacillus brevis*, W25 et P).

Cette étude a permis l'isolement de quatre souches bactériennes thermophiles à partir d'une source chaude en Arabie Saoudite, présentant une activité antimicrobienne notable contre plusieurs agents pathogènes testés. L'un des composés bioactifs identifiés est la tabtoxinine-β-lactame, une toxine produite notamment par certaines souches de Pseudomonas. Ce composé, appartenant à la famille des antibiotiques β-lactames, constitue une voie thérapeutique innovante pour le traitement des bactéries à Gram négatif multirésistantes, en particulier celles exprimant des niveaux élevés de β-lactamases, enzymes responsables de la dégradation des antibiotiques **(Alrumman *et al.*, 2019).**

Bien que de nombreuses recherches aient été menées sur les micro-organismes vivant dans des environnements extrêmes, notamment les bactéries thermophiles, il existe très peu d'informations sur leurs métabolites secondaires, en particulier ceux impliqués dans la production de composés antimicrobiens d'origine protéique **(Ojha *et al.*, 2021).**

Les résultats obtenus dans cette étude ont permis d'isoler trois souches bactériennes thermophiles appartenant aux genres Bacillus et Saccharomonospora. Parmi ces isolats, deux souches ont démontré une activité antimicrobienne marquée et stable à une température élevée de 75 °C, ciblant efficacement des pathogènes cliniques tels que *Staphylococcus aureus* (bactérie à Gram positif) et *Escherichia coli* (bactérie à Gram négatif) **(Rafiee *et al.*, 2021).**

Nos résultats concernant l'activité antimicrobienne des souches thermophiles isolées sont cohérents avec plusieurs travaux antérieurs ayant mis en évidence le potentiel antimicrobien des micro-organismes issus d'environnements thermaux. Par exemple, une étude menée par **Abouseoud *et al*. (2008)** sur 30 isolats de Streptomyces provenant des zones thermales du nord de la Jordanie a montré que 20 % des souches présentaient une activité antibactérienne contre E. coli et 26 % contre S. aureus. Bien que notre étude se soit focalisée exclusivement sur des bactéries thermophiles, et non sur des actinobactéries filamenteuses telles que Streptomyces, ces résultats confirment l'intérêt croissant pour les sources thermales comme réservoirs potentiels de microorganismes producteurs de biomolécules à activité antimicrobienne.

Ces observations soulignent le potentiel thérapeutique considérable des bactéries thermophiles, notamment en tant que source de biomolécules actives capables de résister à des conditions physico-chimiques extrêmes, ce qui représente un avantage important pour leur exploitation dans des contextes industriels ou biomédicaux.

III.4.4. L'aptitude de formation de biofilm :

On a testé la capacité des souches isolées à former un biofilm en utilisant deux méthodes : technique de Rouge Congo (RCA) et la technique des microplaques de titration.

III.4.4.1. Technique Rouge Congo :

Les onze souches, ont été testées pour mettre en évidence leurs capacités à former des biofilms par la méthode RCA dont les résultats sont présentés dans la **figure III.12** et **tableau III.7.**

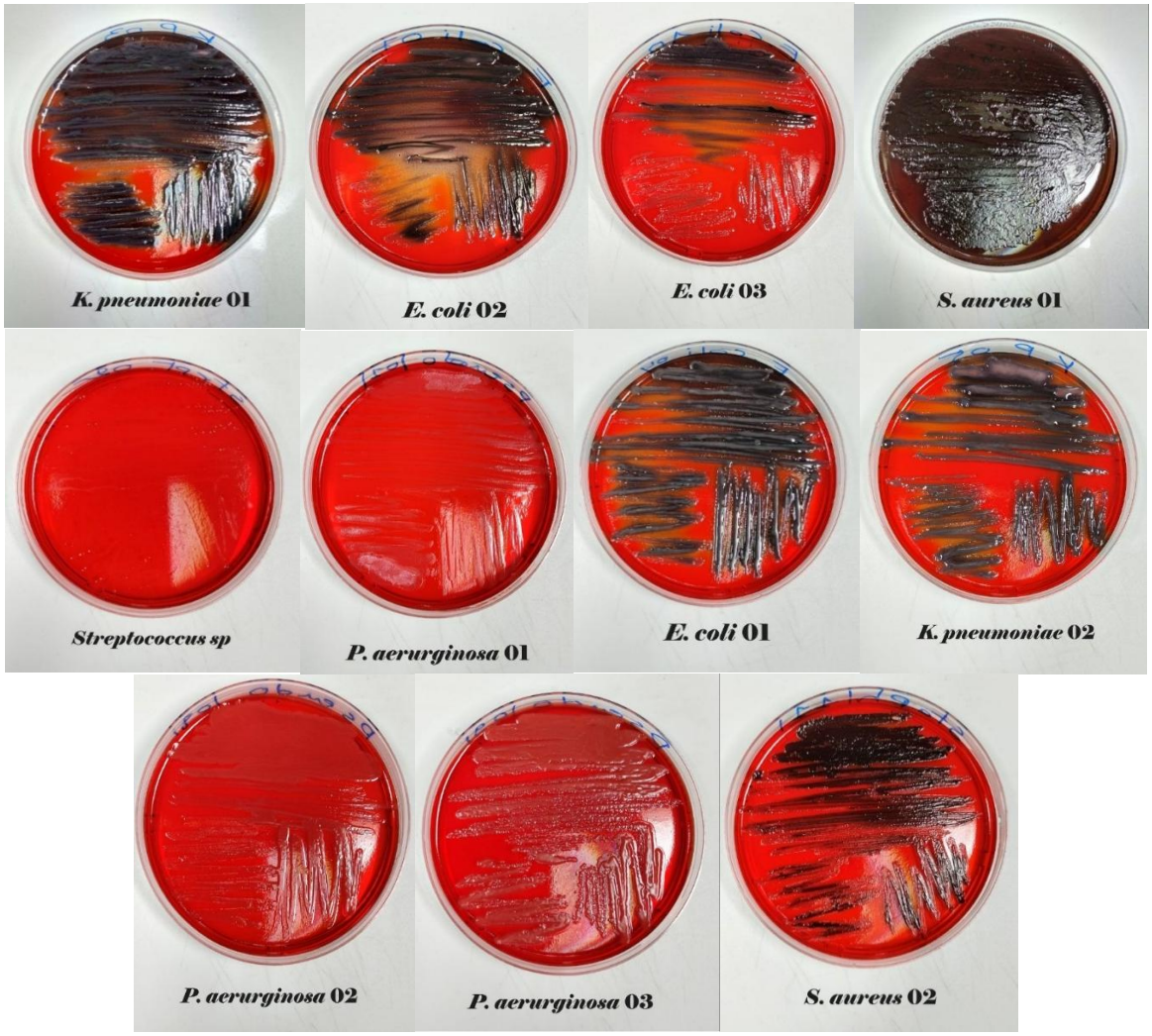


Figure III.12 : La production de slime chez les souches

Tableau III.7 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

Souche	Phénotype (slime)
P. aerurginosa 01	Non formatrice
Streptococcus sp	Non formatrice
K. pneumoniae 01	Formatrice
E. coli 01	Formatrice
K. pneumoniae 02	Formatrice
S. aureus 01	Formatrice
E. coli 02	Formatrice
P. aerurginosa 02	Non formatrice
P. aerurginosa 03	Non formatrice
E. coli 03	Formatrice
S. aureus 02	Formatrice

La recherche de la production de slime sur RCA a révélé, qu'après 24 à 48 heures d'incubation, Sur 11 souches bactériennes, le taux des souches formatrices de slime était de 63.6% soit un nombre de 07 souches ont donné naissance à des colonies noire et sont donc

considérées comme productrices de slime, Tandis que 04 souches non productrices des slime soit un taux de 36.4% ont données des colonies rouges.

