

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE ET BIOCHIMIE

N°/SNV/2021

THÈSE

Présentée par

MERRADI Manel

Pour l'obtention du Diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : MICROBIOLOGIE

THÈME

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AU CHU DE BATNA :
EPIDÉMIOLOGIE, RÉSISTANCE ET OPTIONS
THÉRAPEUTIQUES**

DEVANT LE JURY

Président	ZERROUG Mohamed Mihoub	Pr. Université de Batna 2, Algérie
Rapporteur	KASSAH-LAOUAR Ahmed	Pr. Université de Batna 2, Algérie
Co-rapporteur	AYACHI Ammar	Pr. Université de Batna1, Algérie
Examineurs	TOBBI Ayache	Dr. Université de Batna 2, Algérie
	AOUF Abdelhakim	Dr. Université de Sétif 1, Algérie
	SEKHRI-ARAF A Nedjoua	Dr. Université de Constantine 1, Algérie

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Ce manuscrit de thèse est l'aboutissement de plusieurs années de travail qui ont pu se concrétiser grâce à l'expertise et au soutien sans faille de nombreuses personnes auxquelles j'adresse mes plus vifs remerciements.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, Pr. KASSAH-LAOUAR Ahmed pour sa précieuse expérience et son implication apportées au cours de la réalisation de ce travail.

Je remercie également mon co-encadreur, Pr. AYACHI Ammar avec qui j'ai étroitement travaillé au cours de mon doctorat et chère Pr. HELEILI Nouzha qui n'a cessé en aucun instant à m'aider et à me faire partager son expérience scientifique.

J'adresse tout mon respect et mes remerciements éternels au Pr. VILA Jordi qui m'a accueilli, encouragé et encadré au sein du laboratoire de recherche de microbiologie (Université de Barcelone), j'espère pouvoir suivre un jour ses pas. Sans oublier l'exceptionnelle Dr. BALLESTE Clara.

Je remercie : Pr.ZERROUG Mohamed Mihoub pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance de thèse, Dr SEKHRI-ARAFI Nedjoua, TOBBI Ayache et Dr.AOUF Abdelhakim d'avoir accepté examiner ce travail. Je vous exprime par ces mots mes sincères considérations.

Je dois avouer que ma thèse n'aurait pas été la même sans Maman et Papa. Pour n'avoir jamais cessé de m'encourager et pour leur soutien indéfectible et d'avoir supporté tout ce stress depuis toujours. Je vous dois tant et je vous en serais à jamais reconnaissante. Votre Amour et vos conseils m'ont permis d'avancer et de franchir chaque nouvelle étape. Merci pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez transmis. Vous êtes ma plus grande force !

Sifeddine, toi qui m'accompagnes depuis près de 6 ans, qui m'a épaulé et suivi durant ces longues études, merci pour ta patience et tes attentions de chaque jour. A tous les jours qui nous attendent avec notre fille qui illumine nos vies ;

Je remercie sans aucune commune mesure toute ma famille et ma belle-famille, toujours si présente et attentionnée. Sans oublier les autres belles rencontres que j'ai eu le bonheur de faire au cours de cette t

Sommaire

Remerciements	
Sommaire	I
Liste des abréviations	V
Liste des tableaux	XI
Liste des figures	XII
Résumé	XV
Abstract	XVI
المخلص	XVII
Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
1. Historique	4
2. Taxonomie	4
3. Morphologie et physiologie	5
4. Niches écologiques	6
5. Génétique	6
6. Pathogénie et facteurs de virulence	7
6.1. LPS	8
6.2. Flagelle	8
6.3. Pili type VI	8
6.4. Alginate	9
7. Epidémiologie	9
8. Résistance	10
8.1. Résistance naturelle	10
8.1.1. Imperméabilité de la membrane externe	11
8.1.2. Systèmes d'efflux	12
8.1.3. Céphalosporinase chromosomique AmpC	13
8.2. Résistance acquise	14
8.2.1. Surexpression de l'AmpC	14
8.2.2. Surexpression des pompes d'efflux	14
8.2.2.1. La pompe MexAB-OprM	15
8.2.2.2. La pompe MexXY	15
8.2.2.3. La pompe MexCD-OprJ	16
8.2.2.4. La pompe MexEF-OprN	16
8.2.3. Résistance par acquisition des gènes de résistance	16
8.2.3.1. Les β -lactamases transférables	17
8.2.3.1.1. Les β -lactamases à spectre réstreint	17
8.2.3.1.2. β -lactamases à spectre étendu (BLSE)	17
8.2.3.1.3. Les carbapénèmases	20
8.2.4. Altération de la porine OprD	22
8.2.5. Modification des PLPs	22
8.2.6. Enzymes-modifiant les aminosides (AMEs)	23

8.2.7. Méthylation ribosomale	24
8.2.8. Résistance aux fluoroquinolones	25
8.2.9. Résistance à la colistine	26
9. Biofilm	26
9.1. Composition et organisation de biofilm chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
9.2. Cycle de développement de biofilm chez <i>P. aeruginosa</i>	30
9.3. Biofilm et résistance aux antibiotiques	33
10. Les huiles essentielles	33
10.1. Définition	33
10.2. Propriétés physiques	33
10.3. Activité antimicrobienne des huiles essentielles	33
10.4. <i>Citrus limon</i>	33
10.5. <i>Lavandula angustifolia</i>	35
10.6. <i>Zingiber officinale</i>	35
10.7. <i>Rosmarinus officinalis L</i>	35
10.8. <i>Eucalyptus globulus</i>	36
10.9. <i>Artemisia dracuncululus L.</i>	36
10.10. <i>Artemisia herba alba</i>	37
10.11. <i>Juniperus communis</i>	37
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
1. Cadre d'étude	38
1.1. Recueil des données	38
1.2. Élimination des doublons	38
1.3. Limites de l'étude	38
2. Identification des souches	38
2.1. MALDI-TOF MS	39
3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	40
3.1. La recherche des métallo-béta-lactamases	41
3.1.1. Test Hodge modifié	41
3.1.2. Test de synergie double disque	42
3.2. Détermination de la sensibilité par concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide (colistine et méropénème)	42
3.2.1. Préparation de la solution antibiotique, suspension bactérienne et inoculation de la microplaque	42
3.2.2. Lecture des plaques	43
4. Détermination des pompes à efflux	43
4.1. Technique E-test	43
4.2. Technique de la CMI	44
5. Multi-locus sequence typing (MLST)	44
6. Etude de la relation épidémiologique entre les souches étudiées par électrophorèse en champ pulsé	46
7. Identification des gènes de résistance par PCR simple	48
7.1. Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour la PCR	48

7.2. Extraction de l'ADN bactérien	50
7.3. Préparation du mix	51
7.4. Paramètres de la PCR	52
7.4.1. Lecture des produits de PCR	52
7.5. Analyse statistique des données	53
8. Etude de la formation des biofilms	53
8.1. La méthode du rouge Congo(CRA)	53
8.2. La méthode des tubes (TM)	54
8.3. La méthode de Plaque de culture de tissus (TCP)	55
9. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	56
9.1. Huiles essentielles	56
9.2. Matériel végétal	56
9.3. Hydrodistillation	56
9.4. Souches bactériennes	57
9.5. Activité antibactérienne	58
9.5.1. La lecture des résultats	58
9.6. Analyse statistique	59
Chapitre III : Résultats et Discussion	
1. Identification des souches par MALDI-TOF-MS	60
2. Répartition des souches	60
2.1. Répartition des souches par service	60
2.2. Répartition des souches par nature de prélèvement	63
2.3. Répartition des souches par âge	64
2.4. Répartition des souches par sexe	65
3. Germes co-isolés	66
4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques	68
4.1. Répartition des souches selon leur multirésistance	70
4.2. Résistance aux carbapénèmes	71
4.2.1. Recherche de la résistance aux carbapénèmes par production de M β L	72
4.2.1.1. Résultats des tests de confirmation de M β L (Hodge modifié et du double disque de synergie (EDTA)	72
4.2.1.2. Caractérisation génétique de la résistance aux carbapénèmes par production de M β L	73
4.2.1.3. Résistance associée des souches productrice de M β L	75
4.2.1.4. Génotypage des souches VIM-4 positives par PFGE et MLST	76
4.2.1.5. Analyse de l'intégron des souches VIM-4 positives	81
4.2.2. Résistance aux carbapénèmes par surexpression des systèmes d'efflux	82
4.2.2.1. Génotypage des souches à systèmes d'efflux surexprimés par PFGE et par MLST	83
4.2.2.2. Résistance associées des souches à systèmes d'efflux surexprimés	86
4.3. Résistance aux aminoglycosides	87

4.3.1. Caractérisation des gènes de résistance aux aminoglycosides par PCR	88
4.3.2. Résistances associées des souches choisies résistantes aux aminoglycosides	90
4.4. Résistance aux fluoroquinolones	91
4.4.1. Caractérisation moléculaire du mécanisme de résistance aux fluoroquinolones	91
4.4.2. Résistances associées des souches résistantes aux fluoroquinolones	94
4.5. Résistance à la colistine	94
4.5.1. Caractérisation moléculaire du mécanisme de résistance à la colistine	95
4.5.2. Résistances associées des souches résistantes à la colistine	98
4.5.3. Répartition des souches résistantes à la colistine par PFGE et MLST	98
5. Etude de la formation de biofilm	100
5.1. Evaluation par méthode gélose rouge congo (CRA)	100
5.1.1. Répartition des isolats positifs par type de prélèvement	101
5.1.2. Profils de résistance des isolats positifs et prévalence des isolats multirésistants	102
5.1.3. Prévalence des isolats positifs multirésistants	102
5.2. Evaluation par méthode des tubes (TM)	103
5.2.1. Répartition des isolats à forte production de biofilm par nature de prélèvement	104
5.2.2. Profils de résistance des isolats à forte production de biofilm	105
5.2.3. Prévalence des isolats résistantes et à forte production de biofilm multirésistants	106
5.3. Evaluation par méthode de la microplaque (TCP)	107
5.3.1. Répartition des isolats forts producteurs de biofilm par type de prélèvement	108
5.3.2. Profils de résistance des isolats forts producteurs de biofilm	109
5.3.3. Prévalence des isolats forts producteurs de biofilm multirésistants	110
6...Activité antibactérienne des huiles essentielles	111
6.1. Activité antibactérienne d' <i>Artemisia dracunculus L.</i>	111
6.2. Activité antibactérienne de <i>Juniperus communis</i>	114
6.3. Activité antibactérienne d' <i>Artemisia herba alba</i>	116
6.4. Activité antibactérienne de <i>Lavandula angustifolia</i>	119
6.5. Activité antibactérienne de <i>Citrus limon</i>	122
6.6. Activité antibactérienne de <i>Rosmarinus officinalis L.</i>	124
6.7. Activité antibactérienne de <i>Zingiber officinale</i>	127
6.8. Activité antibactérienne d' <i>Eucalyptus globulus</i>	130
Conclusion	133
Perspectives et recommandations	
Références bibliographiques	
Production scientifique	
Annexes	

Liste des abréviations

16S: Svedberg (vitesse de sédimentation)

30S: Ribosome bactérien

A: Adénine (base azotée)

AAC: Aminoglycoside acetyltransferases

AAD: Aminoglycoside adenytransferase

ABC : ATP Binding Cassette

ADH : Arginine Déiminase

ADN: Acide desoxyribonucléique.

AHL: Acyl homosérine lactone

AIM : Adelaide IMipenmase

AK : Amikacine

Ala : alanine

AME: Aminoglycosides modifying enzymes

AMP : Adénosine Monophosphate

AmpC: Bêta-lactamase chromosomique

Asn :Asparagine

Asp : Aspartate

ANT: Nuclétyltransférase

APH: Phosphotransférase

API 20NE: Analytical profile index 20NE (N= Non, E= Entérobactéries)

ArmA: Aminoglycoside resistance methylase

ARN: Acide ribonucléique

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

ATB: Antibiotique

ATCC: American Type Culture Collection

ATM: Aztréoname

ATP: Adénosine Triphosphate

BEL: Belgium

BET: Bromure d'éthidium

BHR : Bactérie Hautement Résistante

BLAST: Basic Local Alignment tool

BLSE: β -lactamase à spectre étendu

BMR: Bactérie multi-résistante

BPR : Bactérie Pan Résistante

C: Cytosine (base azotée)

C1G : Céphalosporine de 1^{ère} Génération

C2G : Céphalosporine de 2^{ème} Génération

C3G : Céphalosporine de 3^{ème} Génération

C4G : Céphalosporine de 4^{ème} Génération

Ca²⁺ : Calcium

CARB : Carbénicilline

CAZ : Céfotaxime

c-di-GMP : Cyclic diguanylate

CEG : carbapenemase-encoding genes

CF : Cystic Fibrosis

CG%: Pourcentage en guanine et cytosine du génome (coefficient de Chagraff)

CHU: Centre hospitalier universitaire

CIP : Ciprofloxacine

CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CS : Colistine

CTX-M: Céfotaxime Munich

Dnase: Désoxyribonucléase

EARS-Net: European Antimicrobial Resistance Surveillance Network.

ECBU : Etude CytoBactériologique des Urine

ECP: L'électrophorèse en champ pulsé

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

ESBL: Extended spectrum beta-lactamase

ES-OXA : extended-spectrum Oxacillinase

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

F: Forward

FIM : Florence Imipenemase

FOS : Fosfomycine

FQ: Fluoroquinolones

G: Guanine (base azotée)

GEN : Gentamycine GES: Guiana Extended Spectrum

GIM: German IMipenemase

Gly : Glycine

gyrA: Gene encoding the enzyme; DNA gyrase

gyrB : Gene encoding the enzyme; DNA gyrase

H: Heures

HCl : Chlorure d'hydrogène

HE :Huile essentielles

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IAS : Infections Associées aux Soins

IBC : integron borne cephalosporinase

IMI/ NMC-A : Imipenemase/Non-MetalloCarbapenemaseA

IMP : Imipénème

IMP : Imipéménase (carbapénémase)

Int : Intégrons

IU : Infection Urinaire

Kb: Kilobases

kDA : Kilodalton

KPC : *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

Leu :Leucine

LEV : Levofloxacin

LPS: Lipopolysaccharide

LRP: LDL related protein

M: Marqueur

MATE : Multidrug And Toxic compound Extrusion

Mb : mega base

MBL: Métallo- β -lactamase

MDR : Multi Drug Resistant

MERO : Méropénème

MF :MacFarland

MFS : Major Facilitator Superfamily

Mg²⁺ : Magnésium

MH: Mueller Hinton

NaCl : Chlorure de Sodium

NCBI: Genome database of the National Center for Biotechnology Information

NDM: New Delhi metallo- β -lactamase

NET : Nétilmyine

NHSN : National Healthcare Safety Network

N₂ : azote

NO : oxyde d'azote

NO₃⁻ : nitrates

O: Antigène somatique

OMF : Outer Membrane Factor

OMP : Outer membrane protein

OMS: Organisation Mondiale de Santé

Opr : Outer membrane protein

ORF: Open Reading Frame

OXA : oxacillinases à spectre étendu

OXA: Oxacillinase (carbapénémase)

PAM: *Pseudomonas alcaligenes* Méthallo-β-Lactamase

Pb : Paires de bases

PCR: Polymerase chain reaction

PDR : Pan Drug Resistant

Pel : Pellicle locus

PER: *Pseudomonas* Extended Resistance

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

pH: Potentiel hydrogène

PIB : *Pseudomonas* Imipenem B-lactamase

PIP : pipéracilline

PLP: Protéines liant les pénicillines

POM : *Pseudomonas otidis* Methallo-β-Lactamase

PSE : *Pseudomonas* Specific Enzyme

Psl : Polysaccharide synthesis locus

Qnr: Quinolone resistance gene

R: Reverse (inverse)

RIF : Rifampicine

Rmt: ARNr 16S méthyltransférase

RND : Resistance Nodulation Division

RPM: Rotation par minute

Ser : Sérine

SHV: Sulfhydryl variable

SME: *Serratia marcescens* Enzyme

SMR : Small Multidrug Resistance

SPM: Sao-Paulo Metallo- β -lactamase

spp : Species (espèces)

ST: sequence type

T4P : Pilis de Type 4

TAE : Tris-Acétate-EDTA

TEM : Temoniera : nom du malade chez qui la première souche a été isolée

TFA : Acide trifluoroacétique

TIC : Ticarcilline

TOB : Tobramycine

TTC : Ticarcilline+ acide clavulanique

UDP : Uridine Diphosphate

UFC: Unité Formant Colonie

UV: Ultra-violet7

V: Volt

VEB: Vietnamese Extended Spectrum β -lactamase

VIM: Verona Imipéménase (carbapénémase)

WGS : Whole Genome Sequencing

XDR : Extensively Drug Resistant

Zn²⁺ : Zinc

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
1	Séquences des amorces des gènes de ménage utilisées en MLST	45
2	Amorces utilisées pour la détermination des gènes de résistance	48
3	Préparation du master mix	51
4	Résultats de l'identification des souches de <i>P.aeruginosa</i> selon leurs scores de MALDI-TOF	60
5	Données démographique et distribution des isolats à <i>bla VIM-4</i>	79
6	CMI du méropénème en présence et en absence du PaβN	83
7	Données démographiques des isolats présentant une surexpression du système d'efflux	85
8	Données démographiques et profil de résistance aux aminoglycosides des souches choisies pour étude moléculaire (N=19).	87
9	Données démographiques des isolats résistants aux fluoroquinolones (N=5).	91
10	Données démographiques des isolats résistants à la colistine (N=4)	95

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
1	Génome de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	7
2	Les majeurs facteurs de virulence de <i>P.aeruginosa</i>	8
3	Model structural des principales pompes à efflux chez <i>P. aeruginosa</i>	12
4	Système de régulation de MexAB-OprM	15
5	Cycle de formation de biofilm chez <i>P. aeruginosa</i>	31
6	Antibiogramme	41
7	Test Hodge modifié d'une souche produisant une méthallo- β -lactamase	41
8	E-test du meropénème en présence et en absence du Pa β N.	44
9	Phénotypes de production de slime	54
10	Sélection des souches adhérentes et non adhérente	55
11	Détection de la formation du biofilm par la méthode TCP des souches	56
12	Dispositif utilisé pour l'hydrodistillation	57
13	Test d'activité antibactérienne des huiles essentielles	58
14	Répartition des souches <i>P.aeruginosa</i> en fonction du service d'origine	61
15	Répartition des souches <i>P.aeruginosa</i> en fonction du type de prélèvements	63
16	Répartition des souches par tranche âge	65
17	Répartition des souches par sexe	66
18	Prévalence des espèces bactériennes coisolées.	67
19	Profil de résistance aux antibiotiques des isolats de <i>P.aeruginosa</i>	68
20	Répartition des souches selon leur multirésistance	70
21	Produits d'amplification par PCR du gène <i>blaVIM-4</i> sur gel d'électrophorèse	73

22	Résistance associée des souches productrice de MβL	76
23	Génotypage par : (A) MLST et (B) PFGE. C- : control négatif, M : marqueur de taille	77
24	Répartition des souches VIM-4 positives selon leurs pulsotypes et leurs séquences types	79
25	Dendogramme des souches VIM-4 selon leurs profils PFGE	81
26	Produits d'amplification par PCR de l'intégron Classe1 sur gel d'électrophorèse	82
27	Répartition des souches à systèmes d'efflux surexprimés par pulsotype et par séquence-type (N=10).	84
28	Dendogramme des souches à systèmes d'efflux surexprimés selon leur profil PFGE	86
29	Résistances associées des souches choisies résistantes aux aminoglycosides	86
30	Produits de PCR des gènes de résistances aux aminoglycosides sur gel d'électrophorèse	88
31	Résistances associées des souches résistantes aux fluoroquinolones	90
32	PCR des gènes de résistances aux fluoroquinolones sur gel d'électrophorèse	92
33	Dendrogramme des souches résistantes aux fluoroquinolones selon leur profil PFGE	94
34	Résistances associées des souches résistantes à la colistine	94
35	Produits de PCR du gène <i>bla mcr</i> gel d'électrophorèse	96
36	Produits de PCR des gènes: (A) <i>pmrA</i> et <i>pmrB</i> et (B) <i>PHoPQ</i> gel d'électrophorèse	97
37	Résistances associées des souches résistantes à la colistine (N=4).	98
38	Répartition des souches résistantes à la colistine par pulsotype et par séquence-type	99
39	Dendrogramme des souches résistantes à la colistine selon leur profil PFGE	99
40	Résultats de l'évaluation de la formation de biofilm par CRA	100
41	Répartition des isolats positifs par type de prélèvement	101
42	Profil de résistance des isolats positifs	102
43	Prévalence des isolats positifs multirésistants	103
44	Résultats de l'évaluation de la formation de biofilm par TM	104
45	Répartition des souches à forte production de biofilm par nature de prélèvement	105
46	Profil de résistance des souches à forte production de biofilm	106

47	Prévalence des souches à forte production de biofilm multirésistantes	106
48	Résultats de l'évaluation de la formation de biofilm par TCP	107
49	Répartition des isolats forts producteurs de biofilm par nature de prélèvement	108
50	Profil de résistance des isolats forts producteurs de biofilm	109
51	Prévalence des isolats forts producteurs de biofilm multirésistants	110
52	Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE d' <i>Artemisia dracunculus L.</i>	113
53	Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE de <i>Juniperus communis.</i>	115
54	Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE d' <i>Artemesia herba alba</i>	118
55	Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE de <i>Lavandula angustifolia</i>	120
56	Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE de <i>Citrus limon</i>	123
57	Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE de <i>Rosmarinus officinalis L.</i>	124
58	Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE de <i>Zingiber officinale</i>	128
59	Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i>	131

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène hospitalier majeur impliqué dans plusieurs infections sévères en plus de sa grande résistance aux antibiotiques. Ce problème récent est en croissance continue et menace de nombreux pays à travers le monde notamment l'Algérie. L'objectif de ce travail a été d'étudier la résistance aux antibiotiques et ses supports génétique sur un panel de 227 souches, collectées sur une période de 24 mois des services du CHU de Batna, Algérie. Ainsi qu'évaluer la formation de biofilm chez les souches isolées et étudier l'activité antibactérienne des huiles essentielles de huit plantes contre ces souches.

Les souches ont été identifiées par deux techniques : Api20NE et MALDI-TOF MS. L'antibiogramme a été réalisé par méthode de diffusion sur gélose et des CMI en milieu liquide sur microplaque avec étude moléculaire des gènes de résistance (PCR, séquençage) et de typage moléculaire (MLST et de PFGE). La formation de biofilm a été réalisée selon trois techniques : CRA, TM et la TCP. L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielle a été faite par la méthode de diffusion sur gélose.

Nos résultats rapportaient une prévalence variable de résistance des isolats à la plupart des antibiotiques testés principalement aux β -lactamines et aux aminoglycosides. Nos souches ont été isolées principalement chez des brûlés du sexe masculin. 19,38% des isolats ont été résistantes aux carbapénèmes, parmi lesquels 32 souches hébergeaient des gènes de carbapénémase *bla*_{VIM-4}, 10 souches avaient comme autre mécanisme de résistance aux carbapénèmes la surexpression des systèmes d'efflux. Un total de 5 souches résistantes aux fluoroquinolones par mutations dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* de même les résistants à la colistine étaient 4 souches présentant des mutations dans les systèmes PhoPQ et PmrAB. Le génotypage a révélé une diversité des séquences types avec une épidémie engendrée par le ST244 et une relation clonale démontrée dans le typage par PFGE. Les isolats capables de former un biofilm étaient de: 24%, 19% et 27% selon la technique CRA, TM et TCP respectivement. Les HE ont montré une variabilité dans leur activité antibactérienne où les HE d'eucalyptus, de lavande et d'estragon ont montré l'effet le plus faible.

Ces résultats soulignent la diffusion des souches multirésistantes et virulentes ce qui incite la mise en œuvre de politique de surveillance de la résistance aux antibiotiques et d'implanter des stratégies de lutte contre cette résistance.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, résistances aux antibiotiques, biofilm, huiles essentielles, CHU de Batna.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a major pathogen in hospitals, it's involved in several severe infections besides its high antibiotic resistance. This recent problem is constantly increasing and threatens many countries around the world, especially Algeria. The purpose of this work was to study antibiotic resistance and its genetic supports for a total of 227 strains, collected over a period of 24 months from the services of the CHU of Batna, Algeria. Also assessing the formation of biofilm in isolated strains and study the antibacterial potential of the essential oils of eight plants.

Two identification techniques were used for the isolated strains: Api20NE system and MALDI-TOF MS. The antibiogram was carried out by agar diffusion method and CMI using microplate assay; as well a molecular study for the resistance genes (PCR, sequencing) and molecular typing (MLST and PFGE). Biofilm evaluation was carried out using three techniques: CRA, TM and TCP. The evaluation of the antibacterial activity of essential oils was made by the agar diffusion method.

Our results reported a variable resistance prevalence of isolates to most tested antibiotics mainly for β -lactamines and aminoglycosides. Our strains have been isolated mostly from male burn victims. 19.38% of isolates were carbapenem resistant, of which 32 strains harbored *bla*_{VIM-4} coding for carbapenemase, and 10 strains showed overexpressed efflux pumps as mechanism of resistance to carbapenems. A total of 5 fluoroquinolone resistant strains exhibited mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes. In addition to other 4 colistin resistant strains presented mutations in the PhoPQ and PmrAB systems. Genotyping revealed a diversity of sequence types with an outbreak of ST244 and a clonal relationship demonstrated in PFGE typing. The rates of isolates with formation of forming a biofilm were 24%, 19% and 27% according to the CRA, TM and TCP technique respectively. The essential oils showed variability in their antibacterial activity where eucalyptus, lavender and tarragon oils showed the lowest effect.

These results highlight the spread of multidrug-resistant and virulent strains, which needs extremely the creation of an antibiotic resistance surveillance policy and the implementation of control strategies.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, biofilm, essential oils, the university hospital of Batna.

المخلص

الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* هي أحد مسببات الأمراض الرئيسية في المستشفيات والمسؤولة عن العديد من الالتهابات الحادة بالإضافة إلى مقاومتها العالية للمضادات الحيوية. وهذه المشكلة الأخيرة تشهد تزايد مستمر ما يهدد العديد من البلدان حول العالم لا سيما الجزائر. كان الهدف من هذا العمل دراسة مقاومة المضادات الحيوية الجينات المسؤولة عنها على مجموعة تتكون من 227 سلالة، تم جمعها على مدى 24 شهرًا من مختلف وحدات المستشفى الجامعي في باتنة، الجزائر. إضافة إلى تقييم تكوين الغشاء الحيوي في السلالات المعزولة ودراسة الإمكانيات المضادة للبكتيريا للزيوت الأساسية من ثمانية نباتات.

تم تحديد السلالات ب تقنيتين MALDI-TOF MS و Api20NE تم اختبار الحساسية للمضادات الحيوية بواسطة انتشار الأقراص على الاغار وتم تحديد التركيز المثبط الأدنى بطريقة MICROPLATE مع دراسة جزيئية لجينات المقاومة (PCR والتسلسل الجيني)، و التتميط الجيني (PFGE و MLST) تمت دراسة تكوين الغشاء الحيوي باستخدام ثلاث تقنيات CRA و TM و TCP و تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت العطرية من خلال طريقة انتشار الأقراص على الاغار.

اوضحت نتائجنا عن معدلات مختلفة لانتشار المقاومة في العزلات تجاه معظم المضادات الحيوية التي تم اختبارها بشكل أساسي للبيتالاكتام وللأمينوغليكوزيدات. تم عزل سلالاتنا بشكل رئيسي من ضحايا الحروق من الذكور. كانت 19.38% من العزلات مقاومة للكاربابينيمات، منها 32 سلالة تحتوي على جينات *bla_{VIM-4}*، و 10 سلالات لها الآلية آلية التدفق المفرط النشاط لمقاومة الكاربابينيم. مع وجود مجموعه 5 سلالات مقاومة للفلوروكينولونات عن طريق الطفرات في جينات *gyrA* و *gyrB* و *parC* و *parE* وكذلك 4 سلالات مقاومة للكوليستين مع طفرات في نظام *PhoPQ* و *PmrAB*. كشف التتميط الجيني عن مجموعة متنوعة من التسلسلات النموذجية مع تقشي ST244 و مجموعة متنوعة من الانماط موضحة في PFGE. كانت العزلات القادرة على تكوين غشاء حيوي بنسبة 24% و 19% و 27% حسب تقنية CRA و TM و TCP على التوالي. أظهرت الزيوت العطرية الأساسية تبايناً في نشاطها المضاد للبكتيريا حيث أظهرت الأوكالبتوس والخزامى والطرخون أضعف تأثير.

تؤكد هذه النتائج على انتشار السلالات المقاومة والفتاكة، مما يدفع إلى ضرورة وضع سياسة مراقبة لمقاومة المضادات الحيوية واتباع استراتيجيات لمكافحة هذه المقاومة.

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas aeruginosa*، مقاومة المضادات الحيوية، الغشاء الحيوي، الزيوت العطرية، المستشفى الجامعي باتنة.

Introduction

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est un bacille aérobie non fermentaire à Gram négatif et un pathogène opportuniste cliniquement important (**Gellatly et al., 2013**). C'est l'un des six agents pathogènes bactériens, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*, qui sont couramment associés à la résistance aux antimicrobiens et désignés par l'acronyme ESKAPE (**Ciofu and Tolker-Nielsen, 2019**). C'est une bactérie dotée d'une grande adaptation génique conférées par les gènes régulateurs (> 8%) codés dans son grand génome (> 6 Mb), un remarquable répertoire de déterminants de virulence et une capacité exceptionnelle à échapper à l'activité des traitements antimicrobiens (**Silby et al., 2011**). Ce qui fait de *P. aeruginosa* l'une des causes les plus redoutables d'infections graves en milieu clinique à travers le monde (**Breidenstein et al., 2011**) en particulier chez les patients immunodéprimés, ainsi que chez les personnes hospitalisées en unité de soins intensifs, les patients atteints de mucoviscidose et les personnes gravement brûlées (**Sadikot et al., 2005**). Cette bactérie est liée à un taux de mortalité élevé et occupe la 6^{ème} position parmi les agents pathogènes les plus associés aux infections nosocomiales selon le rapport du National Healthcare Safety Network (NHSN) (**Weiner et al., 2016**). Malgré l'évolution des systèmes de la prise en charge des soins intensifs, les infections à *P. aeruginosa* sont encore associées à un taux de mortalité atteignant 20 à 50 % (**Kim et al., 2014 ; Yoon et al., 2019**).

Un large groupe de souches de *P. aeruginosa* présente une résistance à diverses classes d'antibiotiques ou d'agents antibactériens, ce qui rend difficile le contrôle de l'infection vu le nombre restreint des molécules habituellement actives sur cette bactérie (**Mohanty et al., 2020**). *P. aeruginosa* dispose d'une résistance intrinsèque à la majorité des antibiotiques par le biais de céphalosporinase chromosomiques AmpC, de la faible perméabilité de la membrane externe aux antimicrobiens et l'expression de la pompe à efflux. Dans plusieurs milieux hospitaliers, cette résistance naturelle est plus compliquée par des mutations facilitées par les chromosomes et l'acquisition supplémentaire de gènes de résistance issus de plasmides et de transposons codant pour des enzymes dégradant des antibiotiques (**Belodu et al., 2012 ; Balasubramanian et al., 2013**). Les mutations peuvent toucher les gènes codant pour les porines, les pompes à efflux, les protéines de liaison à la pénicilline et l'AmpC chromosomique, toutes contribuant à la résistance aux β -lactamines, aux carbapénèmes, aux aminosides et aux fluoroquinolones (**Oie et al., 2009**). Souvent, ces mécanismes existent simultanément, conférant ainsi une résistance

Introduction

combinée à de nombreux antibiotiques et donc les options de traitement sont très limitées (**Memar et al., 2016**).

Les taux de résistance élevés constatés dans de nombreux pays du bassin méditerranéen, notamment dans les pays de l'Afrique du nord reviennent aux fréquentes résistances acquises (**Jeannot and Plésiat, 2016**). La surveillance épidémiologique des résistances aux antibiotiques de *P. aeruginosa*, montre l'émergence de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques ces dix dernières années en Algérie (**Aggoune-Khinache et al., 2009; Baba Ahmed et al., 2014 ; Meradji et al., 2016**).

L'augmentation en chiffre des souches multirésistantes en raison de la propagation rapide a rendu le traitement contre *P. aeruginosa* compliqué (**Dogonchi et al., 2018**). De plus, l'existence de clones multirésistants à haut risque épidémiologique, comme *P. aeruginosa* ST175 (**Oliver et al., 2015**), de plasmides épidémiques porteurs de plusieurs gènes de résistance (**Mathers et al., 2015**) qui sont transférés entre bactéries même d'espèces différentes, et l'existence de personnes saines colonisées par des bactéries multirésistantes, dont la détection et le contrôle ne sont pas toujours aisés, contribuent à cette dispersion (**Oteo-Iglesias et al., 2019**).

Sans oublier sa capacité à produire des biofilms, qui est un autre facteur principal impliqué dans les infections chroniques et un déterminant de la virulence de *P. aeruginosa* car il est fortement corrélé avec la résistance aux antibiotiques. Les biofilms offrent un mode de vie protecteur aux bactéries et sont extrêmement difficiles et coûteux à traiter par des composés antimicrobiens ce qui explique la persistance d'infections prolongées causées par ce pathogène (**Baker et al., 2016**). Les biofilms jouent un rôle majeur dans plus de 80% des infections. 60% des infections associées aux soins sont attribués à la formation des biofilms sur dispositifs médicaux implantables et représentent donc un des facteurs de virulence qui permet aux bactéries de résister aux traitements antimicrobiens (**Madouri, 2017**). La résistance ou la tolérance des biofilms bactériens qui peut être 1000 fois plus importante que celle des mêmes cellules à l'état planctonique à pratiquement tous les antibiotiques est liée à plusieurs facteurs avec une plus grande capacité à transférer des gènes de résistance (**Jung et al., 2014**).

Par conséquent il existe un besoin urgent de rechercher des agents antimicrobiens nouveaux mais efficaces et des alternatives possibles impliquant des produits naturels pour atténuer le développement de l'antibiorésistance. Divers composés naturels aux

Introduction

propriétés médicinales ont été proposés comme agents antimicrobiens contre les agents pathogènes multirésistants, en particulier lorsqu'ils sont utilisés en association avec des antibiotiques conventionnels (**Gargano *et al.*, 2020**). Les métabolites d'origine végétale tels que les huiles essentielles (HE) ont été largement étudiés pour leur énorme utilisation en tant qu'agents antimicrobiens (**Solórzano-Santos and Miranda-NOVALES, 2012**)

C'est dans cette optique que s'insère notre étude dont l'objectif principal est de définir la prévalence, la résistance aux antibiotiques et la caractérisation moléculaire des gènes conférant la résistance chez cette bactérie au CHU de Batna. Dans un deuxième temps, il serait essentiel de mettre en évidence l'aptitude des souches isolées à former des biofilms. Puis on étudiera la possibilité de contrecarrer les souches MDR par moyen des alternatives naturelles particulièrement les huiles essentielles. Pour cette fin, on a tracé le plan suivant :

Le premier chapitre est une revue bibliographique sur l'agent pathogène *P.aeruginosa* en élucidant ses mécanismes de résistance aux antibiotiques, les différents facteurs de virulence ainsi que les propriétés du biofilm associés à cette bactérie. Avec des généralités sur les capacités thérapeutiques des huiles essentielles de quelques plantes.

Le deuxième chapitre présentera le matériel et les méthodes expérimentales utilisés. Enfin, le troisième chapitre sera consacré à la présentation de l'ensemble des résultats obtenus et aux discussions qui en découlent.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Synthèse bibliographique

1. Historique

Pseudomonas aeruginosa anciennement nommé *Bacillus pyocyaneus* a été indiqué comme agent infectieux pour la première fois par Lucke en 1862 après l'observation de Sédillot en 1850 de la décoloration des plaies chirurgicales. (Pitt, 1998) Il a été isolé pour la première fois par Gessard en 1882. Son nom est issu du grec *pseudo* (*simili ou imitation*) et *monas* (*unité*) et le mot *aeruginosus* (couvert de rouille) vient du latin et correspond à la couleur verdâtre sur les ulcères infectés par cette bactérie. Il est également appelé bacille pyocyanique : du grec *puon* (pus) et *kuanos* (bleu foncé) (Aissa, 2012). *P.aeruginosa* fut l'agent responsable des surinfections des plaies au cours de la 1ère guerre mondiale, les soldats montrèrent de pus bleu au niveau de leurs plaies. (Yétérien, 2010).

2. Taxonomie

Le premier rapport décrivant le genre *Pseudomonas* remonte à la fin du 19^e siècle du botaniste allemand Walther Migula (Palleroni, 2010). Le genre *Pseudomonas* appartient à la famille des *Pseudomonadaceae* qui inclut 14 genres : *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Chryseomonas*, *Entomomonas*, *Flavimonas*, *Mesophilobacter*, *Oblitimonas*, *Permianibacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, *Serpens* et *Thiopseudomonas*.

Le genre *Pseudomonas* regroupe 332 espèces dont l'espèce type est *Pseudomonas aeruginosa* (LPSN, 2020).

Domaine	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gammaproteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Synthèse bibliographique

3. Morphologie et physiologie

P. aeruginosa est un bacille droit ou légèrement incurvé à Gram négatif de 1 à 5µm de long contre 0.5 à 3µm de large. Il est non fermentant, aérobic strict, non sporulé, non capsulé mais capable de produire un glycocalyx et/ou un slime et est mobile par flagelle polaire en plus des fimbriae. Les cellules se trouvent libres en forme planctonique ou enchâssées dans un biofilm (**Willey et al., 2009**).

P.aeruginosa présente généralement des colonies isolées plates non mucoïdes lisses ou bombées à bord dentelé. Il existe des variants de petites colonies punctiformes (*small colony variants*) pouvant être produites par des souches provenant de patients souffrant d'infections ostéo-articulaires ou pulmonaires chroniques et des colonies muqueuses associées à la production d'alginate qui sont principalement isolées des patients atteints de mucoviscidose, de bronchopneumopathie chronique obstructive ou d'infections urinaires. Les souches environnementales de *P. aeruginosa* forment parfois des colonies en oeuf sur le plat relativement grand avec un centre bombé, des contours irréguliers et des reflets irisés (**Kidd et al., 2011**).

P. aeruginosa peut utiliser une panoplie de sources de carbone par métabolisme oxydatif. Elle produit l'acide à partir de glucose, fructose et xylose. Parmi les caractéristiques biochimiques de *P. aeruginosa*, on retiendra la production d'une *cytochrome C oxydase* (test de l'oxydase positif), d'une nitrate réductase et d'une nitrite réductase permettant la réduction des nitrates (NO₃⁻) en monoxyde d'azote (NO) puis en azote (N₂), ainsi que d'une arginine déiminase (ADH positive) (**Brenner et al., 2005**).

Elle peut se développer en anaérobiose en utilisant le nitrate ou l'arginine comme accepteur final d'électrons (**Kiska and Gilligan, 2003**). Elle se développe dans un intervalle de température allant de 4 °C à 45 °C (**Pier and Ramphal, 2005**), mais sa température optimale est de 37°C. Sa croissance à 42°C permet de la différencier des autres espèces fluorescentes pathogènes du genre *Pseudomonas* comme *P. fluorescens* et *P. putida*. Sa culture est aisée sur des milieux ordinaires (Mueller Hinton, gélose nutritive), sélectifs (géloses Drigalski, Hektoën, Mac Conkey ou renfermant du cétrimide) ou chromogènes. (**López Causapé, 2018**)

P. aeruginosa utilise aussi le fer qui est nécessaire pour sa croissance et ses fonctions métaboliques telles que la respiration et la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Dans un environnement pauvre en fer, *P. aeruginosa* est

Synthèse bibliographique

capable de séquestrer le fer libre à l'aide de composés chélateurs du fer appelés sidérophores. Les sidérophores solubles dans l'eau produits par *P. aeruginosa* sont la pyoverdine et la pyochéline (Saha *et al.*, 2013). Sous une lumière ultraviolette (UV), l'expression de la pyoverdine est indiquée par une fluorescence jaune-verte. Les pigments supplémentaires produits par *P. aeruginosa* sont la pyocyanine, la pyomélanine et la pyorubine, qui donnent les teintes bleues, brunes et rouges observées sur ses colonies (Lamont *et al.*, 2003).

4. Niches écologiques

P. aeruginosa est un microorganisme ubiquitaire qui a une grande flexibilité métabolique et des exigences nutritionnelles minimales ce qui lui permet de coloniser plusieurs niches écologiques de différentes conditions de vie (température, oxygène, pH, substrat) (Spiers *et al.*, 2000). Il est largement distribué dans l'environnement surtout dans les milieux aquatiques doux et marins, le sol, l'air, la matière organique et les surfaces humides. Des études récentes indiquent que *P. aeruginosa* est souvent trouvé dans les eaux grises ménagères (Remold *et al.*, 2011). L'hôpital constitue une niche écologique favorable à son développement où il est isolé des dispositifs et équipements chirurgicaux et médicaux (matelas, endoscopes, cathéters, nébulisateurs, humidificateurs et respirateurs), siphons, douches, toilettes, désinfectants, détergents et eau distillée. De plus, il est capable d'infecter ou de coloniser plusieurs hôtes (végétaux, animaux, insectes, nématodes etc...) (Silby *et al.*, 2011 ; Zubko and Zubko 2013).

5. Génétique

Pseudomonas aeruginosa étant une bactérie, son ADN se trouve sur un seul chromosome circulaire et surenroulé. Le premier génome complet disponible séquencé en 2000 était celui de la souche de référence PAO1 avec une taille de 6.3 MPb, un taux de G+C de 66.6%, 5697 gènes et 5570 cadres de lecture ouverts (ORF) (Stover *et al.*, 2000). Un total de 5063 génomes séquencés sont disponibles sur le site du NCBI (Février 2020).