Nos résultats concordent partiellement avec ceux de plusieurs études antérieures, **Podbielska *et al.* (2010)** ont rapporté, dans leur étude sur *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* isolés de patients atteints d'ulcères du pied diabétique, que 78 % des souches étaient slime-positives selon la méthode CRA. Ce taux, plus élevé que celui observé dans notre étude, peut s'expliquer par le site d'infection (milieu cutané profond) qui favorise la sélection de souches plus virulentes.

Dans l'étude menée par **Dadawala *et al.* (2010)**, où 86 % des isolats d'*E. coli* présentaient une production significative de biofilm in vitro, confirmant ainsi l'implication fréquente de cette espèce dans les infections associées aux biofilms.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Rajkumar *et al.* (2016)** traitant de l'évaluation phénotypique de la production de slime par la méthode CRA, et qui ont révélé que 94,7 % des souches de *Klebsiella pneumoniae*, 84 % de *Staphylococcus aureus* et 78 % d'*Escherichia coli* étaient productrices de slime, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* était totalement non productrice. Ces proportions concordent parfaitement avec nos résultats, où toutes les souches de *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *E. coli* se sont révélées positives, contrairement à *P. aeruginosa* qui s'est montrée négative dans tous les cas.

L'étude comparative de plusieurs techniques de détection du slime menée par **Sharma *et al.* (2021)** a mis en lumière que la méthode RCA, bien que simple et économique, présente parfois une sensibilité inférieure à celle des techniques comme la méthode en microplaque ou en tube. Cela souligne que notre taux de détection pourrait être sous-estimé par la seule utilisation de RCA, et qu'une combinaison de méthodes phénotypiques serait plus fiable pour caractériser pleinement les capacités de production de biofilm des souches.

III.4.4.2. Technique de microplaque de titration :

Les valeurs seuils pour l'essai de BHIB.

D.O min= 0.336

D.O max=1.008

D.O min= D.O témoin moyen + 3*Ecart type = 0.187+(3* 0.0497)

D.O max= 3. D.O min=3*0.336

Tableau III.8 : Résultats de la technique de microplaque de titration

Souche	D.O moyenne	Formation de biofilm
P. aerurginosa 01	0.866	Moyennement
Streptococcus sp	1.049	Fortement
K. pneumoniae 01	0.470	Moyennement
E. coli 01	0.744	Moyennement
K. pneumoniae 02	0.717	Moyennement
S. aureus 01	0.693	Moyennement
E. coli 02	0.366	Moyennement
P. aerurginosa 02	0.520	Moyennement
P. aerurginosa 03	0.628	Moyennement
E. coli 03	0.483	Moyennement
S. aureus 02	0.885	Moyennement

Les valeurs de densité optique (D.O) ont été mesurées à 600 nm, et les seuils ont été calculés selon la formule de **Stepanović *et al*. (2000)** :

D.O témoin moyen = 0,187

Écart type = 0,0497

D.O min = 0,187 + (3 × 0,0497) = 0,336

D.O max = 3 × 0,336 = 1,008

Sur cette base :

D.O < 0,336 : correspondent aux souches non productrices de biofilm

0,336 ≤ D.O < 1,008 : les souches modérément productrices de Biofilm

D.O ≥ 1,008 : correspondent aux souches fortement productrices de Biofilm

Les résultats obtenus, suivant une approche qualitative, ont permis de mettre en évidence la capacité des souches à former des Biofilms en microplaques à 96 puits après culture en BHIB.

Dix souches ont montré une formation modérée de biofilm. Une souche (*Streptococcus sp*) a montré une formation forte de biofilm (D.O = 1,049).

Les espèces *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. aureus* ont présenté un comportement similaire avec des valeurs comprises entre 0,366 et 0,885.

Les résultats obtenus sont globalement cohérents avec plusieurs travaux récents sur la formation de biofilm par des bactéries pathogènes :

Dans l'étude d'**Abarna *et al*. (2017),** 50 prélèvements de plaies chroniques ont été analysés, révélant que 60,3 % des isolats (38 sur 63) étaient positifs à la formation de biofilm selon la méthode de microplaques (TCP) Cette prévalence élevée confirme que le biofilm est un facteur majeur dans la chronicité des infections, et s'aligne avec vos résultats où une souche (*Streptococcus sp*) a montré une capacité poussée à former un biofilm (D.O = 1.049)

L'étude menée par **Vuotto et al. (2017)** ont mis en évidence que les souches de *K. pneumoniae* peuvent former des biofilms modérés à forts selon l'origine de l'isolement. Dans notre série, les deux souches de *K. pneumoniae* présentent une formation modérée, ce qui pourrait s'expliquer par l'environnement spécifique (pus) ou la variabilité génétique entre les souches.

Cette étude de référence, qui décrit la méthode de microplaque utilisée ici, précise que les souches de *P. aeruginosa* et *E. coli* présentent généralement une formation intermédiaire à forte de biofilm. Nos résultats montrent que les trois souches de *P. aeruginosa* et trois *d'E. coli* sont moyennement adhérentes, ce qui confirme leur capacité modérée mais persistante à coloniser les surfaces inertes **(Stepanović *et al*. 2007)**.

Conclusion

Conclusion

En conclusion, Les infections suppuratives représentent un problème de santé publique majeur en raison de la diversité des agents pathogènes impliqués et de leur résistance croissante aux antibiotiques. Dans cette étude, un total de 186 prélèvements de pus a été analysé, parmi lesquels 97 se sont révélés positifs, soit un taux de positivité de 52,2 %. L'isolement et l'identification des souches ont permis de mettre en évidence une prédominance de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*.

Onze souches bactériennes isolées ont été soumises à une évaluation approfondie de leur capacité à former des biofilms, ainsi qu'à des tests d'inhibition par des agents antimicrobiens. Les résultats ont montré que 63,6 % des souches étaient capables de produire du slime selon la méthode au rouge Congo, avec une forte concordance avec la littérature. Par ailleurs, la méthode de titration en microplaque a confirmé le potentiel de formation de biofilm chez plusieurs souches, notamment celles appartenant à *K. pneumoniae*, *E. coli* et *S. aureus*.

Une évaluation complémentaire de l'activité antimicrobienne de souches thermophiles, isolées de différentes sources chaudes, a révélé un potentiel inhibiteur intéressant contre des souches pathogènes cliniques. Certaines souches ont démontré une efficacité notable, en particulier contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, suggérant un intérêt thérapeutique pour la découverte de nouveaux composés bioactifs.

En somme, cette étude met en évidence l'importance de la surveillance microbiologique des infections purulentes et l'intérêt de l'exploration de souches environnementales, notamment thermophiles, comme source prometteuse de biomolécules antimicrobiennes capables de faire face aux souches multirésistantes. Ces résultats ouvrent des perspectives pour des recherches appliquées dans le domaine biomédical et pharmaceutique.

À l'avenir, il serait opportun de compléter le présent travail par des études plus approfondies, notamment :

- **Identifier la nature des composés actifs** responsables de l'activité antimicrobienne des souches thermophiles, à l'aide de techniques de séparation et d'analyse telles que la HPLC ou la spectrométrie de masse.