Ce grand génome présente une complexité génétique dont plusieurs gènes partagent la même fonction. Plus de 521 ORF (8.4%) du génome sont dédiés à la régulation ce qui confère à cet organisme une incroyable adaptation aux différentes conditions environnementales (milieux minimaux, variables conditions physiques) et aux différents hôtes. Le génome code aussi pour de nombreux transporteurs impliqués dans

Synthèse bibliographique

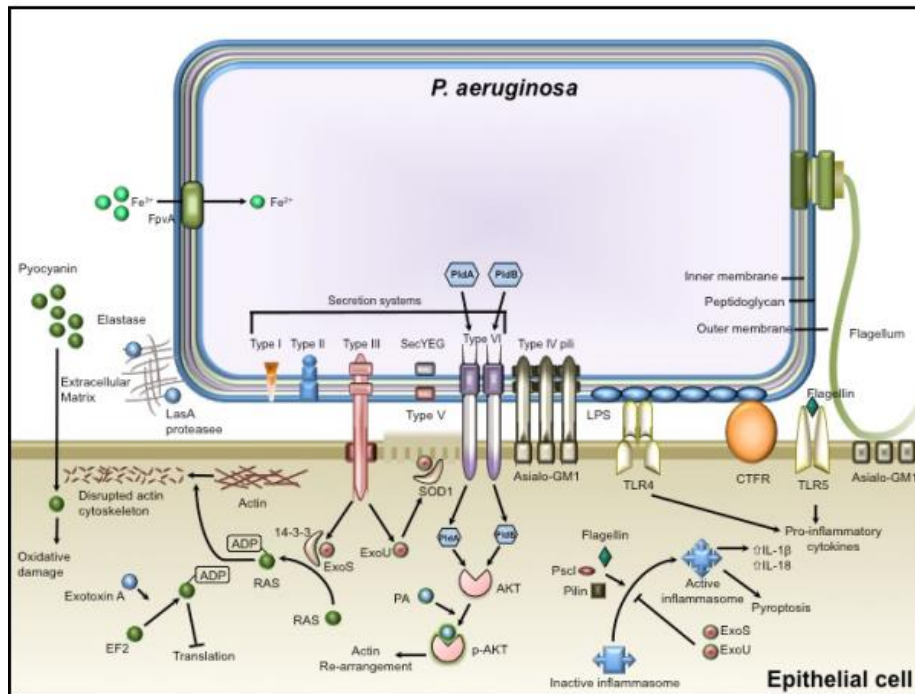


Figure.2. Les majeurs facteurs de virulence de *P.aeruginosa* (Hauser and Ozer, 2011)

6.1. LPS

Le LPS est connu pour son rôle protecteur contre la lyse provoquée par le sérum et pour son activité endotoxique. L'endotoxine est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort (Elemam *et al.*, 2009).

6.2. Flagelle

P. aeruginosa possède un seul flagelle polaire qui est responsable de sa motilité de type swimming, le chimiotactisme et l'acquisition des nutriments. Néanmoins, son rôle dans la virulence va au-delà de la simple motilité où les protéines flagellaires jouent un rôle critique dans l'attachement, l'invasion, la formation de biofilm et la médiation des réponses inflammatoires. Les souches non flagellées sont moins invasives. Cependant, lors d'une infection chronique, comme la mucoviscidose, les souches dépourvues de flagelles sont progressivement soumises à une pression de sélection des résistants (Verma *et al.*, 2005; Ben Haj *et al.*, 2011).

6.3. Pili type IV

Chez *P.aeruginosa*, les pili de type IV (T4P) jouent un rôle important dans le tropisme tissulaire et l'attachement aux différents types de tissus cellulaires, dans

Synthèse bibliographique

l'initiation de la formation de biofilm et dans la phagocytose non opsonique (**Mattick, 2002; Barken et al., 2008**). Les bactéries dépourvues de T4P sont nettement moins capables de se lier aux cellules eucaryotes (**Farinha et al., 1994**) et incapables de former des microcolonies sur des surfaces artificielles nécessaires pour initier la formation de biofilm. En outre, les souches piliées provoquent non seulement plus de pneumonies mais sont aussi à l'origine d'une plus grande mortalité que les souches ne possédant pas le pili. (**O'Toole and Kolter, 1998**).

6.4. Alginate

Elle est responsable de l'aspect muqueux des colonies. Comme elle facilite l'adhésion des cellules bactériennes aux cellules trachéales, inhibe la phagocytose et l'action des antibiotiques, impliquée dans la pathogénicité respiratoire (**Ben Haj et al., 2011**)

7. Epidémiologie

P.aeruginosa est un pathogène opportuniste provoquant des infections aiguës et chroniques, communautaires et nosocomiales et rarement trouvé colonisant des hôtes immunocompétents (**Kidd et al., 2012**). La gravité de l'infection peut varier d'une simple infection spontanément résolutive à une infection systémique grave associée à une morbidité et une mortalité importantes (**Afshari et al., 2012**). Il est responsable d'infections de localisations diverses chez des patients ayant des défenses antibactériennes altérées. *P. aeruginosa* est ainsi responsable d'infections cutanées, oculaires, auriculaires, neuroméningées, de bactériémies mais cette espèce est principalement responsable d'infections respiratoires (particulièrement en réanimation ou chez les patients atteints de mucoviscidose) et d'infections urinaires (IU) (**Oliveira et al., 2020**). *P. aeruginosa* représente la seconde cause de pneumopathie nosocomiale et est la troisième espèce de bacille à Gram négatif la plus fréquemment identifiée au cours de bactériémie. *P. aeruginosa* est responsable d'infections chez 60-80% des patients atteints de mucoviscidose (**Acosta et al., 2020**). Lors d'une étude multicentrique française réalisée sur cinq mois, la prévalence des infections à *P. aeruginosa* en service de réanimation et soins intensifs était de 15,3% (**Hoang et al., 2018**). *P. aeruginosa* est responsable de 10% des infections liées aux soins (IAS) et représente ainsi le quatrième pathogène nosocomial le plus fréquemment isolé au cours d'IAS, en France et dans le monde (**Daniau et al., 2020**).

Synthèse bibliographique

8. Résistance

Les bactéries présentent de multiples mécanismes de résistance aux antibiotiques, notamment la diminution de la perméabilité, l'expression des systèmes à efflux, la production d'enzymes d'inactivation d'antibiotiques et des modifications de la cible. Parmi les bactéries multi-résistantes *P. aeruginosa* constitue une préoccupation majeure et une menace croissante pour la santé mondiale entraînant une augmentation accrue de la prévalence des infections nosocomiales et chroniques. Cela est dû à l'extraordinaire capacité de ces bactéries à développer une résistance contre un large éventail d'antimicrobiens par le biais de divers mécanismes moléculaires qui sont souvent présents simultanément dans les isolats cliniques (**Hirsch and Tam, 2010**). Bien que chaque mécanisme de résistance soit lié à une classe spécifique d'antibiotiques, plusieurs mécanismes interviennent de manière variable dans la résistance à chaque classe d'antibiotiques (**Potron et al., 2015**).

P. aeruginosa est difficilement traité du fait qu'il possède la plupart de ces mécanismes de résistance (**Lister et al., 2009**). La résistance chez *P. aeruginosa* est intrinsèque codée par le chromosome ou génétiquement acquise qui affecte les principales classes d'antibiotiques tels que les β -lactames, les aminosides, les quinolones et les polymyxines (**Llanes et al., 2013**).

Au moins huit classes d'antibiotiques sont utilisées dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* à savoir la famille des β -lactamines : les carbapénèmes, les céphalosporines, les pénèmes avec inhibiteurs de β -lactamase et les monobactames et d'autres familles essentiellement les aminoglycosides, les fluoroquinolones, les polymyxines et la fosomycine (**El Solh and Alhajhusain, 2009**). Ainsi, les souches de *P. aeruginosa* sont classées en fonctions de leurs spectres de résistances en BMR (résistance à un antibiotique dans trois classes différentes), BHR (résistance à un antibiotique dans plus de quatre classes d'antibiotiques) ou BPR (totorésistance aux antibiotiques utilisés). (**El Zowalaty et al., 2015**).

8.1. Résistance naturelle

P. aeruginosa est naturellement résistant aux aminopénicillines, aux pénicillines M, aux céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération (C1G et C2G) et certaines de 3^{ème} génération (C3G) comme le céfotaxime et la ceftriaxone, et à un carbapénème : l'ertapénème. Les mécanismes participant à cette résistance naturelle aux β -lactamines

Synthèse bibliographique

sont au nombre de trois, fréquemment regroupés sous l'appellation de « résistance intrinsèque » de *P. aeruginosa* aux β -lactamines : l'imperméabilité relative de la membrane externe, la présence de systèmes d'efflux actif et la production d'une β -lactamase chromosomique de classe C spécifique de cette espèce bactérienne. (Guevara *et al.*, 2012 ; Montalegre, 2016)

P. aeruginosa résiste naturellement également à la kanamycine, la streptomycine et la néomycine grâce à une enzyme modificatrice des aminosides : APH(3')- II. Elle possède aussi deux systèmes d'efflux actifs sur les aminosides (MexEF-OprN et MexXY-OprM) mas ils ne jouent pas de rôle dans la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa*. (Poole, 2005; Breidenstein *et al.*, 2011)

8.1.1. Imperméabilité de la membrane externe

Une inhibition sélective des antibiotiques est imposée par la membrane externe de *P.aeruginosa*, sa perméabilité est à 1/100 par rapport à celle de la membrane d'*E.coli* et ne permet la pénétration des composés de grand poids moléculaire (Bellido *et al.*, 1992). Elle se compose d'une bicouche phospholipidique, LPS et deux types de protéines celles de structure et celles qui servent comme canaux de transport (porines) (Delcour, 2009).

La porine la prédominante chez *P.aeruginosa* est la OprF (37.6 kD) (Winsor *et al.*, 2016), elle joue un rôle structural tout en contribuant dans le maintien de la forme de la cellule (Rawling, Brinkman and Hancock, 1998) ainsi qu'un rôle de transporteur responsable de la diffusion non spécifique des ions, des saccharides avec une faible perméabilité pour les antibiotiques (Bratu *et al.*, 2007). Elle a deux conformations la plus abondante est une structure fermée qui traduit la faible perméabilité de la membrane externe de *P.aeruginosa* par rapport aux autres bactéries. Tandis que celle sous forme de canal ouvert forme une petite fraction (<5%) (Sugawara and Nikaido 1994; Sugawara *et al.*, 2006)

La OprH est la plus petite porine chez *Pseudomonas aeruginosa* (21.6 kDa) et lorsqu'elle est en surexpression, elle confère une résistance aux polymyxines B et aux aminoglycosides (Macfarlane *et al.* 1999; Kwon and Lu 2006; Wei *et al.* 2011). Cependant sa répression rend *Pseudomonas aeruginosa* sensible à la colisitine (Chambers and Sauer, 2013).

Synthèse bibliographique

8.1.2. Systèmes d'efflu

Il existe chez les bactéries des systèmes de transport actif primaire et secondaire dites les pompes d'efflux. Elles sont décrites comme mécanisme de résistance pour la première fois en 1980 (pompe d'efflux de la tétracycline chez *E. coli*) et elles sont présentes chez les souches sensibles et résistantes avec une large spécificité de substrats (**Hernando-Amado et al., 2016**)

L'analyse génomique de ces systèmes révèle la présence de cinq superfamilles. On distingue la superfamille des « Major Facilitator » (MFS), la superfamille des ABC transporteurs « ATP Binding Cassette », la superfamille des « Small Multidrug Resistance » (SMR), la superfamille des « Resistance Nodulation Division » (RND) et la superfamille « Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE) (**Li and Nikaido, 2009**)

Cependant les pompes d'efflux responsable de la résistance chez *P. aeruginosa* sont membres de la superfamille des RND (**Poole, 2007**). Ce sont des systèmes à trois composants formés des canaux protéiques de la membrane externe (OMF), des protéines de liaison periplasmiques (MFP) et des protéines de transport cytoplasmiques (**fig.3**) (**Daury et al., 2016**). *P. aeruginosa* possède quatre systèmes principaux d'efflux : le MexAB-OprM qui est le premier système d'efflux décrit chez cette espèce pour son implication dans l'efflux de la pyoverdine ainsi que son implication dans la résistance aux antibiotiques également démontrée (**Li et al., 1995**), MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY-OprM (**Gotoh et al., 1995 ; Li et al., 2000b, Dreier and Ruggerone, 2015**)

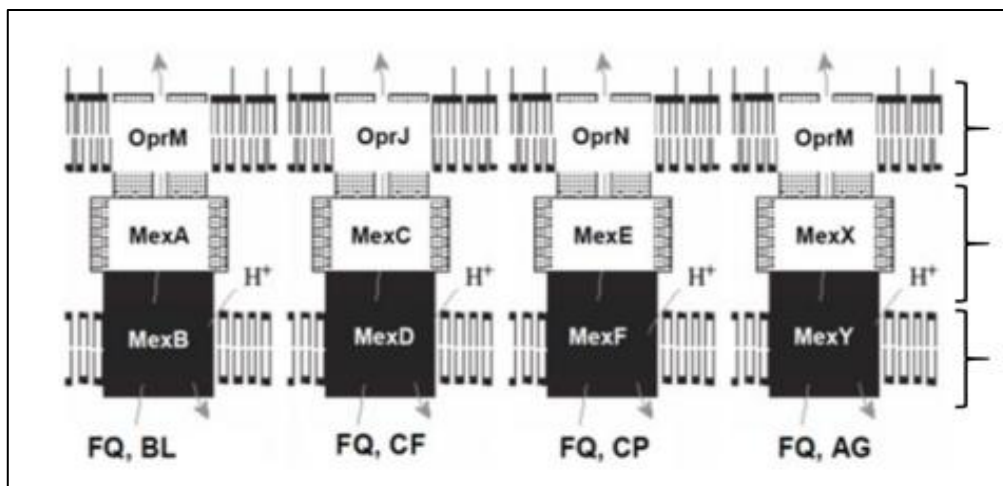


Figure.3. Model structural des principales pompes à efflux chez *P. aeruginosa* (**Neves et al., 2010**)

Synthèse bibliographique

Ces pompes peuvent attribuer une résistance aux : quinolones, β -lactamines, tetracycline, macrolides, chloramphenicol, novobiocine, triméthoprime et sulfonamides comme c'est le cas de la pompe (MexAB-OprM,) (**Köhler et al., 1996 ; Li et al., 1998b ; Srikumar et al., 1998; Dupont et al., 2005 ; Tomas et al., 2010**). La pompe MexCD-OprJ induit une résistance aux β -lactamines (**Okamoto et al., 2002**), pour et la pompe MexEF-OprN confère une résistance aux quinolones (**Llanes et al., 2011**), tandis que les aminoglycosides et les fluoroquinolones peuvent être expulsés par la pompe MexXY-OprM (**Hocquet et al., 2003**).

8.1.3. Céphalosporinase chromosomique AmpC

De plus de sa faible perméabilité membranaire et ses systèmes d'efflux, la résistance intrinsèque chez *P.aeruginosa* peut être attribuée à une enzyme dite céphalosporinase chromosomique AmpC qui est une β -lactamase à large spectre de la classe C de Ambler. Elle est caractéristique de l'espèce et connue depuis plus de trente ans (**Ambler et al., 1991**). Elle est exprimée à un niveau basal et peut conférer une résistance naturelle aux β -lactamines (aminopenicillines, ampicilline, amoxicilline, cephalothine C1G, C2G et quelques C3G comme la cefotaxime et le moxalactame) sauf la ceftazidime, le cefepime et les carbapénèmes (**Aghazadeh et al., 2014**). Dans les conditions normales, l'enzyme est produite à bas niveau du fait de l'action limitée d'*ampR* activateur de la transcription (codant pour une protéine transmembranaire) d'*ampC* réprimé, mais certaines β -lactamines comme les carbapénèmes et la céfoxitine ou encore l'acide clavulanique peut induire sa production (**Jeannot and Plésiat, 2016**).

Outre AmpC, *P. aeruginosa* présente deux autres β -lactamases chromosomiques : l'OXA-50 ou PoxB de classe D d'Ambler dont le rôle en résistance reste marginal vu sa faible activité et de son restreint spectre, et une métallo- β -lactamase PIB-1 (**Girlich et al., 2004; Fajardo et al., 2014; Juan et al., 2017b**). Les homologues de FosA sont présents dans la majorité des génomes de certaines espèces, y compris *P. aeruginosa*, et contribuent à la résistance intrinsèque à la fosfomycine (**Ito et al., 2017a, 2017b**).

L'aminoglycoside 3'-phosphotransférase II (APH (3')-II) chromosomiquement codée est présent chez *P. aeruginosa* et lui confère naturellement une résistance à la kanamycine, à la néomycine et à la parmomycine. En fait, c'est cette enzyme qui a efficacement éliminé ces aminosides de l'utilisation clinique (**Okii et al., 1983**).

Synthèse bibliographique

8.2. Résistance acquise

8.2.1. Surexpression de l'AmpC

La production de l'AmpC peut considérablement augmenter sous certaines conditions conférant ainsi une résistance à toutes les β -lactamines sauf les carbapénèmes. Cela est le résultat soit des mutations dans l'un de ses gènes régulateurs (*ampD*, *ampDh2*, *ampDh3*, *ampR*, *ampG*, *ampO*, *ampP* et *dacB*) (Oliver *et al.*, 2015; Kong *et al.*, 2010), soit d'une induction du gène. Les mutations des gènes de régulation de la production de l'AmpC peuvent survenir à des fréquences qui varient de 10^{-7} à 10^{-9} (Bagge *et al.*, 2002). L'induction de l'AmpC est un processus réversible qui se produit sous exposition à des β -lactamines et des inhibiteurs de β -lactamases spécifiques tels que la céfoxitine, l'imipénem et / ou le clavulanate (Lister *et al.*, 2009).

La résistance de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes est couramment expliquée par L'hyperproduction de l'AmpC en association avec d'autres mécanismes de résistance comme l'altération de la porine D2 le plus souvent, cette dernière provoque une augmentation des CMI de quatre à seize fois pour les carbapénèmes (Fournier *et al.*, 2013), ou par la surexpression d'un système d'efflux (MexAB-OprM ou MexCD-OprJ) voire parfois les deux. L'AmpC naturelle de *P. aeruginosa* a la capacité d'hydrolyser les carbapénèmes (faible pour le méropénème, plus importante, jusqu'à 25 fois plus, pour l'imipénème) et son surexpression diminue sa sensibilité aux carbapénèmes (Castanheira *et al.*, 2014). La détection de l'hyperproduction d'AmpC doit s'envisager en cas de résistance à la ceftazidime (Montalegre, 2016). Le gène codant pour AmpC de *P. aeruginosa* n'a pas encore été identifié sur des plasmides et donc n'est pas transmis à d'autres espèces comme c'est le cas des AmpC plasmidiques d'entérobactéries (Mérens *et al.*, 2012).

8.2.2. Surexpression des pompes d'efflux

Un autre facteur contribuant à la résistance aux β -lactamines chez *P. aeruginosa* est la surexpression des pompes d'efflux qui surgit lors d'un traitement aux fluoroquinolones, pénicillines et céphalosporines comme conséquence de mutation ponctuelle dans les systèmes de régulation génique de ces pompes (Livermore, 2003 ; Ong *et al.*, 2007)

Synthèse bibliographique

8.2.2.1. La pompe MexAB-OprM

Sa surexpression mutationnelle explique la sensibilité réduite à toutes les β -lactamines sauf l'imipénème. La mutation provoque une inactivation ou une altération des gènes répresseurs *mexR*, *nalC* ou *nalD* (fig.4). Les mutants surproducteurs de MexAB-OprM présentent près de 50% des isolats présentant une sensibilité réduite à la ticarcilline (Li *et al.*, 2015) les mutations du *nalB* dans le locus du *mexR* entraîne une élévation de la CMI des pénicillines, céphalosporines, quinolones, tétracyclines et le chloramphénicol. La surexpression de MexXY ou MexCD-OprJ peut aussi conférer une résistance au cefepime (Mulet *et al.*, 2011)

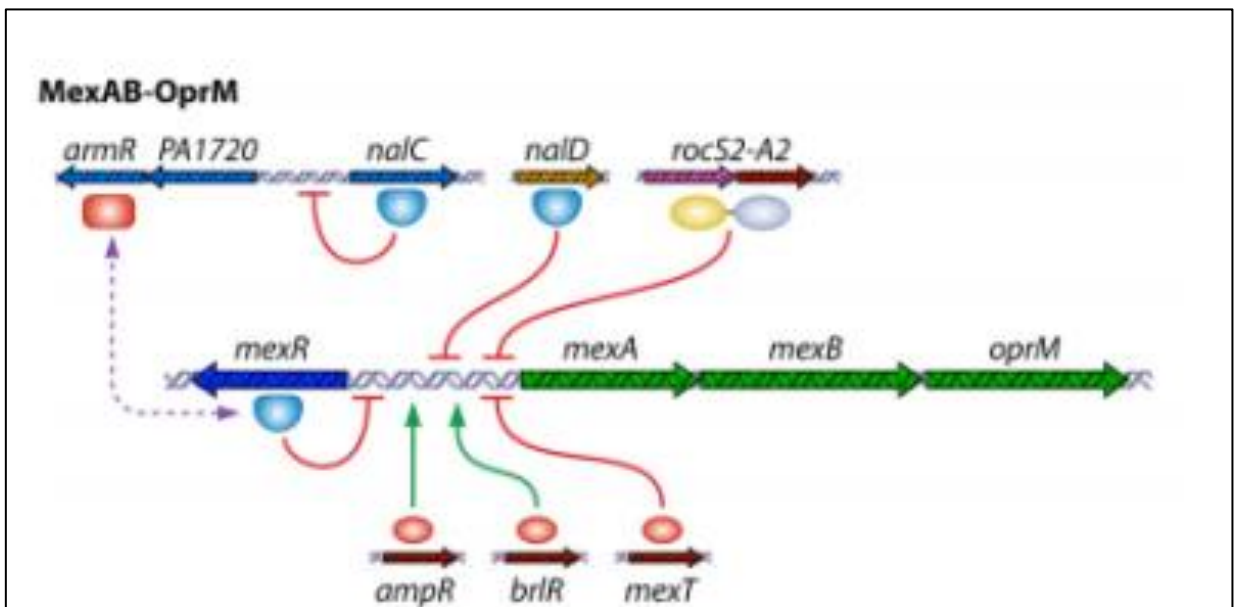


Figure.4. Système de régulation de MexAB-OprM. (Lister, 2009).

Toutefois la surexpression de la pompe d'efflux baisse la virulence chez les mutants surproduisant le MexAB-OprM en entraînant une diminution de la production des élastases et, protéases servant de facteurs de virulence et de pyocyanine et pyoverdine (Evans *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2002).

8.2.2.2. La pompe MexXY

La surexpression de MexXY augmente la résistance aux aminosides, fluoroquinolones, macrolides, tétracyclines et céphalosporines de 2 et 16 fois (Li *et al.*, 2015). Il existe trois types de mutants surproduisant MexXY le premier type présente une mutation sur *mexZ* (mutants *agrZ*) qui est un répresseur de la pompe (Hocquet *et al.*, 2008), le deuxième a des mutations sur les protéines ribosomales (L21 et L27, mutants *agrWI*) qui affectent la

Synthèse bibliographique

synthèse protéique (Lau *et al.*, 2012) et le dernier a des mutations sur *parR* et *parS* (mutants *agrW2*) (Fournier *et al.*, 2013).

8.2.2.3. La pompe MexCD-OprJ

MexCD-OprJ est inductible par des agents qui causent des dommages à la membrane tels que les détergents ou les solvants comme La chlorhexidine et le chlorure de benzalkonium. (Piddock *et al.*, 2006; Jeannot *et al.*, 2008). La mutation dans le gène *nfxB* entraîne la surexpression de cette pompe et augmente la résistance à plusieurs familles d'antibiotiques : les fluoroquinolones, les céphalosporines (C4G), le chloramphénicol et les tétracyclines, mais semble rendre sensible aux aminoglycosides quelques β -lactamines (carbénicilline, aztréoname et imipénème) (Poole *et al.*, 1996). De plus, la surproduction de MexCD-OprJ induit une diminution de l'expression de MexXY-OprM et de MexAB-OprM ainsi que leurs résistances associées (Jeannot *et al.*, 2008).

8.2.2.4. La pompe MexEF-OprN

La dernière pompe majeure est MexEF-OprN qui tout comme MexCD-OprJ n'est pas constitutivement exprimée (Li *et al.*, 2003). Les mutants *nfxC*, portant des mutations sur les gènes *mexS*, *mexT* ou *mvaT* expriment également une surproduction de la pompe de MexAB-OprM, sont résistants aux β -lactamines et peuvent présenter une perte de la porine OprD ce qui les rendent résistants aux carbapénèmes (Vila *et al.*, 2008 ; Llanes *et al.*, 2011). On retrouve rarement ce phénotype chez les souches cliniques et il confère aux mutants une résistance aux fluoroquinolones, au chloramphénicol, à la tétracycline et au triméthoprime alors qu'ils sont hypersensibles aux aminosides (Köhler *et al.*, 1997).

8.2.3. Résistance par acquisition des gènes de résistance

Un autre mécanisme important que *P. aeruginosa* déploie pour éviter l'effet inhibiteur des antibiotiques est leur inactivation via l'acquisition des gènes de résistance (Breidenstein *et al.*, 2011). Ce dernier est transmis sur des plasmides, des transposons, des intégrons (Walsh *et al.* 2005) par transfert horizontal (conjugaison et transformation) de gènes à partir de la même espèce bactérienne, de différentes espèces ou encore des prophages (transduction) (Arber, 2014). Outre la céphalosporinase chromosomique, *P. aeruginosa* peut acquérir des gènes de résistance aux aminosides et aux β -lactamines produisant ainsi une large gamme d'enzymes. (Yan *et al.*, 2006; El Zowalaty *et al.*, 2015).

Synthèse bibliographique

8.2.3.1. Les β -lactamases transférables

8.2.3.1.1. Les β -lactamases à spectre rétreint

P. aeruginosa peut couramment acquérir des β -lactamases plasmidiques qui sont les pénicillinases (PSE, TEM, SHV) de la classe A d'Ambller et des oxacillinases OXA (classe D d'Ambller), qui hydrolysent les carboxy-pénicillines et les uréidopénicillines, la ticarcilline, les associations ticarcilline-acide clavulanique, la pipéracilline-tazobactam, les céphalosporines à spectre étroit mais pas les céphalosporines à spectre étendu (**Montalegre, 2016**). Les oxacillinases sont courantes chez *P. aeruginosa*, mais très rares chez les entérobactéries. Inversement, les β -lactamases de classe A d'Ambller à spectre étroit, telles que TEM et SHV, couramment trouvées chez les entérobactéries, ne se trouvent que rarement chez *P. aeruginosa* (**Weldhagen et al., 2003**). Une étude française a révélé que seulement 10% des isolats de *P. aeruginosa* résistants à la ticarcilline avaient acquis une β -lactamase de type TEM.

Les principales pénicillinases sont PSE-1 dite CARB-2 (enzyme spécifique de *Pseudomonas* isolées chez 90% des cas), PSE-4 (CARB-1), PSE-3 à 5, CARB-2 et CARB-4 (**Bert et al., 2002**). Ces pénicillinases sont inactives sur la ceftazidime et les carbapénèmes (**Mérens et al., 2012**). La première detection de PSE-1 en Afrique du nord a été rapportée par **Ktari et ses collaborateurs** en Tunisie (**2011**).

Les principales oxacillinases sont OXA-1, OXA-2 et OXA-10. La résistance exprimée par OXA-2 à la ticarcilline et à la pipéracilline est inférieure à celle générée par OXA-10 et OXA-1 (**Mendoza et caballero, 2016**).

8.2.3.1.2. β -lactamases à spectre étendu (BLSE)

A la différence des pénicillinases, les BLSE ont une résistance non seulement aux carboxy-pénicillines et aux uréidopénicillines mais aussi aux C3G et les C4G (céfépime et céftazidime) et à l'aztréoname et sont inhibées par l'acide clavulanique, tazobactam et carbapénèmes. Elles appartiennent aux classes A ou D de Ambller. La première BLSE décrite chez *P. aeruginosa* fut la PER-1 (*Pseudomonas* Extended Resistance) en 1991 (**Nordmann et al., 1993**). Les types BLSE décrits jusqu'à présent chez *P. aeruginosa* sont; BLSE des classes VEB, PER, SHV, TEM, GES, IBC et BEL (**Weldhagen et al., 2003; Bogaerts et al., 2007**). Certaines BLSE sont associées à des régions géographiques spécifiques, ce qui suggère que ces enzymes peuvent jouer un rôle dans des niches écologiques spécifiques. La fréquence de positivité des BLSE chez *P. aeruginosa* semble

Synthèse bibliographique

augmenter (**Jiang et al., 2006**). On pense que les BLSE des classes PER et OXA sont des mutations d'enzymes de *P. aeruginosa* lui-même et celles des classes TEM et SHV ont été acquis à partir d'entérobactéries (**Bradbury, 2009**).

Les premiers isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* à BLSE sont apparus vers les années 90. En plus des BLSE de type TEM et SHV présentes aussi chez d'autres bactéries gram-négatives, d'autres BLSE ont été identifiées comme le type PER (Turquie), le VEB (en Asie du Sud-Est, en France et en Bulgarie), le type GES / IBC (en France, en Grèce et en Afrique du Sud) et le type CTX-M. Ces six types de BLSE sont génétiquement différents, mais sont similaires dans leurs profils d'hydrolyse. L'enzyme SHV-2a qui peut hydrolyser les C4G a été détectée pour la première fois en France (**Naas et al., 1999**). Récemment, d'autres enzymes telles que SHV-5 et SHV-12 ont été isolées chez *P. aeruginosa*, où SHV-5 présente une résistance élevée à la ceftazidime et aux monobactames (**Neonakis et al., 2003**).

Les gènes des BLSE de type TEM et SHV ont été transférés des entérobactéries où le séquençage de l'ADN chromosomique s'est avéré être identique à ceux rapportés dans les isolats plasmidiques d'*Enterobacter arogenes*, *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* (**Marchandin et al., 2000**). En 1991, l'enzyme PER-1 a été la première BLSE identifiée et caractérisée chez *P. aeruginosa* (**Nordmann et al., 1998**). Quant au type VEB, actuellement deux types VEB-1 et VEB-2 sont identifiés se différenciant d'un acide aminé en dehors du centre actif (**Weldhagen et al., 2003**).

À la fin des années 1990, une nouvelle famille de BLSE a été décrite, les GES (Guiana Extend Spectrum) GES-1, GES-2, GES-5, GES-8 et GES-9. (**Dubois et al., 2002 ; Castanheira et al., 2004**). Le GES-2 a une activité carbapénémase due à la formation de ponts disulfure à travers les résidus sérine. Cependant, cette activité est plus faible que celle des métalloenzymes de classe B (**Poirel et al., 2002**). De nouvelles variantes de GES-1 ont été identifiées : GES-5, GES-8 et GES-9 dont les différences sont dues aux changements des acides aminés dans leur structure. GES-5 est une enzyme codée par le gène *blaGES-5*, située dans un intégron de classe 1, la variation d'acides aminés est donnée par Gly242Ser. Tandis que la GES-9 est codé par le gène *blaGES-9* porté sur l'intégron de classe 1 tout comme la GES-5, elle diffère de GES-1 par la substitution d'acide aminé Gly243Ser. La GES-8 varie de la GES-1 par substitution d'Ala125Leu (**Mavroidi et al., 2001 ; Poirel et al., 2005**).

Synthèse bibliographique

C'est en Belgique qui s'est faite la première détection de la BLSE BEL-1 chez *P. aeruginosa*, portée sur un transposon chromosomique (**Bogaerts et al., 2007**).

Les BLSEs de classe D sont dites oxacillinasés à spectre élargi (ES-OXA) pour les distinguer des oxacillinasés à spectre restreint et des oxacillinasés carbapénémases (**Poirel et al., 2010**). La plupart de ces BLSEs sont isolées en Turquie et en France (**Hall et al., 1993; Poirel et al., 2002; Hocquet et al., 2010**) et proviennent des mutations ponctuelles des oxacillinasés à spectre restreint (OXA-14, OXA-19, OXA-28, OXA-32, OXA-45...). Elles sont peu inhibées par l'acide clavulanique sauf en ce qui concerne OXA-18 et OXA-45 (**Hocquet et al., 2011**). Les oxacillinasés à large spectre n'ont été identifiées, pour l'instant, que chez *P. aeruginosa*. La majorité des BLSE de cette classe sont codées par des plasmides ou des intégrons ce qui a facilité leur large diffusion dans le bassin méditerranéen (**Nordmann and Guibert 1998**) sauf la BLSE OXA-18 qui est chromosomiquement codée (*blaOXA-18*) et qui fut décrite pour la première fois en France ensuite en Tunisie entre 1998 et 2000. Elle diffère des autres oxacillinasés par sa séquence en acides aminés (**Philippon et al., 1997 ; Kalai et al., 2007**)

Sanschagrin *et al.* 1995 décrivent cinq groupes différents d'oxacillinasés chez *P. aeruginosa*, le groupe OXA I, qui comprend OXA-5, OXA-7, OXA-10 et leurs variantes (OXA-11, OXA-14, OXA-16 et OXA-17) et OXA-13 et ses variantes (OXA-19 et OXA-28) (**Couture et al., 1992**). Ces dernières années, l'enzyme OXA-13 et ses variantes (OXA-19 et OXA-28) ont été définies comme un sous-groupe lié à OXA-10 (**Bert et al., 2002**). Les oxacillinasés OXA-11, OXA-14 et OXA-19 affectent principalement l'activité de la ceftazidime, tandis que l'OXA-17 hydrolyse principalement le céfotaxime. En général, les variants à spectre étalé de l'OXA-10 déterminent un faible niveau de résistance aux céphalosporines de quatrième génération (**Aubert et al., 2001**). Le groupe OXA II comprend OXA-2, OXA-3, OXA-15 et OXA-20 avec une autre variante de l'OXA-2 (OXA-32) qui a été identifiée (**Senda et al., 1996**). Le groupe OXA III comprend OXA-1 et ses variantes OXA-4, OXA-30 et OXA-31. Le groupe OXA IV est composé d'une seule enzyme, OXA-9, et le groupe OXA V contient la LCR-1. Hormis l'OXA-15 et l'OXA-32, le reste des ES-OXA sont dérivées de l'OXA-10. Toutes les variantes de l'OXA-10 sont connues pour avoir l'une des deux substitutions d'acides aminés suivantes : Ser73Asn ou Gly157Asp (**Bradford et al., 2001**).

Synthèse bibliographique

La transmission des gènes codant pour les BLSE joue un rôle important dans la propagation de la résistance aux antibiotiques. Les plasmides et les intégrons sont des éléments fondamentaux pour cette mission. La plupart des gènes codant pour les enzymes TEM et SHV (**Mugnier et al., 1996**) sont localisés sur des plasmides, et dans l'intégron de classe 1 se trouvent les gènes codant pour les bêta-lactamases de classe B, et les gènes codant pour les enzymes de type VEB et GES. Enfin, les gènes des transposons participent aussi dans la résistance par l'expression de BLSE plasmidique ou chromosomique (**Weldhagen et al., 2003**).

8.2.3.1.3. Les carbapénèmases

Les carbapénèmes sont une classe importante de β -lactamines anti-pseudomonales en raison de leur stabilité vis-à-vis de la plupart des β -lactamases (**El Gamal and Oh, 2010**) et sont particulièrement utiles dans le traitement infections associées aux producteurs de BLSE et d'AmpC. Toutefois il existe une catégorie d'enzymes capables d'hydrolyser les carbapénèmes (**Walsh, 2010**) connues comme des carbapénèmases de la classe A, B (metallo- β -lactamases) et D (**Poirel et al., 2010b**).

Bien que chez *P. aeruginosa* la perte ou à l'inactivation de la porine OprD et / ou la surexpression des pompes à efflux restent les mécanismes de résistance aux carbapénèmes par mutations chromosomiques les plus importants, l'acquisition de gènes codant pour des carbapénèmases (CEG) est extrêmement pertinente (**Moradali et al., 2017; Partridge et al., 2018b**). Une étude récente menée dans 14 pays européens a révélé que 20% des isolats de *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes étaient des producteurs de carbapénémase (**Castanheira et al., 2014**). Les carbapénèmases de *P. aeruginosa* ne sont pas exprimées par le chromosome à l'exception de POM-1 de *Pseudomonas otitidis* et de PAM-1 de *Pseudomonas alcaligene* qui sont des métallo- β -lactamases (MBL) (**Thaller et al., 2011; Suzuki et al., 2014**).

Les carbapénèmases de classe A sont rares et sont divisées en cinq groupes : GES, IMI, KPC, NMC-A et SME (**Walther-Rasmussen and Hoiby, 2007**) dont seules les enzymes GES et KPC sont décrites à ce jour chez *P. aeruginosa*. Les enzymes KPC montrent une activité contre la plupart des β -lactamines, y compris les oxyiminocéphalosporines, les monobactames et les carbapénèmes. Seules KPC-2 et KPC-5 ont été signalées chez cette espèce, mais le nombre de *P. aeruginosa* à KPC est en augmentation (**Akpaka et al., 2009**). La KPC-2 est plus active contre les carbapénèmes

Synthèse bibliographique

que le KPC-5 qui a une meilleure activité contre la ceftazidime (**Wolter et al., 2009b**). Il convient également de noter que la présence d'enzymes KPC dans les isolats résistants aux carbapénèmes est souvent associée à la perte de la porine OprD (**Villegas et al., 2007**). Bien que toutes les enzymes GES soient des BLSE, trois d'entre elles montrent également une activité contre les carbapénèmes (GES-2, -4 et -5) (**Wang et al., 2010**). Ces carbapénémases n'ont pas encore été rapportées dans les pays méditerranéens (**Naas et al., 2013**).

Les carbapénémases de classe B sont caractérisées par la présence de Zn^{2+} comme co-facteur dans leurs centres actifs ce qui leur confère une résistance contre toutes les bêtalactamines sauf l'aztréonam (**Nordmann et al., 1998**). Le clavulanate et le tazobactam n'inhibent pas l'activité de ces metallo- β -lactamases (M β L), cependant, elle est inhibée par des chélateurs ioniques bivalents, tels que l'EDTA (**Poirel et al., 2002**). Les principales M β L isolées chez *P. aeruginosa* sont IMP, VIM, SPM, AIM, FIM-1, NDM-1 et GIM dont la première M β L décrite chez cette espèce était IMP-1 isolée au Japon et codée par un plasmide d'une taille de 36 kb et faisait partie d'un gène cassette situé dans un intégron IN31 de classe 1 (**Gibb et al., 2002**). Entre l'année 2000 et 2001, d'autres variantes d'IMP ont été identifiées IMP-7 au Canada et Singapour, IMP-9 en Chine, IMP-13 en Italie, et en 2002, IMP-15 en Espagne (**Gilarranz et al., 2013**) IMP-16 au Brésil et la plus récente l'IMP -18 aux états-unis (**Llanes et al., 2004; Hanson et al., 2006; Parkins et al., 2007**). Les MBLs de type IMP rapportées dans les pays méditerranéens sont IMP-13, IMP-1, IMP-18 et IMP-15.

Pour le type VIM, la VIM-1 a été identifiée en 1997 en Italie (**Lauretti et al., 1999**). Du point de vue génomique, la VIM-1 fait partie de l'intégron classe 1 qui rassemble les gènes codant pour le VIM-1 et la résistance aux aminoglycosides (**Riccio et al., 2001**). La VIM-2 a été détectée en France chez un patient atteint de neutropénie (**Poirel et al., 2000**). Le VIM-2 présente une corrélation de 90% d'acides aminés identiques à ceux de la VIM-1. Mais la VIM-3 diffère de la VIM-2 par substitutions d'acides aminés et elle est d'origine chromosomique (**Yan et al., 2001**). Successivement, d'autres variantes du type VIM ont été identifiées dans les différentes parties du monde (VIM-4, VIM-5, VIM-7, VIM-8, VIM-11, VIM-13, VIM-16, VIM-17, VIM-20 et VIM-38) (**Pournaras et al., 2002 ; Schneider et al., 2008**). Les enzymes VIM-2 et VIM-4 ont été décrites en Algérie (**Sefraoui et al., 2014 ; Mellouk et al., 2017**).

Synthèse bibliographique

La première détection de la MBL SPM-1 était en 2002 au Brésil où elle représentait 35% des isolats cliniques de *P. aeruginosa* ; la SPM-1 présente plus d'affinité vis-à-vis aux carbapénèmes et aux céphalosporines qu'aux pénicillines (**Poirel et al., 2004**).

La GIM-1 a été isolé pour la première fois en Allemagne sur un plasmide de 22 kb, cette enzyme hydrolyse l'aztréonam et les inhibiteurs de bêta-lactamasas, l'amoxicilline, la ticarcilline, la céphalothine, l'imipénem, la ceftazidime et le céfotaxime (**Castanheira et al., 2004**).

La première détection des MBL de type FIM-1 a été rapportée en 2007 en Italie (**Pollini et al., 2013**) et celle du type NDM-1 l'a été en Serbie. La diffusion de la NDM-1 était associée aux voyageurs de la région des Balkans et la Bosnie-Herzégovine en Europe (**Jovcic et al., 2011**) ou la première souche à NDM-1 isolée en France était chez un patient précédemment hospitalisé en Serbie (**Janvier et al., 2013**).

8.2.4. Altération de la porine OprD

Chez *P. aeruginosa*, et contrairement aux autres molécules β -lactamiques, les carbapénèmes n'utilisent pas la porine majoritaire OprF pour pénétrer dans la bactérie, mais plutôt la porine OprD. La porine OprD est une protéine de 45–~49 kDa. La « perte » de la porine OprD par mutations est un événement fréquent chez les souches cliniques avec une augmentation de 4 à 16 fois de la résistance à l'ensemble des carbapénèmes sans affecter les CMI des autres β -lactamines. (**Sakyo et al., 2006**).

L'inactivation mutationnelle du gène *oprD* résulte de l'insertion ou la délétion d'un seul nucléotide ou la présence d'un codon stop prématuré (**Gutiérrez et al., 2007**). D'autre part, différents auteurs ont décrit la présence de séquences d'insertion (IS) interrompant la séquence nucléotidique, de la protéine ou du promoteur, apportant ainsi une résistance aux carbapénèmes. (**Ruiz-Martínez et al., 2011a; Diene et al., 2013**).

Généralement, la résistance aux carbapénèmes issue de la perte de la porine OprD nécessite la présence d'AmpC inductible ou dérégulée de manière stable (**Livermore, 1992**).

8.2.5. Modification des PLPs

La mutation ponctuelle ou la disparition de PLP entraînant une résistance aux β -lactamines est très répandue chez les bactéries à Gram positif comme *Streptococcus*

Synthèse bibliographique

pneumoniae et *Staphylococcus aureus* mais chez *P. aeruginosa* ce phénomène reste relativement rare (**Ghuysen, 1998**). Ce mécanisme se caractérise par une haute résistance aux carboxy et uréido-pénicillines. (**Bellido et al., 1990**).