- **Optimiser les conditions de production** des composés antimicrobiens par les bactéries thermophiles (température, milieu de culture, durée d'incubation, pH…).
- **Étudier l'effet de ces composés dans des conditions biologiques complexes** (biofilms matures, modèles animaux…) afin d'évaluer leur efficacité dans un contexte plus proche des situations cliniques réelles.
- **Analyser les mécanismes moléculaires** d'inhibition du biofilm par les composés thermophiles, notamment par l'étude de l'expression génique des bactéries cibles.
- **Réaliser des études comparatives** avec les antibiotiques conventionnels, en vue d'évaluer l'efficacité relative et les éventuels effets synergiques.

Références bibliographique

A

- **Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, s, & Nabi, A. (2008).** Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by Pseudomonas fluorescens. *Desalination*, *223*, 143-151. https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.01.198

- **Afshan, N., & Shahid, M. (2013).** Isolation of Gram Positive and Gram Negative Organisms from Pus Samples : One Center Study. 4, 3.

- **Aiza, A., Kaidi, R., Ahmed, M., & Khiati, B. (2023).** Bacteriological Profile and Antibiotic Resistance Patterns of Pus/Wound Samples in Humans with Infected Wounds in North Central Algeria. Journal of Pure and Applied Microbiology, 17(3), 1628–1640. https://doi.org/10.22207/jpam.17.3.24

- **Alain, K., Geslin, C., Godfroy, A., Prieur, D. (2010).** Les thermophiles. [En ligne]

- **Alharbi, & A. S. (2022).** Bacteriological profile of wound swab and their antibiogram pattern in a tertiary care hospital, Saudi Arabia. Saudi Medical Journal, 43(12), 1373–1382. https://doi.org/10.15537/smj.2022.43.12.20220681

- **Allouche, F. N., Hellal, A., & Laraba, A. (2010).** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Revue Nature et Technologie*, *2*(2), 13-20.

- **Alnnasouri, M. (2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France

- **Alrumman, S. A., Mostafa, Y. S., Al-Qahtani, S. T. S., Sahlabji, T., & Taha, T. H. (2019).** Antimicrobial Activity and GC-MS Analysis of Bioactive Constituents of Thermophilic Bacteria Isolated from Saudi Hot Springs. *Arabian Journal for Science and Engineering*, *44*(1), 75-85. https://doi.org/10.1007/s13369-018-3597-0

- **Anderson, M., Mitchell, L., Zhao, L. & Mobley, H., 2017.** Capsule production and glucose metabolism dictate fitness during Serratia marcescens bacteremia. mBio 8:e00740-17.

- **Annous, B., Fratamico, P. et Smith, J. L. (2009), —**Quorum sensing in biofilms : why bacteria behave the way they do‖, *Journal of Food Science*, Vol.74 No. 1, pp. 24–37.

- **Armbruster, C. E., Prenovost, K., Mobley, H. L. & Mody, L., 2017**. How Often Do Clinically Diagnosed Catheter-Associated Urinary Tract Infections in Nursing Homes Meet Standardized Criteria?. Journal of the American Geriatrics Society,. 65(2), p. 395–401.

- **Ashurst, J. V. & Dawson, A., 2021.** Klebsiella Pneumonia. In StatPearls. StatPearls Publishing.

- **Atlaw, A., Kebede, H. B., Abdela, A. A., & Woldeamanuel, Y. (2022).** Bacterial isolates from diabetic foot ulcers and their antimicrobial resistance profile from selected hospitals in Addis Ababa, Ethiopia. *Frontiers in Endocrinology*, *13*, 987487.

- **Aubry, . p. & gaüzére, b., 2022.** Infections à staphylocoques actualités 2022. *Médecine tropicale.*

- **Avril, J.-L., Dabernat, H., Denis, F. & et al., 2000.** *Bactériologie Clinique. Ellipses.*. 3ème Edition éd. s.l.:s.n.

B

- **Bagnoli, F., Rappuoli, R. & Grandi, G., 2018.** Staphylococcus aureus: microbiology, pathology, immunology, therapy and prophylaxis. Volume Vol. 409.

- **Barbier, F., 2015.** Staphylocoques à coagulase négative: quand, comment et pourquoi sont-ils responsables d'infections?.. *Journal des Anti-infectieux,*, 17(1), pp. : 15-19.

- **Bassetti, M. et al., 2018.** How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. *DrugsContext.*

- **Bassetti, M. et al., 2018.** How to manage Pseudomonas aeruginosa infections. DrugsContext.. *DrugsContext.*.

- **Bassole, I. (2014).** Profil bacteriologique des suppurations postoperatoires dans les services de chirurgie digestive et de chirurgie traumatologique du centre hospitalier universitaire Yalgodo Ouedraogo (CHU-YO), Burkina Faso.

- **Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiellapneumoniae*isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université aboubekrbelkaid, Tlemcen.

- **Bergon, L., 2016.** *S. capitis, S. caprae et S. lugdunensis: rôle dans les infections ostéo-articulaires et impact du biofilm sur la sensibilité aux antibiothiques (thèse dedoctorat, Université Toulouse lll-Paul Sabatier).*. s.l.:s.n.

- **Berthe B. et al,(2018).**Programme interprofessionnel de prévention et de soins de la peau et des plaies. ISBN : 978-2-550-82695-8.

- **Bertolus, C. H. (2011).** Cellulite cervico-faciale. Urgences 2011; Chapitre, 52.

- **Bezoui M. (2016).** Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine *(Thèse de Doctorat en pharmacie).Universite mohammed v-rabat*

- **Biradar, A., Farooqui, F., Prakash, R., Khaqri, S. Y., & Itagi, I. (2016).** Aerobic bacteriological profile with antibiogram of pus isolates. Indian journal of microbiology research, 3(3), 245-249.

- **Branger A. (2007)**. Microbiochimie et alimentation ; 343-345.

- **Branger A**., **Richer M-M**., **Roustel S**. (2007). Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon. p.131-164.

- **Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.R. & Garrity G.M. (2005).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria***. 2nd edition. Springer, New York.**

C

- **Cahn, A., & Y, K. (2014).** A novel approach to the treatment of diabetic foot abscesses - a case series. Journal of wound care, 23(8) : 394–399

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

- **Chalvet de Rochemonteix A. (2009).** Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat. École Nationale Vétérinaire D'Alfort Paris

- **Chandesris, M. O., Schleinitz, N., Gayet, S., Bernit, E., Crebassa, C., Veit, V., & Kaplanski, G. (2005).** Abcès profonds à germes anaérobies de localisation inhabituelle: à propos de cinq cas. La revue de médecine interne, 26(7) : 534-540.

- **Chatane I et Ziadi Ch. (2017).** Analyse phénotypique et quantitatification de la formation de biofilm par les bactéries d'intérêt médical. Thèse de Master. Université Frères Mentouri, Constantine.

- **Christensen G. D., Simpson W. A., Bisno A. L. et Beachy E. H. (1982).** Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smoth surface. *Infection and Immunity, 37, 318-326.*

- **Christopher M-Waters., Bonnie L-Bassler (2007).** Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 21 : 319–46

- **Clark, N. M, Zhanel, G. G & Lynch, J. P., 3rd, 2016**. *Emergence of antimicrobial resistance among Acinetobacter species: a global threat. Current opinion in critical care, 22(5) : 491–499..*

- **Clave, D., 2012.** Fiche technique : Escherichia coli. Centre Toulousain pour le Contrôle dequalité en Biologie clinique.. Volume 123 , pp. 8-543.

- **Coque,, T. M., Baquero,, F. & Canton, R., 2008**. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. Eurosurveillance,. 13(47), p. 19044.

- **Costerton J.W. (1999).** Introduction to biofilm. *International journal of Antimicrobial Agents.* 11 :217-721

- **Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995).** MICROBIAL BIOFILMS. *Annual Review of Microbiology*, *49*(1), 711-745. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431

𝒟

- **Dadawala, A. I., Chauhan, H. C., Patel, S. S., Singh, K., Rathod, P. H., & Shah, N. M. (2010).** Assessment of Escherichia coli isolates for in vitro biofilm production. *Veterinary World*, *3*(8), 364.
- **Daffe, F. M., 2018.** Surveillance de la résistance aux antimicrobiens des souches de Klebsiella Pneumoniae isolées au Laboratoire Rodolphe Mérieux De 2016 A 2017 au Mali (thèse de doctorat, These Bamako: Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako)..
- **David Brunato.(2005)** Les cellulites d'origine dentaire: classification, étiologie, bactériologie et traitement, illustrations cliniques. Sciences du Vivant [q-bio] hal-01733617. pp 5-28
- **David Lebeaux ; Jean-Marc Ghigo** (2012) : Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale, Institut Pasteur, Unité de Génétique des Biofilms, Département de Microbiologie, m/s n° 8-9, vol. 28.
- **De Vos P. et al. (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Three: The Firmicutes*. **2nd edition. Springer, New York.**
- **Dealey, C. (2005).** The care of wounds : A guide for nurses (3rd ed). Blackwell.
- **Dicks, L. M. T. et al., 2018.** Our gut microbiota: a long walk to homeostasis. Beneficial microbes,. 9(1), pp. 3-20..
- **Dickson, A. et al., 2018.** Possible pseudotransmission of Enterobacter cloacae associated with an endobronchial ultrasound scope. American journal of infection control,. 46(11), pp. 1296-1298..
- **DiGiacomo, J., McKay, C., & Davila, A. (2022).** ThermoBase: A database of the phylogeny and physiology of thermophilic and hyperthermophilic organisms. *PLOS ONE*, *17*(5), e0268253. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268253
- **Domig, K. J., Mayer, H. K. & Kneifel, W., 2003.** Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of Enterococcus spp.: 1. Media for isolation and enumeration. International Journal of Food Microbiology. 88(2-3), pp. 147-164..
- **Donlan R.M. (2002).** Biofilms : Microbiol life on surface. *Emerging Infections Disease journal*. 8 (9), 881-890.
- **Dorsey, G., Borneo, H., Sun, S. & et al., 2013.** A heterogeneous outbreak of Enterobacter cloacae and Serratia marcescens infections in a surgical intensive care unit. Infect Control HospEpidemiol..

F

- **Fauchère, J. L., & Avril, J. L. (2002).** *Bactériologie générale et médicale*.Éditions Ellipses, 365p.

- **Filloux Alain., Isabelle Vallet. (2003).** Biofilm : mise en place et Organisation d'une communauté bactérienne. *MEDECINE/SCIENCES*. 19 : 77-83. https://doi.org/10.1051/medsci/200319177
- **Fitch, M. T., Manthey, D. E., McGinnis, H. D., Nicks, B. A., & Pariyadath, M. (2007).** Abscess incision and drainage. N Engl J Med, 357(19): e20.

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

- **Freiberg, J. A. (2017**). The mythos of laudable pus along with an explanation for its origin. Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives, 7(3): 196-198.

G

- **Gadou, V., 2019.** Epidémiologie moléculaire des entérobactéries productrices de β-lactamases a spectre élargi résistantes aux aminosides et aux fluoroquinolones dans le district d'Abidjan, côte d'ivoire (thèse de doctorat, Université Félix Houphouët-Boigny (Abidjan, Côte d.

- **Ghaith, D. M. et al., 2018.** First reported nosocomial outbreak of Serratia marcescens harboringbla IMP-4 and bla VIM-2 in a neonatal intensive care unit in Cairo, Egypt. Infect. Drug Resist.. Volume 11, p. 2211–2217.

- **GHEIT, A., 2011.** *Les principales bactéries isolées des pus superficiels et leur comportement vis-à-vis des antibiotiques (thèse de doctorat).*. s.l.:s.n.

- **Gill, M. K., & Sharma, S. (2019).** Bacteriological profile and antibiotic sensitivity patterns of aerobic pus isolates: A study conducted in tertiary care hospital of North India. *Int J Med Microbiol Trop Dis*, *5*(2), 99-102.

- **Ginting, C. N., Piska, F., Harmileni, H., & Fachrial, E. (2023).** Molecular identification of thermophilic bacteria with antimicrobial activity isolated from hot springs in North Sumatra, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *24*(2). https://doi.org/10.13057/biodiv/d240210

- **Givskov M., Kjelleberg S. (2007)**. The biofilm mode of life : Mechanisms andadaptation ; 300.

- **Goetz C., Dufour S., Archambault M., Malouin F., Jacques, M.2016**. Importance et Contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la Vache laitière : une revue bibliographique. PP: 215-229

- **Gonzalez, C. D., Ledo, C., Cela, E., Stella, I., Xu, C., Ojeda, D. S., Frenette, P. S., & Gómez, M. I. (2019).** The good side of inflammation: Staphylococcus aureus proteins SpA and Sbi contribute to proper abscess formation and wound healing during skin and soft tissue infections. Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease, 1865(10): 2657–2670.

- **Grace, B. N., Kiran, K. R., & Rao, B. V. (2020**). Study of Aerobic Bacterial Isolates and Their Antibiogram from Pus Sample in Government General Hospital, Guntur. 7, 5.
- **Grollier, G., Le Moal, G., & Robert, R. (2004).** Infections dues aux bactéries anaérobies de la flore endogène (Clostridium difficile et Actinomyces exclus). EMCMaladies infectieuses, 1(4) : 262-280.

- **Grosjean, J., Clavé, D., Archambaud, M. & Pasquier, C., 2011.** Bactériologie et virologie pratique..

- **Guzmán-Soto I., McTiernan C., Gonzalez-Gomez M., Ross A., Gupta K., Suuronen E. J., … Alarcon E. I. (2021).** Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. *iScience, 24(5), 102443*

H

- **H., Castellar-Leones, S. M., Elzain, M. A., & Moscote-Salazar, L. R. (2013**). Brain abscess: Current management. Journal of neurosciences in rural practice, 4(Suppl 1) : S67–

- **Haenni, M., Lupo, A. & Madec, J. Y., 2018.** Antimicrobial Resistance in Streptococcus spp. Microbiology spectrum. 6(2).

- **Hanumanthappa, P., Vishalakshi, B., & Krishna, S. A. (2016).** Study on aerobic Bacteriological profile and Drug sensitivity pattern of Pus samples in a tertiary care hospital. Int J Curr Microbiol App Sci, 5(1) : 95-102.

- **Harold C., Slavkin D.D. (1997)**. Biofilms, Microbial ecology and Antoni Van Leeuwenhoek. *National institute of dental research* ; 128(4) :492-495.

- **Hart, C., 2006.** Klebsiella. Citrobacter, Enterobacter and Serratia spp in Principles and practice of Clinical Bacteriology, 2nd Edn eds Gillespie S. H., Hawkey P. M., editors (Chichester John Wiley & Sons Ltd),. p. 386p.