8.2.6. Enzymes-modifiant les aminosides (AMEs)

Les aminosides sont des inhibiteurs de la synthèse protéique microbienne et agissent en se liant à la sous-unité ribosomale bactérienne 30S et interfèrent avec l'initiation de la synthèse protéique (**Pachori et al., 2019**). Le principal mécanisme de résistance aux aminoglycosides dans les souches cliniques est les enzymes modifiant les aminoglycosides. Ces enzymes sont codées par des plasmides et se caractérisent par la fixation d'un radical phosphate, adényle ou acétyle sur la molécule antibiotique ce qui diminue l'affinité de liaison de l'antibiotique à la sous-unité ribosomale 30S de la cellule bactérienne (**Llano-Sotelo et al., 2002**).

Ces enzymes sont classées selon la réaction qu'elles catalysent : en trois familles: aminosides-*o*-phosphotransférases (APH) qui utilisent l'ATP comme substrat pour la phosphorylation, les aminosides adénylyl transférases (également connues sous le nom de aminosides-*o*-nucléotidyl transférases) (AAD ou ANT) qui utilisent l'AMP pour nucléotidylation d'un groupement hydroxyle et les aminosides-N-amino-acétyl transférases (AAC) qui utilise l'acétylCoA comme substrat pour acétylation du groupement aminé (**Miller et al., 1997**). Chaque famille d'enzymes est divisée en classes, selon le site de modification, qui est indiqué entre parenthèses, elles sont ensuite subdivisées en types d'enzymes (décrits en chiffres romains) qui correspondent les phénotypes de résistance. Les enzymes de la même classe et type avec le même phénotype, mais codées par des gènes différents sont désignés par une lettre minuscule. (**Vakulenko et al., 2003**).

Pseudomona aeruginosa exprime le plus souvent les enzymes : ACC (6')-II qui lui confère une résistance à la gentamicine, à la tobramycine et à la nétilmicine, ACC (6')-I avec une résistance à la tobramycine, nétilmicine et amikacine, AAC (6')-Ib détermine la résistance à la tobramycine et à l'amikacine. De plus, ACC(3')-II qui détermine la résistance à la tobramycine et à l'amikacine. De plus, ACC(3')-II qui détermine la résistance à la gentamicine, à la tobramycine et à la nétilmicine, AAC(3')-I donnant une résistance à la gentamicine, et ANT(2')-I qui désactive la gentamicine et la tobramycine. Et moins fréquemment APH (3')-II avec un profil de résistance à la Kanamycine, néomycine, butyrosine, paromomycine et à la ribostamycine (**Pachori et**

Synthèse bibliographique

al., 2019). L'expression simultanée de toutes ces enzymes chez la même souche se traduit par une résistance à tous les aminosides disponibles (tobramycine, amikacine, nétilmicine et gentamicine). Les enzymes ANT (2'')-1, AAC(3)-I et AAC (6')-Ib sont les plus répandues parmi les isolats cliniques de *P. aeruginosa*. (Poole, 2005).

L'enzyme AAC (6')-Ib (variante de AAC (6')-I) initialement détectée chez les entérobactéries, confère chez *P. aeruginosa* une sensibilité réduite aux quinolones (Libisch *et al.*, 2008). Les souches de *P. aeruginosa* résistantes aux aminosides isolées dans des pays européens portent principalement le gène *aac(6')-II* et le gène *ant(2'')-I* (Miller *et al.*, 1997) et celles isolées en Algérie ont les gènes *aac(3')-II*, *aadA1* et *aadA13* associés au gène *blaVIM-2* (Sefraoui *et al.*, 2014) et les gènes *aadB* et *aacA4* associés au gène *blaVIM-2* identifiés au sein d'intégrons de classe 1 (Touati *et al.*, 2013)

8.2.7. Méthylation ribosomale

Un autre mécanisme de résistance aux aminosides est la capacité de modifier non pas l'aminoside mais la structure ribosomale de la cellule bactérienne sur lequel il se fixe, l'ARN 16S, la méthylation de la sous-unité 16S par les méthylases (Trigueros, 2015). Ce mécanisme de résistance a été observé pour la première fois chez les actinomycètes de manière intrinsèque en tant que mécanisme de protection ribosomique par méthylation de nucléotides spécifiques dans l'ARNr 16s, car ils sont producteurs d'aminosides (Yokoyama *et al.*, 2003). La production des méthylases chez des isolats cliniques de *P. aeruginosa* et a été rapportée au Japon en 2003 pour le RmtA (Resistance methylase transferase) et au Brésil en 2007 pour le RmtD (Doi and Arakawa, 2007). Ces enzymes confèrent une résistance de haut niveau à la gentamicine, à la tobramycine et à l'amikacine, mais pas à la néomycine, à la paromomycine ou à la streptomycine. Cinq types de méthylases ont été identifiés à ce jour chez *Pseudomonas aeruginosa* : RmtA, RmtB, RmtC, RMTD et ArmA, portées par le transposon Tn4051 (Mendoza and Caballero, 2016) et les gènes *rmtA* et *rmtB* mais aussi *rmtD* codant pour ces méthylases ont été mis en évidence et ils sont parfois accompagnés d'autres gènes codant pour des bêta-lactamases rendant les souches insensibles à presque tous les aminosides et toutes les β -lactamines. Ces enzymes représentent donc un risque épidémiologique majeur qui doit inciter à la vigilance. (Doi *et al.*, 2007). Elles sont peu répandues chez *P. aeruginosa* mais de plus en plus souvent décrites chez les entérobactéries telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter*

Synthèse bibliographique

cloacae, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Shigella flexneri* et chez *Acinetobacter* sp. dans plusieurs pays y compris la France (**Bogaerts et al., 2007**).

8.2.8. Résistance aux fluoroquinolones

Les quinolones exercent une inhibition de la synthèse de l'ADN bactérien en agissant sur deux enzymes : l'ADN topoisomérase de type II ou ADN gyrase et l'ADN topoisomérase de type IV. *P. aeruginosa* est sensible naturellement aux quinolones dites urinaires, systémiques et respiratoires, seul l'acide nalidixique est inactif par imperméabilité (**Montalegre, 2016**). Ces deux enzymes peuvent devenir insensibles à l'action de ces antibiotiques lors des mutations par substitution d'acides aminés dans les régions où se fixent les antibiotiques (Quinolone Resistance Determining Regions). La résistance aux fluoroquinolones par mutation est une cause majeure de résistance chez les isolats cliniquement importants de *P. aeruginosa*. Une augmentation significative de la CMI de toutes les fluoroquinolones résulte des altérations de la sous-unité GyrA de l'ADN gyrase ainsi les altérations de la sous-unité ParC de la topoisomérase IV contribuent à amplifier la résistance jusqu'à des niveaux très élevés avec une CMI ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ de la ciprofloxacine (**Lee et al., 2005**).

Les premières mutations ont été identifiées au niveau du *gyrA* conférant une résistance à la ciprofloxacine chez *P. aeruginosa* (**Garrabé et al., 1998**). Des études ultérieures ont montré que les variantes de séquence dans lesquelles la thréonine en position 83 dans le gène *GyrA* est remplacé par l'isoleucine et la sérine en position 87 est remplacée par une leucine dans le gène *ParC* qui sont les altérations les plus fréquentes associées à la résistance à la ciprofloxacine chez les isolats des patients atteints de mucoviscidose (**Mazzariol et al., 2008**). La deuxième variante la plus fréquente de *GyrA* est en position 87, des résidus d'asparagine, de tyrosine ou de glycine étant présents à la place de l'aspartate. Les variantes *GyrA* et *ParC* se produisent plus fréquemment que les variantes *GyrB* et *ParE*. (**Rehman et al., 2019**)

La résistance aux quinolones à médiation plasmidique a été identifiée pour la première fois dans un isolat clinique de *Klebsiella pneumoniae* avec le gène *qnr* qui code pour la protéine Qnr qui se lie à l'ADN gyrase et à la topoisomérase IV et les protège de l'inhibition par les fluoroquinolones. Ce plasmide a été identifié dans un isolat environnemental de *P. putida*. A ce jour, aucune preuve de la présence de *qnr* à médiation plasmidique n'a été trouvée chez *P. aeruginosa* (**Subedi et al., 2018**).

Synthèse bibliographique

Aux États-Unis, le taux de résistance à la ciprofloxacine des isolats cliniques de *P. aeruginosa* est supérieur à 20% (Jacoby *et al.*, 2005). En Inde, 31% de souches résistantes à la ciprofloxacine sont d'origine oculaire (Smitha *et al.*, 2005).

8.2.9. Résistance à la colistine

La prévalence de la résistance à la polymyxine (polymyxine B et colistine) est encore très faible (<5%) dans les isolats de *P. aeruginosa*. Cette résistance est le résultat de la modification du LPS par l'ajout d'un groupement 4-amino-4-désoxy-l-arabinose dans la structure lipidique A (Olaitan *et al.*, 2014) issu de l'activation de l'opéron *arnBCADTEF* par des mutations dans les systèmes à deux composants *pmrA* / *pmrB* ou *phoP* / *phoQ* (Barrow and Kwon, 2009). Des études plus récentes ont également révélé que des mutations au sein du système de régulation à deux composants *ParRS*, peuvent activer l'opéron *arnBCADTEF* et conférer une résistance à la colistine. Ce système, associé à une surexpression de *MexXY*, *MexEF* et une répression d'*OprD*, conduit à un profil BHR (Muller *et al.*, 2011). Enfin, il a également été démontré que deux régulateurs supplémentaires à deux composants, *ColRS* et *CprRS*, jouent un rôle dans la résistance à la colistine (Gutu *et al.*, 2013). De plus, de récents tests moléculaires par WGS ont révélé l'implication de mutations supplémentaires dans la résistance à la colistine en particulier celles qui surviennent dans la *LptD* (OMP essentielle impliquée dans le transport du LPS), la *LpxC* (UDP-3-O- hydroxymyristoyl -N-acétylglucosamine désacétylase impliquée dans la biosynthèse des lipides A) ou *MigA* (α -1,6-rhamnosyltransférase) impliquée dans la synthèse de la région centrale du LPS (Lopez-Causapé *et al.* 2018).

9. Biofilm

Le biofilm est définie comme un mode de vie multicellulaire dans lequel les cellules bactériennes produisent une matrice exocellulaire, composée de polysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire qui les enveloppe et sont attachées irréversiblement à une surface biotique ou abiotique (Donlan and Costerton, 2002).

Les cellules bactériennes encastrées dans un biofilm peuvent échapper aux réponses immunitaires de l'hôte et résister aux traitements antimicrobiens jusqu'à 1000 fois plus que leurs homologues planctoniques (Lewis *et al.*, 2001). *P. aeruginosa* est une bactérie modèle pour l'étude de la formation de biofilm (Crespo *et al.*, 2018). Chez cette bactérie, le biofilm est une arme essentielle pour survivre et dominer dans des environnements polymicrobiens comme dans la mucoviscidose. *P. aeruginosa* colonise

Synthèse bibliographique

également efficacement une variété de surfaces, y compris les matériaux médicaux (cathéters urinaires, implants, lentilles de contact, etc....) et les équipements de l'industrie alimentaire (cuves de mélange, cuves et tubes) (Coughlan *et al.*, 2016).

9.1. Composition et organisation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

La matrice de biofilm de *P. aeruginosa* englobe principalement les polysaccharides, l'ADN extracellulaire (ADNe), les protéines et les lipides (Ghafoor *et al.*, 2011). Elle représente plus de 90% de la biomasse du biofilm et agit comme un échafaudage pour l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques et comme un abri pour les bactéries contre les conditions environnementales difficiles (antibiotiques et réponses immunitaires de l'hôte). Elle fournit également des nutriments, des enzymes et des protéines cytosoliques essentiels pour les cellules de biofilm. Elle facilite aussi la communication intercellulaire (Stremmel *et al.*, 2013).

Les trois exopolysaccharides (Psl, Pel et alginate) sont extrêmement impliqués dans la fixation sur une surface, la formation et la stabilité de l'architecture du biofilm (Billings *et al.*, 2013). Leur production aboutit à l'inhibition des éléments nécessaires à la mobilité et ils permettent la structuration et le maintien du biofilm, les interactions entre leurs chaînes carbonées ou avec d'autres molécules conduisent à la création d'un réseau complexe structurant la matrice (Flemming, 2001)

Le Psl (Polysaccharide synthesis locus: opéron de 15 gènes) est un pentasaccharide neutre comprenant typiquement des fractions de mannose et de de rhamnose, de xylose et de N-acetylglucosamine (Posseureu, 2015). Cet exopolysaccharide est nécessaire à l'adhésion des cellules sessiles aux surfaces et aux interactions entre cellules lors de l'initiation du biofilm des souches non mucoïdes et mucoïdes (Jones and Wozniak, 2017). Dans un biofilm mature, le Psl est situé dans la périphérie des macrocolonies en forme de champignon où il aide à maintenir la stabilité structurelle. L'augmentation de l'expression de Psl est liée à l'induction des agrégats cellulaires dans une culture liquide observée dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose (Staudinger *et al.*, 2014). Il fonctionne comme une molécule de signalisation pour favoriser la production de c-di-GMP dont le niveau, s'il est élevé, se traduit par des biofilms plus épais et plus robustes (Irie *et al.*, 2012). De plus, le Psl protège les bactéries du biofilm des antimicrobiens et de la phagocytose des neutrophiles

Synthèse bibliographique

ce qui en fait une défense efficace pour obtenir une infection persistante (**Mishra *et al.*, 2012**)

Le Pel (Pellicle locus) est un polymère de polysaccharide cationique de N-acétyl-d-glucosamine et de N-acétyl-d-galactosamine partiellement désacétylées. C'est un composant essentiel de la matrice chez les souches non mucoïdes, impliqué dans l'initiation de la fixation sur les surfaces et dans le maintien de l'intégrité et la compacité du biofilm et confère une résistance aux aminosides pour les cellules incluses dans le biofilm (**Jennings *et al.*, 2015**). Il est responsable du biofilm pelliculaire qui se forme à l'interface air-liquide d'un bouillon de culture statique. Il intervient dans les interactions entre les cellules en fournissant un échafaudage pour la communauté dans les premiers stades de la formation du biofilm. En outre, il a été démontré que les biofilms contenant du Pel sont résistants à la colistine et moins susceptibles d'être tués par des neutrophiles humaines HL-60. La synthèse des Psl et le Pel est spécifique à la souche et peut être commutée en réponse aux conditions environnantes (**Colvin *et al.*, 2011**)

L'alginate est le premier exopolysaccharide à avoir été identifié chez *P. aeruginosa*, caractérisé en 1973 par Evans et Linker principalement produit dans le biofilm des souches mucoïdes en raison d'une mutation de l'allèle *mucA22*. Les phénotypes mucoïdes présentent 85 % des souches de *P. aeruginosa* d'origine clinique et environ 1 % des souches d'origine environnementale. Chez les souches cliniques, ce phénotype se trouve principalement dans les isolats de mucoviscidose, ce qui signifie la conversion d'une infection aiguë à une infection chronique (**Ciofu *et al.*, 2015**). L'alginate est un polymère acétylé chargé négativement constitué d'acide mannuronique et de résidus d'acide guluronique. Un large éventail de fonctions importantes a été attribué à l'alginate, y compris la maturation du biofilm, la protection contre la phagocytose et l'opsonisation, l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales et aux mucines et la diminution de la diffusion des antibiotiques à travers le biofilm (**Tseng *et al.*, 2013**). La surproduction d'alginate pourrait fournir une résistance aux antibiotiques, mais également à la capacité d'éliminer les radicaux libres libérés des neutrophiles (**Ouchar *et al.*, 2013**). Les proportions de l'acide mannuronique et l'acide guluronique influencent les propriétés viscoélastiques des biofilms qui conduisent à une altération de la clairance de la toux dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose infectés par *P. aeruginosa* (**Gloag *et al.*, 2018**)

Synthèse bibliographique

La surproduction d'alginate joue un rôle dans l'adhérence cellulaire au sein du poumon des patients atteints de mucoviscidose et joue également un rôle dans la résistance à la défense de l'hôte en réduisant la sensibilité à la phagocytose (**Pier et al., 2001**) et également dans la résistance aux antibiotiques. Les patients infectés par des souches non mucoïdes de *P. aeruginosa*, ont une fonction pulmonaire significativement meilleure au fil du temps par rapport à ceux infectés par des souches mucoïdes (**Parad et al., 1999**). La tendance de *P. aeruginosa* à passer à un phénotype mucoïde est l'une des caractéristiques les plus frappantes et cliniquement pertinentes de l'infection par cette bactérie. De plus, le poly-M partage avec le LPS la capacité de stimuler la production de cytokines chez les monocytes humains, d'une manière dépendante du CD-14 (**Otterlei et al., 1993**). L'alginate confère aux cellules bactériennes la capacité de piéger les radicaux libres libérés par les macrophages, fournissant ainsi une barrière physique qui altère la phagocytose et inhibant la chimiotaxie des neutrophiles et l'activation du complément. De plus, l'alginate semble être important pour la formation des biofilms de *P. aeruginosa*. (**Ramsey et al., 2005**).

La lyse cellulaire libère de l'ADN dans l'environnement, et cet ADN extracellulaire (ADNe) est l'un des constituants cruciaux des biofilms. La lyse cellulaire peut être causée par un stress environnemental tel que le traitement antimicrobien et cela peut se produire à la fois dans le développement précoce des biofilms et dans la phase planctonique où les bactéries en forme de bâtonnet se transforment rapidement en cellules rondes suivies d'une lyse (**Chiang et al., 2013**). L'ADNe est impliqué dans divers processus: comme source de nutriments pour les bactéries du biofilm (source de phosphore, de carbone et/ou d'azote); soutenir l'organisation et l'alignement cellulaires via la motilité de contraction; comme chélateur de cations qui interagit avec les cations divalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}) sur la membrane externe et active ensuite le système de sécrétion de type VI qui permet la dissémination des facteurs de virulence chez l'hôte et influe le processus inflammatoire activé par les neutrophiles; le dépôt d'ADNe provoque une acidification de l'environnement du biofilm et des sites d'infection, limitant la pénétration d'agents antimicrobiens (**Bass et al., 2010**).

De nombreuses protéines sont impliquées dans la formation de la matrice du biofilm (**Latasa et al., 2006**). La famille de protéines la plus représentée regroupait les protéines impliquées dans le transport d'acides aminés et dans le métabolisme. Au cours des premières phases de développement (de 12 h à 48 h), la majorité des protéines

Synthèse bibliographique

présentaient une augmentation de leur abondance. A l'inverse, entre 48 h et 96 h de développement, les protéines sont moins abondantes (**Landry et al., 2013**).

Le biofilm de *P. aeruginosa* comprend de nombreuses adhésines. Ces dernières sont distinguées selon leur structure en deux familles. Les adhésines dites fimbriales regroupent les adhésines portées par le flagelle, les pili de la voie CU (Chaperone-Usher) et les pili de type IV impliquées dans l'adhésion aux surfaces biotiques et abiotiques. Les adhésines dites nonfimbriales correspondent à des protéines mono ou oligomériques qui ne sont pas assemblées sous forme de fibrilles mais sécrétées par la bactérie et qui sont également impliquées dans l'adhésion (**Gerlach and Hensel, 2007**).

Les rhamnolipides jouent un rôle primordial dans la formation et le maintien des structures dites «champignons» caractéristiques d'un biofilm mature (**Pamp and Tolker-Nielsen, 2007**). Il confère des propriétés tensioactives telles que la réduction des tensions de surface (**Chrzanowski et al., 2012**).

9.2. Cycle de développement de biofilm chez *P. aeruginosa*

P. aeruginosa se développe lentement sous forme d'agrégats cellulaires non attachés dans des conditions hypoxiques et anoxiques observées dans les voies respiratoires de la mucoviscidose et les plaies chroniques (**Sønderholm et al., 2017**). Généralement, les biofilms de *P. aeruginosa* peuvent être développés sur des surfaces abiotiques, telles que des implants médicaux ou des équipements industriels. Le développement du biofilm est divisé en cinq étapes distinctes (fig.5).

Synthèse bibliographique

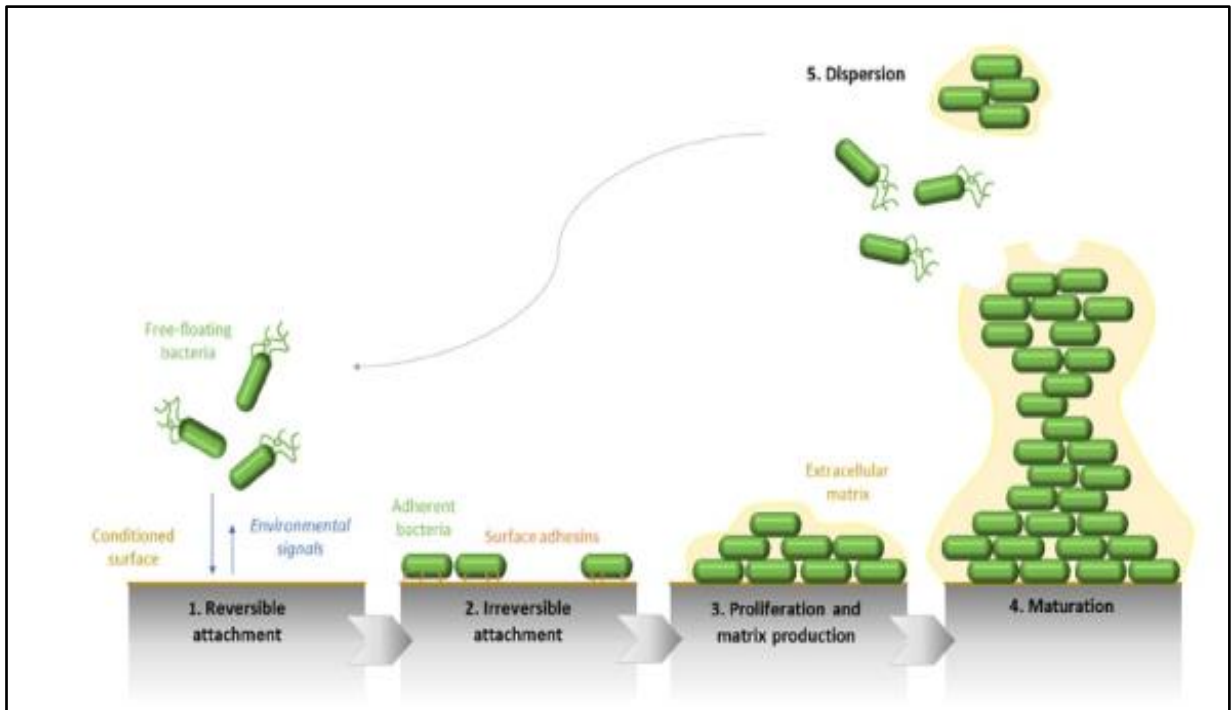


Figure.5.Cycle de formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (Olivares *et al.*, 2019).

Etape I : adhésion réversible

Les cellules bactériennes adhèrent par le biais de flagelle et des pili de type IV. Le mouvement flagellaire a été impliqué dans la motilité de type twitching et de la biosynthèse des exopolysaccharides nécessaires à l'association de surface (Hickman and Harwood , 2008). Cette adhérence est réversible. Une étude protéomique sur le type sauvage de *P. aeruginosa* (PAO1) indique que les réponses bactériennes et la formation de biofilm sont spécifiques à la surface sur laquelle les cellules vont être fixées où des protéines spécifiques sont produites avec des quantités bien déterminées (Guilbaud *et al.*, 2017)

Etape II : attachement irréversible

Dans cette phase, les cellules s'attachent d'une façon irréversible.

Etape III : prolifération

Les bactéries attachées se propagent en microcolonies. Après un attachement irréversible, des microcolonies se forment en augmentant la communication par quorum sensing (Boyle *et al.*, 2013) en réponse aux changements de densité cellulaire ou aux stress environnementaux. Le quorum sensing implique la production, la sécrétion et

Synthèse bibliographique

l'accumulation de molécules de signalisation appelées autoinducteurs (AI) dont la spécificité et la concentration sont détectées par des régulateurs transcriptionnels (**Mukherjee et al., 2019**). Ces molécules sont appelées acyl homosérine lactones (AHL). *P. aeruginosa* possède deux systèmes AHL : *las* et *rhl*. Chaque système possède sa propre AHL synthase (LasI et RhlI) et son propre régulateur transcriptionnel (LasR et RhIR) (**de Kievit, 2009**).

Etape IV : maturation

Ces microcolonies se développent davantage pour devenir des structures tridimensionnelles en forme de champignon, une caractéristique de la maturation du biofilm. Il a été montré que les gènes impliqués dans la progression de la maturation et de la persistance du biofilm chez *P. aeruginosa* sont positivement régulés par le quorum sensing (**Moradali et al., 2017**).

Etape V : détachement

Au centre de la microcolonie, la cavité de la matrice est perturbée par l'autolyse cellulaire suivie du passage du mode de croissance sessile au mode planctonique pour coloniser d'autres surfaces et permettre d'entamer un nouveau cycle de biofilm (**Rasamiravaka et al., 2015**)

Il a été récemment démontré que l'endonucléase EndA est nécessaire pour la dispersion du biofilm existant via la dégradation de l'ADNe (**Cherny et al., 2019**). Les cellules du biofilm sont physiologiquement différentes de leurs homologues planctoniques et plus résistantes aux traitements antimicrobiens. Les cellules dispersées, contrairement aux cellules planctoniques et sessiles, possèdent une physiologie distincte et représentent le passage des infections chroniques en infections aiguës. Ces cellules prennent 2 h de temps pour passer en forme planctonique ce qui est une phase de latence avec une diminution des niveaux de pyoverdine et de c-di-GMP intracellulaire (**Chua et al., 2015**). Une régulation des gènes codant pour la virulence et une répression des gènes d'absorption du fer ont été observées dans la population dispersée ce qui les rend hautement cytotoxiques pour les macrophages, plus sensibles à la déplétion en fer et très virulentes pour les hôtes nématodes par rapport aux cellules planctoniques (**Li et al., 2014**).

Synthèse bibliographique

9.3. Biofilm et résistance aux antibiotiques

Les conditions de vie en mode biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène, etc....) et le transfert horizontale de gènes de résistance entre les bactéries au sein de ce biofilm rend les cellules de ce dernier plus résistantes aux agents antimicrobiens et aux désinfectants par comparaison à leurs homologues planctoniques (**Roux and Ghigo, 2006**). Par conséquent, les concentrations d'ATB utilisées sont 10 à 100 fois plus élevées que celles utilisées pour inhiber les mêmes bactéries à l'état planctonique. Ces concentrations ne permettent pas l'élimination complète ce qui provoque de nombreux problèmes en milieu médicale (**Auger, 2012**).

La résistance aux antibiotiques s'est considérablement accentuée et élargie au cours des dernières décennies et il a été identifiée comme l'une des plus grandes crises sanitaires mondiales à l'heure actuelle (**Shriram et al., 2018**). Les options thérapeutiques actuelles pour les infections courantes sont nettement limitées en raison de l'émergence d'agents pathogènes multirésistants (MDR) dans la communauté et aux hôpitaux. Le rôle des différentes huiles essentielles (HE) dans l'exposition de propriétés antimicrobiennes été largement élucidé (**Leong et al., 2021**).

10. Les huiles essentielles

10.1. Définition

Les huiles essentielles (HE) sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires odorants volatils, de consistance huileuse, très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs, Elle concentre l'essence de la plante, autrement dit son parfum (**Lardry, 2007**). Elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles comme les Conifères, les Rutacées, les Ombellifères, les Myrtacées, les Lamiacées, les Poacées (**Lamendin, 2004**). Elles sont obtenues à partir de différents organes végétaux producteurs, en fonction de la zone productrice du végétal : les sommités fleuries (lavande, menthe...), les graines (Muscade), dans les écorces (cannelles), les fruits (citron), dans les racines ou rhizomes (vétiver, gingembre), le bois (camphrier), et sont contenues dans des structures spécialisées à savoir : les canaux sécréteurs, les poches et les poils (**Couic-Marinier, 2013**)

Synthèse bibliographique

10.2. Propriétés physiques

Elles sont liquides à température ambiante et volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles. Leur densité est en général inférieure à celle de l'eau et varie de 0,75 à 0,99. Rarement qu'elles sont que colorées. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévie la lumière polarisée. Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation, elles sont donc de conservation limitée (**Bruneton, 2009**)

10.3. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les qualités microbiologiques des plantes aromatiques et médicinales sont connues. Leur spectre d'action est très étendu, car elles agissent contre un large éventail de bactéries, y compris celles qui développent des résistances aux antibiotiques. Cette activité est par ailleurs variable d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche bactérienne à l'autre (**Avlessi, 2012**).

Elles peuvent être bactéricides ou bactériostatiques. Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique, et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (**Oussou, 2009**). Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif (**Burt, 2004**).

10.4. *Citrus limon*

Le citron est une plante médicinale importante de la famille des Rutacées, avec une teneur en différents composés phytochimiques, notamment des huiles essentielles, des alcaloïdes, des flavonoïdes, de l'ouramine, des psoralènes et des caroténoïdes. Cette plante a plusieurs activités notamment anticancéreuse, antibactérienne, antifongique, anthelminthiques, insectifuges, antioxydants, cardiovasculaires, anti-inflammatoires, antivirale et antidiabétique (**Henderson et al., 2018**) ; aussi que dans les soins de la peau, le traitement des hémorroïdes, de l'ulcère gastroduodénal, des troubles respiratoires et des troubles urinaires (**Mohanapriya et al., 2013**). L'huile essentielle comprend les monoterpènes, les sesquiterpènes, les alcools, les aldéhydes, les cétones et les esters. Les monoterpènes avaient une activité antimicrobienne plus élevée que les hydrocarbures. La carvone et le limonène étaient actifs contre un large spectre d'activité antifongique et antimicrobienne (**Vimal et al., 2013; Berk, 2016**)

Synthèse bibliographique

10.5. *Lavandula angustifolia*

La lavande appartient à la famille des Lamiacées. Ces arbustes sont célèbres pour leurs fleurs très parfumées et pour leur feuillage aromatique et persistant (**Saadatian et al., 2013**) Il a été démontré que les huiles essentielles de possèdent un large éventail de propriétés biologiques, analgésiques, antimutagènes, anti-inflammatoires, anxiolytiques et une gamme d'avantages antimicrobiens (**Karadag et al., 2017 ; Woronuk et al., 2011**). De plus, il a été démontré par de nombreuses études *in vitro* que les thérapies combinatoires incorporant l'utilisation des HE renforcent considérablement les effets bactéricides contre les agents pathogènes MDR (**Van Vuuren et al., 2009 ; Yang et al., 2018**)

10.6. *Zingiber officinale*

Connue sous le nom de gingembre est une plante herbacée vivace à rhizome atteignant jusqu'à 90 cm de hauteur, trouvée en Asie tropicale. Les rhizomes sont aromatiques, lobés épais, blancs à brun jaunâtre, irrégulièrement ramifiés, annulaires et comprimés avec une surface lisse (**Demin and Yingying, 2010**). Elle était connue en Allemagne et en France au IXe siècle et en Angleterre au Xe siècle pour ses propriétés médicinales (**Sasidharan and Nirmala, 2010**). C'est une plante importante avec plusieurs usages ethnomédicinaux et nutritionnels. Elle est largement utilisée dans le monde entier comme épice, agent aromatisant, contre le rhume, les infections de la gorge et de la poitrine et la toux (**Sharma et al., 2016**). Les composés de gingembre sont actifs contre un type spécifique de diarrhée qui entraîne la mort des nourrissons dans les pays en développement. De plus, il a été constaté que le gingembre est efficace dans le traitement des nausées causées par le mal de mer, les nausées matinales et la chimiothérapie (**Sebiomo et al., 2011**). En outre, il a été rapporté que les huiles volatiles, le gingérol, le shogaol et les diarylheptanoïdes agissent comme antioxydants, anti-inflammatoires, antilipidiques, antidiabétiques, analgésiques, antipyrétiques et antitumoraux (**Wang et al., 2009 ; Shim et al., 2011**).

10.7. *Rosmarinus officinalis L.*

Le romarin est une plante aromatique de la famille des Lamiacées originaire de la région méditerranéenne. Aux États-Unis et en Europe, le romarin est disponible dans le commerce pour être utilisée comme antioxydant (**Cuvelier et al., 1996**), outre son utilisation culinaire comme épice et arôme. L'huile essentielle de romarin est dotée des

Synthèse bibliographique

propriétés antibactériennes, antifongiques et antioxydantes et possède un certain nombre d'applications dans la guérison de nombreuses maladies telles que les maladies inflammatoires (Arranz *et al.*, 2015). Elle est également utilisée pour traiter les éruptions cutanées, les maux de tête, la dyspepsie, les problèmes de circulation, comme expectorant, diurétique et antispasmodique dans les coliques néphrétiques (Ulbricht *et al.*, 2013). Des études ont montré l'activité antibactérienne de l'huile de romarin contre les bactéries gram négatives et positives (*Enterobacteriaceae*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* *Brochothrix thermosphacta* (Burt, 2004 ; Sirocchi *et al.*, 2013).

10.8. *Eucalyptus globulus*

L'eucalyptus est un grand arbre à feuilles persistantes, originaire d'Australie et de Tasmanie, introduit avec succès dans le monde entier (Mubita *et al.*, 2008). L'espèce la plus importante et représentée est *Eucalyptus globulus* qui est le principal fournisseur d'huiles essentielles (Bajaj, 1995). Ces huiles ont plusieurs applications anesthésiques, antiseptiques, expectorantes, fébrifuges, fumigantes, hémostatiques, inhalantes, contre les abcès, l'arthrite, l'asthme, les furoncles, la bronchite, les brûlures, le cancer, le diabète, diarrhée, diphtérie, dysenterie, encéphalite, entérite, érysipèle, fièvre, grippe, lèpre, paludisme, mammite, phthisie, rhinite, et les plaies (Bachir-Rah and Benali, 2012). De plus, l'huile possède un large spectre d'activité biologique, notamment antimicrobienne, fongicide, insecticide / insectifuge, herbicide, acaricide et nématocide (Singla *et al.*, 2014).

10.9. *Artemisia dracuncululus L.*

L'estragon (*Artemisia dracuncululus L.*) également connu sous le nom d'absinthe de dragon, de faux estragon ou de millepertuis, est une espèce d'herbe vivace de la famille des Astéracées. Le nom d'espèce dracuncululus est associé à la forme des feuilles, qui rappelle la langue d'un dragon (Aglarova *et al.*, 2008). En tant que plante médicinale traditionnelle, elle est utilisée pour le traitement des maux d'estomac, de la fièvre, du diabète et des infections parasitaires ou bactériennes. Dans une étude menée en Turquie, il a été montré que l'huile essentielle d'*A. dracuncululus* a des effets antibactériens et des activités antifongiques (Kordali *et al.*, 2005)

Synthèse bibliographique

10.10. *Artemisia herba alba*

Artemisia herba alba ou l'armoise blanche est une espèce de la famille des Astéracées. C'est une plante herbacée à tiges ligneuses, ramifiées et tomenteuses de 30 à 50 cm de long. Elle est très utilisée lors d'un désordre gastrique tel que la diarrhée et les douleurs abdominales et en tant que remède de l'inflammation du tractus gastro-intestinal (**Ghrabi and Sand, 2008**). Plusieurs études scientifiques ont également prouvées l'efficacité de l'armoise blanche en tant qu'agent antidiabétique, antiparasitaire, antibactérien, antiviral, antioxydant, anti malarien, antipyrétique, antispasmodique et antihémorragique (**Yin et al., 2008**).

10.11. *Juniperus communis*

Juniperus communis L. ou génévrier, un gymnosperme de la famille des *cupressaceae*, est un arbuste de haute altitude entre 2000 et 2400 m. Il contient environ 2% d'huile volatile, des résines (environ 10%), des protéines et des acides formique, acétique et malique (**Sati and Sativa, 2010**). Le génévrier est également utilisées en médecine traditionnelle pour ses propriétés stomacales, diurétiques, antiseptiques et antirhumatismales pour traiter la dyspepsie, la cystite, l'arthrite, la goutte et d'autres inflammations (**Sela et al., 2011**). En outre, ses huiles essentielles montraient un certain nombre d'activités biologiques telles que : antihyperglycémique antimicrobien, antioxydant et anti inflammatoire (**Kim et al., 2003**).

Chapitre II : Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Cadre d'étude

Un total de 227 souches qui ont été collectées des prélèvements cliniques provenant des patients hospitalisés dans les différents services du centre hospitalo-universitaire de Batna (une structure de 635 lits) et des patients à consultation externe. La période d'étude est étalée entre Janvier 2015 à Décembre 2016. Le travail a été réalisé dans le laboratoire de bactériologie, département des sciences vétérinaires, Université Batna1 (isolement, identification et antibiogramme), et les autres étapes de l'étude (MALDI-TOF, CMI, E-test, identification des gènes de résistance, MLST et PFGE) ont été réalisées au niveau de l'unité d'hygiène hospitalière, CHRU de Besançon, France aussi que dans le laboratoire de bactériologie clinique, Université de Barcelone, Espagne.

1.1. Recueil des données

Le recueil des informations est réalisé à partir des registres du laboratoire de bactériologie du CHU de Batna en exploitant les données suivantes :

- Le nom et prénom du patient.
- Le sexe du patient.
- Le service d'origine.
- La nature du prélèvement.

1.2.Élimination des doublons

Les souches isolées d'un même malade, au niveau du même site anatomique dont le profil de sensibilité est identique et /ou présente au moins une différence mineure S/I ou I/R ont été considérées comme doublons et donc éliminées.

1.3. Limites de l'étude

Aucun accès aux données concernant les dates d'admission des patients et leur durée de séjour.

2. Identification des souches

Après leur isolement, les souches de *Pseudomonas aeruginosa* ont été identifiées premièrement par les tests conventionnels phénotypiques à savoir leur croissance sur gélose au cétrimide à 42°C, la mise en évidence d'oxydase et leur profil biochimique sur galerie API 20NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), et deuxièmement confirmées par MALDI-TOF MS

Matériel et méthodes

(Matrix-Assisted Laser Desorption and Ionization Time-Of-Flight mass Spectrometry Method) (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

2.1. MALDI-TOF MS

La spectrométrie de masse MALDI TOF, sert à identifier les microorganismes par l'analyse de leurs protéines totales. Le *screening* des protéines ribosomales est présenté sous forme de spectres constitués de différents pics. L'échantillon à analyser est déposé sur une cible est traité par une matrice appropriée. Après introduction de la cible dans le système, elle est bombardée par un laser. Les ions ainsi générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ électrique qui les dirige dans un tube de vol vers l'analyseur. Ce dernier permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol (TOF) et de produire un spectre de masse. Le spectre de masse obtenu est une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de la composition en protéines du microorganisme analysé qui peut être comparé à une banque de données de spectres (Seng *et al.*, 2009; Descy *et al.*, 2010).

Le typage des souches par ces spectres a été réalisé avec la combinaison de deux Bruker softwares, le Flex analysis (Bruker Daltonics), qui sélectionne les spectres correctes > 1000DA, et le Biotyper Bruker 3.0 (Bruker Daltonics) qui sert au téléchargement des spectres, et à la projection du spectre principale MSP (Main Spectra) pour chaque souche. Par la suite, les MSP dendrogrammes ont été construits en utilisant le MALDI Biotyper 3.0. Le MSP dendrogramme est divisé en clusters, ces derniers sont analysés selon le niveau de distance arbitraire.

a.Préparation de la matrice : la matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie des faisceaux laser incident. Dans un tube à Eppendorf, on dispose les éléments suivants en respectant la procédure suivante :

- 2 spatules d'alpha- cyano- 4 hydrocinnamic acide
- 500 µl d'acetonitril HPLC
- 250 µl de TFA à 10% (acide trifluoroacétique)
- 250 µl d'eau HPLC
- Soniquer pendant 10 minutes dans un Bain à ultrasons
- Centrifuger 5 minutes à 13000 RPM

Matériel et méthodes

-Transférer le surnageant dans un tube à Eppendorf propre. Ainsi la matrice prête à être utilisée.

b.Préparation des échantillons pour l'analyse spectrométrique

- On prélève les bactéries à identifier, à partir d'une culture bactérienne de 24 heures, pour les déposer sous forme d'un fin frottis d'environ 5 mm², sur les spots de la plaque métallique servant de cible aux tris du laser. Pour chaque souche, on fait 4 spots pour réduire le risque d'erreur.

-On dépose 2µl de matrice sur chaque spot.

- On laisse sécher sous la hotte pendant 15 minutes pour permettre sa co-cristallisation avec l'échantillon bactérien.

c.Insertion de la cible et lancement du MALDI TOF

- La cible était ensuite introduite dans l'appareillage (Microflex, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) et exposée sous- vide, aux tris du laser.

- Remplir la fiche du logiciel MALDI Biotyper Automation Control.

- Lancer le spectromètre de masse : Microflex.

3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques était réalisée selon les recommandations de la **CLSI, 2011** en utilisant la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller -Hinton (MH) à partir d'une suspension bactérienne ajustée à 0,5 Mac Farland. Un total de 14 antibiotiques ont été testés : ticarcilline, piperacilline, ticarcilline/ acide clavulanique, ceftazidime, imipeneme, aztreonam, amikacine, tobramycine, gentamicine , netilmicine, ciprofloxacine, levofloxacine, fosfomycine et la rifampicine (annexe 2).

Les souches bactériennes ont été classées en trois catégories cliniques : sensible (S), intermédiaire (I) et résistante (R) (annexe 2).

Matériel et méthodes

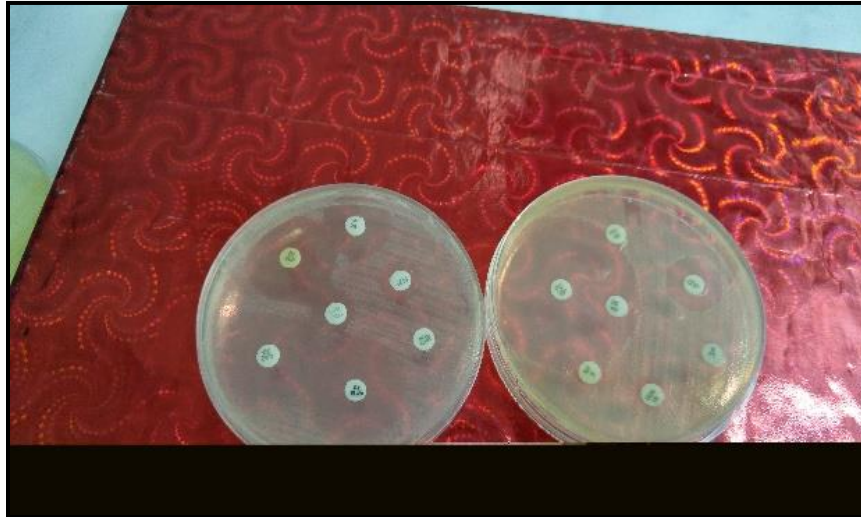


Figure.6.Antibiogramme.