- **Harwood, V. J. et al., 2004.** Molecular confirmation of Enterococcus faecalis and E. faecium from clinical, faecal and environmental sources. Letters in applied microbiology. 38(6), pp. 476-482..

- **Hickey, D. A., & Singer, G. A. (2004).** Genome Biology, 5(10), 117. https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-117

- **Hou W., Sun X., Wang Z. et *al*., (2012),** Investigative Ophthalmology& Visual Science, the Association for Research in Vision and Ophthalmology. (53) : 9.5624.5631 https://wwz.ifremer.fr/content/download/12612/file/fiche_big2010_thermophiles

I

- **Iliaquer, M., 2010.** Epidémiologie et caractérisation moléculaire de souches clininiquesde Klebsiella pneumoniae résistantes aux céphalosporines de 3ème generation hors BLSE, isolées entre 2007 et 2009, au C.H.U de Nantes. Université de Nantes.. p. 123p.

- **In Riedel, S., In Morse, S. A., In Mietzner, T. A. & In Miller, S., 2019.** Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology..

- **Islam, S., Aziz, Z. T., Rahman, Md. A., Rahaman, S., & Hossain, Md. B. (2024).** Characterization of the microorganisms of human pus samples- a tertiary care hospital based study. Molecular Mechanism Research, 2(1), 6171. https://doi.org/10.59429/mmr.v2i1.6171

J

- **J.P. Rasigade, A. Tristan. (2019).** Diagnostic bactériologique des infections cutanées.

- **Jadhav A., 2021**. *Bacterial Profile of Pus Samples and their Antibiotic Susceptibility*, IOSR Journal of Dental and Medical Sciences, Vol. 20, Issue 8,

- **Jean, P. R. & Anne, T., 2019.** Diagnostic bactériologique des infections cutanées. *Société française de microbiologie.*.

K

- **Kaluarachchi, V., Bulugahapitiya, D., Arambewela, M. H., Jayasooriya, M. D., De Silva, C. H., Premanayaka, P. H., &Dayananda, A. (2020).** Assessment of Prevalence, Associations, Knowledge, and Practices about Diabetic Foot Disease in a Tertiary Care Hospital in Colombo, Sri Lanka. International journal of chronicdiseases, 2020, 4504627.

- **Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L., 2004**. Pathogenic escherichia coli. Nature reviews microbiology,. 2(2), pp. 123-140..

- **Kara Turki, I. (2014).** Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de *staphylocoques* isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

- **Ketty, S. (2011).** Mise en place d'une réaction inflammatoire aigue. [En ligne]

- **Khalid, F., Poulose, C., Farah, D. F. M., Mahmood, A., Elsheikh, A., & Khojah, O. T. (2024).** Prevalence and Antimicrobial Susceptibility Patterns of Wound and Pus Bacterial Pathogens at a Tertiary Care Hospital in Central Riyadh, Saudi Arabia. Microbiology Research, 15(4), 2015-2034. https://doi.org/10.3390/microbiolres15040135

- **Khanam, R. A., Islam, M. R., Sharif, A., Parveen, R., Sharmin, I., & Yusuf, M. A. (2018).** Bacteriological profiles of pus with antimicrobial sensitivity pattern at a teaching hospital in Dhaka City. *Bangladesh Journal of Infectious Diseases*, *5*(1), 10-14.

- **Kitouni, M. (2007).** Isolement de bactéries actinomycètes productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. *Université Mentouri-Constantine. Faculté des sciences de la nature et de la vie (Alger)*.

- **Krzymińska, S., Mokracka, J., Koczura, R. & Kaznowski, A., 2009**. Cytotoxicactivity of Enterobacter cloacae humanisolates. OUP Academic..

- **Kumar, M., Lakra, N., Sharma, A. K., Prasad, A., & Seema, K. (2020).** Bacterial profile and antibiogram of pus isolates in a tertiary care hospital. *Journal of Dental and Medical Sciences*, *60*, 39-45.

L

- **Larbi Daouadji, K. (2015).** *Isolement et identification des souches productrices de lipase* (Doctoral dissertation).

- **Lavigne J P., Sotto A. (2007).** Recommandations pour la bonne pratique du prélèvement microbiologique dans les infections cutanées et osseuses : à propos du pied diabétique. Spectre biologie ; 159 :29-34

- **Lee, A. S. et al., 2018.** Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Nature reviews Disease primers,. 4(1), pp. 1-23.

- **LEULMI, Z., 2015.** Les Proteus incriminés dans les infections communautaires et hospitalières: étude moléculaire de la résistance aux antibiotiques [thèse de doctorat]. DBI/115..

- **Li,, B. et al., 2014.** Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae. Future microbiology,. 9(9), pp. 1071-1081.

- **Lorenz, H. P., & Longaker, M. T. (2003).** Wounds: biology, pathology, and management. In Essential practice of surgery (pp. 77-88). Springer, New York, NY.

- **Lutgring, J. D. & Limbago, B. M., 2016.** The problem of carbapenemase-producing-carbapenem-resistant-Enterobacteriaceae detection.. *Journal of clinical microbiology*, 54(3), p. 529.

M

- **Mahlen, S., 2011.** Serratia infections: from military experiments to current practice. Clin Microbiol Rev. Volume 24, p. 755–791..

- **Mainil, J., 2003.** Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'Escherichia coli: les adhésines et facteurs de colonisation. Annales De Médecine Vétérinaire. Volume 147, pp. 105-126..

- **Makeri, D., Odoki, M., Eilu, E., & Agwu, E. (2023).** Update on prevalence and antimicrobial resistance of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa isolated from diabetic foot ulcers in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Bulletin of the National Research Centre*, *47*(1), 145.

- **Malek, F., Boudjemaa, B., Aquametric, A., & Kihal, M. (2013).** Identification and genetic diversity of Bacillus cereus strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. *Dairy Science & Technology*, *93*(1), 73-82. https://doi.org/10.1007/s13594-012- 0093-2

- **Mathur T., Singhal S. , Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. Indian Journal of Medical Microbiology, 24 (1):25-9

- **Mehta, R., Singhal, P., Singh, H., Damle, D., & Sharma, A. K. (2016).** Insight into thermophiles and their wide-spectrum applications. *3 Biotech*, *6*(1). https://doi.org/10.1007/s13205-016-0368-z

- **Merino, S., Gonzalez, V. & Tomás, J. M., 2016.** The first sugar of the repeat units is essential for the Wzy polymerase activity and elongation of the O-antigen lipopolysaccharide. Future microbiology,. 11(7), pp. 903-918..

- **Mezzatesta, M. L., Gona, F. & Stefani, S., 2012**. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future microbiology,. 7(7), pp. 887-902.

- **Militz, M. (2018).** Management der frühen postoperativen Wundinfektion. Orthopädie und Unfallchirurgie up2date, 12(05) : 523-537.

- **Mlaga, K. D. et al., 2017.** 'Nissabacter archeti'gen. nov., sp. nov., a new member of Enterobacteriaceae family, isolated from human sample at Archet 2 Hospital, Nice, France. New microbes and new infections. Volume 17, pp. 81-83.

- **Mogha, K. V., Shah, N. P., S., J. B., & Chaudhari, A. R. (2014).** Biofilm a threat to dairy industry. *Indian Journal of Dairy Science*, *67*(6), Article 6. https://epubs.icar.org.in/index.php/IJDS/article/view/39317

- **Moller, A. G., Lindsay, J. A. & Read, T. D., 2019.** Determinants of Phage Host Range in Staphylococcus Species. Applied and environmental microbiology. 85(11), pp. :e00209-19..

- **Morand, A., & Morand, J. J. (2017, November).** Pseudomonas aeruginosa en dermatologie. In Annales de Dermatologie et de Vénéréologie (Vol. 144, No. 11, pp. 666-675). Elsevier Masson.

- **Muhammad M. H., Idris A. L., Fan X., Guo Y., Yu Y., Jin X., ... Huang T. (2020).** Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches . *Front Microbiol*, 11, 928.

- **Mukherjee, S., Mishra, S., & Tiwary, S. (2020).** Microbial profile and antibiogram of pus isolate in a tertiary care hospital of Western Odisha. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, *9*(16), 1325-31

- **Muluye, D., Wondimeneh, Y., Ferede, G., Nega, T., Adane, K., Biadgo, B., Tesfa, H., & Moges, F. (2014).** Bacterial isolates and their antibiotic susceptibility patterns among patients with pus and/or wound discharge at Gondar university hospital. *BMC research notes*, *7*, 619. https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-619

- **Murphy, C. N. & Clegg, S., 2012**. Klebsiella pneumoniae and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation (vol 7, pg 991, 2012). FUTURE MICROBIOLOGY. 7(10), pp. 1234-1234..

N

- **Nagaveni S., Rajeshwari H., Ajay Kumar Oli., Patil S.A., AND Kelmani Chandrakanth R (2010).** Evaluation of boifilm forming ability of the multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa.* The Bioscan; 5(4) : 563-566

- **Niu C. et Gilbert E.S., 2004.** Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. Appl Environ Microbiol., 70 : 6951–6956

O

- **Octarya, Z., Nugroho, T. T., Nurulita, Y., & Saryono. (2022).** Molecular Identification, GC-MS Analysis of Bioactive Compounds and Antimicrobial Activity of Thermophilic Bacteria Derived from West Sumatra Hot-Spring Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, *29*(4), 549–561. https://doi.org/10.4308/hjb.29.4.549-561

- **Ofogbu, C. V., 1, Orji, F. T., Ezeanolue, B. C., &Emodi, I. (2016).** Microbiological profile of chronic suppurative otits media among HIV infected children in South Eastern Nigeria. Nigerian journal of medicine: journal of the National Association of Resident Doctors of Nigeria, 25(1): 5–11.

- **Ojha, P., Kar, N. P., Nayak, S., Patra, A. K., & Sahoo, K. K. (2021).** Isolation of a broadspectrum antimicrobial producing thermophilic Bacillus and characterization of its antimicrobial protein. *Archives of Microbiology*, *203*(5), 2059-2073. https://doi.org/10.1007/s00203-020-02162-w

- **Oulymata, G., 2007.** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification dequelques bacilles a gram négatif. Thèse doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. p. 120p..

𝒫

- **Paraje, M., Barnes, A. & Albesa, I., 2005**. An Enterobacter cloacae toxin able to generate oxidative stress and to provoke dose-dependent lysis of leukocytes. Int J Med Microbiol. Volume 295, p. 109–116..
- **Perrière, G., 1992.** Application d'une présentation par objet des connaissances demodélisation de certains aspects de l'expression des gènes chez E. coli UCBL. Thèse de doctorat. Université de Claude Bernard –Lyon 1.. p. 96p.
- **Philippe, B., 2019.** Escherichia coli/ Shigella. Société française de microbiologie..
- **Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley Jr. F.L., Mowat E., Ramage G. et Lopez-Ribot J.L., 2008.** A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. Nat Protoc., 3 : 1494–1500
- **Pierrick HORDE. (2013).** Le journal de santé-médecine.
- **Pisetsky DS. (2011**). Pus: the Rodney Dangerfield of immunology. *Arthritis Res Ther* .13(5):131.
- **Podbielska, A., Galkowska, H., Stelmach, E., Mlynarczyk, G., & Olszewski, W. L. (2010).** Slime production by Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strains isolated from patients with diabetic foot ulcers. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, *58*, 321-324.
- **Pratt L.A. et Kolter R., 1998.** Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation : roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Molecular Microbiology, 30 : 285–293
- **Proft, T. & Loh, J. M. S. , 2020.** Group A Streptococcus : Methods and Protocols (Vol. 2136). Springer US..

ℛ

- **Radhika, Selvaraj, B., Radhakrishnan, M., & Balagurunathan, R. (2011).** Bioprospecting of fresh water actinobacteria: Isolation, characterization and antagonistic potential of selected actinobacteria. *Journal of Pharmacie Resarci*, *44*, 2584-2586.
- **Rafiee, Z., Jalili Tabaii, M., Moradi, M., & Harirchi, S. (2024).** Unveiling Antibacterial Potential and Physiological Characteristics of Thermophilic Bacteria Isolated from a Hot Spring in Iran. *Microorganisms*, *12*(4), 834. https://doi.org/10.3390/microorganisms12040834

- **Rajkumar, H. R. V., Devaki, R., & Kandi, V. (2016).** Evaluation of different phenotypic techniques for the detection of slime produced by bacteria isolated from clinical specimens. *Cureus*, *8*(2).

- **Rajput, K., Johri, S., & Goyal, A. (2023).** Identification of Bacterial Isolates and Their Antimicrobial Susceptibility Pattern from Wound/Pus Sample in a Tertiary Care Hospital, Gwalior, India. *Annals of the National Academy of Medical Sciences (India)*, *59*, 97–103. https://doi.org/10.1055/s-0043-1768136

- **RANDRIAMAMPIONONA, E., 2018**. Identification et caractérisation des Staphylocoques à Coagulase Négative résistants à la méthicilline isolés d'échantillons sanguins de patients fébriles dans les centres de santé de la région Analamanga Antananarivo (Thèse de doctorat, UNIVERSITE D'ANTA.

- **Rao, D. R., Basu, R., & Biswas, D. R. (2014).** Aerobic bacterial profile and antimicrobial susceptibility pattern of pus isolates in a South Indian Tertiary Care Hospital. Surgery, 36, 35-29.

- **Rewatkar A. R., Wadher B. J. (2013).** *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*- Biofilm formation Methods. IOSR Journal of Pharmacy and BiologicalSciences. Volume 8, Issue 5 (Nov. – Dec. 2013), PP 36-40

- **Ribeiro Da Costa, R., Andres, A., & Huttner, B. (2020).** Abcès hépatique pyogène. Revue Médicale Suisse, 16(708) : 1822-1826.
- **Roux A., Ghigo J.M. (2006).** Les biofilms bactériens, *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 261- 268.S81.

S

- **Salabert. D. (2008).** L'hygiène en médecine générale : états des lieux dans une commune des hauts de seine. Thèse doctorat en médecine. Université pierre et marie curie (Paris 6). Faculté de médecine Pierre et Marie Curie. p 26-27

- **Samrot A. V., Abubakar Mohamed A., Faradjeva E., Si Jie L., Hooi Sze C., Arif A., ... Kumar S. S. (2021).** Mechanisms and Impact of Biofilms and Targeting of Biofilms Using Bioactive Compounds—A Review. *Medicina (Kaunas)*, *57(8), 839.*

- **Sbiti, M., Bouhamidi, B. & Louzi, L., 2017.** Arthrite septique à Proteus mirabilis [Proteus mirabilis septic arthritis]. The Pan African medical journal,. Volume 26, p. 197.