3.1. La recherche des métallo-béta-lactamases

3.1.1. Test Hodge modifié

Sur une boîte de gélose MH on ensemence par écouvillonnage une suspension bactérienne d'*E. coli* ATCC 25922 (type-sauvage) à 0.5 MF diluée au 1/10^{ème} et laisser sécher 5min. Au centre de la boîte on dépose un disque d'imipenème. Ensuite on ensemence en trait la souche à tester à partir du disque jusqu'à la périphérie de la boîte. Incuber à 35°C ±2°C pendant 16 à 24 heures (CLSI, 2011).

La déformation de la zone d'inhibition à l'intersection entre une strie et la culture d'*E. coli* indique la présence d'une méthallo-β-lactamase (CLSI, 2011).

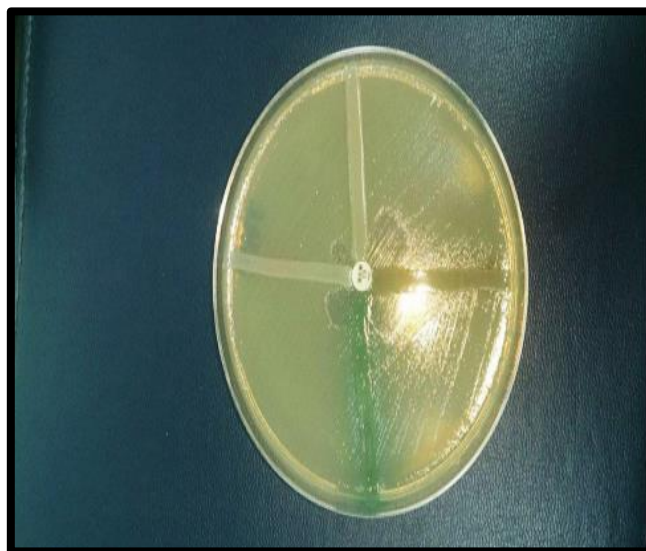


Figure.7. Test Hodge modifié d'une souche produisant une méthallo-β-lactamase.

Matériel et méthodes

3.1.2. Test de synergie double disque

On dépose deux disques d'imipénème à deux centimètres d'intervalle dans la même boîte de gélose MHensemencée par la souche à tester, on rajoute à l'un d'eux 4µl d'EDTA (soit 750µg d'une solution d'EDTA 0.5M, pH=8). Après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C, un diamètre d'inhibition autour du disque IPM-EDTA est supérieur à celui obtenu avec disque d'IPM seul d'au moins 6mm, la souche est considérée comme souche productrice de MBL (CLSI, 2011)

3.2. Détermination de la sensibilité par concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide (colistine et méropénème)

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont définies comme la plus faible concentration d'antimicrobien qui inhibe la croissance visible cependant l'utilisation de la technique de diffusion des disques sur gélose n'est plus recommandée en raison de la mauvaise diffusion de la colistine dans la gélose (Gales *et al.*, 2001). La méthode la mieux recommandée par l'EUCAST et le CLSI comme seule méthode de test de sensibilité fiable et reproductible est la détermination de la CMI par méthode de microdilution en bouillon selon le standard ISO 20776-1. Ils précisent d'utiliser un milieu liquide Mueller-Hinton (MH) ajusté en cations ou le milieu liquide ISO qui présente des caractéristiques voisines de celles du MH ajusté, de réaliser le test avec la colistine sulfate (et non la colistine méthanesulfonate : CMS) et d'utiliser des plaques de titrage en polystyrène dépourvues de prétraitement sans l'utilisation d'autres additifs comme les polysorbates (EUCAST, 2016).

3.2.1. Préparation de la solution antibiotique, suspension bactérienne et inoculation de la microplaque

Les essais sont réalisés sur des plaques de microdilution 96 puits. La méthode est basée sur la préparation de solutions de travail des antibiotiques pour un volume total de 150 µL dans la cupule, c'est-à-dire, 50 µL de milieu, 50 µL d'antibiotique et 50 µL de suspension bactérienne.

Nous avons commencé par préparer des solutions mères d'antibiotiques à 512 mg/L et à partir de ces solutions mères d'antibiotiques dans l'eau, nous avons réalisés des solutions travail à 4X selon les CMI de référence (EUCAST, 2016).

A partir d'une culture de 24h sur gélose au sang, on prépare une suspension bactérienne de 0.5McFarland et faire une dilution 1:50 dans un tube de 9.8 ml du bouillon choisi.

Matériel et méthodes

D'après la norme ISO ISO 20776-1, les plaques doivent être inoculées dans les 30 min de la normalisation de la suspension de l'inoculum afin de maintenir la concentration du nombre de cellules viables. Nous avons d'abord distribué les solutions d'antibiotiques puis les suspensions (EUCAST, 2016).

-Toutes les cupules sont ensuite couvertes à l'aide d'une feuille adhésive pour éviter la contamination et le dessèchement et sont incubées à 37°C pendant 18-20h.

Le contrôle de qualité était la souche de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27835

3.2.2. Lecture des plaques

Pour la lecture, il est important de vérifier le témoin de croissance positif auquel on comparera les autres cupules pour définir la CMI, la concentration la plus faible de l'antibiotique qui inhibe complètement la croissance visible. La croissance dans une cupule apparaît sous forme de turbidité ou d'un dépôt de cellules au fond de la cupule La CMI est alors définie comme la plus faible concentration d'antimicrobien qui inhibe la croissance visible (EUCAST, 2016).

4. Détermination des pompes à efflux

La mise en évidence des pompes à efflux a été réalisée en suivant deux techniques : celle des bandelette E-test de méropénem en présence et en absence d'un inhibiteur des pompes à efflux : le PaβN (phenyl-arginine-b-naphthylamide) sur gélose Mueller-Hinton et celle de la CMI en milieu liquide (Mesaros *et al.*, 2007).

4.1. Technique E-test

- Mélanger la solution de PaβN à 1mg/ml avec la gélose Mueller-Hinton en surfusion ;
- Etaler à la surface d'une boîte de gélose Mueller-Hinton avec un écouvillon la suspension bactérienne de 0.5McFarland ;
- Appliquer les bandelettes E-test de méropénème
- Incuber à 37°C pendant 24h.

Matériel et méthodes



Figure.8. E-test du meropeneme en présence et en absence du Pa β N.

Lecture :

Une différence de CMI de l'E-test à l'ordre de 4 concentrations indique la présence d'une pompe à efflux.

4.2. Technique de la CMI

La détermination de la CMI en milieu liquide utilisée précédemment est appliquée pour la mise en évidence des pompes à efflux avec un volume final de 150 μ l (50 μ L de milieu, 50 μ L d'antibiotique à 4X, 25 μ L de la solution d'inhibiteur à 4X et 25 μ L de suspension bactérienne (Mesaros *et al.*, 2007).

5. Multi-locus sequence typing (MLST)

MLST est une technique de génotypage basée sur le séquençage de 7 gènes de ménage (housekeeping genes) importants dans le métabolisme de la bactérie, approximativement 400 à 500 pb de chaque gène vont être séquencées (après avoir été amplifiées par PCR). Ces gènes de ménage sont stables dans le temps, le taux de mutation est faible et les allèles sont caractéristiques à chaque espèce.

L'alignement des séquences d'un locus donné, permet de repérer les allèles différents entre eux, par des mutations et/ou recombinaisons pour chaque souche bactériennes. La combinaison des numéros correspondant aux allèles des 7 locus étudiés définit un profil allélique ou «Séquence Type» (ST). Pour la détermination du profil allélique, l'ordre d'affectation des numéros aux 7 locus a été fixé arbitrairement. La numérotation des profils

Matériel et méthodes

alléliques a également été établie par ordre d'identification de ceux-ci (ST-1, ST-2, etc.) (Maiden *et al.*, 1998).

Curran *et al.* (2004) et Van Mansfeld *et al.* (2009) ont mis au point le MLST de *P. aeruginosa* par l'analyse par les séquençages nucléotidiques des 7 gènes *acsA*, *aroE*, *mutL*, *ppsA*, *gua*, *nuoD*, et *trpE*.

La base des données référençant les profils alléliques déposés et les protocoles sont accessible en ligne (<http://pubmlst.org> et <http://pasteur.fr/mlst/>). Les amorces des sept gènes de ménage utilisé dans notre étude sont mentionnées dans le tableau 1.

Tableau.1 Séquences des amorces des gènes de ménage utilisées en MLST

Gène	Amorce (5'-3')
<i>acsA</i> (Acetyl coenzyme A synthetase) 390 pb	F AAGGGCGTGCTGCATACCA R CGGCCAGGAGTCGAGGATC
<i>aroE</i> (Shikimate dehydrogenase) 495 pb	F ATGTCACCGTGCCGTTCAAG R GCGCCAGAGGAAGAATGCC
<i>guaA</i> (GMP synthase) 372 pb	F ACTACGGCGTGCAATTCCAC R GAACGGGTGGCGGTAGACC
<i>mutL</i> (DNA mismatch repair protein) 441 pb	F AGCCTGGCAGGTGGAAACC R CTCTCCAGCACGCTCTCGG
<i>nuoD</i> (NADH dehydrogenase I chain C, D) 366 pb	F GGGACATGTACGGCATCACCT R GCGCAGGATGCTGTTCTTCA
<i>PpsA</i> (Phosphoenolpyruvate synthase) 369 pb	F CGGTCAAGGTAGTGGACGTCG R TTCTTGCGCACATCGAAACC
<i>TrpE</i> (Anthralite synthetase component I) 441 pb	F CGCGAGGACTATGAAAACGC R CGCTTGTTGATGGTTTCTT

Matériel et méthodes

6. Etude de la relation épidémiologique entre les souches étudiées par électrophorèse en champ pulsé (PFGE ou ECP)

-Principe

L'électrophorèse en champ pulsé est une technique discriminante qui permet de distinguer des souches génétiquement très proches et offre une bonne reproductibilité, malgré un délai d'analyse relativement long. Cette méthode a prouvé son efficacité dans de nombreuses enquêtes épidémiologiques et a permis la comparaison de nombreux génotypes dont l'identification aurait été difficile par d'autres méthodes (Tuméo *et al.*, 2008; Vettoretti *et al.*, 2009).

Le protocole suivant a été emprunté de celui de Tenover *et al.*, (1995) avec quelques modifications

J1 : Préparation de l'ADN total

Les différentes souches de *P.aeruginosa* ont été cultivées sur un milieu MH gélosé pendant 18 heures à 37°C.

J2 : Préparation des blocs (insertion de l'ADN dans une matrice d'agarose)

Une quantité de bactéries a été mise en suspension dans 1 ml de tampon Tris-HCL 10mM, NaCl 1 M, pH 7.6 (PETT 1V) à raison de 10⁹ UFC/ml. Les cellules étaient récupérées par centrifugation à 12000 g pendant 10 mn puis remises en suspension dans 1.6 ml de tampon PETT 1V à 42°C. Cette suspension était mélangée avec un volume égal d'agarose à bas point de fusion (Incert agarose ; FMC BioProducts, Rockland, ME, USA), à 1% dans le tampon PETT 1V, puis après liquéfaction la solution obtenue était coulée dans des moules Bio-Rad. Les blocs étaient solidifiés dans de la glace pendant 15 mn puis incubés dans un cryotube contenant 500µl du tampon ESP (pH 8.0) pendant 72h à 55°C pour permettre la lyse de la paroi et la déprotéinisation.

J5 : Lavage des blocs

Après la protéolyse, les inserts d'ADN génomique étaient lavés quatre fois par le tampon Tris-acide acétique 10 mM (TE-acétate) et incubés à chaque lavage à 42°C pendant une heure pour inactiver la protéinase K.

Matériel et méthodes

Un tiers du bloc est transféré dans un tube avec le tampon d'enzyme approprié à 1X. Les deux autres tiers de chaque bloc d'agarose étaient conservés en tampon TE-acétate à 4°C pour une éventuelle utilisation ultérieure.

Parallèlement, pour permettre la comparaison des profils intra-gels et inter-gels, la souche de référence de *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 (National Collection of Type Culture) a été préparée et placée dans du tampon adapté à l'enzyme de restriction *SmaI* et placée également à 4°C.

J6 : Restriction enzymatique

Les inserts (1/3) d'ADN génomique ont été incubés avec 40 unités de l'endonucléase appropriée pendant 18h, à la température optimale d'activité de l'enzyme :

DraI (Roche Diagnostics) pour *P.aeruginosa* : 37°C

SmaI (Q-BIOgene) pour *Staphylococcus aureus* : 25°C

J7 : Séparation des fragments d'ADN

Les fragments obtenus ont été séparés par électrophorèse en champ pulsé (CHEF-DRIII, BioRad, Richmond, USA) sous les conditions suivantes : 5.5 V/cm à 14°C, avec des impulsions de 20 secondes pendant 12 heures puis de 5 à 15 secondes pendant 17 heures. La souche de *S.aureus* NCTC 8325 a été incluse dans chaque gel après restriction par *SmaI* ;

J8 : Révélation du gel

Les gels d'électrophorèse ont été colorés par une solution de bromure d'ethidium à 0.5µg/ml durant 30 min, puis lavés à l'eau distillée pendant 2 heures, avant d'être révélés par transillumination aux rayons ultraviolets à 312 nm et photographiés avec le système *Syngene GBOX-CHEMI-XRQ* ;

J9 : Comparaison des profils électrophorétiques et interprétation

Le logiciel GelCompar version 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgique) a été utilisé pour établir la matrice de similitude d'ADN basée sur le calcul du coefficient de corrélation de Dice, qui analyse les profils deux à deux et qui correspond au rapport du nombre de fragments communs multiplié par deux sur le nombre total de fragments observés dans les deux profils ;

Matériel et méthodes

7. Identification des gènes de résistance par PCR simple

7.1. Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour la PCR

Les réactions d'amplification des gènes de résistance aux antibiotiques sont réalisées avec des couples d'amorces spécifiques cités dans le tableau ci-dessous (tab.2) dans un thermocycler de type C10000 Thermal cycler et Veriti thermal cycler Applied Biosystems en présence de Taq DNA Polymerase (Go Taq Flexi) en respectant les conditions d'utilisation spécifiées par le fournisseur. Les amplicons sont ensuite purifiés et séquencés.

-Pour la détection des carbapénèmases, les amorces utilisées étaient *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}* et *bla_{VIM}*. Aussi que l'amorce de l'intégron de classe I pour analyser la séquence de l'intégron des souches présentant une carbapénémase.

-Les amorces : *aac6'*, *rmtA*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtG*, *rmtH*, *armA*, *npmA*, *rmtB*, *rmtE* et *rmtF* ont été utilisées pour déterminer les gènes de résistance aux aminoglycosides.

-On a utilisé comme amorces : *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* dans l'étude des gènes de résistance aux fluoroquinolones.

-Pour l'étude de la résistance à la colistine on a utilisé les amorces suivantes : *mcr*, *pmrAB*, *phoP* et *phoQ*.

Tableau.2. Amorces utilisées pour la détermination des gènes de résistance

Gène	Amorce (5'-3')
<i>bla_{NDM-1}</i> 621 pb (Poirel et al., 2011)	F : GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC R: CGGAATGGCTCATCACGATC
<i>bla_{VIM-2}</i> 580pb (Zhao et al., 2011)	F : TCATTGTCCGTGATGGTGAT R : ACGACTGAGCGATTTGTGTG
<i>bla_{VIM-4}</i> 449pb (Zhao et al., 2011)	F : GATGGTGTTTGGTCGCATATC R : ACGGCACAACCACCGTATAG
<i>bla_{IMP-1}</i> 740 pb (Yan et al., 2001)	F : TGAGCAAGTTATCTGTATTC R : TTAGTTGCTTGGTTTTGATG

Matériel et méthodes

<i>bla_{IMP-13}</i> 741 pb (Gutiérrez <i>et al.</i>, 2007)	F : ATGAAGAAATTATTTGTTTTATG R : TTAGTTACTTGGTGATGATG
<i>intI1</i> variable (Shahada <i>et al.</i>, 2006)	F : GGCATCCAAGCAGCAAG R : AAGCAGACTTGACCTGA
<i>aac(6)</i>' 395pb (Teixeira <i>et al.</i>, 2016)	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT
<i>rmtA</i> 88pb (Berçot <i>et al.</i>, 2011)	F : AA ACTATTCCGCATGGTTC R : TCATGTACACAAGCTCTTTCC
<i>rmtB</i> 171pb (Berçot <i>et al.</i>, 2011)	F : ACTTTTACAATCCCTCAATAC R : AAGTATATAAGTTCTGTTCCG
<i>rmtC</i> 246pb (Berçot <i>et al.</i>, 2011)	F : CAGGGGTTCCAACAAGT R:AGAGTATATAGCTTGAACATAAGTAGA
<i>rmtD</i> 652pb (Berçot <i>et al.</i>, 2011)	F : TCGTTTCAGCACGTAAAACA R : CAGCGCGAAATTCAAAAAGG
<i>rmtE</i> 446pb (Berçot <i>et al.</i>, 2011)	F :GATGCCGTGTCTGTTACGCCG R : ACGTGAACCCACGAGTCCTGC
<i>rmtF</i> 341pb (Berçot <i>et al.</i>, 2011)	F : CGATCCTACTGGGCTCCAT R: GGCATAGTGCTTTTCCATGC
<i>rmtG</i> 381pb (Berçot <i>et al.</i>, 2011)	F : ACGGAATGCCGCGCGAAGTA R : TCTCCGCAAGCAGATCGCCG
<i>rmtH</i> 464pb (Berçot <i>et al.</i>, 2011)	F : ATGACCATTGAACAGGCAGC R : AGGGCAAAGGTAAAATCCCA
<i>armA</i> 101pb (Berçot <i>et al.</i>, 2011)	F : CCCGGGATCCGGTCAACAACGCCGATAACACC R : CCCGGGATCCGCCGTTGGACAGAGTTTAGTAC

Matériel et méthodes

<i>npmA</i> 229pb (Berçot et al., 2011)	F : GGGCTATCTAATGTGGTG R : TTTTATTTCGGCTTCTTCGT
<i>gyrA</i> 364 pb (Oh et al., 2003)	F : TTATGCCATGAGCGAGCTGGGCAACGACT R : AACCGTTGACCAGCAGGTTGGGAATCTT
<i>gyrB</i> 600 pb (Oh et al., 2003)	F : AGCTCGCAGACCAAGGACAAG R : GGGCTGGGCGATGTAGATGTA
<i>parC</i> 208 pb (Oh et al., 2003)	F : ATGAGCGAACTGGGGCTGGAT R : ATGGCGGCCGAAGGACTTGGGA
<i>parE</i> 592 pb (Oh et al., 2003)	F : CGGCGTTCGTCTCGGGCGTGGTGAAGGA R : TCGAGGGCGTAGTAGATGTCCTTGCCGA
<i>mcr-1</i> 502pb (Lescat et al., 2018)	F:ATGCCAGTTTCTTTTCGCGTG R:TCGGCAAATTGCGCTTTTGGC
<i>mcr-2</i> 379pb (Lescat et al., 2018)	F: GATGGCGGTCTATCCTGTAT R: AAGGCTGACACCCCATGTCAT
<i>pmrAB</i> 2138pb (Lin et al., 2019)	F : CGATCTTAACCGCTTCACGC R : GACTGGGTATTCGCTTCC
<i>phoP</i> 690pb (Lin et al., 2019)	F: CGCCATATGAAACTGCTGGTAGTGGAA R: CGCCTCGAGCCGGCAGCGCTCGGTGAA
<i>phoQ</i> 1359 pb(Lin et al., 2019)	F: CGGCATATGATCCGTTCCCTGCGCATC R: CGGCTCGAGGACTGTAGCGAAACGTATG

7.2. Extraction de l'ADN bactérien

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée selon la technique de boilling dont on fait suspendre une anse de 1 µL d'une culture jeune sur gélose au sang bactériennes dans un eppendorf contenant de 100 µL de l'eau distillée stérile et après 10 min à 96-100°C au bain

Matériel et méthodes

marie , on centrifuge le tube et le surnageant contenant la matrice d'ADN était récupéré. On conserve l'ADN extrait à une température de - 20°C pour toutes études ultérieures.

7.3. Préparation du mix

La composition du master mix est indiquée dans le tableau 3

Tableau.3. Préparation du master mix

Produits	Réaction par échantillon
<i>Master mix</i>	
Buffer	10µl
MgCl ₂ à 1.5mM	5µl
dNTP	5µl
<i>Primers</i>	
Primer F	5µl
Primer R	5µl

Chaque constituant de ce mix est multiplié par le nombre d'échantillons étudiés, puis 30µl de ce mélange sont distribués dans chaque tube Eppendorf PCR stérile à savoir :

- Contrôle négatif : 20µl d'eau distillé stérile ;
- Contrôle positif : 20µl de DNA positif ;
- Echantillons : 20µl de DNA de notre échantillon est ajouté à 30µl de mix
- Volume total : 50µl par échantillon (les contrôles ou les échantillons à analyser) ;
- ajouter 0.5µl de la Taq dans les tubes des échantillons et le témoin positif.

Le mix et les DNA sont transférés dans des tubes Eppendorf de type « Mastercycler personal » et sont introduits dans le thermocycleur.

Matériel et méthodes

7.4. Paramètres de la PCR

Les réactions d'amplification sont réalisées selon les conditions suivantes :

2 min à 95°C, ensuite 30cycles (30 sec à 94°C pour la dénaturation, 30 sec à 55°C et 2.5 min à 72°C) et pour l'élongation finale 5 min à 72°C.

7.4.1. Lecture des produits de PCR

a.Préparation du gel d'agarose

- Pour 100 ml d'agarose à 1% (1g d'agarose dans 100 ml de TAE 1X)
- Faire chauffer le mélange dans un four microonde pendant 4 min jusqu'à l'obtention d'un liquide clair et homogène ;
- Ajouter 8µl de SYBR Safe au gel qui permet la visualisation des bandes d'ADN dans le gel sur la table UV du transilluminateur.
- Couler le gel dans un moule puis déposer un peigne dans le gel pour créer des puits et laisser refroidir à température ambiante pendant 30 minutes puis retirer le peigne.
- Placer le moule avec le gel dans la cuve d'électrophorèse en ajoutant un volume de tampon TAE 1X dans la cuve préalablement remplie jusqu'à ce que le gel soit immergé (environ 1mm au-dessus).
- Dans le premier et le dernier puits on dépose 15µl le marqueur de taille (Invitrogen 1kb DNA Ladder) d'une concentration de 1X.
- Dans le deuxième puits et le puits avant dernier on dépose 15µl du témoin positif et du témoin négatif respectivement ;
- Les autres puits sont réservés aux échantillons ;
- Fermer la cuve et brancher l'alimentation de la cuve de manière à ce que les dépôts soient côté cathode (-).
- Appliquer une tension de 130 Volte correspondant à environ 30 minutes de migration.
- Couper l'alimentation quand le colorant a parcouru la distance requise ou laisser la migration arriver jusqu'à 1 cm du bord de la cuve (cette ligne est appelée le front de migration).
- Débrancher le générateur de la cuve.

Matériel et méthodes

b. Visualisation et lecture du gel

A l'aide d'un transilluminateur (GBox) on passe le gel à une lecture sur une table à UV. Les fragments d'ADN des échantillons sont repérés par rapport au marqueur du poids moléculaire et au témoin positif.

c. Préparation des produits de PCR pour le séquençage

-Dans un eppendorf stérile on mélange 20 µl de chaque échantillon avec 20µl de chaque primer.
-Ensuite les échantillons sont envoyés pour être séquencer.

-L'analyse et l'alignement des séquences ont été réalisés par BioEdit 7.2. Les séquences d'ADN résultantes ont été comparées aux séquences nucléotidiques publiées de la base de données GenBank en utilisant la recherche BLAST disponible sur le site Web du Centre américain pour les informations biotechnologiques NCBI (Bethesda, MD, États-Unis) et par Serial Cloner 2.6.

7.5. Analyse statistique des données

Les fréquences des isolats de *P. aeruginosa* récupérés dans différents services ont été calculées comme le pourcentage d'un certain nombre d'isolats par rapport au total des patients enquêtés hospitalisés dans différentes unités. Le test Chi-carré de Pearson (χ^2) a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes des variables quantitatives. La signification statistique a été définie comme $P < 0,05$. Tous les tests ont été effectués avec SPSS version 20.

8. Etude de la formation des biofilms

8.1. La méthode du rouge Congo (CRA)

La gélose Rouge Congo permet la détection de souches productrices de slime. Le milieu est ensemencé en stries avec la souche à tester (une colonie dans 20 ml d'eau distillée). La lecture est faite après une nuit d'incubation à 37°C et 24 heures supplémentaires à température ambiante (Touati *et al.*, 2007).

Les souches productrices de slime donnent des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges, à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variable donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Ziebuhr *et al.* 2001).

Matériel et méthodes

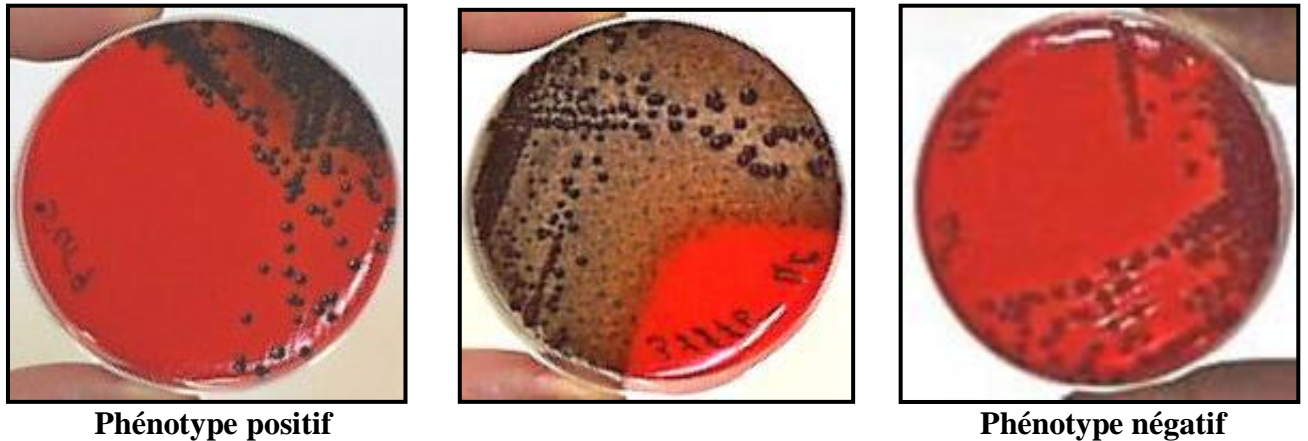


Figure.9.Phénotypes de production de slime (**Touati et al., 2007**).

8.2.La méthode des tubes (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par **Christensen et al., 1982**. A partir d'une boîte de culture de 24h, ensemercer une colonie dans 10ml de bouillon Brain Heart Infusion Broth (BHIB) supplémenté de 2% de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24h. Après incubation les tubes de culture sont rincés avec le tampon phosphate salin PBS (pH=7,3) et sont séchés. Ensuite on colore chaque tube par le cristal violet (0,1%) pendant 5 minutes. L'excès de colorant est supprimé et les tubes ont été lavés avec de l'eau distillée, puis séchés en position renversée (**Mathur et al., 2006**).

La formation de biofilm est considérée comme positive si un film visible double recouvre la paroi et le fond du tube et la présence d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la présence de biofilm. La formation de biofilms est notée de 0 pour absent, + pour faible, ++ pour modéré et +++ pour fort (fig.10).

Matériel et méthodes



Figure.10.Sélection des souches adhérentes et non adhérentes. Tube 7: 0, tube 3 : + faible, tube 4: ++ et tube 6 : +++ (Srinivasa *et al.*, 2008).

8.3. La méthode de Plaque de culture de tissus (TCP)

La technique TCP décrite par Christensen *et al.* (1985) est une évaluation semi quantitative de la formation du biofilm.

A partir d'une boîte de culture de 24h, on ensemence une colonie dans 10ml de bouillon BHIB supplémenté de 2% de saccharose puis l'incuber à 37°C pendant 18h.

On effectue une dilution au 1/100 avec du milieu frais (BHIB). Les 96 puits des microplaques ont été remplis avec 0,2 ml de la dilution ainsi que de 0.2 ml de bouillon de culture (BHIB) qui servira de témoin stérile.

Les microplaques ont été incubées pendant 18 heures à 37°C. Après incubation le contenu de chaque puits a été retiré en tapant doucement les microplaques. Les puits ont été lavés quatre fois avec 0,2 ml de tampon phosphate salin (PBS pH=7,2) pour éliminer les bactéries flottant (planctoniques). Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles dans la plaque ont été fixés avec de l'acétate de sodium (2%) pendant 15 min et colorés avec du cristal violet pendant 5 min. L'excès de colorant a été ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques ont été séché afin d'évaluer l'importance de la coloration du biofilm (Stepanovic *et al.*, 2000).

Les souches sont classées dans les catégories suivantes : non-adhérentes (0), faiblement (+), modérée (++) , ou fortement (+++) adhérentes (fig.11).

Matériel et méthodes

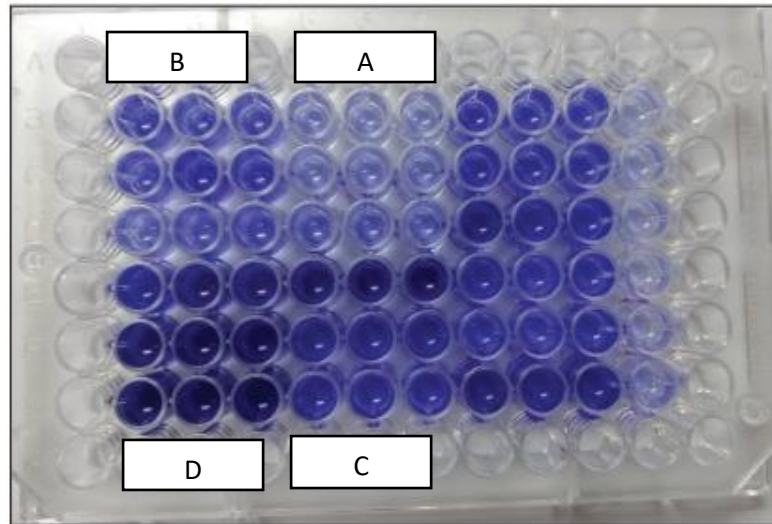


Figure.11.Détection de la formation du biofilm par la méthode TCP des souches. A: non-adhérentes (0), adhérentes B: faiblement adhérentes (+), C: adhérence modérée (++) D: fortement adhérentes (+++) (**Harika et al., 2020**).

9. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

9.1. Huiles essentielles

Sept huiles essentielles (HE) obtenues auprès d'Arko essential (producteurs commerciaux d'huiles essentielles végétales et de substances aromatiques - France) ont été utilisées dans cette étude : *Juniperus communis*, *Eucalyptus globulus*, *Artemisia dracunculus L.*, *Citrus limon*, *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis L.* et *Zingiber officinale*.

Une huile essentielle de la plante *Artemesia herba alba* a été obtenue par la technique d'extraction dite hydro distillation. La sélection de ces huiles a été basée sur l'étude de la littérature et leurs propriétés thérapeutiques en médecine traditionnelle.

9.2. Matériel végétal

Après collecte des feuilles d'*Artemesia herba alba*, elles sont lavées puis séchées. Après séchage, les échantillons sont stockés dans un endroit sec à l'abri de la lumière et la chaleur.

9.3. Hydrodistillation

L'hydrodistillation (la méthode de Moritz) consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à l'ébullition et l'opération est conduite à pression atmosphérique. Les composés volatils et semi-volatils sont entraînés par la vapeur d'eau, qui est ensuite condensée.

Matériel et méthodes



Figure.12. Dispositif utilisé pour l'hydrodistillation

Extraction

- 100g de la partie aérienne de la plante est introduite dans un ballon de 2 litres, imprégné d'un litre d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition ; pendant environ 3 heures en prenant garde de ne pas chauffer jusqu'à séchage. L'H.E s'évapore avec les vapeurs d'eau dégagées qui se condensent en traversant un réfrigérant puis elle est recueillie à l'autre bout de montage. Le distillat est introduit dans une ampoule à décanter afin de séparer l'eau de l'H.E qui la surnage.

-Les vapeurs condensées obtenus conduisent à deux phases qui seront séparées à l'aide d'une ampoule à décanter. L'H.E se trouve dans la phase organique sous forme d'une couche flottante.

-L'huile essentielle obtenue est gardée dans des flacons bien clos est conservée à 4°C et à l'abri de la lumière, pour éviter toute dégradation de l'essence.

9.4. Souches bactériennes

Pour l'activité antibactérienne de chaque HE, un total de 26 souches a été testé de plus de la souche de référence *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

Matériel et méthodes

9.5. Activité antibactérienne

Afin d'évaluer l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles sélectionnées, nous utilisons la méthode de diffusion sur disque (**Dobre, et al., 2011**).

Les suspensions bactériennes à 0.5 Mc Farland ont été étalées sur les plaques contenant de la gélose Mueller-Hinton selon la technique d'écouvillonnage pour obtenir une croissance microbienne uniforme sur les plaques de contrôle et celles à tester.

-Trois concentrations ont été testées : 100% (huile brute), 50% et 25% ;

-Dans des conditions aseptiques, des disques stérilisés vides (Whatman n° 5, 6 mm de diamètre) ont été imprégnés de 25 µl d'huiles essentielles de chaque concentration.

- Les boîtes de Pétri ont été laissées 30 min à température ambiante (20-22°C) pour une meilleure diffusion de l'huile puis incubées à 37°C. Après 24 heures d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et documentés (**Mahboubi and Farzin, 2009**).

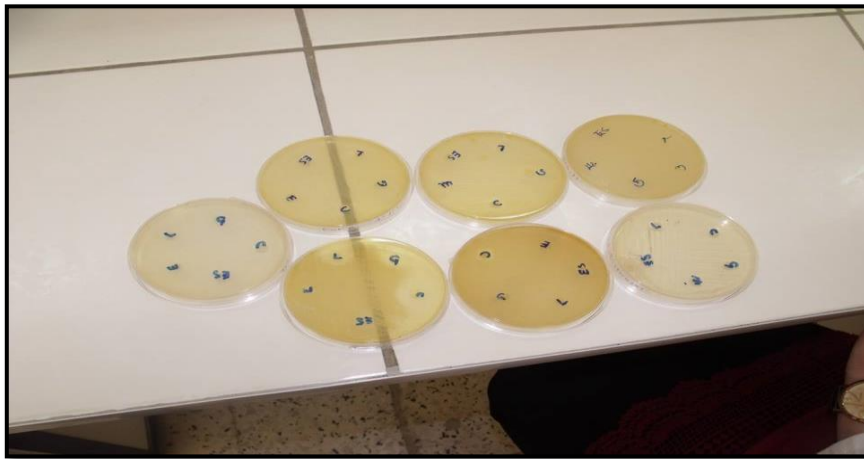


Figure.13. Test d'activité antibactérienne des huiles essentielles

9.5.1. La lecture des résultats

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied de coulisse. D'après **Ponce et al., (2003)** et **Gachkar et al., (2007)**, la sensibilité à l'huile a été classée par le diamètre des halos d'inhibition :

-Non sensible (-) pour les diamètres moins de 8mm.

-Sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm.

-Très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm.

-Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm.

Matériel et méthodes

9.6. Analyse statistique

Tous les résultats expérimentaux ont été réalisés en triple et les résultats ont été exprimés en moyennes \pm SD. La comparaison des groupes a été effectuée par l'analyse des de la variance ANOVA à un facteur ; en utilisant Graph Pad Prism 5.03. Les différences détectées ont été considérées comme significatives lorsque $p < 0,05$.

Chapitre III : Résultats et discussion

Résultats et discussion

Sur une période de deux années, des souche appartenant à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ont été isolées et identifiées, après traitement de divers échantillons cliniques. Ces souches proviennent d'une multitude de prélèvements et de plusieurs services du CHU de Batna. Les sections ci-dessous détaillent les résultats obtenus en accord avec les objectifs soulignés avec leur discussion.

1. Identification des souches par MALDI-TOF-MS

L'identification par MALDI-TOF nous a permet de classer les isolats de *P.aeruginosa* en fonction de leurs scores. L'identification de toutes les souches a donné les mêmes résultats que les Api systèmes. Les résultats d'identification par MALDI-TOF présentent de bon score allant de 1.9 à 2.541 comme le montre le tableau 4.

Tableau.4.Résultats de l'identification des souches de *P.aeruginosa* selon leurs scores de MALDI-TOF

Result Overview					
Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
D3 (+++)(A)	15G	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.313
D4 (+++)(A)	357	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.344	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.166
D5 (+++)(A)	165	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.338	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.109
D6 (+++)(A)	262.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.491	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.276
D7 (+++)(A)	CONTROL	<i>Escherichia coli</i>	2.366	<i>Escherichia coli</i>	2.298

2. Répartition des souches

2.1. Répartition des souches par service

Le service à partir duquel qu'on a pris des prélèvements et par la suite isoler l'espèce en question *Pseudomonas aeruginosa* forme un paramètre clé pour comprendre le flux de la contamination et/ou l'infection par cette bactérie. L'histogramme suivant montre la prévalence d'isolement de *P.aeruginosa* par service :

Résultats et discussion

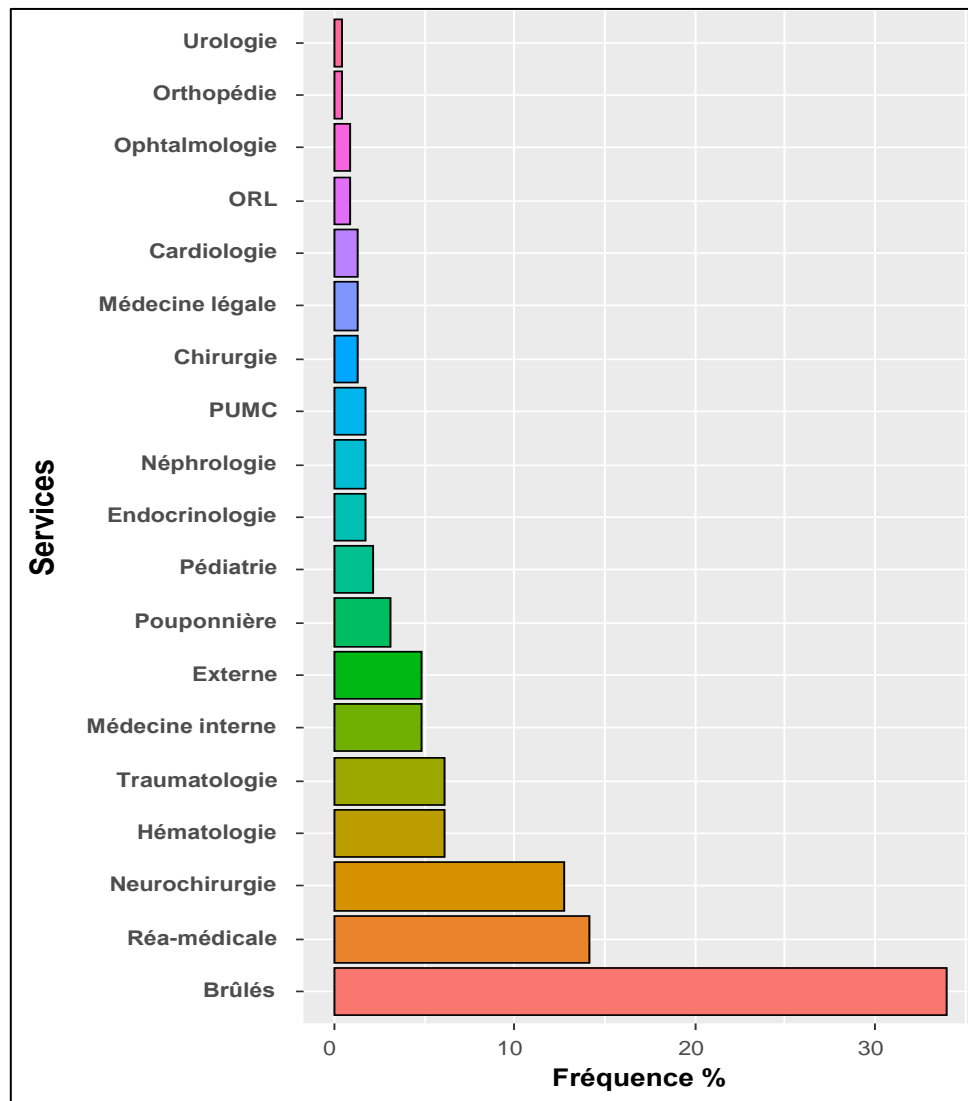


Figure.14.Répartition des souches *P.aeruginosa* en fonction du service d'origine (N= 227).

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire omniprésente chez des hôtes vivants et l'un des facteurs importants des infections nosocomiales qui menace la vie de nombreux patients chaque année (Loveday *et al.*, 2014). Au cours des années 1960, lorsque *P. aeruginosa* est apparue pour la première fois comme une cause fréquente de bactériémie à Gram négatif avec l'absence des antibiotiques anti-Pseudomonas efficaces, le taux de mortalité était 90 % et actuellement ce germe persiste encore dans l'environnement hospitalier (Kang *et al.*, 2003). Ce qui explique l'isolement de *Pseudomonas aeruginosa* de différentes unités du CHU de Batna.

La part du service des brûlés est de 35% suivis de 14 et 13% pour la réanimation et la neurochirurgie respectivement. 1% des souches isolées proviennent de chacun des services de chirurgie, médecine légale, cardiologie, ORL, orthopédie et ophtalmologie. Pour les services

Résultats et discussion

d'orthopédie et d'urologie une seule souche a été isolée de chaque service. Les patients qui consultent en externe forment 5% de l'ensemble des isolats. Ces variations dans le taux d'isolement entre les différents services sont dû essentiellement à la nature de chaque service. La prévalence d'isolement peut varier d'une unité à une autre et d'une étude à une autre (Nathwani *et al.*, 2014). L'analyse statistique de la différence entre les fréquences d'isolement de *P.aeruginosa* entre les différents services a indiqué une significativité p-value<0,001.

Nos résultats montrent que l'unité des brûlés est la plus touchée par la colonisation et/ou l'infection à *P. aeruginosa* ce qu'on peut être expliquer par le caractère opportuniste de ce germe souvent rencontré chez les brûlés immunodéprimés ce qui favorise son implantation sur leurs lésions cutanées (plaies et brûlures traumatiques ou chirurgicales) (Nichols *et al.*, 2013). De plus, *P.aeruginosa* est la deuxième cause d'infections bactériennes des brûlures (Mirsalehian *et al.*, 2011). Malgré l'amélioration des traitements des brûlures, l'infection reste l'une des principales causes de décès chez ces patients et en particulier chez les brûlés gravement malades ; sans oublier le long séjour de ces patients qui facilite leurs contamination par plusieurs pathogènes et contribuant aux infections à *P. aeruginosa* (Kwei *et al.*, 2015). Les bactéries à Gram-négatif comme *P. aeruginosa* sont détectées chez les brûlés suite à l'application du débridement des plaies chirurgicales et de la greffe de peau au début de la chirurgie, ainsi que l'utilisation intensive des antibiotiques systémiques et d'autres interventions thérapeutiques (Wanis *et al.*, 2016).

Nos résultats concordent avec l'étude menée par Dou *et al.* (2017) qui a rapporté une prévalence d'isolement de *P.aeruginosa* de 26.16% chez les brûlés. Dans une autre étude réalisée en Irak ; *P.aeruginosa* était présent à 14.07% chez les brûlés (Al-Saffar and Jarallah, 2019). Un taux d'isolement de 28% a été rapporté dans l'étude de Meradji (2016) réalisée au niveau des hôpitaux de la ville d'Annaba. En Egypte, l'unité des brûlés représentait 66.7% des isolats de *P. aeruginosa* (Mansour *et al.*, 2013).

En outre, les patients hospitalisés dans des unités à haut risque comme celles de réanimation et de neurochirurgie et avec des défenses immunitaires réduites semblent être sensibles aux infections par des agents pathogènes comme *P. aeruginosa*, où la pression de sélection de la prescription d'antibiotiques à large spectre augmente l'infection bactérienne. Dans une étude menée dans des unités de réanimation en Europe occidentale, *P. aeruginosa* était l'un des organismes les plus isolés et présentait un taux de 17% (Vincent *et al.*, 2009). Selon le rapport annuel de l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) de

Résultats et discussion

l'année **2017**, on trouva que *P.aeruginosa* était présent à 19.9% dans l'unité de réanimation surtout chez les patients atteints de pneumonie. Cependant, une fréquence de 65,90% d'isolement du service de la réanimation et de 7,83% du service de la neurochirurgie ont été rapportées dans l'étude de Sefraoui (**2015**) au niveau de trois centres hospitalo-universitaires du nord-ouest algérien (CHU d'Oran, CHU de Tlemcen et CHU de Sidi Bel Abbas). Le service hospitalier le plus fréquemment associé est l'unité de réanimation comme le rapporte Rossi-Goncalves *et al.* (**2017**). En contrepartie *P.aeruginosa* est moins fréquent dans les infections urinaires moins que les brûlures ; Ullah *et al.* (**2019**) montre que la majorité des isolats de *P. aeruginosa* proviennent des urines.

2.2. Répartition des souches par nature de prélèvement

On rapporte dans la figure 15 la fréquence d'isolement de *P. aeruginosa* en fonction des prélèvements étudiés.

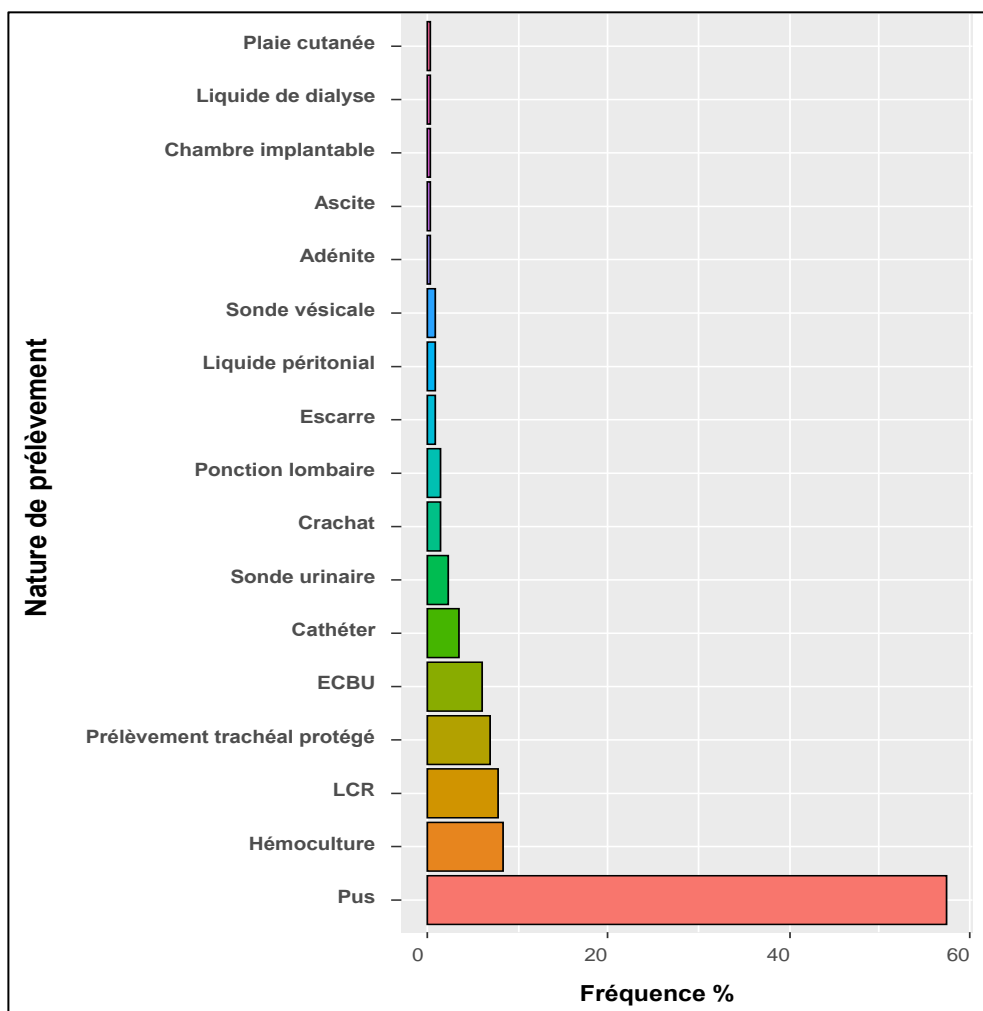


Figure.15. Répartition des souches *P.aeruginosa* en fonction du type de prélèvements (N=227).

Résultats et discussion

La prise de prélèvement est la première étape dans le diagnostic des infections et la mise en évidence des germes impliqués. Donc la nature et le site anatomique d'échantillon est lié au germe isolé. Le pus des plaies représentait le prélèvement le plus dominant avec 57%, les hémocultures et le LCR présentaient 8% de la totalité des prélèvements, le trachéal protégé 7% et les urines 6%. Le reste des prélèvements représentaient 1% (crachat, ponction lombaire, liquide péritonéal, sonde vésicale) voir même 0% (adénite, ascite, liquide de dialyse, plaie cutanée, étude de la chambre). La différence statistique entre les résultats de l'isolement de *P.aeruginosa* selon leur prélèvement d'origine a été très significative ($p\text{-value}<0,001$).

La répartition de *P. aeruginosa* selon l'origine des prélèvements peut varier d'un hôpital à l'autre, car chaque établissement hospitalier est associé à un environnement différent (Golia *et al.*, 2016). Cette fréquence élevée d'isolement de *P. aeruginosa* des collections suppuratives traduit la fréquente contamination des plaies par cette bactérie (Elogne *et al.* , 2018).

Hoque *et al.* (2015) indiquaient que 38.38% des souches de *P. aeruginosa* ont été isolées à partir des prélèvements de pus et 3.45% du trachéal protégé. En outre, Chinbo, *et al.* (2014) selon leur étude descriptive menée sur une période de 4 ans au Maroc, rapportaient une prédominance de pus de 29,7% par rapport aux autres types de prélèvement

. Mohanasoundaram *et al.* (2011) ont avancé une prévalence de 30% des isolats à partir du pus. A partir de 120 prélèvements cliniques, le pus représentait 85% des sources des isolats de *P. aeruginosa* (Golia *et al.*, 2016).

Toutefois, d'autres études rapportent un taux d'isolement de *P. aeruginosa* de 38,5 % à partir des urines, de 8,3 % des hémocultures et de 3,1 % du cathéter (Kiana *et al.*, 2016)

2.3. Répartition des souches par âge

L'âge des patients est un facteur de risque très important qui influence grandement la persistance du germe et permet de sélectionner ses candidats susceptibles. La figure 16 montre la répartition des tranches d'âge touchées par *P.aeruginosa*.

Un taux de 41% des isolats de *P.aeruginosa* était trouvé chez les sujets dont l'âge varie entre 20 et 40 ans, suivi par la tranche des enfants avec 26%. Entre 10% et 12% des patients sont de la tranche d'âge entre 10 et 20 ans, et 40 et 90 ans. L'Age moyen est 25.99 ± 21.71 , l'analyse statistique de la différence des âges entre patients a montré une très grande significativité avec $p\text{-value}<0,001$.

Résultats et discussion

En revanche, **Patel et al. (2017)** ont rapporté une prévalence plus élevée chez les personnes âgées de 61 à 80 ans (43,92 %). **Araújo et al. (2018)** trouvaient que les patients qui ont l'âge entre 59 et 77 présentent la tranche la plus touchée par les infections à *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* est fréquemment trouvé dans la tranche d'âge entre 10–20 ans et plus de 60 ans (**Ullah et al., 2019**).

De même, selon **Mohanasoundaram et al. (2011)**, la prévalence la plus élevée des isolats de *P.aeruginosa* a été trouvée dans le groupe d'âge 31-40 ans.

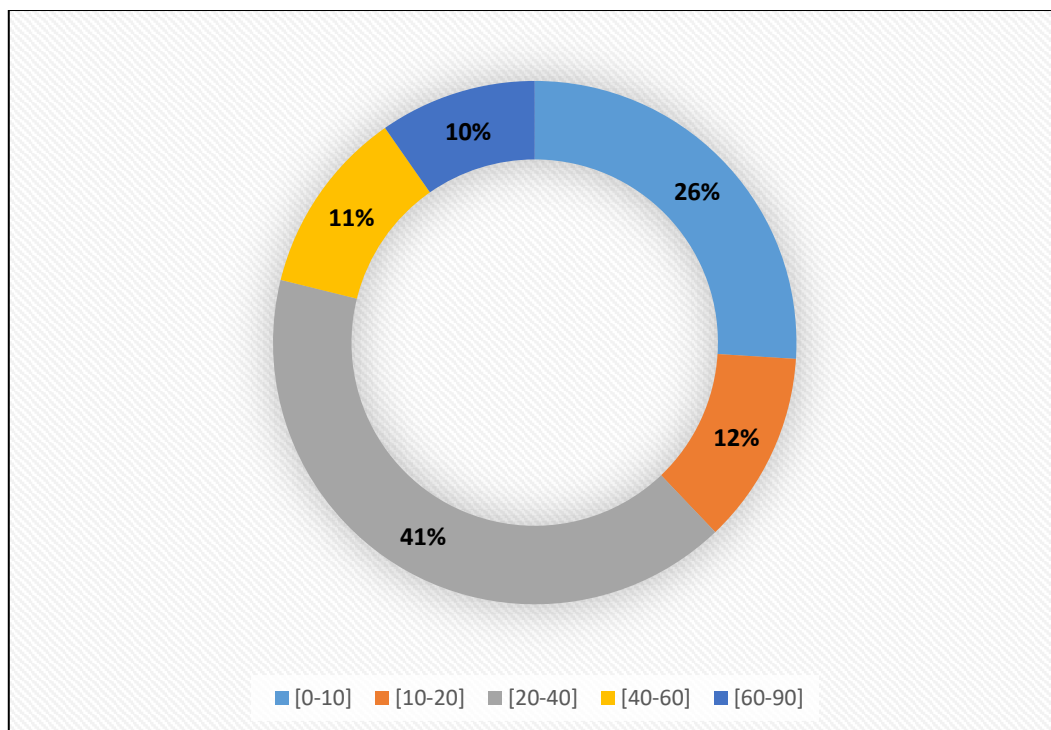


Figure.16. Répartition des souches par tranche âge (N=227).

2.4. Répartition des souches par sexe

Le sexe du patient reflète sa prédisposition d'attraper des infections liées à *P.aeruginosa*. La répartition des isolats selon le sexe est montrée dans la figure 17. Le sexe male semblait être le plus touché par les infections à *P.aeruginosa* avec 62% des cas. Tandis que les femmes présentaient que 38% de la totalité des isolats. Le sexe est considéré comme un facteur de risque et l'incidence de l'infection augmente considérablement chez les hommes (les infections à *P. aeruginosa* sont plus fréquentes chez les hommes, en particulier avec les brûlures) (**Oberholzer et al., 2000**). Les fréquences des femmes et des hommes ont été statistiquement très différentes avec $p\text{-value} < 0,001$.

Résultats et discussion

De même, **Mansour et al. (2013)** rapportent une prédominance du sexe male des isolats de *P.aeruginosa* en Egypte (59.3%) et en Arabie Saudi (63%). Nos résultats concordent avec ceux des autres études ; **Ullah et al. (2019)** ont détectées 62.5% des isolats chez les hommes et 37.5% chez les femmes et **Jafar et al. (2014)** rapportaient 61% des souches de *P.aeruginosa* chez les hommes. **Zhang et al. (2020)** dans son étude dans les centres de santé en Chine entre 2012 et 2019 indiqua que 71.6% des patients infectés par *P.aeruginosa* étaient des hommes.

En revanche, les résultats obtenus de l'étude d'**Oluwatosin et al. (2019)** au Nigeria, ont révélé que les femmes constituaient le groupe le plus important dans l'étude (52%). **Araújo et al. (2018)** avançaient une prédominance de l'infection chez le sexe femelle avec 57.1%.

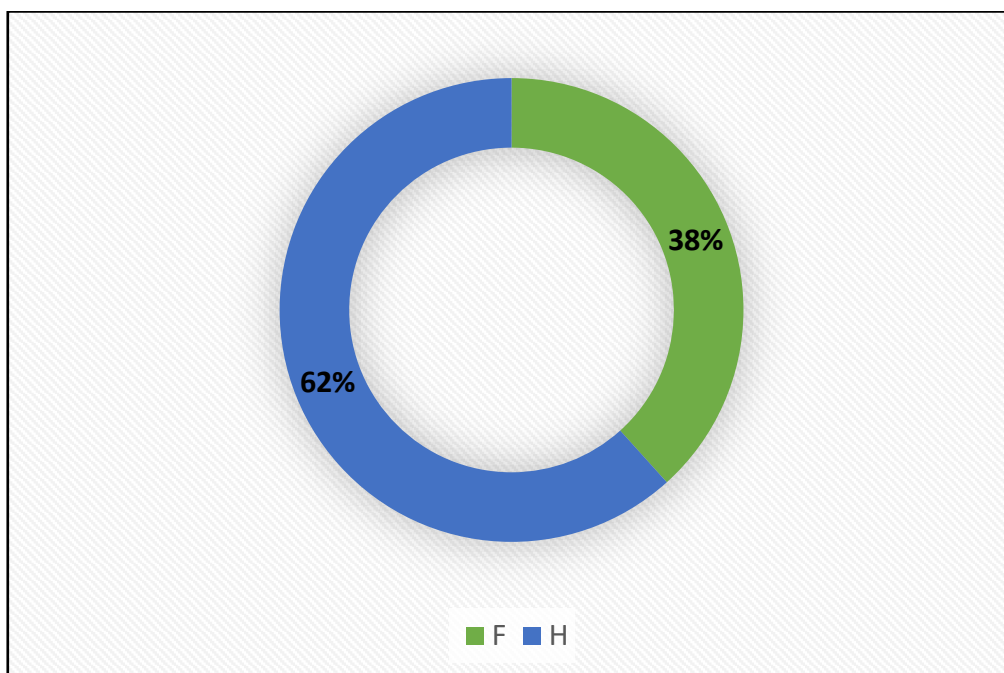


Figure.17. Répartition des souches par sexe (N=227).

3. Germes co-isolés

Les prélèvements cliniques sont des milieux très riches et sont généralement polymicrobien, du coup, savoir la composition de la communauté bactérienne incluse est fortement essentiel. La figure 18 comprend prévalence des bactéries coisolées avec *P. aeruginosa*.

La mise en culture des prélèvements cliniques conduit à l'isolement consécutif de plusieurs espèces bactériennes à la fois vu la nature polymicrobienne des prélèvements. D'après notre étude on a pu constater le coisolement d'autres germes avec l'espèce sujet d'étude : des espèces des deux groupes bactériens (Gram négatives et positives). Les espèces

Résultats et discussion

les plus fréquentes étaient : *Klebsiella pneumoniae* (17%), *Staphylococcus aureus* (13%), *Acinetobacter spp* (8%), *E.coli* (8%), *Enterobacter cloacae* (6%) et *Proteus spp.* (4%). On peut expliquer la présence de *Klebsiella pneumoniae* dans la même culture que *P.aeruginosa* par le fait que les patients sujet d'étude dans leur majorité sont des patients présentant des capacités immunitaires diminuées, ont été admis dans des unités de soins intensifs, exposés à des traitements prolongés ou non par antibiotiques (en particulier les carbapénèmes et les fluoroquinolones) qui sont tous des facteurs de risque élevé de colisation par *K. pneumoniae* (Kritsotakis *et al.*, 2011).

Dans le même ordre d'idées les facteurs de risque extrinsèques étaient les plus associés à la colonisation par des souches de *S.aureus*. Cette espèce bactérienne se trouve sur la peau, dans les cathéter, les tubes endotrachéaux (Hoffman *et al.*, 2006) qui ce sont tous des environnements favorables au développement de *P.aeruginosa* ce qui peut interpréter la fréquence d'isolement de *S.aureus* parmi les cultures de *P.aeruginosa* Meradji. (2017) a rapporté une fréquence d'isolement élevée d'*E.coli* suivi par *S.aureus* par rapport aux autres espèces bactériennes dans des co-cultures de *P.aeruginosa*.

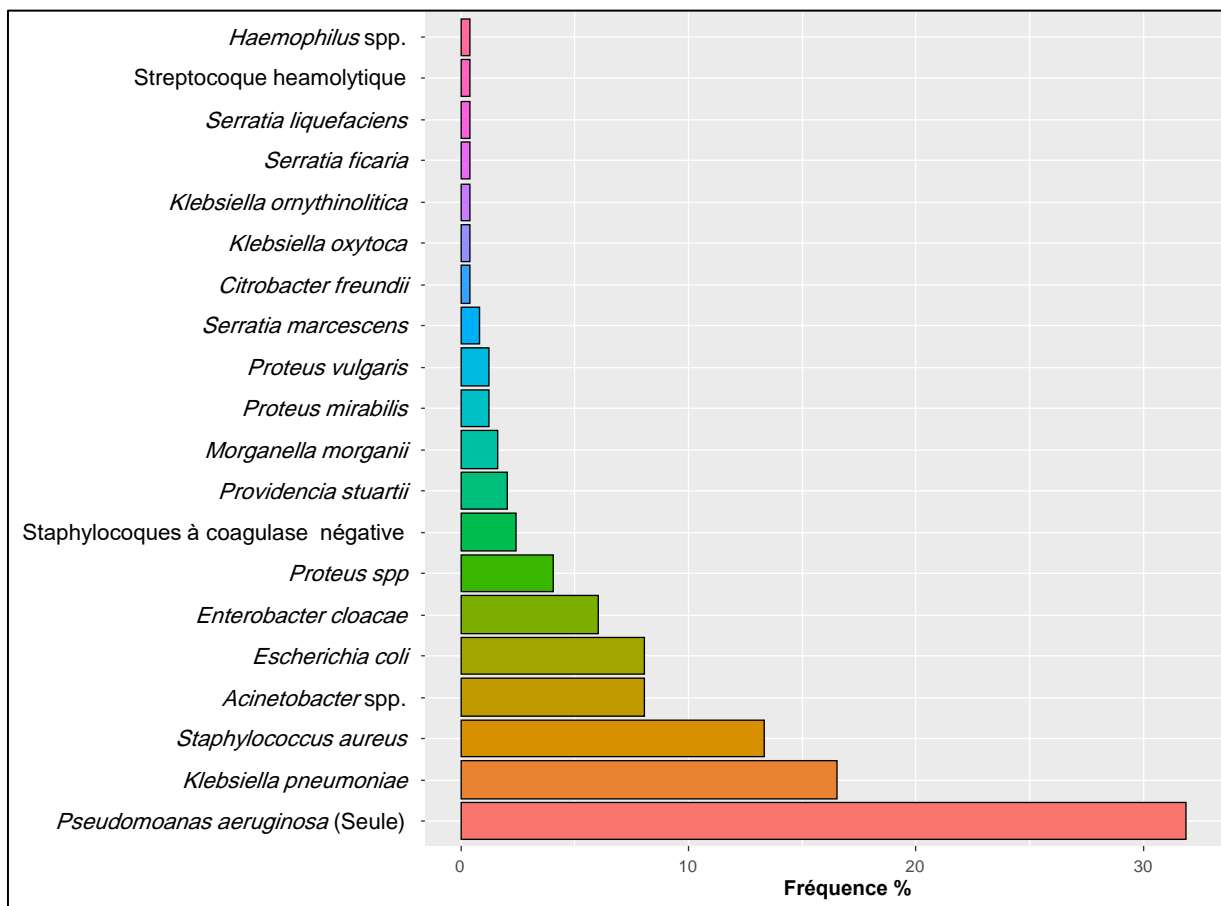


Figure.18. Prévalence des espèces bactériennes coisolées (N=227).

Résultats et discussion

4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

La figure 19 regroupe les résultats de l'antibiogramme global de toutes les souches isolées de *P.aeruginosa* vis-à-vis des antibiotiques utilisés :

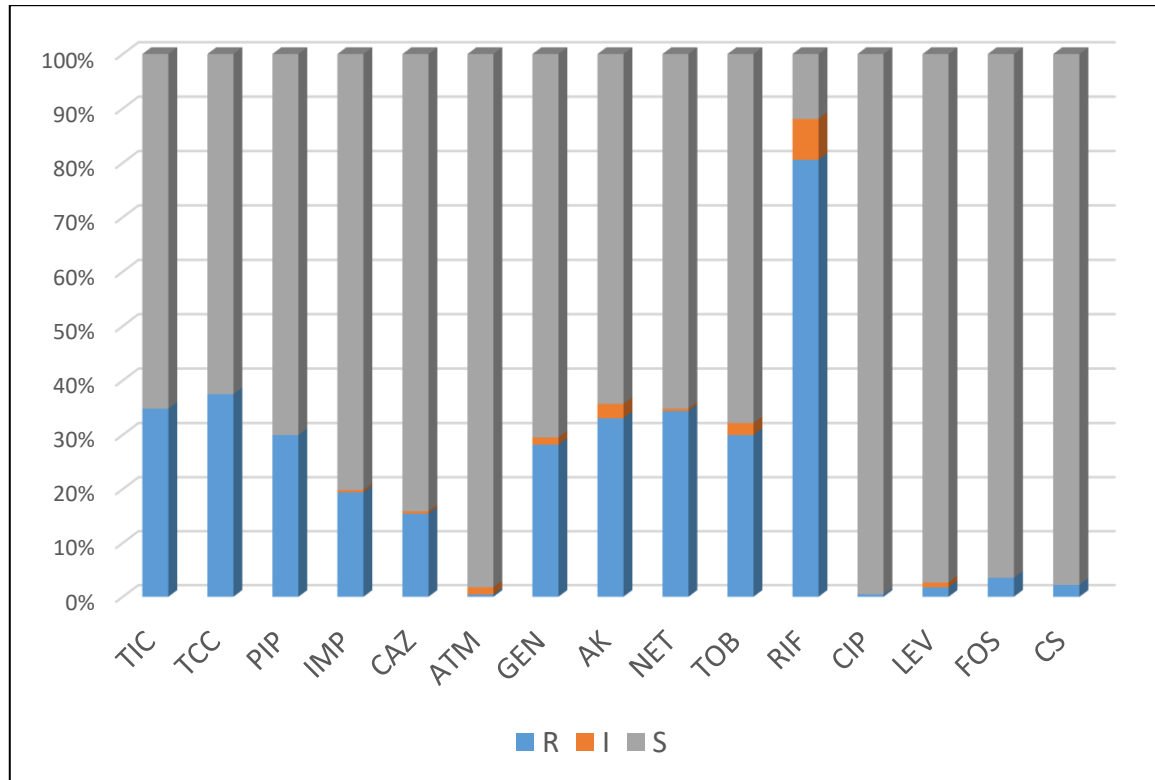


Figure.19. Profil de résistance aux antibiotiques des isolats de *P.aeruginosa*. TIC : ticarcilline, TCC : ticarcilline+acide clavulanique, PIP : pipéracilline, IMP : imipénème, CAZ : ceftazidime, ATM : aztreoname, GEN : gentamycine, AK : amikacine, NET : netilmicine, TOB : tobramycine, RIF : rifampicine, CIP : ciprofloxacine, LEV : levofloxacine, FOS : fosfomycine, CS : colistine, R : résistant, I : intermédiaire, S : sensible (N=227).

Au cours des dernières décennies, il y a eu une augmentation remarquable dans la résistance aux antibiotiques accompagnée à une réduction de l'efficacité de nombreux antibiotiques cliniquement importants (Seiffert *et al.*, 2013). Les molécules antiPseudomonas, y compris certains bêta-lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones, ont été les antibiotiques les plus importants utilisés pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*. Cependant, la surveillance de l'antibiorésistance de *P. aeruginosa* a révélé l'émergence de souches multirésistantes dans le monde qui est le résultat de l'utilisation excessive d'antibiotiques à large spectre ainsi qu'à la capacité de *P. aeruginosa* à acquérir des gènes de résistance (Breidenstein, 2011; Sievert *et al.*, 2013), d'où la difficulté de traitement des infections liées

Résultats et discussion

à cette bactéries et qui sont responsables des taux de mortalité élevés, qui varient de 18 à 61 % (**Strateva et al., 2009**).

L'étude de la résistance vis-à-vis aux antibiotiques testés a montré des taux très variables en fonction du type d'antibiotique. Le plus haut taux de résistance était pour la rifampicine avec 80,31% ce qui montre son faible activité sur les isolats de *P. aeruginosa*. Ensuite, on trouve la famille des β -lactamines où les carboxypénicillines : la ticarcilline la ticarcilline+acide clavulanique, la résistance varie entre 34,80% et 37,45% respectivement, tandis que la pipéracilline enregistre un taux inférieure de 29,96%. L'aztréoname a le taux de résistance le plus bas par rapport aux autres molécules 0,44% suivi par la ceftazidime (C3G) (15,42%). Les carbapénèmes, molécules de choix pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*, sont également concernés par la résistance. Dans notre étude, 19,38% des souches étaient résistantes à l'imipénème. Les aminoglycosides entre autres se fluctuent entre 28,19% et 34,36% de souches résistantes. La famille des fluoroquinolones (ciprofloxacine et lévofloxacine) forme la classe des molécules les plus actives avec 0,44% de souches résistantes pour la ciprofloxacine et 1,77% pour la lévofloxacine. La résistance à la colistine affectait 1.76% des souches et 3,52% des souches pour la fosfomycine.

Des résultats comparables aux nôtres sont rapportés par **Ullah et al. (2019)** dont les souches résistantes à la colistine était de 13.3% qui un taux est plus élevé que le nôtre ; 42.6% de résistance pour la ticarcilline/acide clavulanique et un taux de résistance moins élevé que le nôtre pour l'amikacine (13.2%). A l'inverse, **Hoque et al. (2015)** ont trouvé une résistance maximale contre l'aztréonam (84,31 %), la ceftazidime (81,82 %), l'imipénème (80,8 %), l'amikacine (81,40 %) et la gentamicine (85,22 %). Et **Ruh et al. (2016)** qui ont étudié la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* entre 2010 et 2014 dans le nord de Chypre et ont signalé que le taux de résistance à l'aztréonam était de 42,9 %, 19.5% contre la ceftazidime et 11.8% de résistance vis-à-vis l'imipénème.

En Algérie, des taux similaires ont été observés pour la ticarcilline (32,7%), la ciprofloxacine (19,4%) et la ceftazidime (14,7%) (**Sefraoui, 2015**) tandis qu'au Nigeria en 2015, des taux plus élevés ont été signalés pour la ceftazidime (46%) et la ciprofloxacine (34 %), avec 13 % pour l'imipénème et de 23 % pour l'amikacine (**Iregbu et al., 2015**). En Côte d'Ivoire, une étude réalisée en 2013 sur les effluents hospitaliers a montré des taux de résistance très élevés à la ceftazidime et à la ticarcilline dont les souches étaient résistantes à 100 % (**Guessennd et al., 2013**). Nos données contrastent avec celles rapportées par **Meradji et al.**

Résultats et discussion

(2016) où des taux élevés de résistance à la ticarcilline, à la pipéracilline et à la ciprofloxacine ont été notés.

En Tunisie, une étude de trois ans sur les patients du Centre de Traumatologie et Grands Brûlés Ben Arous, montre des taux de résistance de 34%, 37,1%, 27,1% et 29,6% à la : ceftazidime, imipénème, ciprofloxacine et amikacine respectivement (Zoghلامي *et al.*, 2012). Une autre étude dans un CHU du Monastir révèle des taux de résistance très élevés pour la ciprofloxacine (100 %), la gentamicine (96 %) et la ticarcilline (93 %). Les taux de résistance les plus faibles ont été obtenus pour l'imipénem (74 %) et la ceftazidime (70 %) (Ben Nejma *et al.*, 2018). Ces derniers résultats dépassent largement les taux de résistance de nos isolats

4.1. Répartition des souches selon leur multirésistance

La figure 20 montre la répartition des isolats selon leur profil de résistance.

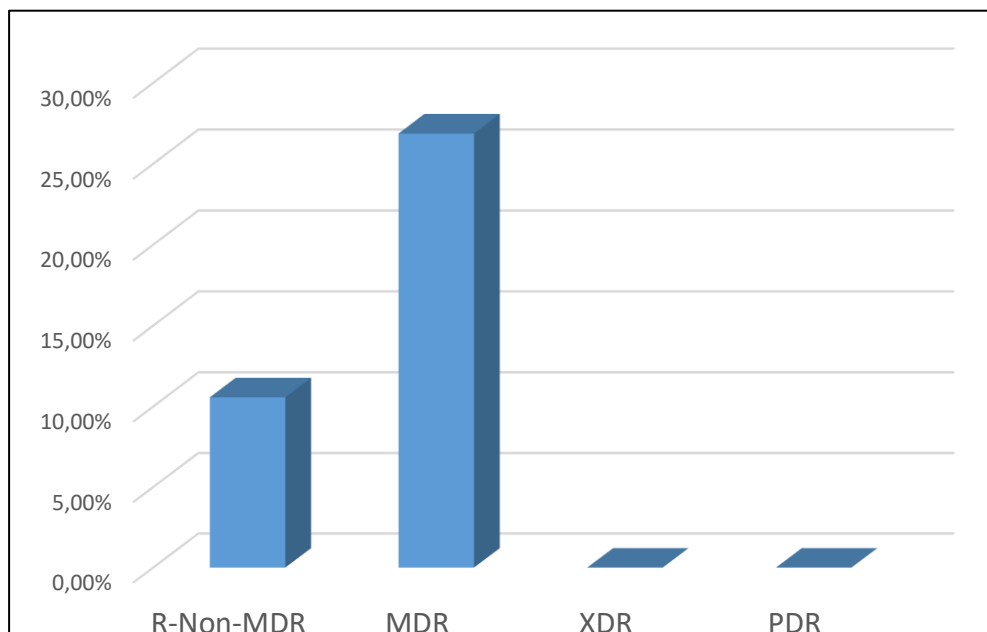


Figure.20. Répartition des souches selon leur multirésistance. R-Non MDR : souches résistantes à moins de 3 classes d'antibiotiques, MDR : souches multirésistantes, XDR : souches hautement résistantes, PDR : souches totorésistantes (N= 227).

Les isolats de *P. aeruginosa* ont été classés en plusieurs groupes selon leur réponse aux classes d'antibiotiques. *P. aeruginosa* multirésistant (MDR) a été défini comme résistant à au moins un agent dans trois catégories d'antimicrobiens ou plus, *P. aeruginosa* hautement résistant (XDR) a été défini comme étant résistant à tous les antibiotiques dans toutes les classes sauf deux ou moins (c'est-à-dire que les isolats bactériens restent sensibles à seulement à une

Résultats et discussion

ou deux classes). *P. aeruginosa* toto-résistant (PDR) a été défini comme étant non sensible à tous les antibiotiques dans toutes les classes. Ces définitions sont conformes à la terminologie normalisée d'un groupe d'experts internationaux du Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) et du CDC aux États-Unis (**Magiorakos et al., 2012**). Le groupe des R-Non MDR (résistant non MDR) sont des isolats présentant une résistance à moins de trois classes d'antibiotiques.

De nombreuses épidémies hospitalières ont été identifiées de par le monde ce dernières décennies en lien avec des isolats MDR ou XDR. Le taux d'isolats MDR ou XDR est estimé entre 15 et 30% dans de multiples régions géographiques (**Horcajada et al., 2019**).

Le flux de bactéries multirésistantes (MDR) est devenue un problème majeur de santé publique à travers le monde (**Javaid et al., 2021**). Les résultats ont indiqué un taux de 26.87% de souches avec un profil MDR, cependant aucune de nos souches n'a été XDR ou PDR. La résistance à moins de trois classes d'antibiotiques a été détectée chez 10.57% des souches. En Europe, en 2018, 32,1% des isolats invasifs étaient résistants à au moins une famille d'antibiotiques. Le pourcentage de souches de *P. aeruginosa* ayant une résistance MDR était de 12,8%, variant selon les pays de 0% (Islande) à 49,4% (Roumanie). Le taux d'isolats résistants à 5 classes d'antibiotiques listés était de 4,1% en 2018 (**ECDC, 2019**). Par contre, en France le taux de souches multirésistantes (sensibilité intermédiaire ou résistance à la ticarcilline, la ceftazidime et l'imipénème) a diminué de 9,8% en 2008 à 6,6% en 2016 (**ONERBA, 2018**).

En comparant la fréquence des souches MDR dans notre étude avec d'autre réalisée avec des patients admis dans les hôpitaux de Recife au Brésil, des pourcentages MDR similaires (54.1%) ont été trouvés par **Jacome et al. (2012a)**

P. aeruginosa MDR représente 13 à 19 % des infections liées aux soins chaque année aux États-Unis. Le niveau croissant de résistance de *P. aeruginosa* MDR est souvent attribué à la transmission de patient à patient de souches résistantes ainsi qu'à une résistance nouvellement acquise suite à une exposition antérieure aux antibiotiques (**Magiorakos et al., 2012**).

4.2. Résistance aux carbapénèmes

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) classe *P. aeruginosa* résistant aux carbapénèmes (CRPA) comme un pathogène d'une priorité critique qui nécessite définitivement de nouvelles options de traitement (**OMS, 2017**).

Résultats et discussion

La résistance aux carbapénèmes a été signalée dans plusieurs pays du monde entier, à savoir des pays européens (Italie, France, Grèce, Espagne, Turquie), des pays africains (Tunisie, Algérie, Kenya et Afrique du Sud) et des pays asiatiques (Chine, Corée) (**Lee et al., 2011 ; Fang et al. 2014 ; Ben Nejma et al., 2018**).

Nos résultats montrent une prévalence de CRPA de 19,38% (résistance à l'imipénème). Ce rythme de résistance traduit un risque de restriction des options thérapeutiques. Il est raisonnable d'expliquer que cela peut être corrélé à l'étendue de l'utilisation des carbapénèmes ces dernières années ainsi qu'à une pression sélective résultant de l'augmentation des prescriptions de carbapénèmes. (**Basha et al., 2020**). Ainsi que l'utilisation antérieure de pipéracilline-tazobactam et de vancomycine en traitement était tous significativement associée à l'acquisition de résistance aux carbapénèmes par *P. aeruginosa* (**Raman et al., 2018**)

La prévalence de CRPA des isolats identifiés dans toutes les études en Afrique du Nord variait de 0 % selon **Bourafa et al. (2018)** ; à 84 % ans l'étude de **Gaballah et al.(2018)** ; et de 2,3 % suivant les résultats obtenus par **Aruhomukama et al. (2019)** à 21,4 % d'après les résultats de **Kateete et al. (2016)** en Afrique de l'Est. Selon le programme Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance de Pfizer, la variabilité des taux de souches cliniques de *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes par continent enregistrait le plus bas en Océanie (imipénem-R dans 7,1 % et méropénème-R dans 5,1 % des 99 isolats d'Australie), et le plus élevé était au Moyen-Orient (imipénem-R dans 27,9 % et méropénème-R dans 19,5 % des 226 isolats de Koweït, Arabie Saudite, Palestine et la Jordanie) (**Pfizer, 2020**).

4.2.1. Recherche de la résistance aux carbapénèmes par production de MBL

La production de carbapénémases est un mécanisme important de résistance aux carbapénèmes, souvent observée dans les isolats cliniques de *P. aeruginosa*. Les carbapénémases les plus importantes sont les (**Picão et al., 2009**). Dans leur revue, Moghnieh et al. ont rapporté que la production de MBL (principalement VIM et IMP) est le mécanisme le plus important de résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa* dans tous les pays de la Ligue arabe (**Zaidi et al., 2020**).

4.2.1.1. Résultats des tests de confirmation de MBL (Hodge modifié et du double disque de synergie (EDTA))

Toutes les souches présumées MBL montrent un résultat positif pour les deux tests de confirmation. Nos résultats montrent une prévalence de MBL de 14.09% ce qui est similaire à

Résultats et discussion

celle signalée par (Gba *et al.*,2018) (12,5%) à la Côte d'Ivoire, mais inférieure à celle enregistrée en Egypte (68,7%) (Zafer *et al.*, 2015) Cependant, le problème fondamental réside dans la production de MBL, qui dans l'étude européenne atteint 20 % (106/529), VIM-2 étant son gène principal, notant une augmentation entre les années 2009 (13,4%) et 2011(30,6%).

4.2.1.2. Caractérisation génétique de la résistance aux carbapénèmes par production de MBL par PCR

La mise en évidence du gène portant la résistance aux carbapénèmes par production de MBL par PCR est illustrée dans la figure 21.

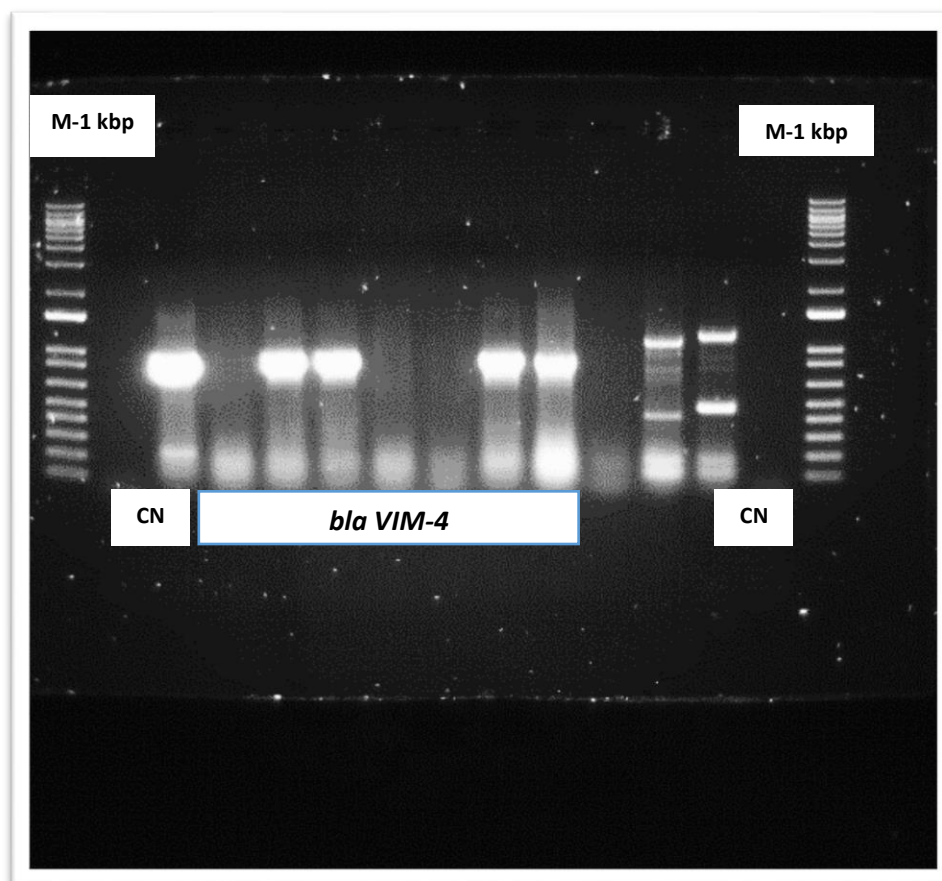


Figure.21. Produits d'amplification par PCR du gène *blaVIM-4* sur gel d'électrophorèse. CN : control négatif, M : marqueur de taille.

Les résultats de la détermination du gène de résistance aux carbapénèmes par PCR ont montré la présence du gène *blaVIM* chez 32 souches présentant un profil de MBL. Aucun gène *blaIMP* ou *blaNDN* n'a été détecté. Les gènes *blaVIM-4* ont été signalés dans plusieurs pays à travers le monde, dont la Grèce (Pournaras *et al.*, 2002), la Suède (Giske *et al.*, 2003), la Pologne (Patzner *et al.*, 2004), la Hongrie (Libisch *et al.*, 2006) , le Canada (Mataseje *et al.*,

Résultats et discussion

2012), d'autres pays européens (Castanheira *et al.*, 2014) et l'Égypte (Hashem *et al.*, 2017) et, principalement détecté parmi les clones de *P. aeruginosa* qui sont codés par une cassette de gènes à intégrons à fort potentiel de dissémination. Peu de rapports d'isolats de MBL de classe VIM en Algérie ont été décrits. Le premier était le *blaVIM-19* décrit dans cinq isolats cliniques d'enterobactéries (Robin *et al.*, 2010), puis le *blaVIM-2* qui a été noté dans des souches cliniques de *P.aeruginosa* (Touati *et al.*, 2013 ; Sefraoui *et al.*, 2014) et le gène *blaVIM-4* qui a été récemment rapporté parmi les isolats cliniques de *P. aeruginosa* dans l'est algérien (Mellouk *et al.*, 2016. Meradji *et al.*, 2016), par cette étude nous rapportons la troisième détection en Algérie du gène VIM-4 chez *P. aeruginosa* indiquant sa diffusion en milieu hospitalier.