- **Seghir A., Z Boucherit-Otmani., L Sari-Belkharroubi., K Boucherit. (2016).** Risque infectieux lié à la formation des biofilms multi-espèces (Candida — bactéries) sur cathéters vasculaires périphériques. *Journale de mycologie médicale*. 27 : 20-27

- **Seifi, K. et al., 2016.** Evaluation of biofilm formation among Klebsiella pneumoniae isolates and molecular characterization by ERIC-PCR.. *Jundishapur journal of microbiology*, , 9(1).

- **Sekhri-Arafa, N., 2011.** Fréquence et marqueurs épidémiologiques de Klebsiella pneumoniae dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. université constantine 1.

- **Senn, L., Sommerstein, R., & Troillet, N. (2017).** Prévenir les infections associées aux soins en 2017. *Forum Médical Suisse – Swiss Medical Forum*, *17*(45).

- **Sharma, R., Batra, S., Balothia, V., & Agarwal, S. (2021).** Bacteriological Profile and Antimicrobial Susceptibility Pattern of Pus Culture Isolates from a Tertiary Care Hospital, SMS Medical College Jaipur. European Journal of Molecular & Clinical Medicine, 7(11) : 7502-7508.

- **Sharma, S. et al., 2021.** Identification and detection of biofilm producing staphylococcus. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, pp. 150-156.

- **Shirai, N., & Preciado, D. (2019).** Otitis media: what is new?. Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery, 27(6): 495–498.

- **Sickkids staff. (2015).** Acne (acne vulgaris). [En ligne]

- **Singh P K., Parsek M R., Greenberg E P., Welsh M J. (2002).** A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature., 417 : 552-555.

- **Slonczewski, J. L., Foster, J. W. & Foster, E., 2020.** Microbiology: An Evolving Science Fifth International Student Edition with Ebook, Smartwork5, Animations, eTopics and eAppendices. WW Norton & Company..

- **Sougakoff W. & Trystram D., 2003**. Résistances aux β-lactamines. Université Pierre et MarieCurie. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. pp. p. 31-46.

- **Spellerberg, B. & Brandt, C., 2016.** Laboratory diagnosis of Streptococcus pyogenes (group A streptococci). Streptococcus pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations..

- **Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000).** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, *40*(2), 175-179.

- **Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007).** Quantification of biofilm in microtiter plates : overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, *115*(8), 891-899.

- **Sullivan, N. L. et al., 2013.** The complete genome sequence of Proteus mirabilis strain BB2000 reveals differences from the P. mirabilis reference strain. Genome announcements,. 1(5).

- **Suranigi, S. M., Ramya, S. R., Devi, C. S., Kanungo, R., & Najimudeen, S. (2021).** Risk factors, bacteriological profile and outcome of surgical site infections following orthopaedic surgery. *Iranian Journal of Microbiology*, *13*(2) : 171-177.

- **Sutherland IW (2001).** The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* **9** : 222-227

$\mathcal{T}$

- **Talaro, Kathleen, Park (2008**), *Foundation in Microbiology: Basic Principles*, McGraw-Hill, New York

- **Tijani, N., 2019.** Infections à pseudomonas aeruginosa en dermatologie (thèse de doctorat)..

- **TRANSDISCIPLINAIRES, I. M. (2008**). Item 87—Infections cutanéo-muqueuses bactériennes. In Annales de dermatologie et de vénéréologie (Vol. 135, pp. F35-F41).

- **Trojan, R., Razdan, L., & Singh, N. (2016).** Antibiotic Susceptibility Patterns of Bacterial Isolates from Pus Samples in a Tertiary Care Hospital of Punjab, India. *International journal of microbiology*, *2016*, 9302692. https://doi.org/10.1155/2016/9302692

$\mathcal{U}$

- **Ustin, J. S., & Malangoni, M. A. (2011).** Necrotizing soft-tissue infections. Critical care medicine, 39(9): 2156-2162.

$\mathcal{V}$

- **V. Abarna, Dr. N. Sri Sakthipriya, Dr. M. Anitha Raj, Dr. E. Arthi, Dr. Bagyalakshmi, & Dr. Jayalakshmi G. (2017).** Detection of Biofilm production in microorganisms complicating Chronic wound infections. *Tropical Journal of Pathology and Microbiology*, *3*(4), 362-367. https://doi.org/10.17511/jopm.2017.i04.01

- **Vincenot, F., Saleh, M. & Prévost, G., 2008.** Les facteurs de virulence de Staphylococcus aureus.. *Revue Francophone des laboratoires*,, 2008(407), pp. 61-69..

- **Vitolo, M. (2021).** Decomposition of hydrogen peroxide by catalase. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 10(8 p. 47-56).

- **Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. et Ivanova, E. P. (2009), —**Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation‖, *Molecules*, Vol. 14 No. 7, pp. 2535-2554.

- **Vuotto, C. et al., 2014.** Antibiotic resistance related to biofilm formation in Klebsiella pneumoniae. Pathogens,. 3(3), pp. 743-758.

- **Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., Tiracchia, V., Salvia, A., & Varaldo, P. E. (2017).** Biofilm formation and antibiotic

resistance in Klebsiella pneumoniae urinary strains. *Journal of applied microbiology*, *123*(4), 1003–1018. https://doi.org/10.1111/jam.13533

W

- **Weitz, J., 2017**. Exploration au laboratoire de la résistance aux carbapénèmes chez Enterobacter sp (Thèse de doctorat, Université Toulouse lll-Paul Sabatier)..
- **Wijesundara, N. M. et al., 2021.** Carvacrol exhibits rapid bactericidal activity against Streptococcus pyogenes through cell membrane damage. *Scientific Reports*, 11(1), p. 1487.
- **Wilson M., Wilson P.J.K. (2021)** Microbes and Infectious Diseases. In: Close Encounters of the Microbial Kind. Springer, Cham. (Close Encounters of the Microbial Kind). (pp. 23-46)
- **Winn,, W. et al., 2006.** Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th Edition, Lippincott Williams and Wilkins, New York..
- **Woese Cr, Kandler O, Wheelis Ml. (1990).** Towards a natural system of organisms : proposal for the domainsarchaea, bacteria, and eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 87, 4576–4579
- **Wong, D, et al., 2017.** . *Clinical and Pathophysiological Overview of Acinetobacter Infections: a Century of Challenges. Clinical microbiology reviews, 30(1) : 409–447..*
- **Wu, D. C. et al., 2011.** Pseudomonas skin infection.. *American journal of clinical dermatology*, 12(3), pp. 157-169..

Y

- **Yin W., Xu S., Wang Y., Zhang Y., Chou S.-H., Galperin M. Y., He J. (2020).** Ways to control harmful biofilms : prevention, inhibition, and eradication. *Critical Reviews in Microbiology, 47(1), 57–78*
- **Yousefi, Y., Meldrum, J., & Jan, A. H. (2020).** Periodontal Abscess. StatPearls.