D'une façon générale les isolats de *P. aeruginosa* producteurs de VIM ont été signalés dans le monde entier, y compris dans des pays européens (Castanheira *et al.*, 2009) et certains pays d'Asie (Liew *et al.*, 2018 ; Osawa *et al.*, 2019).

Zaidi *et al.*, (2020) rapportent a détection des souches *P. aeruginosa* VIM-4 positives au ouest algérien à 2.94% de la totalité des souches isolées.

Dans l'étude de Mathlouthi *et al.* (2015) effectuée entre 2013 et Avril 2014 dans deux hôpitaux (Burn et chirurgie plastique Tripoli Hôpital et Benghazi Médical Center) en Libye l'identification de carbapénème par PCR a révélé la présence de gène *blaVIM-2* dans tous les *P. aeruginosa* résistant à l'imipénème.

En Tunisie, seuls des isolats de *Klebsiella pneumonia* possédant une MBL de type VIM-4 ont été détecté (Ktari *et al.*, 2006). La méthallo- β -lactamase de type VIM-2 était la principale métallob- β -lactamase détectée en Tunisie, et a été fréquemment rapportée chez *Pseudomonas aeruginosa* (95 isolats) et dans plusieurs hôpitaux entre 2006 et 2019 (Dziri *et al.*, 2020).

En moyen orient et aux pays de Golf, plusieurs études ont été réalisées dans cet axe. En Arabie Saudi une grande diversité clonale des VIM a été détectée chez *P. aeruginosa* (VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-11, VIM-28) (Al-Agamy *et al.*, 2012 ; Tawfik *et al.*, 2012; Al-Agamy *et al* 2016). Au Koweit une seule étude a rapporté la détection de souches cliniques de *P. aeruginosa* VIM positives, aussi qu'au Qatar (Zowawi *et al.*, 2018). Dans les hôpitaux égyptiens les gènes : VIM-2, VIM-28 et VIM-1-like ont été rapportés chez *P. aeruginosa* (El-Mahdy, 2014 ; Zafer *et al.*, 2014 ; Zafer *et al.*, 2015 ; Khalifa *et al.*, 2017). des hôpitaux libanais, seules les MBL: IMP-1, IMP-2, IMP-15 et VIM-2 ont été détectées chez *P. aeruginosa* (Al Bayssari *et al.*, 2014 ; Hammoudi *et al.*, 2015b ; Hammoudi *et al.* , 2017).

Résultats et discussion

Parmi les enzymes carbapénémases, la variante VIM a été fortement détectée chez les isolats de CRPA dans plusieurs pays africains. Les carbapénémases OXA-10, IMP, SPM, NDM, GES et GIM ont également été détectées avec un total de 66 isolats présentant une coproduction d'au moins deux carbapénémases (porteurs de gènes codant pour plus d'une carbapénémase) (**Kindu et al., 2020**).

Les isolats de *P. aeruginosa* portant des gènes codant pour plus d'une carbapénémase ont été principalement observés dans différentes études menées en Égypte (**Gaballah et al., 2018; Ramadan et al., 2018 ; Abdeltwab et al., 2019**) et au Soudan, (**Satir et al., 2016 ; Adam et al., 2018**). L'émergence de telles souches résistantes représente une menace importante, non seulement pour ces pays mais aussi pour l'ensemble de l'Afrique puis pour le monde, d'autant plus que la dissémination de gènes de résistance est accélérée par des taux élevés d'immigration et de tourisme (**Uskudar-Guclu et al., 2019**).

La dissémination rapide des bactéries productrices de carbapénémases conduit à de véritables impasses thérapeutiques car elle contribue fortement à la diffusion des souches multirésistantes. Ainsi le dépistage rapide des patients colonisés ou infectés devient dès lors un véritable impératif de santé publique pour les patients eux-mêmes et pour les patients qui partageraient la même unité ou structure d'hospitalisation (**Dortet et al., 2013**).

4.2.1.3. Résistance associée des souches productrice de M β L

Les souches VIM ont également une résistance aux autres familles d'antibiotiques utilisés. Dans la figure 22 on illustre leur profil de résistance.

Les souches positives pour VIM-4 présentent un taux de résistance élevé vis-à-vis aux aminoglycosides par rapport aux autres familles d'antibiotiques où toutes les souches (32/32) étaient résistantes à la tobramycine. Les fluoroquinolones étaient à 100% efficaces contre ses souches ainsi que pour la fosfomycine et pour la colistine.

Résultats et discussion

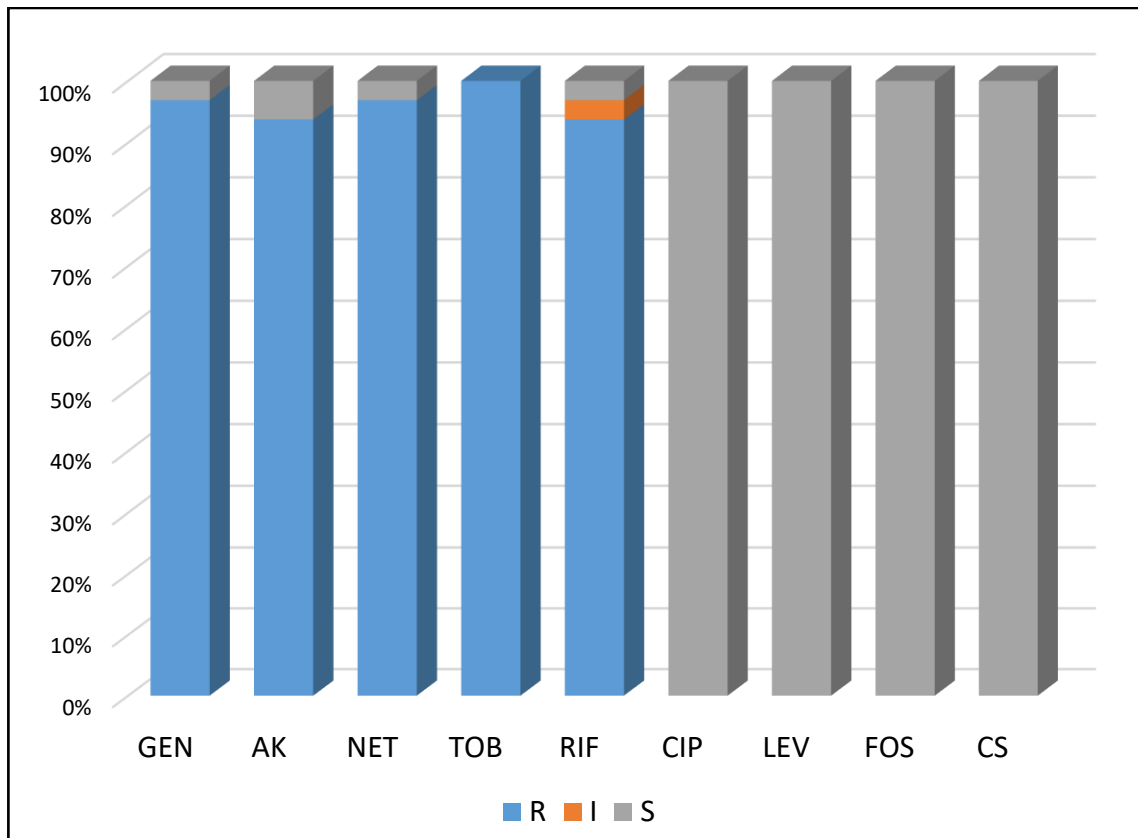


Figure.22. Résistance associée des souches productrice de M β L (N=32).

Selon **Al-Charrakh et al. (2016)**, la haute résistance de *P. aeruginosa* résistant aux carbapénèmes aux autres classes d'antibiotiques telles que la ciprofloxacine et la gentamicine, peut être attribuée à la surutilisation de ces agents antimicrobiens dans les pratiques cliniques irakiennes. Une grande résistance aux antibiotiques est observée chez les souches productrices de VIM-2, à l'exception de l'aztréonam surtout vis-à-vis à la gentamycine, la tobramycine et la ciprofloxacine, cependant aucune n'a été résistante à la colistine (**Estepa, 2014**). La plupart des isolats coréens de *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes étaient des souches MDR (**Lee et al., 2011 ; Huh et al., 2013**).

4.2.1.4. Génotypage des souches VIM-4 positives par MLST et par PFGE

Les résultats obtenus (fig.23) révélèrent que les souches à *blaVIM-4* se regroupent en cinq pulsotypes différents selon l'analyse par PFGE (fig.24) où la majorité des souches VIM-4 partageaient les mêmes pulsotypes ce qui indique la contamination et la co-transmission entre patient, et selon l'analyse par MLST (fig.24) trois séquences types (244, 381 et 1076) ont été détectées. Nous rapportons dans cette étude une première détection des clones épidémiques ST 244 et ST 381 pour des souches productrices de carbapénémase de type VIM-4 en Algérie.

Résultats et discussion

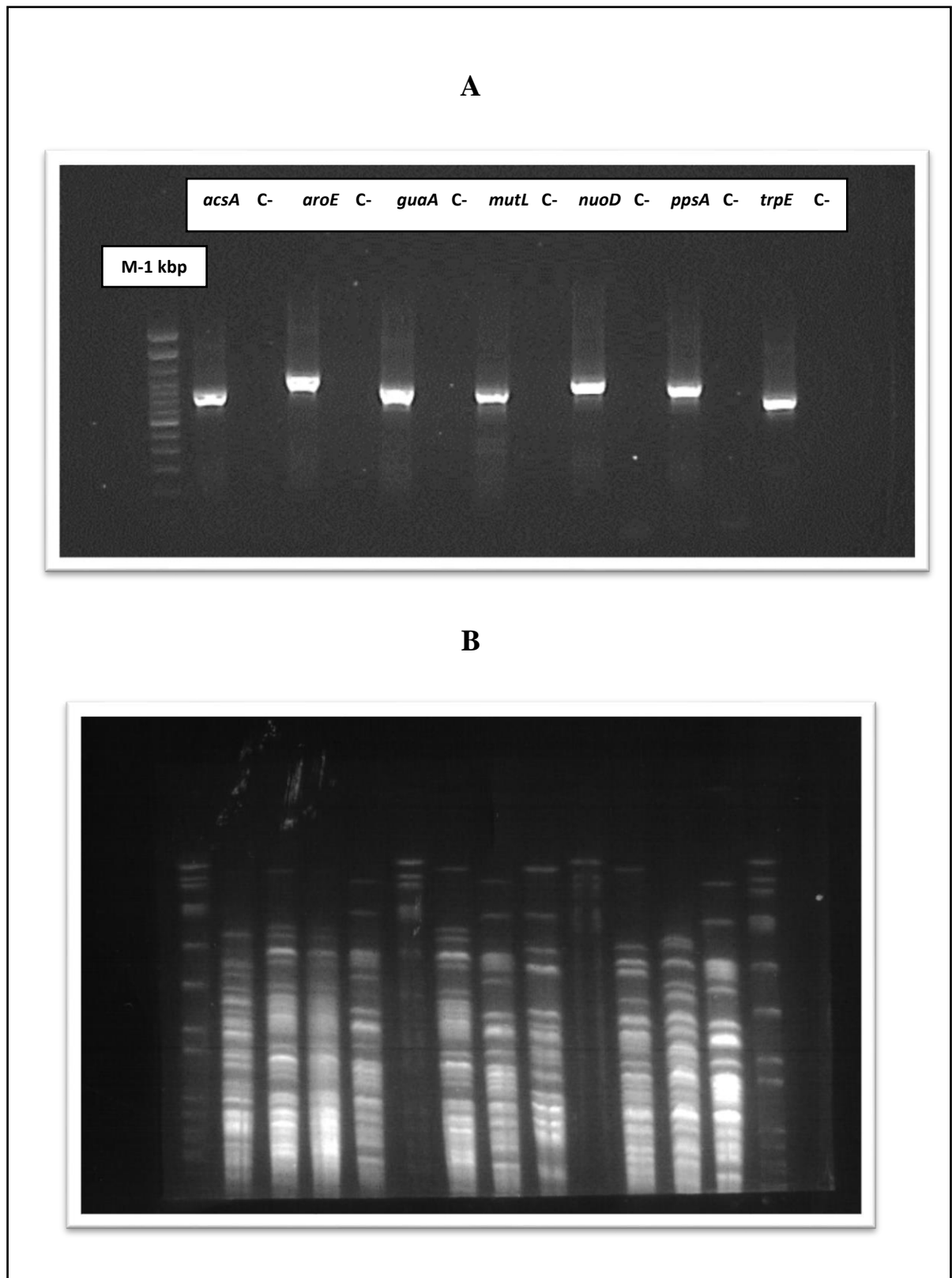


Figure.23. Génotypage par : (A) MLST et (B) PFGE. C- : control négatif, M : marqueur de taille.

Résultats et discussion

Pseudomonas aeruginosa est bien connu par sa population épidémique avec plusieurs types de séquences comme ST111, ST175, ST235, ST 244 et ST 395 qui sont couramment associés aux épidémies et les MBL qu'il produit sont couramment associées à des clones à haut risque épidémique (**Wright et al., 2015**).

Le clone appartenant à ST244 était le plus fréquent dans notre étude et correspondait au deuxième clone méditerranéen le plus répandu de *P. aeruginosa* (**Maatallah et al., 2011**) et a été détecté également en Asie (**Chen et al., 2014**). De même, le clone ST1076 a également été signalé parmi les isolats cliniques de *P. aeruginosa* en Algérie (**Mellouk et al., 2016**) avec *P. aeruginosa* sensible à l'imipénem et producteur de VIM-4, ainsi que **Sefraoui et al. (2014)** ont détecté le ST 381 dans des souches de *P. aeruginosa* sensibles à l'imipénem. En revanche, une étude menée par **Mathlouthi et al. (2015)** ont montré que les clones ST911 et ST235 étaient les clones les plus fréquents en Libye. **Treepong et al. (2018)** ont rapporté la propagation clonale de ST 235 avec des gènes de résistance aux antibiotiques dans des isolats de *P. aeruginosa* à travers les pays et les continents.

La récente étude de **Zaidi et al. (2020)** révélait après analyse de MLST la présence de sept ST dont deux sont nouvelles (ST3349 et ST3350) et cinq qui étaient préalablement décrites (ST244, ST499, ST709, ST809 et ST1239).

Zowawi et al. (2018), dans leurs études sur des isolats cliniques de *P. aeruginosa* d'un hôpital koweïtien rapportaient la répartition des souches selon leurs séquences types reconnues comme des clones internationaux hautement disséminés tels que ST111, ST235, ST357 et ST654. Une souche de *P. aeruginosa* VIM-4 isolée dans un hôpital palestinien présentait une séquence type ST1081 (**Sjolander et al., 2014**).

Les études réalisées sur des hôpitaux tunisiens (Sfax, Sousse et Tunis) sur des isolats de *P. aeruginosa* VIM-2 positifs rapportent dans leurs analyses des MLST une indétermination des ST (**Dziri et al., 2020**).

Résultats et discussion

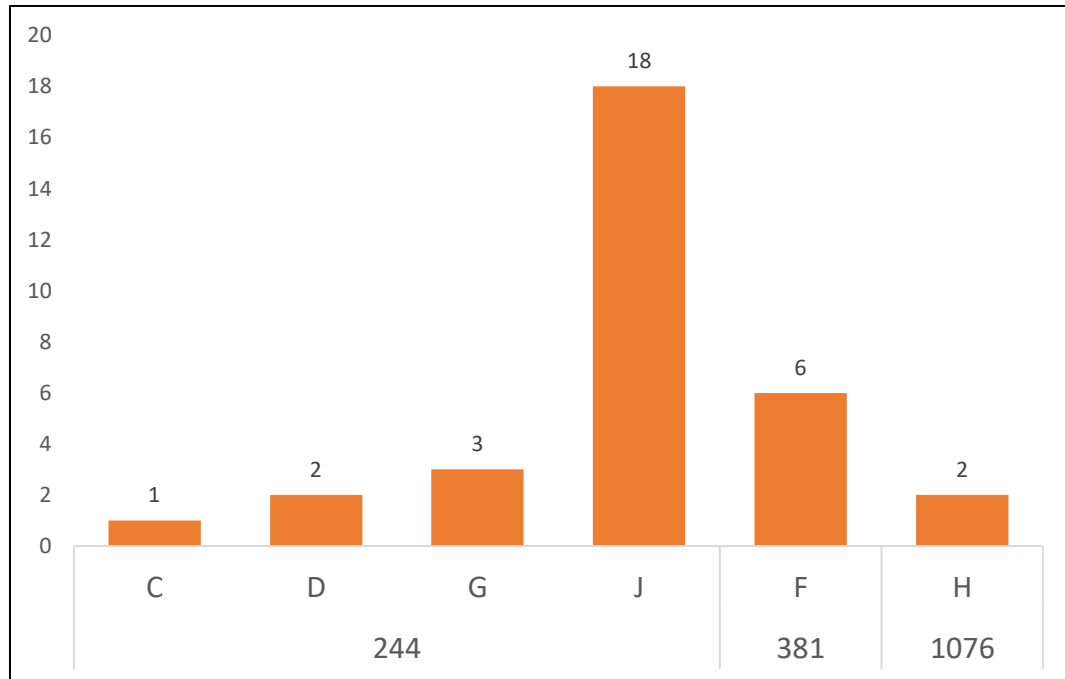


Figure.24. Répartition des souches VIM-4 positives selon leurs pulsotypes et leurs séquences types (N=32).

A noter que la majorité des souches ayant le même pulsotype (pulsotype J et F) est isolée du service des brûlés (tab.5) qui est un véritable foyer de déssimination de ce type de gène avec l'absence de doublons chez le même patient. Le service des brûlés représente un service avec un taux d'occupation des lits élevé, avec des infrastructures limitées et l'irritation de la peau par les produits d'hygiène des mains ce qui forment une cause majeure du manque de suivi des protocoles de contrôle des infections. Sans oublier le manque de chambres d'isolement pour brûlés qui facilite la transmission d'infection par *P. aeruginosa* producteur de MBL entre patients (Alp and Damani, 2015).

Tab.5.Données démographique et distribution des isolats à VIM-4.

Variable	MBL (VIM-4) au pulsotype J (n)	p-value	MBL (VIM-4) totale	p-value
Sexe		NS		0.01
M	12		23	
F	6		9	
Age		NS		NS
Moyenne ± SD	21.5 ± 16.62		21.24 ± 16.3	
0-10	6		10	
10-20	3		6	
20-40	5		10	
40-60	4		6	
60-90	0		0	

Résultats et discussion

Service		NS		<0.001
Brûlés	14		19	
Neurochirurgie	1		2	
Traumatologie	1		2	
Réanimation	2		2	
Pouponnière	0		1	
Pédiatrie	0		1	
Hématologie	0		2	
Néphrologie	0		1	
Urologie	1		1	
Médecine légale	0		1	
Type de prélèvement		NS		<0.001
Pus	15		20	
Ascite	0		1	
PL	0		1	
Hémoculture	1		2	
LCR	0		1	
ECBU	0		2	
Catheter	0		1	
Crachat	0		1	
Sonde urinaire	2		2	
Sonde vésicale	0		1	
Prélèvement trachéal protégé	1		0	

De plus, les patients portant des souches identiques appartenait au deux sexes. Un problème pertinent qui peut alourdir la tâche des traitants par la contamination rapide au sein de l'hôpital est qui sera par la suite transmise au milieu externe. Ces observations confirment les données antérieures indiquant que les souches épidémiques peuvent présenter le même pulsotype et le même antibiotype (**Yakupogullari et al., 2008**).

Aussi que les souches productrice de VIM-4 partageant ou non le même pulsotype ont été isolées majoritairement du pus ce qui est en désaccord avec les résultats de **Jiménez et al. (2017)** du centre national de référence en bactériologie de Costa Rica où les isolats de *P. aeruginosa* produisant une MBL ont été récupérés à partir d'échantillons d'urine et de voies respiratoires.

Les souches VIM-4 ont été regroupées entre elle dans un arbre phylogénétique suivant leurs profils PFGE (fig.25)

Résultats et discussion

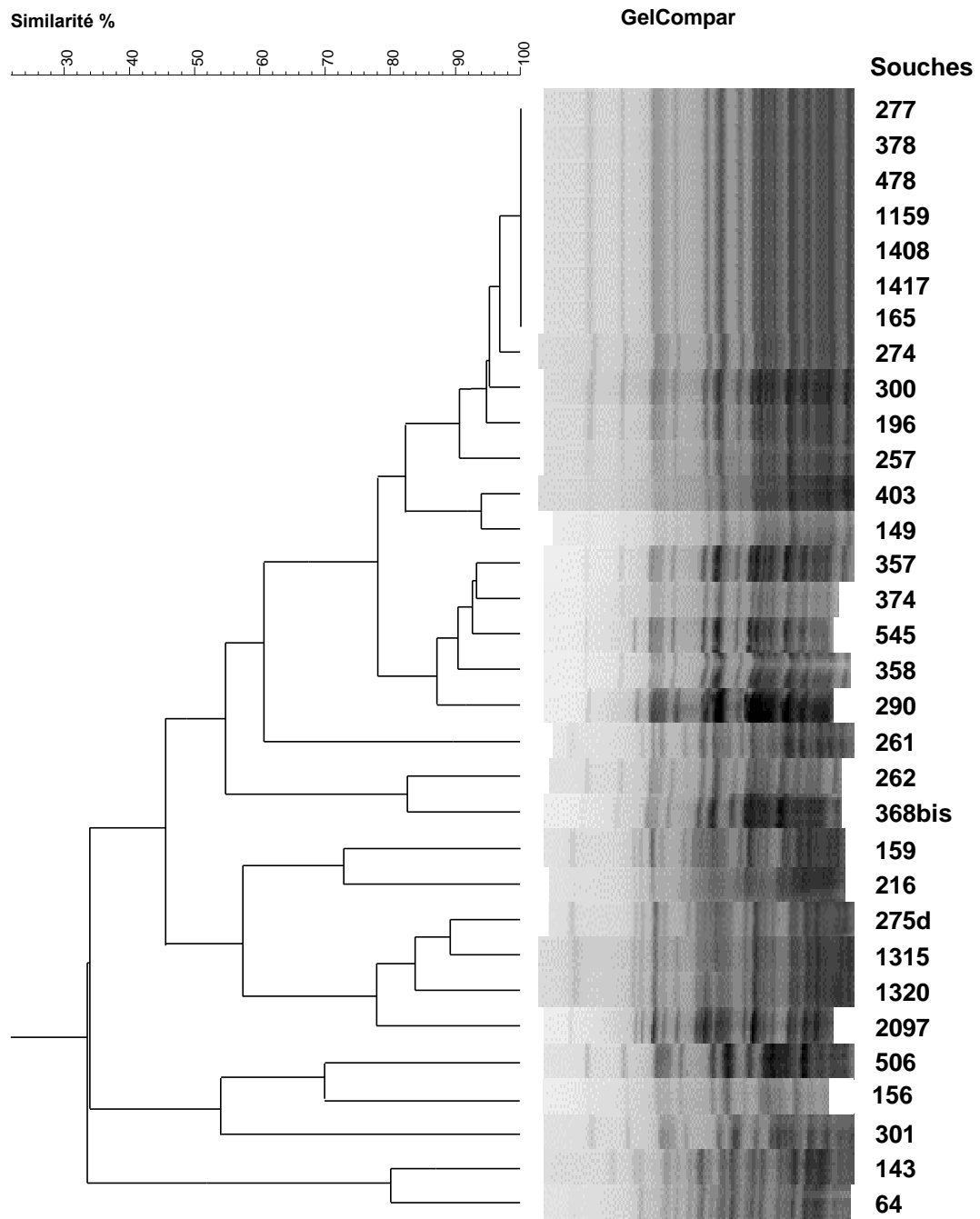


Figure.25. Dendrogramme des souches VIM-4 selon leurs profils PFGE (N=32).

4.2.1.5. Analyse de l'intégron des souches VIM-4 positives

L'analyse des séquences d'intégrons (fig.26) des différentes souches VIM-4 a montré que toutes ces souches disposaient d'un intégron de Classe 1. L'analyse des séquences n'a pas révélé aucune mutation et conserve la même séquence de référence. Jusqu'à présent, les gènes blaVIM ont toujours été intégrés dans des intégrons de classe 1 (Partridge *et al.*, 2009). Plus de 100 structures d'intégrons de classe 1 différentes associées à blaVIM ont été décrites chez les

Résultats et discussion

entérobactéries et les isolats non fermentants (Zhao *et al.*, 2015). La description de l'arrangement de matrice de cassettes n'a pas été réalisée du fait de l'absence de mutation.

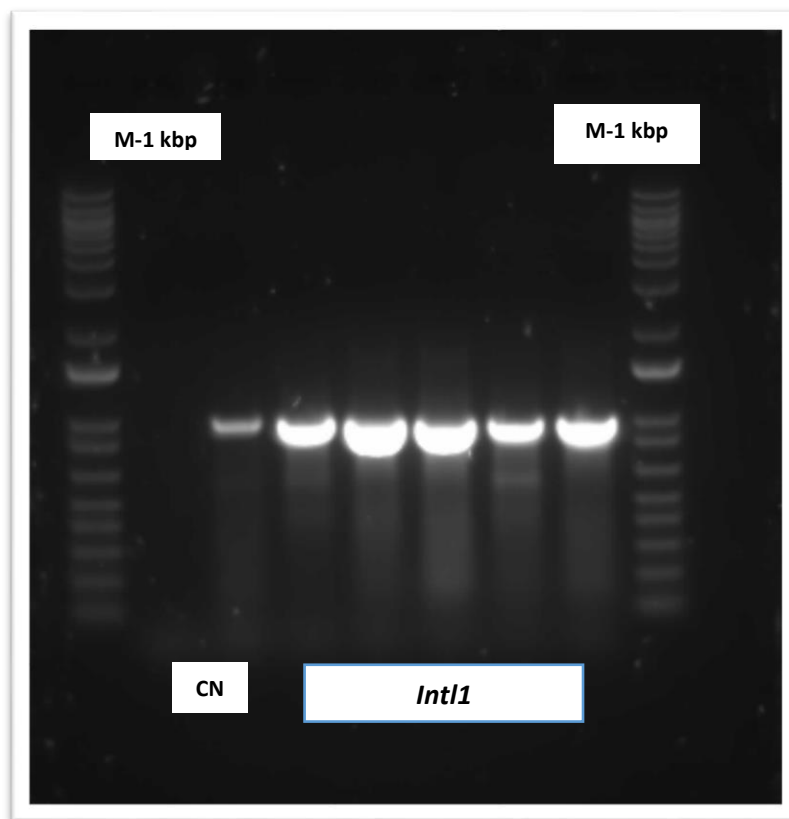


Figure.26. Produits d'amplification par PCR de l'intégron Classe 1 sur gel d'électrophorèse.

CN : control négatif, M : marqueur de taille

4.2.2. Résistance aux carbapénèmes par surexpression des systèmes d'efflux

Un ensemble de 10 souches (4.40%) présentaient une résistance aux carbapénèmes en plus de la TIC, TCC et PIP ont été testées par Hodge-modifié, DDST, CMI et E-test méropénème en présence et en absence de PA β N pour mettre en évidence leur mécanisme de résistance. Toutes les souches n'ont pas été productrices d'aucune carbapénémase. La CMI du méropénème n'a pas été diminué en présence de l'inhibiteur PA β N ce qui traduit une surexpression du système d'efflux (tab.6). La quantification de l'expression moléculaire de ce système par qRT-PCR ou Western Blot, n'a pas été réalisée vu la limite des moyens techniques disponibles au laboratoire. La surexpression du système d'efflux MexAB-OprM peut augmenter la résistance au méropénème (Kohler *et al.*, 1999; Chalhoub *et al.*, 2016). Ce qui est en accord avec les résultats de Pan *et al.* (2016) qui ont indiqué que toutes les souches à système d'efflux surexprimé étaient négatives pour le test Carba NP et le test de synergie du disque EDTA et

Résultats et discussion

que la résistance au méropénème n'a pas été inhibée par le Pa β N chez 6 souches parmi elles. De même, le gène de la pompe à efflux mexB était surexprimé dans 12,78 % des isolats non sensibles au méropénème (Yin *et al.*, 2018). La pompe à efflux MexAB-OprM est responsable de la résistance à diverses classes d'antibiotiques tels que les β -lactamines, les inhibiteurs de β -lactamines, les fluoroquinolones, les aminosides, etc. (Poole, 2011; Li *et al.*, 2015). Cela a confirmé que l'utilisation aveugle d'antibiotiques peut augmenter la mutation dans la pompe à efflux (Tafti *et al.*, 2020).

Tableau.6. CMI du méropénème en présence et en absence du Pa β N (N=10).

Souche	CMI MERO	CMI MERO+PA β N	E-Test MERO	E-Test MERO+ PA β N
25	16	16	>32	>32
47	16	16	>32	>32
340	>32	>32	>32	>32
368	16	16	>32	>32
387	16	16	>32	>32
426	>32	>32	>32	>32
1319	16	>32	>32	>32
40	8	8	16	16
276	16	16	>32	>32
323	16	16	>32	>32

Le système de pompe à efflux est l'un des mécanismes de résistance les plus essentiels chez *P. aeruginosa* (Schweizer, 2003). Le système MexAB-OprM était l'une des plus grandes pompes à efflux conférant une multirésistance avec des niveaux d'expression élevés (Terzi *et al.* 2014).

4.2.2.1. Génotypage des souches à systèmes d'efflux surexprimés par MLST et par PFGE

Les résultats de l'analyse par MLST ont montré la présence de 4 séquences types (244, 1076, 709 et 360) et ceux obtenus du typage PFGE ont démontré que la plupart des isolats de *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes appartenaient à 6 pulsotypes distincts A, B, E, H, I et K (fig.27).

Résultats et discussion

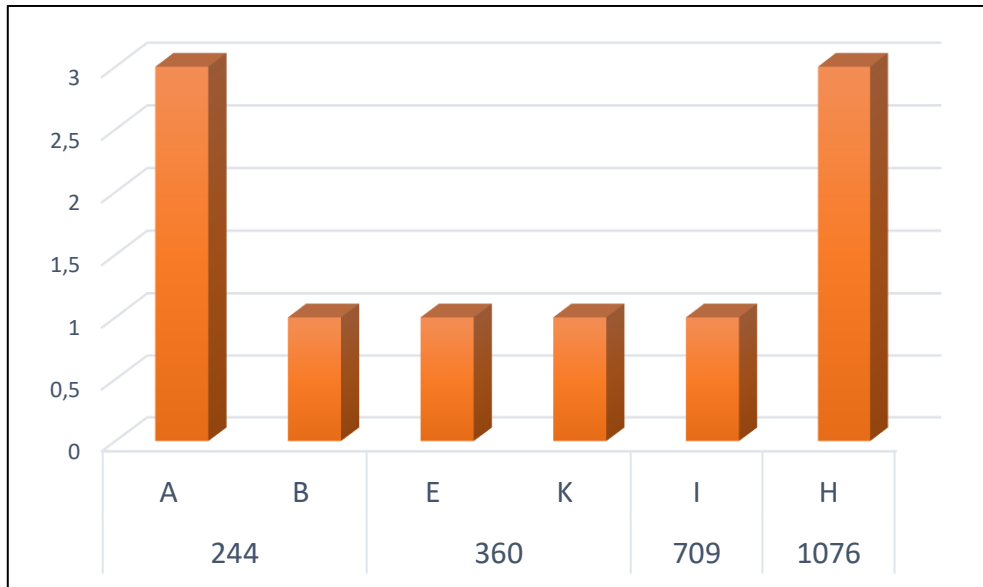


Figure.27.Répartition des souches à systèmes d'efflux surexprimés par pulsotype et par séquence-type (N=10).

Il existe une cotransmission des souches entre patients et services vu le partage du même pulsotype chez trois souches ayant une ST244 et le pulsotype A et trois autres qui ont une ST1076 et le pulsotype H. Les souches ayant le même pulsotype ont été isolées des services différents ce qu'on peut l'expliquer par la transmission de ces souches par le personnel médical suite à une défaillance d'hygiène. Semblable à nos résultats, une hétérogénéité génétique a également été signalée parmi les souches de *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes dans des études antérieures (**Selim et al., 2015**). L'activité de la pompe à flux était détectée dans des souches de *P. aeruginosa* avec des ST1725 (76,5%) et ST233 (50%) (**Aguilar-Rodea et al., 2020**).

Les données démographiques et l'origine d'isolement des souches présentant un profil de résistance aux carbapénèmes par le biais de surexpression du système d'efflux sont regroupées dans le tableau ci-dessous. La lecture de ce tableau permet de conclure que la majorité des souches ont été isolées principalement du service des brûlés, à partir des prélèvements de pus chez des patients du sexe masculin. **Muderris et al. (2018)** ont rapporté une dominance des isolats aux systèmes d'efflux surexprimés initialement récupérés des patients hébergés dans les unités des soins intensifs. En parallèle, le sexe masculin représentait 67.6% des isolats de *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes par un système d'efflux surexprimé (**Tafti et al., 2020**).

Résultats et discussion

Tab.7. Données démographiques des isolats présentant une surexpression du système d'efflux

Variable	Surexpression du système d'efflux (n)	p-value	Surexpression du système d'efflux pulsotype A (n)	p-value	Surexpression du système d'efflux pulsotype H (n)	p-value
Sexe		0.05		NS		NS
M	7		2		2	
F	3		1		1	
Age		NS		NS		NS
Moyenne ± SD	23.93 ± 14.5		12.44 ± 10.78		34.33 ± 20.20	
0-10	1		1		0	
10-20	6		1		1	
20-40	2		1		1	
40-60	1		0		1	
60-90	0		0		0	
Service		NS		NS		NS
Brûlés	4		1		1	
Neurochirurgie	1		0		1	
Réanimation	2		0		0	
Néphrologie	1		1		0	
ORL	2		1		1	
Type de prélèvement		NS		<0.001		
Pus	6		2		2	
LCR	1		1		1	
Catheter	2					
Prélèvement trachéal protégé	1					

Les souches à systèmes d'efflux surexprimés ont été classées phylogénétiquement en fonction de leur clonalité (pulsotype). La figure 28 représente cette clonalité génétique.

Résultats et discussion

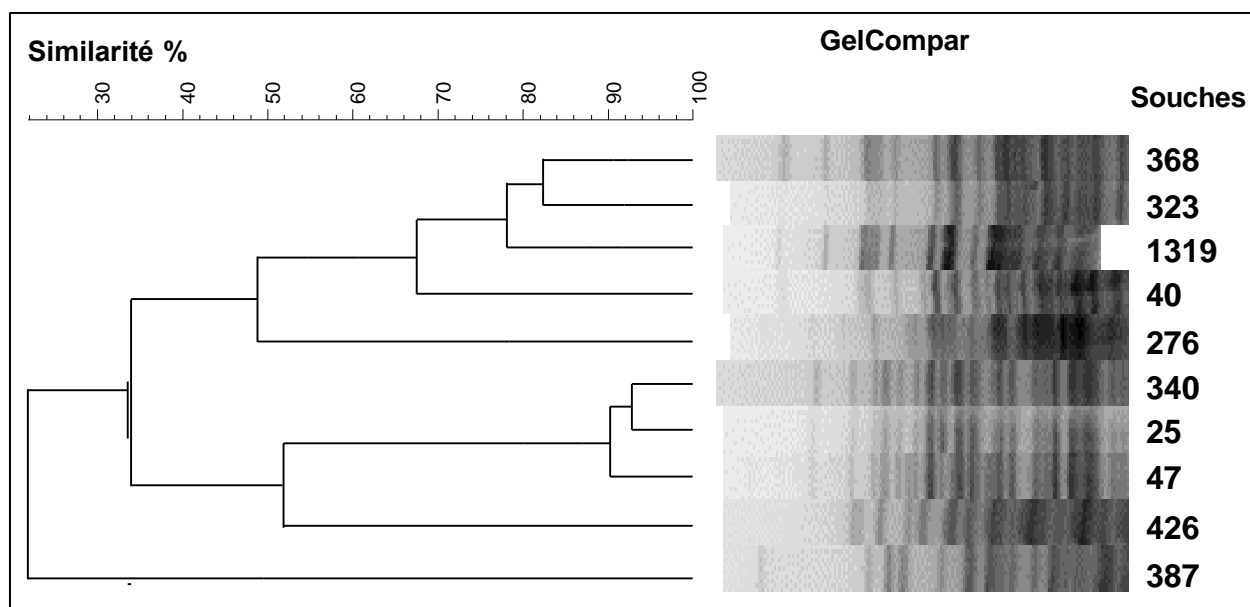


Figure.28. Dendrogramme des souches à systèmes d'efflux surexprimés selon leur profil PFGE (N=10).

4.2.2.2. Résistance associées des souches à systèmes d'efflux surexprimés

Selon les résultats de l'antibiogramme (fig.29) les isolats de *P. aeruginosa* à systèmes d'efflux en surexpression présentaient une résistance de 100% pour la PIP, TCC et TIC, 10% pour l'ATM ; 50% pour la GEN et l'AK, 60% pour la TOB mais aucune résistance pour la CS, LEV, CIP, FOS et CAX.

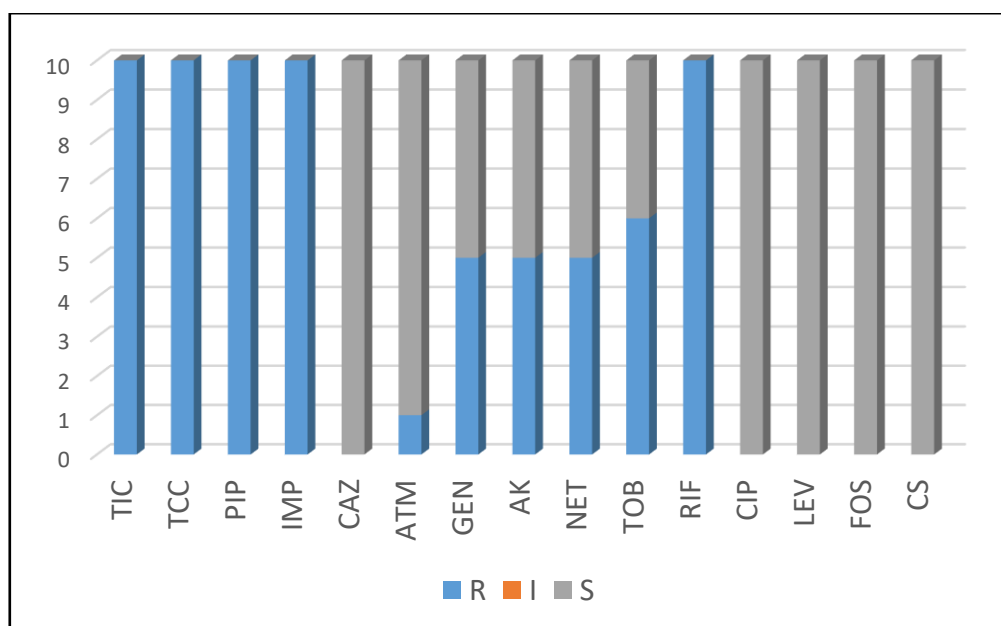


Figure.29. Résistance associées des souches à systèmes d'efflux surexprimés (N=10).

Résultats et discussion

Dans l'étude **Tafti et al. (2020)**, les isolats résistants aux carbapénèmes par mécanismes d'efflux avaient une résistance de (90 %), (95 %), (70 %) et (80 %) isolats étaient résistants au MERO, à l'IMP, à la PIP, et à la GEN respectivement. **Al-Agamy et al. (2016)** ont rapporté des taux de résistance des isolats à pompes d'efflux surexprimée de : 100 % à l'ATM et à la CAZ, 60% à la TOB et à l'AK, 40% à la CIP et 0% à la CS. Les isolats de *P.aeruginosa* à système d'efflux surexprimé avaient un taux de résistance de 100% pour l'AK, 50% pour la CIP et 0% pour la CAZ (**Llanes et al., 2004**).

4.3. Résistance aux aminoglycosides

La résistance de *P. aeruginosa* à différents agents aminosides représente une énorme menace pour la santé publique et limite le choix thérapeutique disponible. L'utilisation à faible dose de multiples médicaments comme traitement contre les maladies rend les souches de *P. aeruginosa* plus résistantes à un large éventail d'antibiotiques (**Smith et al., 2016**).

A partir d'un total de 75 souches résistantes à différents antibiotiques à la classe des aminoglycosides, un groupe de 19 souches a été choisi pour caractériser son mécanisme de résistance moléculaire (tab.8) :

Tableau.8. Données démographiques et profil de résistance aux aminoglycosides des souches choisies pour étude moléculaire (N=19).

Variable	Résistants aux aminoglycosides (n)	p-value
Sexe M F	14 5	0.05
Age Moyenne ± SD 0-10 10-20 20-40 40-60 60-90	20,42 ± 14,90 6 2 9 2 0	NS
Service Brûlés Neurochirurgie Réanimation	15 1 3	NS

Résultats et discussion

Type de prélèvement		NS
Pus	14	
Hémoculture	2	
Catheter	1	
Prélèvement trachéal protégé	2	
Profil de Résistance		
A	1	
G	1	
T	1	
A/N	2	
N/T	1	
A/G/N	3	
A/N/T	1	
G/N/T	2	
A/G/N/T	7	

4.3.1. Caractérisation des gènes de résistance aux aminoglycosides par PCR

Le résultat de la détermination des gènes de résistance aux aminoglycosides par PCR multiplex est indiqué sur la figure 30

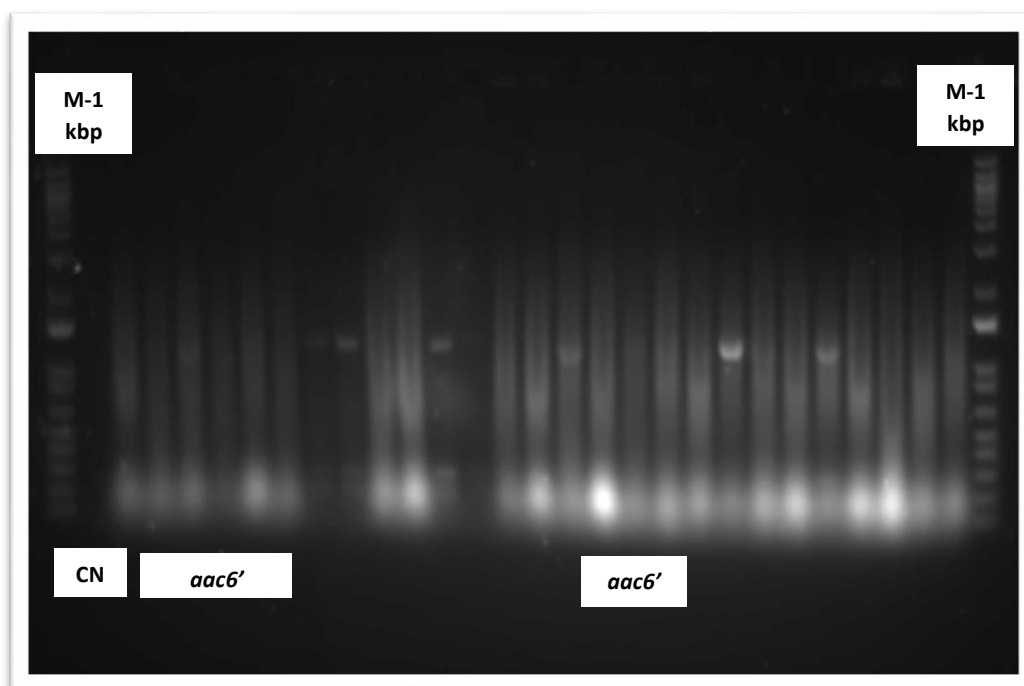


Figure.30. Produits de PCR des gènes de résistances aux aminoglycosides sur gel d'électrophorèse. CN : control négatif, M : marqueur de taille.

Résultats et discussion

Aucun gène de gènes testés (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*, *rmtH*, *armA*, *npmA* et *aac6*) n'a été détecté. Ces gènes sont considérés être les gènes majeurs responsables de la résistance aux aminoglycosides chez l'espèce *P.aeruginosa*. On peut déduire que ces souches possèdent d'autres mécanismes de résistance nécessitant l'étude d'autres gènes voire même faire une analyse du génome complet (WGS) pour en pouvoir trouver le gène exacte. Chez *P. aeruginosa*, du fait de la combinaison de plusieurs mécanismes et des niveaux variables de leur expression, les mécanismes impliqués ne peuvent être facilement déduits (**Dubois et al., 2008**). L'occurrence des AME de type *aac(6')-I* et *ant(2'')-I* a été trouvée respectivement chez 50 % et 45 % des isolats selon l'étude des mécanismes de résistance aux aminosides dans des isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants au Nigeria (**Odumosu et al., 2015**). D'autres études menées en Belgique, en Grèce, en France et en Inde, indiquaient que le gène *aac(6')-I* était le gène des AME le plus fréquemment détecté (**Žáková et al., 2001; Vakulenko et al., 2003; Chaudhary et al., 2014**). Cependant, il a été signalé des recherches aux États-Unis, en Corée et l'Iran que les gènes des AME le plus couramment détectés étaient *aac(6')-II* et *aph(3')-IV* (**Kim et al., 2011; Vaziri et al., 2008**). Dans les échantillons cliniques collectés en Autriche en 2010, les gènes *aph(3')-IIIa* et *aph(3')-IIa* semblaient être non impliqués dans la résistance aux aminoglycosides (**Woegerbauer et al., 2014**). Les gènes de résistance aux aminosides les plus fréquents étaient *aac(6')-Ib*, suivi par *aphA1* et *aadB* ont été trouvés dans différents isolats de *Pseudomonas aeruginosa*, provenant de patients fréquentant différentes unités d'un hôpital à Venezuela (**Teixeira et al., 2016**).

Récemment, des mutations dans *fusA* ont été identifiées comme contribuant à des niveaux de résistance élevés après un traitement prolongé aux aminosides (**Bolard et al., 2018**). Il a été démontré que les substitutions Arg182 et Val121 dans le gène *amgS* augmentent la CMI de la tobramycine de 2 à 4 fois dans les isolats cliniques (**Lau et al., 2015**). Aussi qu'une mutation non synonyme a été identifiée dans le même gène (Cys28Ala) chez un isolat de *Pseudomonas aeruginosa* *small colony* et a entraîné une augmentation de 2 fois de la CMI de la tobramycine (**Schniederjans et al., 2017**).

Sanz-García et al. (2018) et **Seupt et al. (2021)** ont démontré que l'expression de la pompe d'efflux MexXY-OprM joue un rôle mineur dans le développement d'une résistance à la tobramycine.

Résultats et discussion

4.3.2. Résistances associées des souches choisies résistantes aux aminoglycosides

Les résultats de résistances associées aux autres classes d'antibiotiques des souches résistantes aux aminoglycosides sont montrés dans la figure 31.

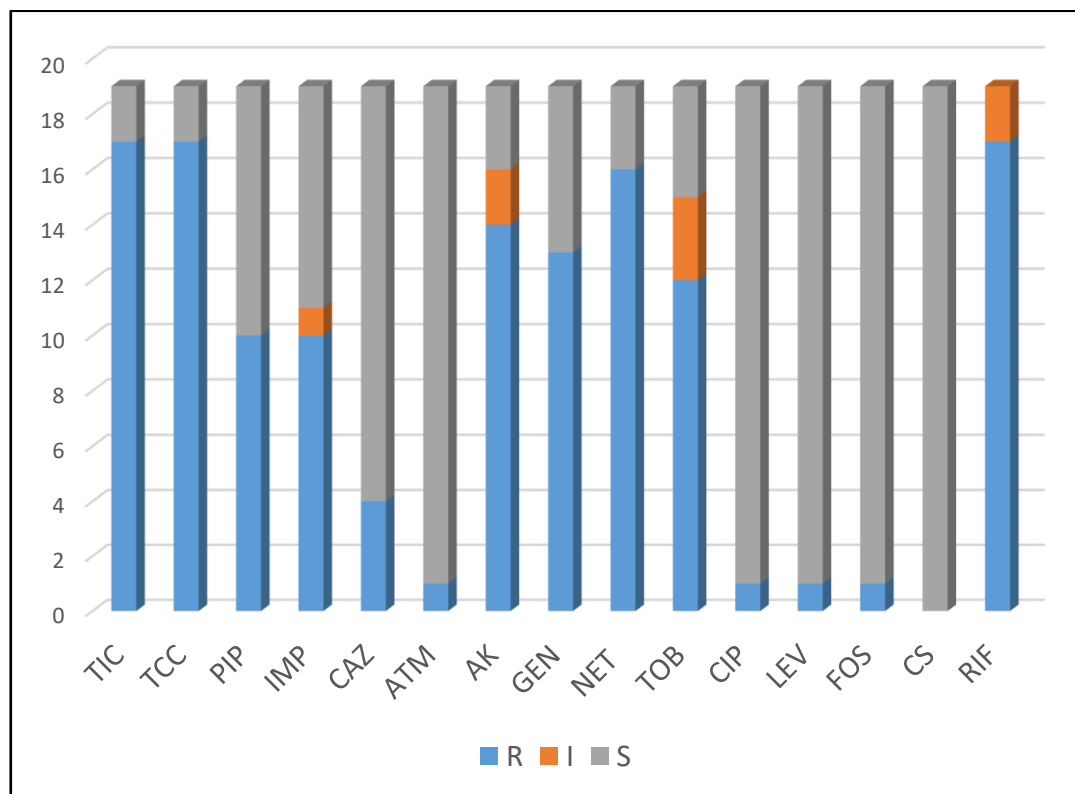


Figure.31. Résistance associée des souches choisies résistantes aux aminoglycosides (N=19).

Les souches choisies présentent également d'autres résistances vis-à-vis aux autres classes d'antibiotiques testés, notamment les β -lactamines (89.5% de résistance à la ticarcilline et la ticarcilline + acide clavulanique). La colistine restait la molécule la plus active contre *P.aeruginosa* avec 0% de souches résistantes suivie par les fluoroquinolones et la fosfomycine avec seulement 5.26% (1 seule souche résistante) de résistance pour chaque antibiotique.

Les aminosides (amikacine, gentamicine, kanamycine, néomycine, nétilmicine, paromomycine, streptomycine et tobramycine) sont utilisés depuis de nombreuses années pour le traitement des infections à *Pseudomonas* mais actuellement, la résistance aux aminosides chez *P. aeruginosa* est très courante et est signalée dans le monde entier (Poole *et al.*, 2005). Plus récemment, le séquençage du génome entier d'une souche de *P. aeruginosa* multirésistante à partir d'un échantillon d'urine a montré que cet isolat abritait un intégron de classe 1 (In113) portant les gènes *aac(6')-Iae* et *blaIMP-1*, qui sont responsables de niveaux élevés de résistance aux aminosides et aux bêta-lactamines, respectivement (Miyoshi-Akiyama *et al.*, 2011).

Résultats et discussion

4.4. Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones forment une classe importante d'antibiotiques utilisés pour traiter les infections causées par *P. aeruginosa*, parmi lesquelles la ciprofloxacine (CIP) et la lévofloxacine (LEV) qui sont fréquemment utilisées. Cependant la résistance de *P. aeruginosa* a ces antibiotiques a émergé (Nguyen *et al.*, 2018).

Nos résultats ont montré que 4/5 des souches résistantes aux fluoroquinolones étaient résistantes à la LEV et qu'une seule d'entre elles était résistante à la CIP (tab.9). Les données du Réseau chinois de surveillance des antimicrobiens ont montré que le taux de résistance de *P. aeruginosa* à la CIP avait atteint 14,8 % en 2017 (Hu *et al.*, 2017). En outre, le taux de résistance de *P. aeruginosa* aux fluoroquinolones dépassait 30 % au sein des hôpitaux des États-Unis (Weiner *et al.*, 2016).

Tableau.9. Données démographiques des isolats résistants aux fluoroquinolones (N=5).

Variable	Résistants aux fluoroquinolones (n)	p-value
Sexe		0.05
M	5	
F	0	
Age		NS
Moyenne ± SD	18.6 ± 15.53	
0-10	2	
10-20	0	
20-40	3	
40-60	0	
60-90	0	
Service		NS
Brûlés	5	
Type de prélèvement		NS
Pus	5	

4.4.1. Caractérisation moléculaire du mécanisme de résistance aux fluoroquinolones

L'utilisation intensive de fluoroquinolones a entraîné l'émergence de bactéries résistantes qui peuvent rendre le médicament inefficace (OMS, 2014). L'étude des mécanismes de résistance aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* est d'une grande importance pour choisir les antibiotiques appropriés et d'éviter l'émergence de souches résistantes. L'analyse par PCR des gènes responsables de la résistance aux fluoroquinolones est montrée dans la figure 32.

Résultats et discussion

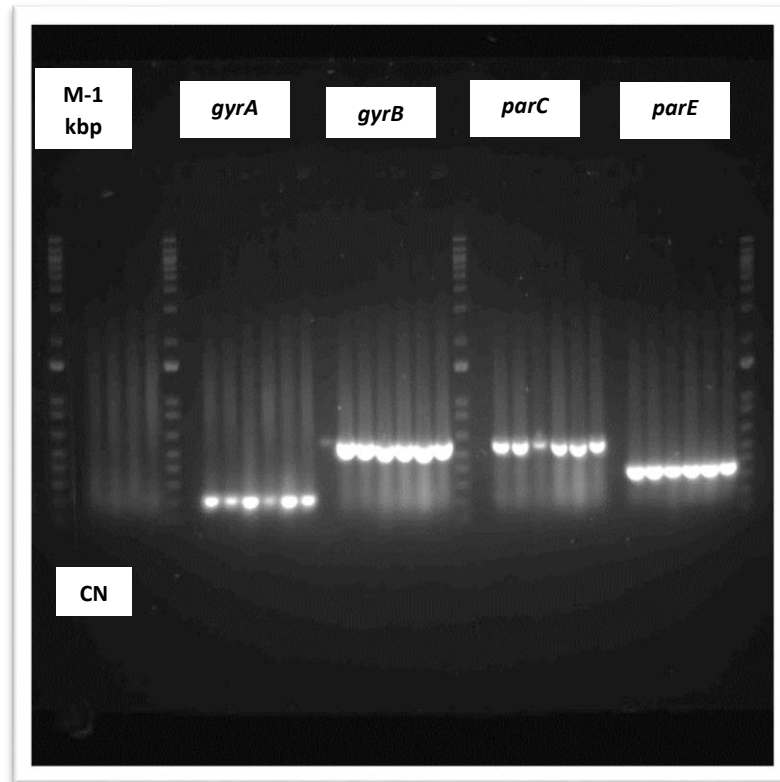


Figure.32. Produits de PCR des gènes de résistances aux fluoroquinolones sur gel d'électrophorèse. CN : control négatif, M : marqueur de taille.

Nos résultats ont révélé que toutes les souches résistantes aux FQ présentait des mutations ont été détectées détectées dans les gènes : *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. Pour le *gyrA*, les principales mutations étaient des codons : 73 (Ile73→Asp), 140 (Lys140 → Stop) et 191 (Ser 191→ Tyr). Les mutations détectées au niveau du gène *gyrB* étaient : 515(Phe515→Ser) et 527(Gly527→Glu), 531 (Met531 → Ile). D'autres mutations ont été trouvées dans le gène *parC* dans les codons : 61 (Leu61→ Trp), 87(Ser87→ Phe), 101 (Ser101→Pro) et 115 (Ser115→ Phe). Et finalement pour le gène *parE* l'analyse a révélé, la présence des mutations sur les codons : 363 (Ile363→Phe), 400 (Gly400→Ile), 432 (His432→ Gly), 484 (Tyr484→Pro) et 514 (Leu514→ Asp). Toutes ces mutations étaient le résultat de délétion, d'insertion et de substitution ce qui était comparables avec certaines études (Nouri *et al.*, 2016 ; Nguyen *et al.*, 2018). Cela peut être dû au fait que *P. aeruginosa* est une bactérie Gram-négative et que la première cible des fluoroquinolones contre les bactéries Gram-négatives est l'ADN gyrase codée par *gyrA* et *gyrB* (Gorgani *et al.*, 2009).

Il a été rapporté que les mutations les plus fréquentes impliquées dans la résistance aux fluoroquinolones concernent le gène *gyrA* codant l'ADN gyrase et les mutations du gène *parC*

Résultats et discussion

codant la topoisomérase IV peuvent survenir secondairement chez des mutants *gyrA*, induisant un plus haut niveau de résistance de la souche aux fluoroquinolones (**López-Causapé et al., 2018**). Bien que des mutations aient été décrites dans les gènes *gyrB* et *parE*, la fréquence de ces mutations est faible, et celles-ci n'ont qu'un rôle mineur dans la résistance aux fluoroquinolones (**Lee et al., 2005; Lister et al., 2009**).

Selon **Feng et al. (2019)** les altérations des acides aminés dans *gyrA* se sont produites principalement au niveau du codon 83 (Thr83 → Ile) et les altérations des acides aminés dans *gyrB* se sont produites principalement au niveau du codon 372 (Ala372→Val, Ala372→Leu), 424 (Ile424→Leu), 464(Leu→Ile) et 483(Glu483→Asp). Des études antérieures ont rapporté que des altérations majeures des acides aminés dans *gyrA* se produisent fréquemment au niveau du codon 83 (Thr83→Ile), et les mutations de *gyrA* étaient étroitement corrélées avec la résistance aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa*. (**Salma et al., 2013 ; Murugan et al., 2018**) Une étude avait rapporté que des altérations des acides aminés dans *gyrB* se produisaient au codon 467 (Ser467→Phe) et 468 (Gln468→His), mais la relation entre les altérations et la résistance n'a pas été établie (**Yang et al., 2015**).

Des mutations de substitution ont été détectées pour Thr83 → Ile et Thr133→ Met dans *gyrA*, pour Ser87→ Leu dans *parC* (**Nguyen et al., 2018**). Récemment, **Matsumoto et al. (2012)** ont rapporté que 2 (9,1 %) des 22 souches de *P. aeruginosa* résistantes à la lévofloxacine isolées au Japon avaient une mutation dans le gène *parC* (Ser87Trp).

L'analyse par PFGE (fig.33) et MLST ont révélé la présence de 5 pulsotypes différents et aucune ST n'a été déterminé pour les cinq souches. L'analyse des séquences génomiques de 79 isol.ats de *P. aeruginosa* ST235 obtenus sur une période de 27 ans dans diverses régions du monde indiquait la capacité du clone à acquérir facilement des gènes de résistance aux antibiotiques et surtout contre la famille des fluoroquinolones par des mutations touchant les gènes *gyrA*, *gyrB* et *parC parE* (**Treepong et al., 2018**).

Un ensemble de souches *P. aeruginosa* résistantes aux fluoroquinolones isolées dans un hôpital coréen présentaient différentes mutations dans un ou plusieurs gènes : *gyrA* (Thr83Ile), *gyrB* (Glu468Asp) et *parC* (Ser87Leu) et appartenaient aux différents ST, principalement : ST 235, ST 244, ST 245, ST 111, ST 654 et ST 357 (**Cho et al., 2014**).

Résultats et discussion

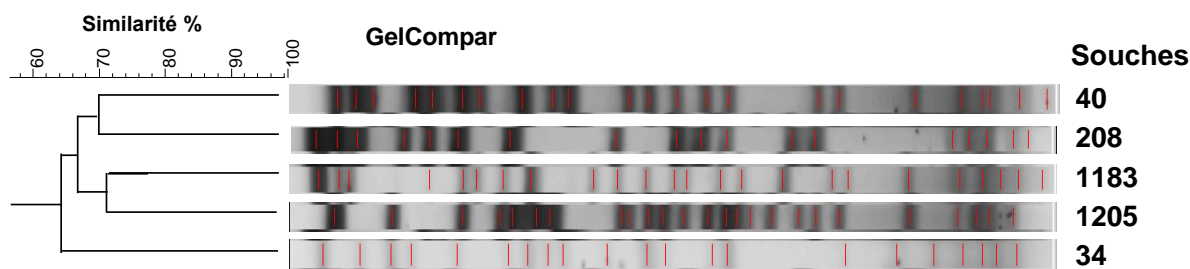


Figure.33. Dendrogramme des souches résistantes aux fluoroquinolones selon leur profil PFGE (N=5).

4.4.2. Résistances associées des souches résistantes aux fluoroquinolones

La figure 34 illustre le profil de résistances des souches résistantes aux fluoroquinolones aux autres classes d'antibiotiques. L'étude des résultats d'antibiogramme des souches résistantes aux fluoroquinolones révélait une résistance associée totale à la terramycine et à la gentamycine de plus de la rifampicine. Aucune résistance n'a été détecté vis-à-vis à la colistine et à la fosfomycine, l'aztréoname et la céftazidime.

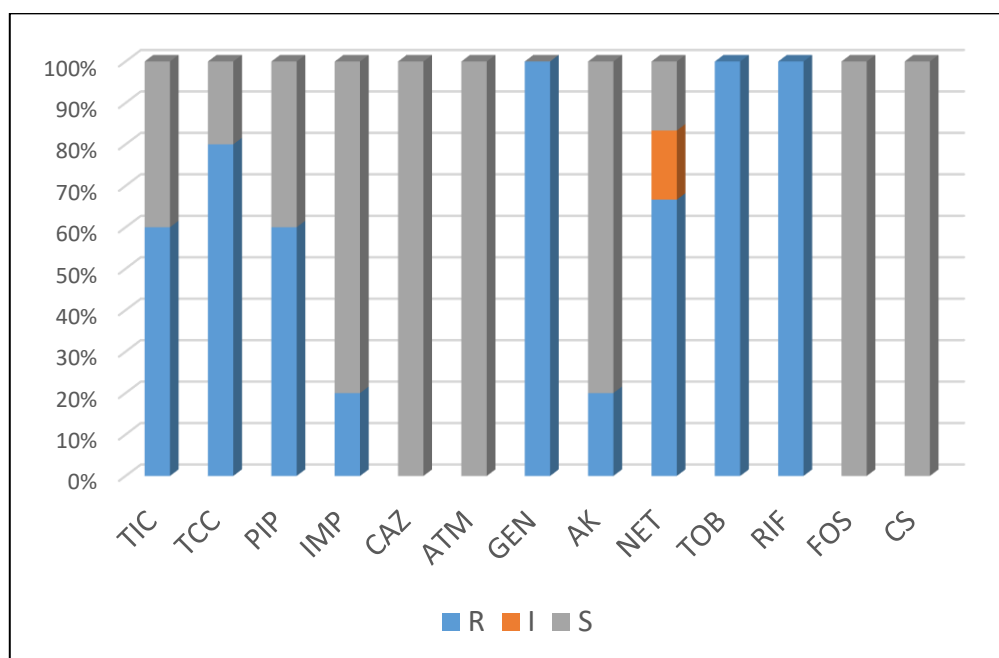


Figure.34. Résistances associées des souches résistantes aux fluoroquinolones (N=5).

4.5. Résistance à la colistine

Les polymyxines E (colistine) étant considérées comme le dernier recours pour le traitement des infections bactériennes multirésistantes, il était donc indispensable d'étudier l'émergence des résistances à la colistine. Les résultats des CMI de la colistine pour la totalité des isolats de *P. aeruginosa* montrent que cinq souches (tab.10) présentent une CMI très élevée $>64\mu\text{g/ml}$ ce qui représente 1.76% des souches isolées. En raison des différentes stratégies de

Résultats et discussion

traitement dans de divers hôpitaux, les taux de résistance à la colistine sont différents selon les régions géographiques (Goli *et al.*, 2016). La résistance à la colistine était 5.1% chez les isolats de *A. baumannii* et 10.9% pour *P. aeruginosa* (Ruh *et al.*, 2016)

Tableau 10. Données démographiques des isolats résistants à la colistine (N=4).

Variable	Résistants aux fluoroquinolones (n)	p-value
Sexe		0.05
M	4	
F	0	
Age		NS
Moyenne ± SD	9.25 ± 8.26	
0-10	3	
10-20	0	
20-40	1	
40-60	0	
60-90	0	
Service		NS
Brûlés	1	
Neurochirurgie	2	
Médecine interne	1	
Type de prélèvement		NS
Pus	2	
LCR	2	

4.5.1. Caractérisation moléculaire du mécanisme de résistance à la colistine

L'émergence de la résistance à la colistine est devenue l'une des préoccupations mondiales dans divers pays d'Asie, d'Europe et de certains pays d'Afrique (Schwarz *et al.*, 2016). Aucun gène de type *mcr* n'a été détecté dans nos isolats (fig.35).

Résultats et discussion

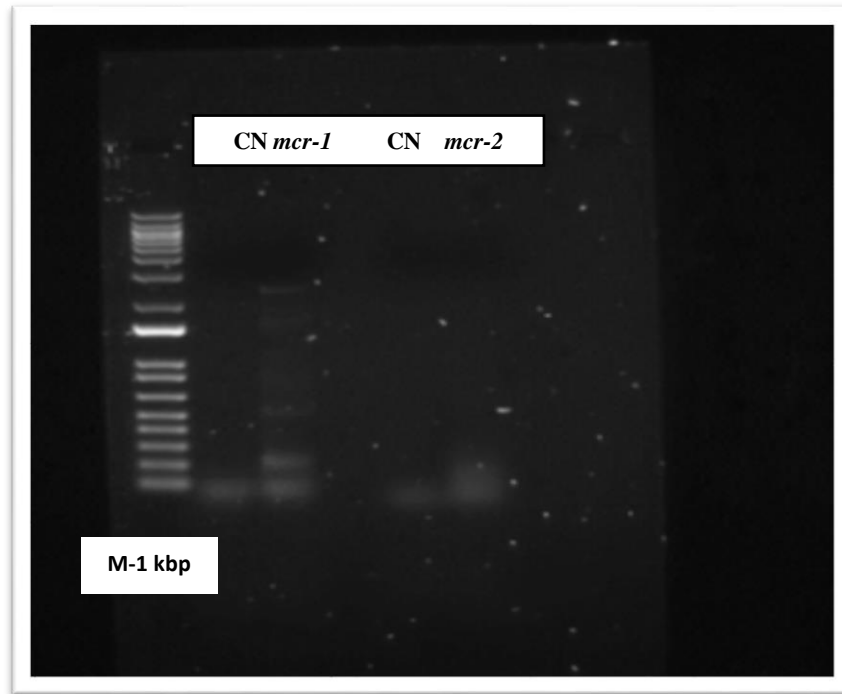


Figure.35. Produits de PCR du gène *bla mcr* gel d'électrophorèse. CN : control négatif, M :marqueur de taille.

L'analyse des séquence (fig.34) a montré la présence de substitutions dans les nucléotides menant à un changement d'acides aminés principalement au niveau de Tyr 345 His chez deux isolats dont une présente une autre substitution Ala 355 Thr dans *pmrB*. En outre on a trouvé d'autres substitutions : Leu532 Ile, Leu 538 Met, Trp 546 Ter et Leu 553 Met dans PhoPQ. Cela peut être traduit par le fait que les mutations survenant dans les systèmes de régulation à deux composants sont les principaux mécanismes attribués au développement de la résistance contre la colistine chez *P. aeruginosa* (Olaitan *et al.*, 2014). Nos résultats (fig.34) sont en accord avec les données publiées précédemment par Barrow and Kwon (2009) qui rapportaient les mêmes mutations en *pmrB* (Tyr 345 His). Choi *et al.* (2017) rapportaient des mutations de *phoP* où Asn188His a été trouvé dans quatre isolats, Asn188Tyr dans trois isolats et Asp246Glu dans *pmrB* dans un seul isolat.

En Afrique les gènes *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-5*, *mcr-8* et *mcr-9* ont été détectés dans des isolats provenant d'humains, d'animaux, d'aliments d'origine animale et de l'environnement et chez plusieurs bactéries comme *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes* et *Acinetobacter baumannii* (Anyanwu *et al.*, 2021). Des souches de *P. aeruginosa* portant le gène *mcr-1* ont été détectées chez des patients au Congo, au Sudan et en Egypt, ce gène est très répandu en Afrique centrale chez les

Résultats et discussion

bacilles non fermentaires comme *P. aeruginosa* (Gabriel *et al.*, 2019 ; Zakaria *et al.*, 2020 ; Ahmed *et al.*, 2019). Hameed *et al.* (2019) ont détecté la présence du gène *mcr-1* dans des souches de *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* résistantes à la colistine dans leur étude sur des isolats cliniques des hôpitaux pakistanais. La première détection de ce gène a été signalée chez *E.coli*.

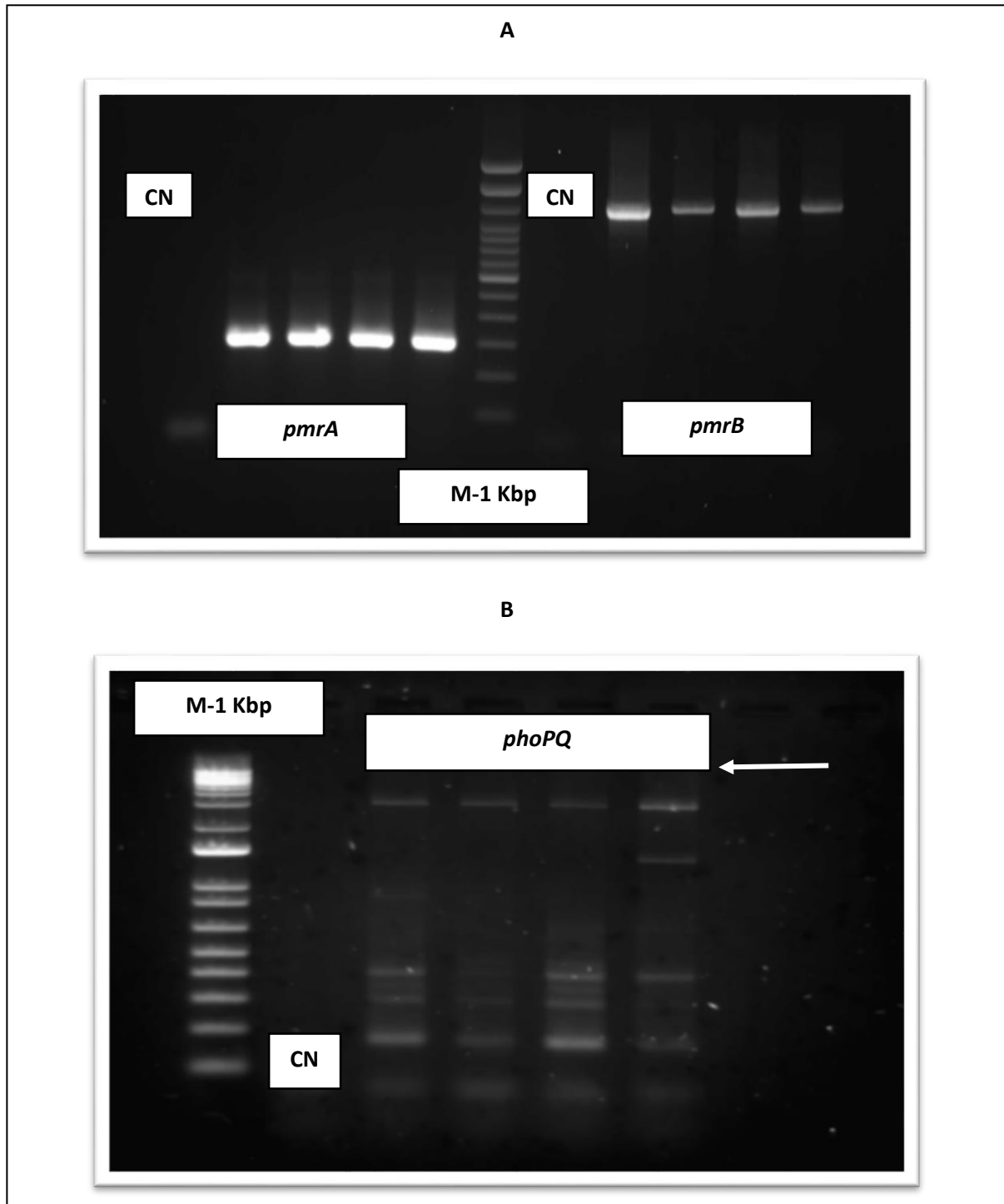


Figure.36. Produits de PCR des gènes: (A) *pmrA* et *pmrB* et (B) *phoPQ* sur gel d'électrophorèse. CN: control négatif, M: marqueur de taille.

Résultats et discussion

4.5.2. Résistances associées des souches résistantes à la colistine

L'antibiogramme des souches résistantes à la colistine expose une différence des taux de résistances vis-à-vis aux autres classes d'antibiotiques (Fig.37).

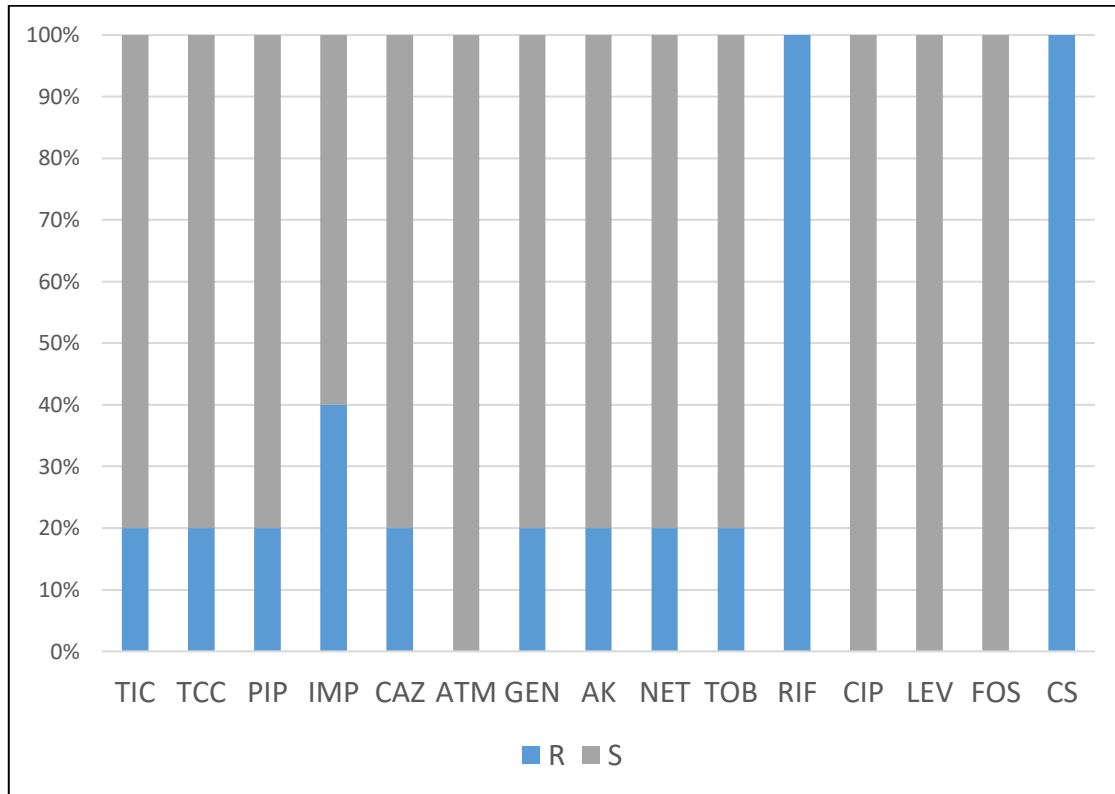


Figure.37. Résistances associées des souches résistantes à la colistine (N=4).

Ces souches étaient entièrement résistantes à la rifampicine. La famille des β -lactamines et des aminoglycosides ont des taux de résistance égaux 25% (1/4) sauf pour l'imipénème 50% (2/4). Les fluoroquinolones (lévofloxacine et ciprofloxacine) et fosfomycine présentaient les antibiotiques les plus efficaces. **Hernández et al., (2018)** rapportaient dans leur étude dans le CHU de Murcie entre l'année 2016 et 2017 une sensibilité totale des isolats de *P. aeruginosa* produisant une carbapénémase de type VIM. **Abd El-Baky et al. (2020)** étudiaient l'émergence des isolats de *P. aeruginosa* résistants à la colistine des isolats dans un CHU en Egypte et qui montraient un taux de résistance de 68.75% à la tobramycine tandis que l'imipénème le méropénème et la ciprofloxacine formaient les antibiotiques les plus actifs.

4.5.3. Répartition des souches résistantes à la colistine par pulsotype et séquence type

Les résultats de l'analyse des clones par champs pulsé et de séquence type sont regroupés dans la figure 38.

Résultats et discussion

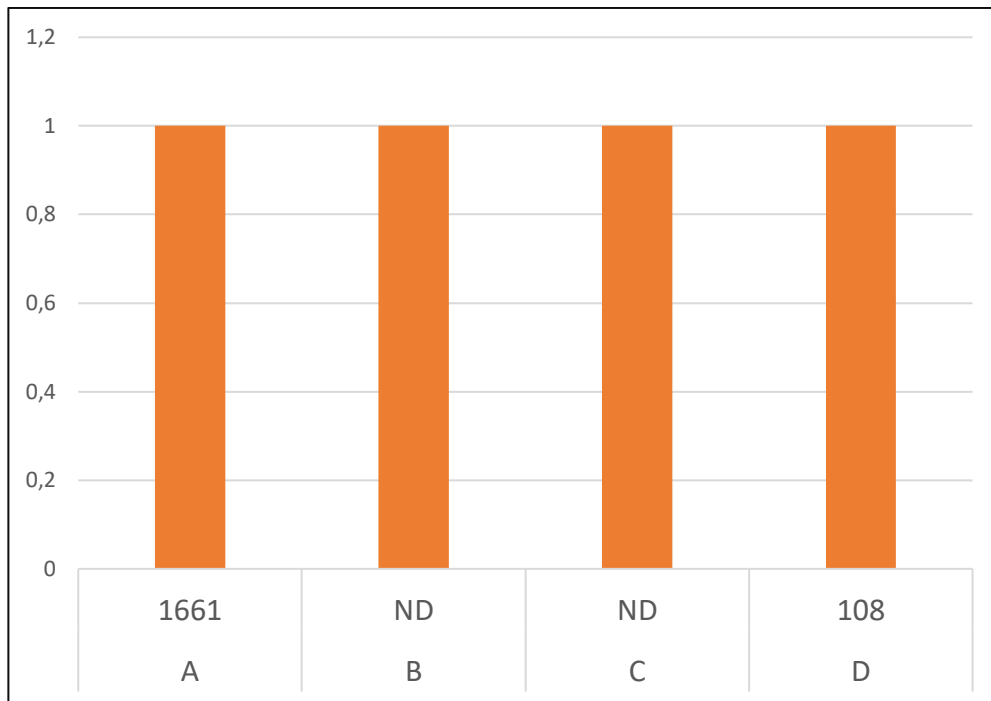


Figure.38. Répartition des souches résistantes à la colistine par pulsotype et par séquence-type (N=4).

Les résultats de MLST montrent que deux de nos isolats résistants à la colistine appartient à trois séquences types différentes (1661 et 108) tandis que pour les deux autres on a pas déterminé leurs Sts. Chacune de ces souches avait un pulsotype différent (quatre pulsotypes au total) (fig.39). **Tahmasebi et al. (2020)** dans leur étude sur la surveillance épidémiologique de *P. aeruginosa* résistant à la colistine en Iran trouvaient que les souches de *P. aeruginosa* appartenant à la ST1078 et ST3340 étaient résistantes à la colistine Certains chercheurs ont signalé que la ST235 et ST108 étaient détectées chez des souches *P. aeruginosa* MDR sensibles à la colistine (**Guzvinec et al., 2014 ; Wi et al., 2017**). Ces souches ne présentaient pas les mêmes pulsotypes donc elles n'appartiennent pas au même clone ce qui signifie l'absence de toute co-transmission entre patients.

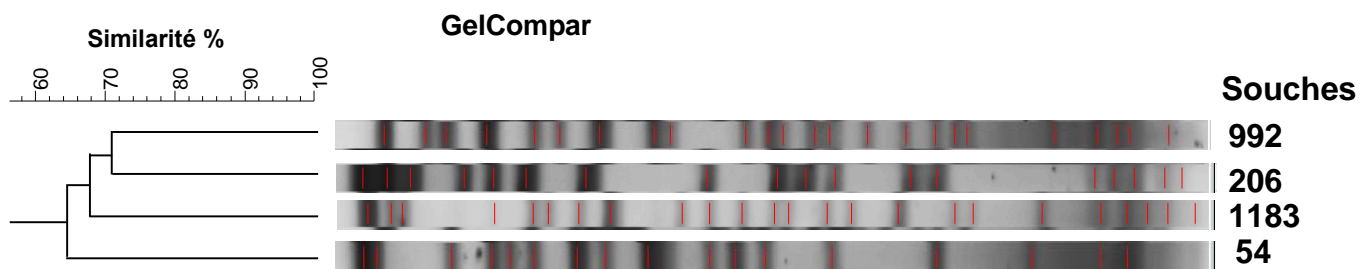


Figure.39. Dendrogramme des souches résistantes à la colistine selon leur profil PFGE (N=4).

Résultats et discussion

5. Etude de la formation de biofilm

5.1. Evaluation par méthode gélose rouge congo (CRA)

La technique de CRA est couramment employée dans l'étude de la formation de biofilms chez les isolats cliniques. La lecture des boîtes a été réalisée après 24h et 48 h après la mise en culture, les résultats sont rapportés sur la figure 40.

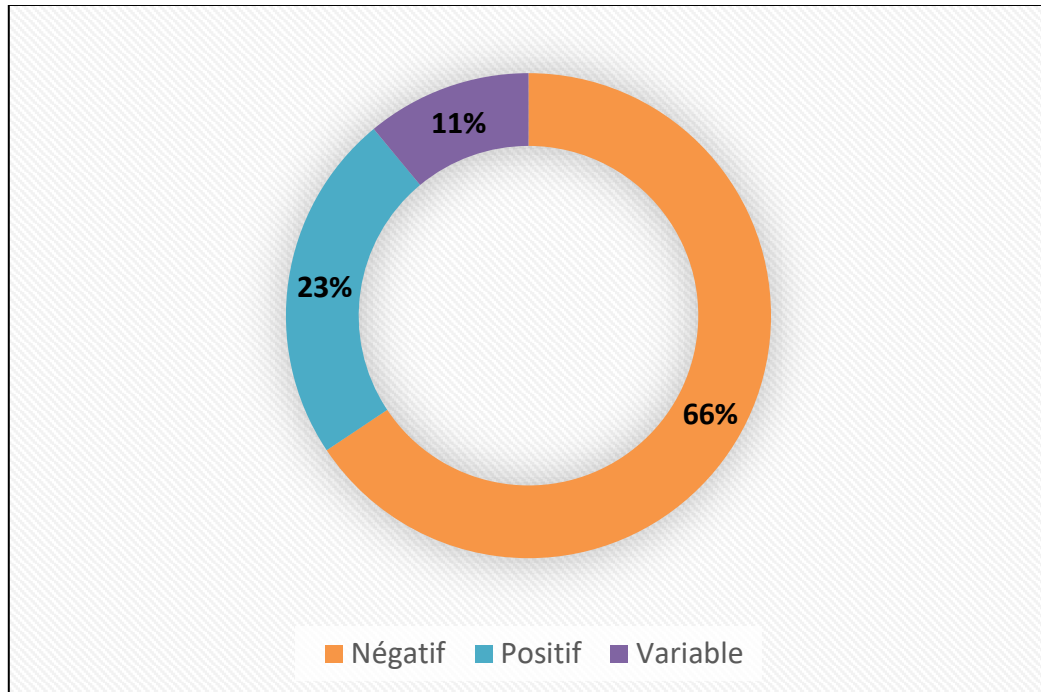


Figure.40. Résultats de l'évaluation de la formation de biofilm par CRA (N=227).

Les souches productrices de slime donnent des colonies soit de couleur noire ou grise par contre les colonies de couleur rose ou rouge sont caractérisées comme non productrices. Les infections liées aux biofilms représentent un défi médical majeur et sont impliquées dans jusqu'à 60% des infections bactériennes, ce qui complique le diagnostic et le traitement (**Hoiby et al., 2014**).

Le criblage de la production de biofilms par la méthode CRA (fig.38) a montré que 23% des souches étudiées étaient productrices de biofilm tandis que 66% d'entre elles étaient non productrices. Ce résultat est conforme à l'étude réalisée par **Khalid and Afaf (2014)** qui ont signalé une faible production de biofilm par des isolats bactériens en utilisant la méthode de la gélose rouge Congo. Tandis que 79.1% des isolats cliniques de *P. aeruginosa* étaient producteurs de biofilm dans l'étude de **Haji, (2018)**. Dans l'étude de **Hou et al. (2012)**, il a été constaté que (31,03 %) des isolats de *P. aeruginosa* ont donné des résultats positifs, tandis que **Heydari and Eftekhari, (2015)** ont rapporté que 43,5 % des isolats de *P. aeruginosa* étaient

Résultats et discussion

positifs pour la formation de biofilm et 14 % d'isolats étaient négatifs. **Bakir and Ali (2016)** ont rapporté que 58,8% des isolats de *P. aeruginosa* produisaient un biofilm.