Z

- **Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V. et Hacker J., 2001.** Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. Methods in Enzymology, 336 : 195-203

ANNEXES

Annex 1 : préparation de milieux de culture :

THERMUS THERMOPHILUS MEDUIM (TTM liquide) : PH= 07

Extrait de levure 4g

Protéase peptone.....8g

Na cl 2g

L'eau distillé 1000ml

THERMUS THERMOPHILUS MEDUIM (TTM solide) : PH= 07

Extrait de levure 4g

Protéase peptone.....8g

Na cl 2g

Agar 15g

L'eau distillé 1000ml

Bouillon Nutritif :

Extrait de levure 1g

Peptone.....5g

Na cl 5g

L'eau distillé 1000ml

Annex 2 : Coloration de gram

Réactifs :

Violet de gentiane :

Violet de gentiane..... 1g

Alcool éthylique à 95% 10ml

Phénol..... 2g

Eau distillée..... 100ml

Lugol de Gram :

Iodure de potassium.....1g

Iode.....1g

Eau distillée..... 300ml

Fushine de Ziehl :

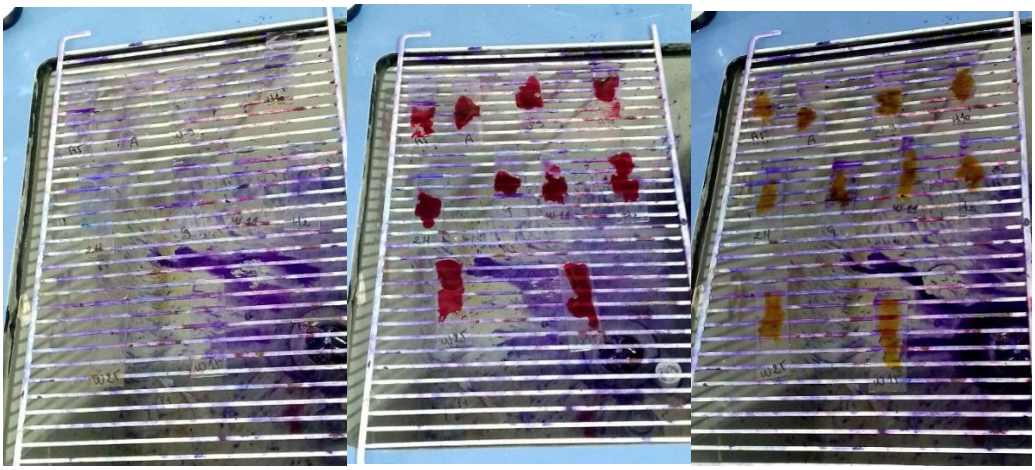
Fushine.....1g

Alcool éthylique à 95.....10ml

Phénol ajouté à 100ml d'eau distillée.....5g

La technique Préparation du Frottis :

- Sur une lame de microscope, déposer une goutte d'H2O.
- A l'aide d'une anse stérilisé (passant sous le bec benzène), toucher une colonie pour prélever des bactéries.
- Déposer ce prélèvement au milieu de lame, puis passer la lame dans la petite flamme du bec bunsen pour fixer à la chaleur.
- Déposer quelques gouttes de solution de violer de gentiane (cristal violer) sur le frottis fixé.
- Laisser agir 1 min, puis rincer à l'eau.
- Déposer quelques gouttes de Lugol (un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries) sur le frottis, Laisser agir 1 min et rincer brièvement à l'H2O.
- Verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 s). Rincer avec l'eau. L'alcool pénètre dans la bactérie.
- La coloration au violet de Gentiane disparait. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram- si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.
- Contre-colorer en déposant la solution de safranine (rose) pendant 1 min. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente.
- Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+.
- Laisser sécher à l'air.
- Observer au microscope (grossissement 40x puis grossissement 100x avec une goutte d'huile à immersion)



Coloration de gram

Annex 3 : Milieux de l'activité antimicrobienne :

MULLER HINTON (MH) :

Muller Hinton..... 38g

Eau distillée..... 1000ml

Annex 4 : Milieux de biofilm :

ROUGE CONGO (RC)

Le bouillon cœur Cherval 37g/L

Saccharoses.....50g/L

Agar .....10 g/L

Rouge Congo .....0,8 g/L

Milieu BHIB

BHIB 38,0g/L

Eau distillée.....1000ml

PH = 7,4

PHOSPHATE BUFFERED SALINE(PBS) PH= 07

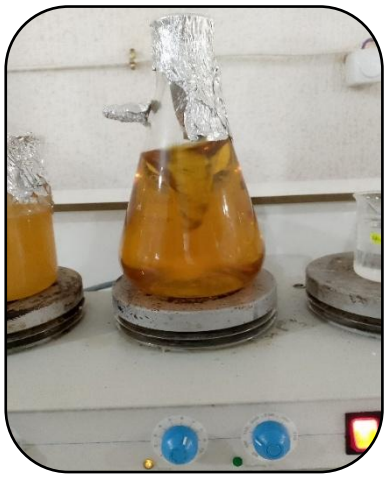
NaCl.....8g/L

Kcl 0.2g/L

Na2HPO4….....1.44g/L

KH2PO4….....0.24g/L

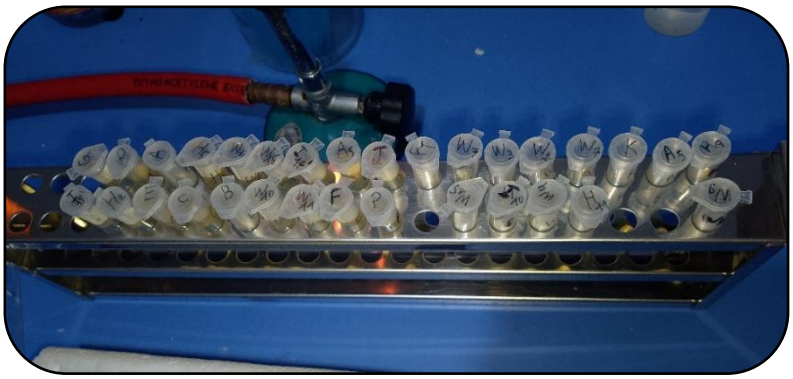
Annex 5 :



Préparation de milieu TTM



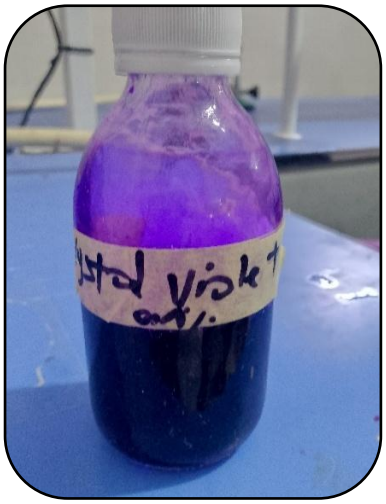
Préparation de milieu MH



Souches thermophiles



L'ajustement de la DO des suspensions bactériennes



Cristal Violet 0.1%

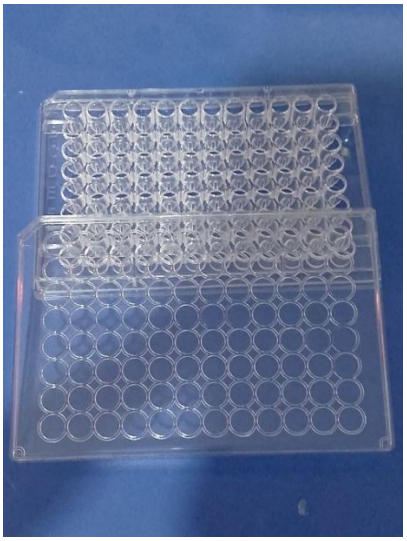




Préparation de milieu Rouge Congo et écoulement Sur les boites pétries



Préparation de solution PBS



Microplaques de titration (96 puits)