5.1.1. Répartition des isolats positifs par type de prélèvement

Les souches présentant un biofilm sous milieu RCA ont été regroupées par prélèvements duquel ont été isolées, les résultats se trouvent dans la figure 41.

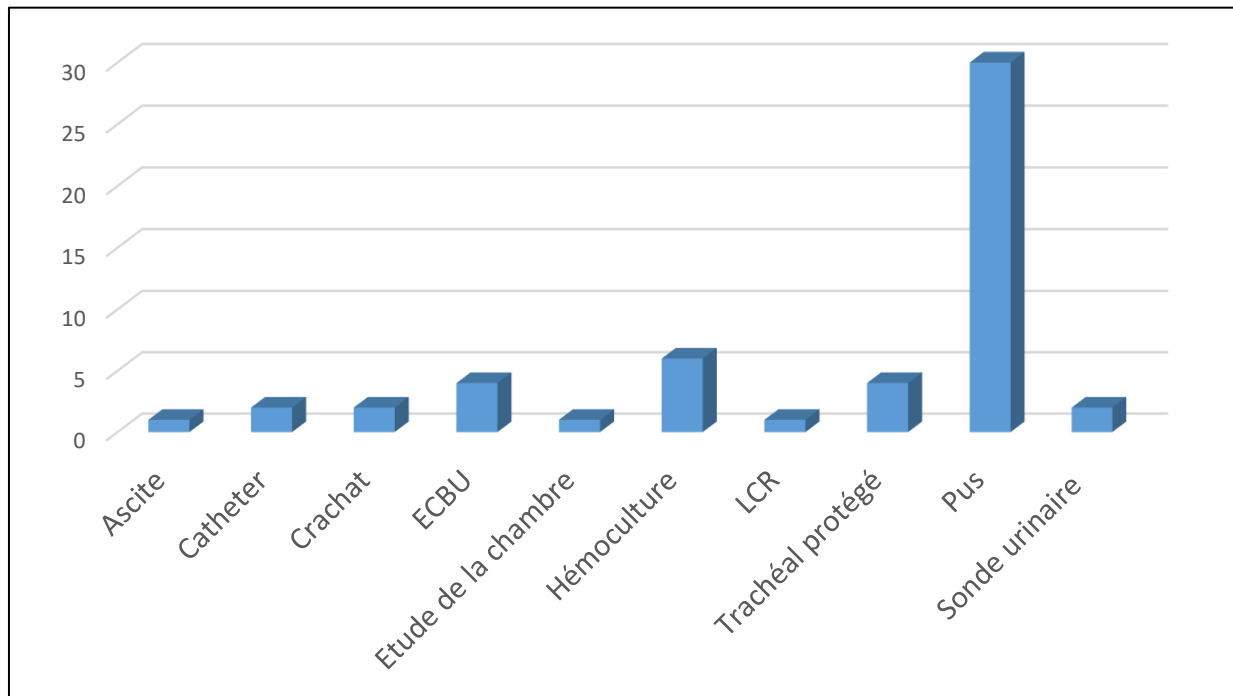


Figure.41.Répartition des isolats positifs par type de prélèvement (N= 53).

Les souches productrices de biofilm sur milieu CRA ont été isolées à partir des prélèvements de : pus (30/53), hémoculture (6/53), ECBU et trachéal protégé (4/53) pour chacun, le reste des prélèvements participaient par: 2/53 (sonde urinaire, crachat et catheter) et et 1/53 (ascite, LCR et chambre implantable). Dans l'étude d'**Abdallah et al. (2011)** au Caire ont rapporté un pourcentage 50 % de production de biofilm par *P. aeruginosa* isolé des urines. 14/20 des souches de *P. aeruginosa* productrices de biofilm ont été isolées des brûlures infectées (**Hussen, 2020**). **Rahim et al.(2017)** rapportaient une prévalence élevée des souches productrices de biofilm parmi les prélèvements des lésions chroniques diabétique(ulcères). **Lima et al. (2017)** ont indiqué que les souches de *P. aeruginosa* biofilm positif étaient isolées des sécrétions bronchiques.

Résultats et discussion

5.1.2. Profils de résistance des isolats positifs

Le profil de résistance des isolats formateurs de biofilm sur CRA est illustré dans la figure 42. Dans notre étude 98.11% des souches productrices de biofilm ont été résistantes à la RIF, 41.50% de souches résistantes à la TIC, TCC et AK avec 37.73% de résistance contre l'IMP et NET et 24.52% contre la CAZ. En contrepartie, on n'a pas trouvé une résistance contre la CIP ; et une faible résistance vis-à-vis la CS, la Lev, la FOS et l'ATM entre 0.98-5.66%. En discordance avec nos résultats, **Haji (2018)** a rapporté des taux de résistances très élevés des souches productrices de biofilm surtout à l'IMP, la CAZ et la CIP et **Abdulhaq et al. (2020)** ont trouvé une résistance élevée à l'IMP, la CAZ, la CIP, l'ATM, l'AK et la GEN parmi les isolats de *P. aeruginosa* producteurs de biofilm.

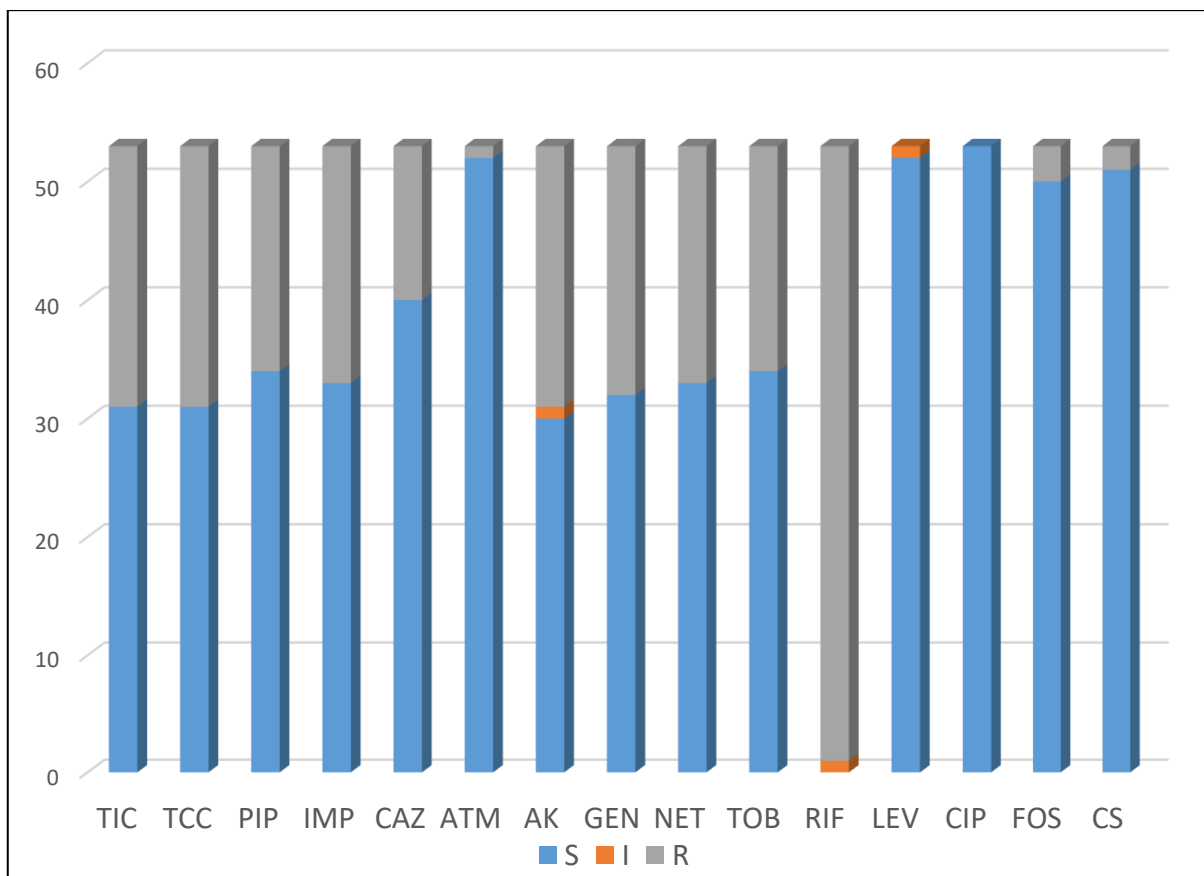


Figure.42. Profil de résistance des isolats positifs (N=53).

5.1.3. Prévalence des isolats positifs multirésistants

La distribution des isolats biofilm positif selon leurs profils de résistance (fig.43) a révélé une fréquence de 28.30% des souches MDR et 11.32% des Résistants-Non-MDR sans oublier de mentionner une défection des souches XDR et PDR.

Résultats et discussion

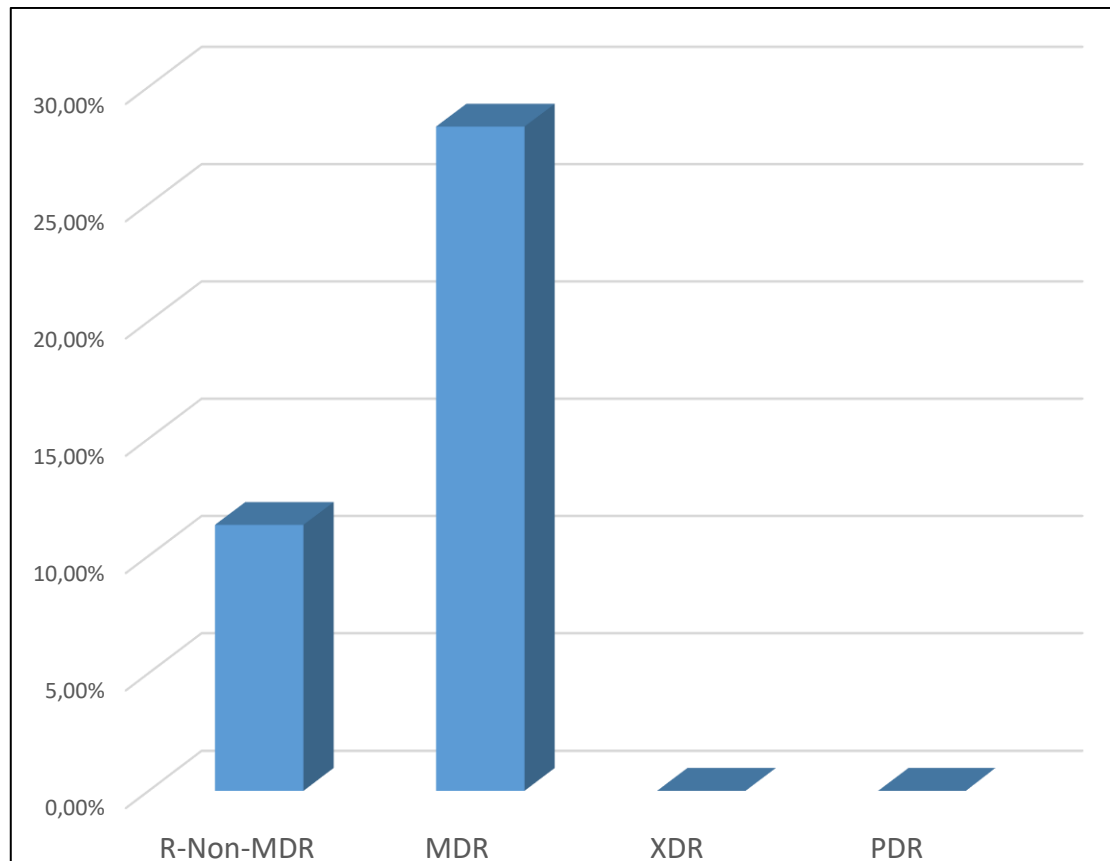


Figure.43. Prévalence des isolats positifs multirésistants (N=53).

Les infections à *P. aeruginosa* multirésistant (MDR) sont associées à une augmentation de la morbidité, de la mortalité et de l'impact économique (**Morales et al., 2012**)

Selon **Harika et al. (2020)** les souches productrices de biofilm ont été exclusivement des MDR. 38.46 % des souches à forte production de biofilm ont été rapporté dans l'étude de **Abdulhaq et al., (2020)**. Aucune souche productrice de biofilm n'a été MDR selon **Lima et al. (2017)**.

5.2. Evaluation par méthode des tubes (TM)

L'étude de la formation de biofilm par la technique des tubes nous a permis de classer les souches étudiées en fonction de l'intensité des biofilms formées en quatre catégories, les résultats sont reportés sur la figure 44.

Résultats et discussion

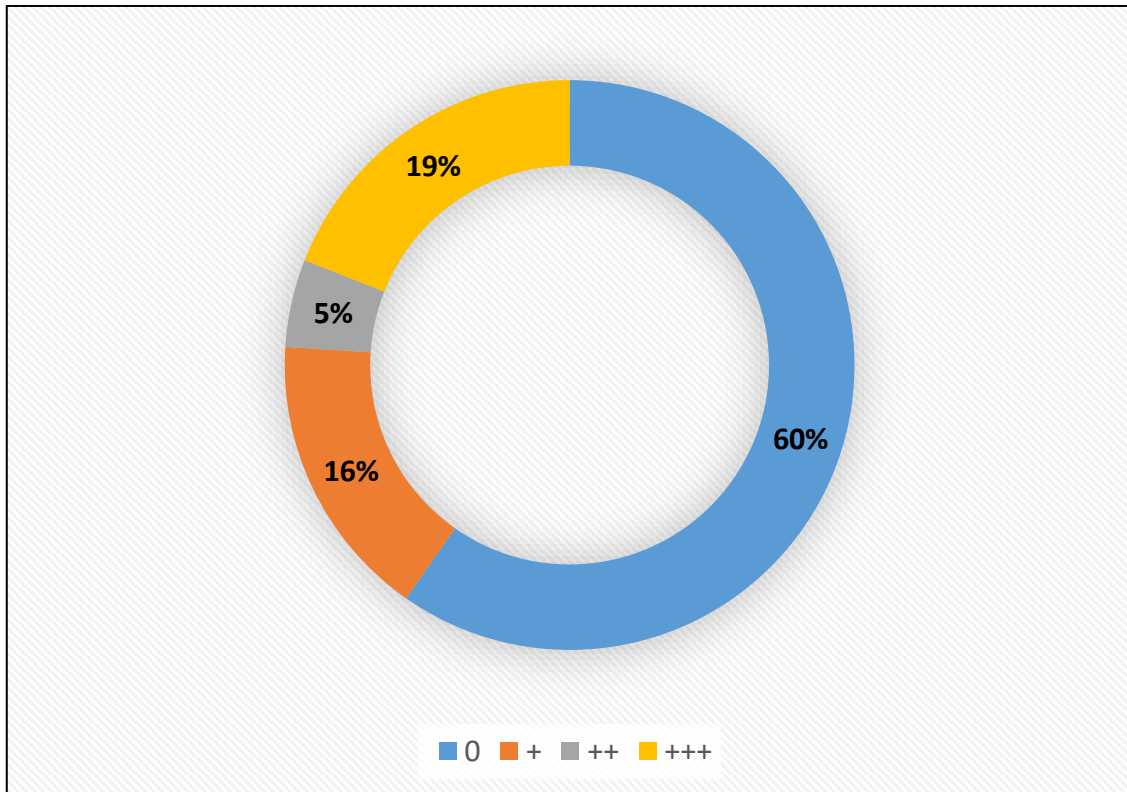


Figure.44. Résultats de l'évaluation de la formation de biofilm par TM (N=227). 0 : aucune production de biofilm, + production faible, ++ production modéré et +++ production très forte .

Parmi les 227 souches étudiées, (16%) ont montré une faible production, (5%) une production modérée, (19%) une forte production, pour un total de 40% souches productrices et 60% souches non productrices. Des résultats similaires ont été trouvés par **Saxena et al. (2014)** qui ont révélé 16 (20 %) producteurs de biofilm forts, 17 (21,25 %) producteurs modérés et 47 (58,75 %) producteurs faibles ou non de biofilm par la méthode qualitative du tube. Une étude menée par **Rewatkar and Wadher (2013)** où ils ont trouvé que 25/30 isolats de *P. aeruginosa* détectés comme forts producteurs de biofilm.

5.2.1. Répartition des isolats à forte production de biofilm par nature de prélèvement

Les bactéries isolées à forte production de biofilm sont issues majoritairement des prélèvements de pus 59.52%, 14.28% des hémocultures, 7.14% des urines, tandis que 2.38% reviennent aux autres prélèvements (fig.45).

Résultats et discussion

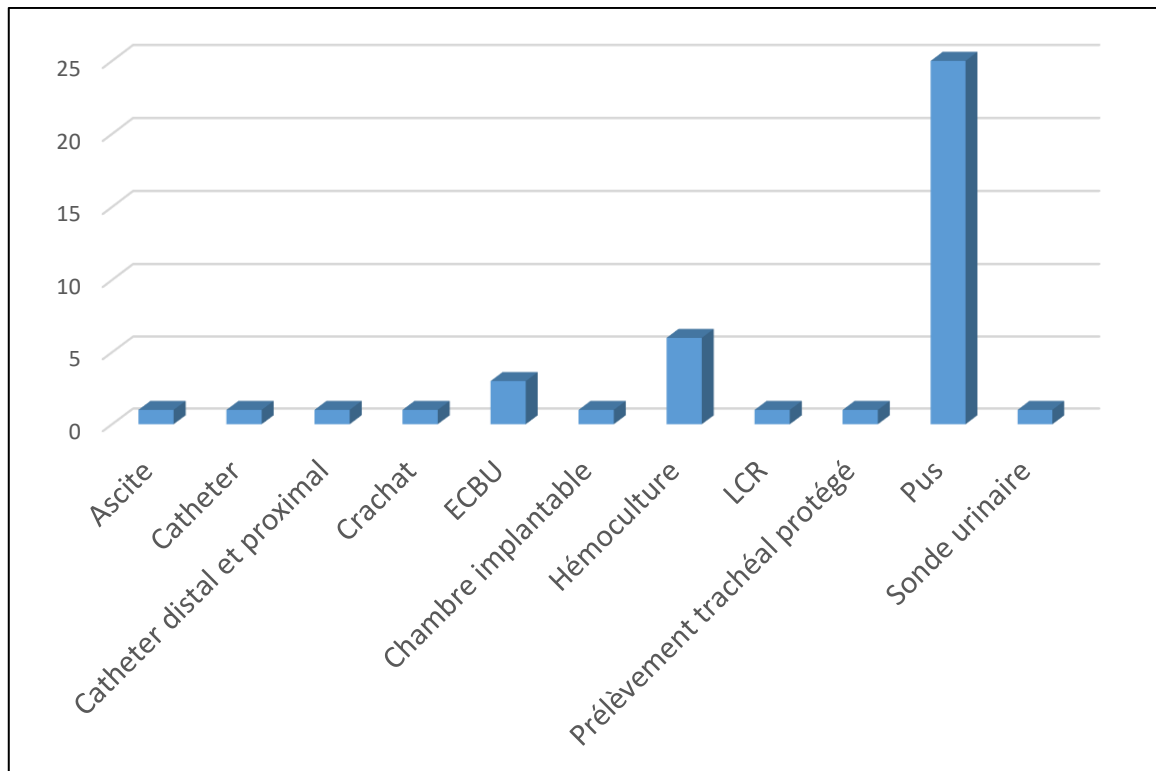


Figure.45. Répartition des souches à forte production de biofilm par nature de prélèvement (N=42).

En revanche, **Rewatkar and Wadher. (2013)** ont trouvé que les bactéries productrices de biofilm ont été isolées principalement à partir des sondes urinaires. Dans l'étude de **Eladawy et al., (2020)**, la source des isolats à fort production de biofilm était les urines et des plaies. **Gurung et al. (2013)** ont constaté que 100 % des souches de *P.aeruginosa* produisant des biofilms ont été isolées à partir des fluides principalement les urines, tandis que dans les échantillons respiratoires ne formaient que 33,33 % des isolats.

5.2.2. Profils de résistance des isolats à forte production de biofilm

Les résultats d'antibiogramme des souches à forte production de biofilm (fig.46) indiquaient aucune résistance contre l'ATM, la CIP et la FOS. La CS présentait un taux de résistance de (2/42). Cependant, pour les molécules restantes de β -lactamines le taux de résistance le plus élevé était trouvé pour la TIC et la TCC avec (18/42) et c'est la CAZ qui enregistrerait le taux de résistance le plus faible (10/42).

Résultats et discussion

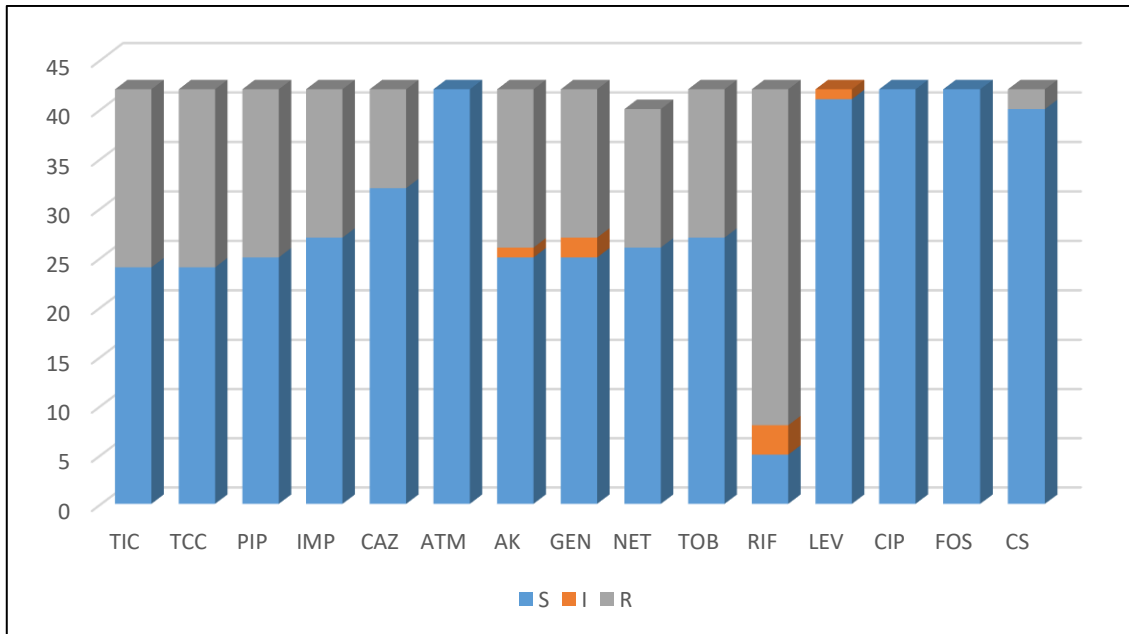


Figure.46. Profils de résistance des souches à forte production de biofilm (N=42).

Les isolats ayant une plus grande capacité à produire un biofilm ont tendance à produire des taux de résistance plus élevés à de nombreux agents antimicrobiens (Shrestha *et al.*, 2019). Baidya *et al.* (2021) dans leur étude sur la capacité des pathogènes à former des biofilms ont trouvé que les isolats de *P.aeruginosa* producteurs de biofilm présentaient des taux de résistance plus élevés que les nôtres avec 64.3% de résistants à la GEN et l'AK, % CIP et LEV, 46.2% à la PIP, 42.9% à l'IMP mais aucune résistance vis-à-vis la CS

5.2.3.Prévalence des isolats résistants et à forte production de biofilm multirésistants

Nos isolats à forte production de biofilm étaient à 33.33% des MDR et 7.14% Résistant-Non –MDR, aucun de ces isolats n'a présenté XDR ou PDR (fig.47).

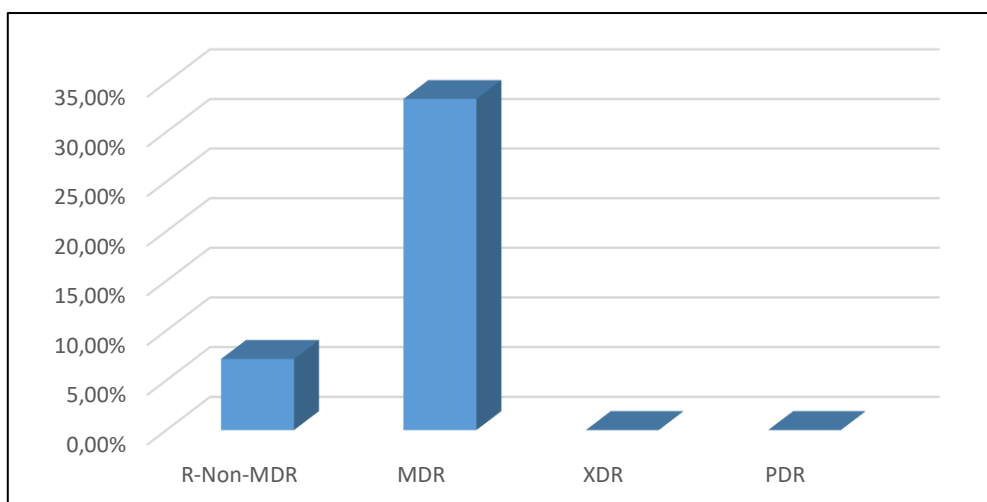


Figure.47.Prévalence des souches à forte production de biofilm multirésistantes (N=42).

Résultats et discussion

Nos résultats sont conformes avec ceux de **Navon-Venezia *et al.* (2005)** qui ont indiqué que 32 % des *P. aeruginosa* avec un profil MDR. De même, **Harika *et al.*, (2020)** ont trouvé que les isolats à forte production de biofilm présentaient le profil de MDR. Dans l'étude de **Gurung *et al.*, (2013)**, 57 % des *P. aeruginosa* qui étaient de forts producteurs de biofilm présentaient un profil MDR. D'après les résultats obtenus par **Andhale *et al.* (2016)**, 9/15 isolats de *P. aeruginosa* à forte production de biofilm étaient des MDR.

5.3. Evaluation par méthode de la microplaque TCP

Les valeurs de la densité optique (DO) du biofilm ont été obtenues à la longueur d'onde 570 nm. La valeur de la DO du témoin (contrôle négatif) était 0,2 ; donc les valeurs de la DO inférieures ou égales à 0,2 ont été considérées comme absence de production. Les valeurs comprises entre 0,3 et 0,4 correspondent à une faible production, celles comprises entre 0,5 et 0,8 à une production modérée et celles supérieures à 0,8 à une forte production, selon les règles de la classification données par **Stepanovic *et al.* (2000)**. La figure 48 donne un aperçu des résultats d'évaluation de la formation de biofilms par la méthode de microplaque.

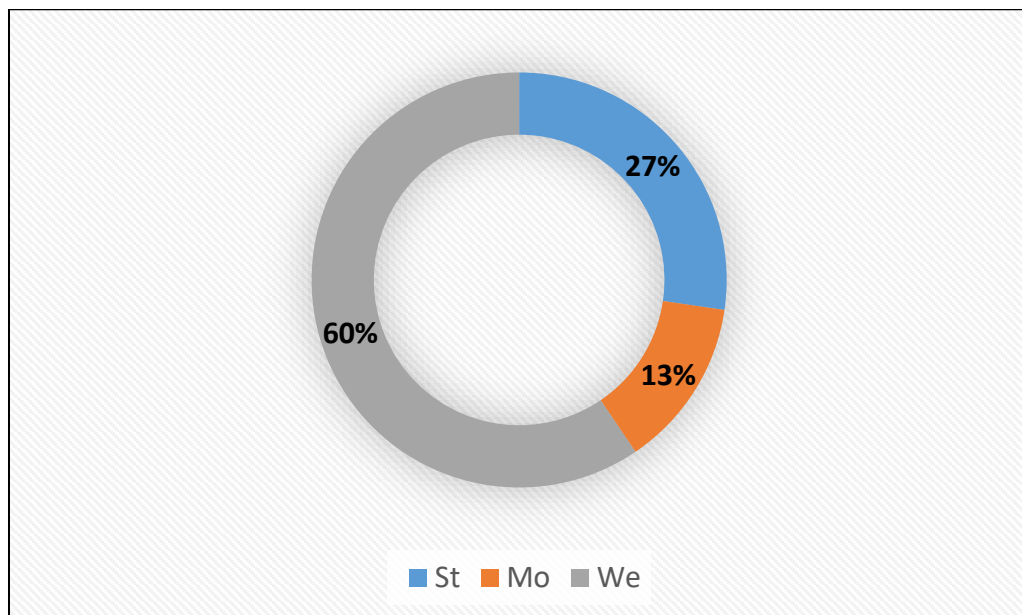


Figure.48. Résultats de l'évaluation de la formation de biofilm par TCP (N=227). St : production intense de biofilm , Mo : production modérée, We : faible production de biofilm.

L'investigation de la production de biofilms par la méthode de TCP a montré que 27% des isolats de présentaient une forte production de biofilm par contre 60% des souches restantes étaient de faibles productrices de biofilm (fig.46). Les résultats étaient statistiquement différents ($p < 0.001$). Nos résultats différaient de ceux de **Hassan *et al.* (2011)** qui ont rapporté que la méthode TCP avait montré que la formation de biofilm était de 64,7 % et que les faibles et les

Résultats et discussion

forts producteurs de biofilm étaient de 36,3 %. Parallèlement aux résultats d'autres études, un nombre important d'isolats de *P. aeruginosa* (83,75 %) ont formé des biofilms (**Vasiljević et al., 2014; Pournajaf et al., 2018**). Dans l'étude de **Azimi et al. (2016)**, 87 % des isolats étaient des producteurs de biofilm et 69% parmi eux étaient de puissants producteurs de biofilm.

De même, l'étude de **Kamali et al. (2020)** a montré une prévalence de 16.25% des isolats de *P. aeruginosa* à fort production de biofilm et que le biofilm formé par *P. aeruginosa* est considéré comme l'une des causes majeures d'échec thérapeutique. **Perez et al. (2013)** ont rapporté que 12.2% des isolats étaient de forts producteurs de biofilm, 24.2% de producteurs modérés et 56% comme faibles producteurs.

Les recherches effectuées au cours des trois dernières décennies ont montré que l'état monocellulaire planctonique est considéré comme une phase de transition, alors que dans la plupart des contextes les bactéries vivent en mode de croissance du biofilm (**Tolker-Nielsen, 2015**).

5.3.1. Répartition des isolats forts producteurs de biofilm par type de prélèvement

Les souches isolées sont liées dans leur physiologie à leur source d'isolement. Les prélèvements d'origine sont regroupés dans la figure 49 en fonction de la prévalence d'isolement de souches à forte production de biofilm.

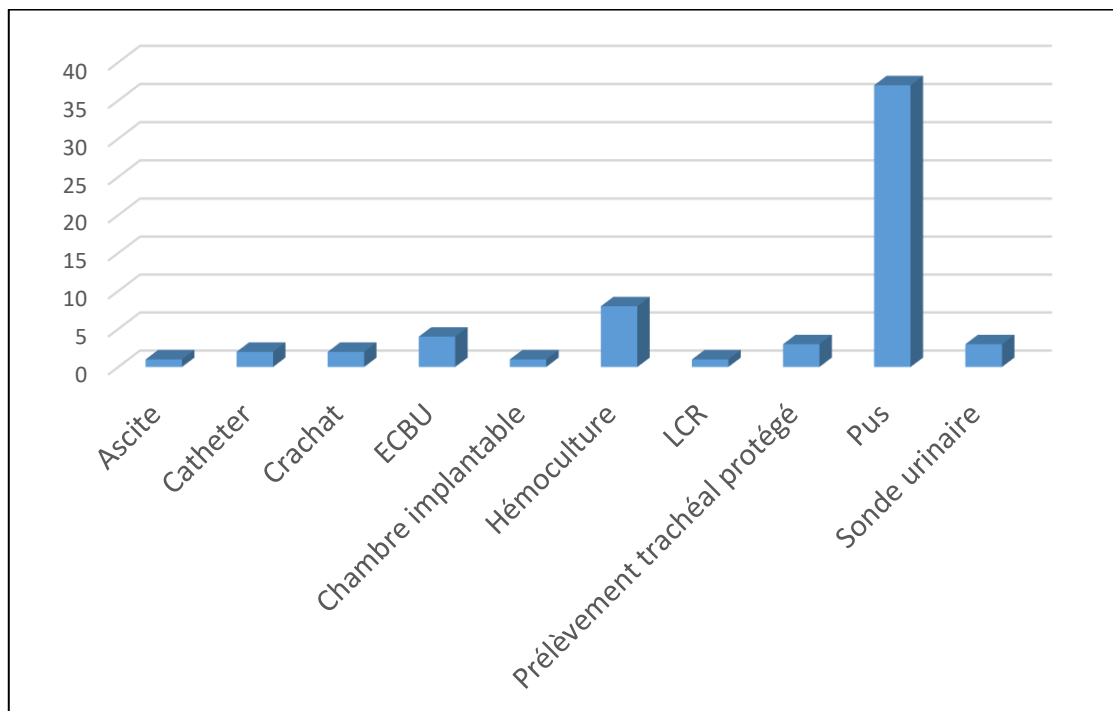


Figure.49.Répartition des isolats forts producteurs de biofilm par nature de prélèvement (N=62).

Résultats et discussion

Selon nos résultats (fig.47), nos isolats venaient principalement des prélèvements de pus (37/62), hémoculture (8/62) et des urines (4/62), sonde urinaire. **Donlan et al. (2001)** ont rapporté dans leur étude l'association de bactéries productrices de biofilm avec des cathéters urinaires. Des isolats de *P. aeruginosa* ont été récupérés des urines (n=24/58), du hémoculture (n=12/58), des plaies (n=13/58) et de LCR (n=9/58) (**Karami et al., 2020**). L'origine fréquente des isolats de *P. aeruginosa* était la sécrétion trachéale (36 %), suivie de l'urine (17 %) et du liquide céphalo-rachidien (11 %) (**Lima et al., 2020**). **Radovanovic et al. (2020)** ont indiqué que les souches productrices de biofilm ont été isolées à partir des prélèvements des plaies infectées et des urines. Des prélèvements des patients atteints de rhinosinusite chronique ont donné des cultures positives de souches de *P. aeruginosa* et ces dernières ont montré leur aptitude à former des biofilm (**Prince et al., 2008**). La majorité des souches productrices de biofilm sont isolées des hémocultures selon **Sanchez et al. (2013)**

5.3.2. Profils de résistance des isolats forts producteurs de biofilm

Les résultats de l'étude de la résistance *in vitro* des cellules planctoniques des isolats montrant une intense production de biofilm sont représentés dans la figure 50.

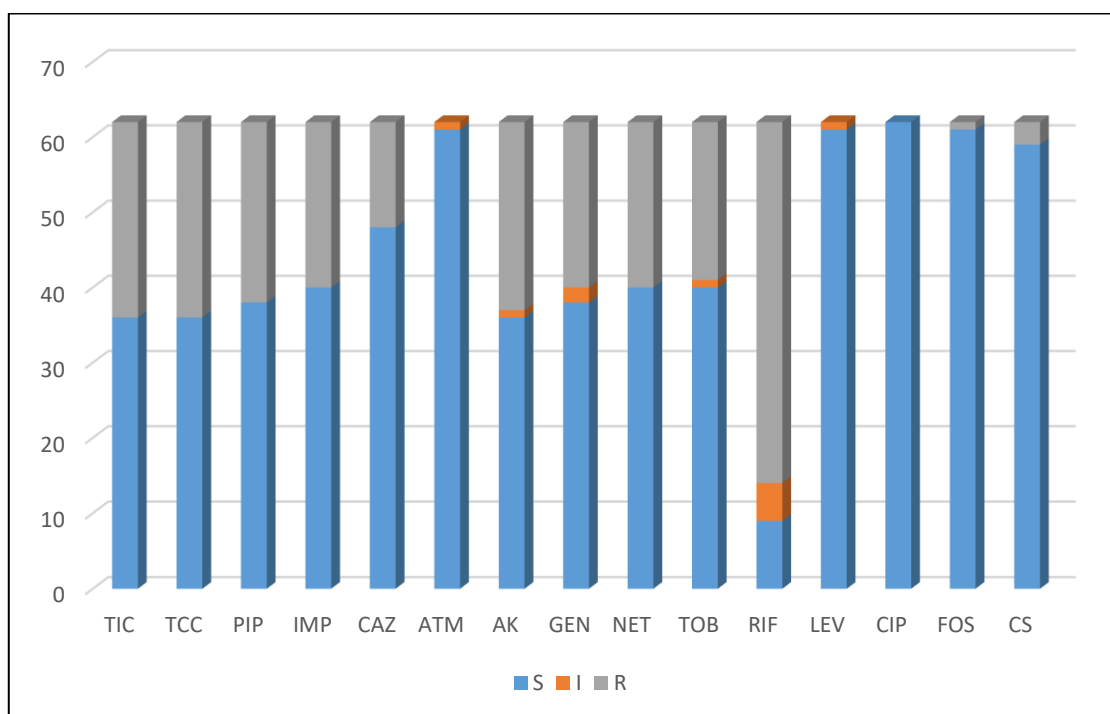


Figure.50. Profils de résistance des isolats forts producteurs de biofilm (N=62).

Les souches à forte production de biofilm présentait de différentes réaction vis à vis aux antibiotiques testés. Pour les β -lactamines l'ATM enregistrait le taux de le plus bas de résistance (1/62) suivi par la CAZ (14/62). Concernant les aminoglycoïdes on a noté un taux de

Résultats et discussion

résistance similaires entre les différents antibiotiques de cette famille (22/62). Les fluoroquinolones représentés par la LEV et la CIP montraient une puissante efficacité sur ces souches (1/62) aussi que la FOS (1/62) et la CS (3/62). La RIF n'a exercé qu'une faible inhibition sur 9/62. Similairement à nos résultats, un taux de résistance beaucoup plus faible pour l'IMP, la GEN et l'AK (Nikokar *et al.*, 2013). Tandis que Anvarinejad *et al.* (2014) ont rapporté des niveaux de résistance supérieurs aux notre pour la CAZ et l'IMP (72 % et 98 %, respectivement). Aussi que dans l'étude de Banar *et al.* (2016), plus de 90 % des isolats de *P.aeruginosa* étaient résistants à l'AK, à la GEN, à la céfépime et les taux de résistance à la CAZ et à l'IMP étaient de 61 % et 83 % respectivement.

Compte tenu de la présence de MBL et de production de biofilm, 100 % des souches ont été classées comme fortes productrices (Gonçalves *et al.*, 2017). Une autre étude au Brésil a révélé que 40 % des *P. aeruginosa* classés comme fortement producteurs de biofilm étaient également des producteurs de MBL (Perez *et al.*, 2012). Dans une étude précédente, Heydari and Eftekhar (2015) ont rapporté que le degré de formation de biofilm était associé à la production de β -lactamases dans les isolats de *P. aeruginosa*.

5.3.3. Prévalence des isolats forts producteurs de biofilm multirésistants

Similairement aux techniques précédentes qui ont montré une prévalence élevée des isolats MDR à forte production de biofilm, la TCP a révélé que les isolats MDR formaient 30.64% des forts producteurs de biofilm avec l'absence totale de toute souche ayant un profil XDR ou PDR (fig.51).

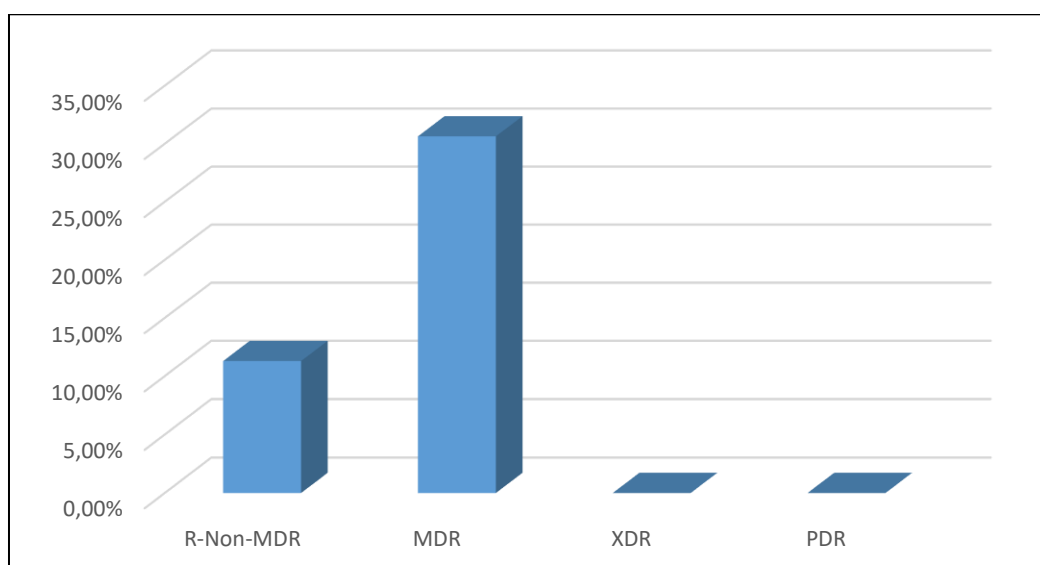


Figure.51. Prévalence des isolats forts producteurs de biofilm multirésistants (N=62).

Résultats et discussion

Lima et al. (2018) au Brésil ont trouvé que 48,4 % des isolats de *P. aeruginosa* producteurs de biofilm étaient MDR et 51,6 % n'étaient pas MDR. Le même auteur a rapporté dans une autre étude que 47/59 des isolats de *P. aeruginosa* à forte production de biofilm présentaient un profil XDR, 11/59 étaient des MDR et 1/59 N-MDR (**Lima et al., 2020**). Dans une autre étude, **Abidi et al. (2013)** ont rapporté que la production de biofilm était significativement plus élevée dans les isolats MDR.

L'étude de **Karami et al. (2020)** a rapporté que 96,2% des isolats (à la fois MDR et non-MDR) d'isolats cliniques et environnementaux avaient la capacité de créer le biofilm et qu'il existe une corrélation significative entre la forme MDR et la formation de biofilm. Contrairement aux résultats actuels, des études antérieures de différentes régions du monde ont montré une prévalence plus faible de formation de biofilm, et par conséquent aucune association entre la production de biofilm et la résistance aux antibiotiques (**Prince et al., 2008 ; Hou et al., 2012**).

6. Activité antibactérienne des huiles essentielles

Pour étudier la possibilité de trouver une alternative thérapeutique naturelle, on a testé l'effet des huiles essentielles sur le groupe des bactéries présentant une résistance aux carbapénèmes par production d'une enzyme MBL.

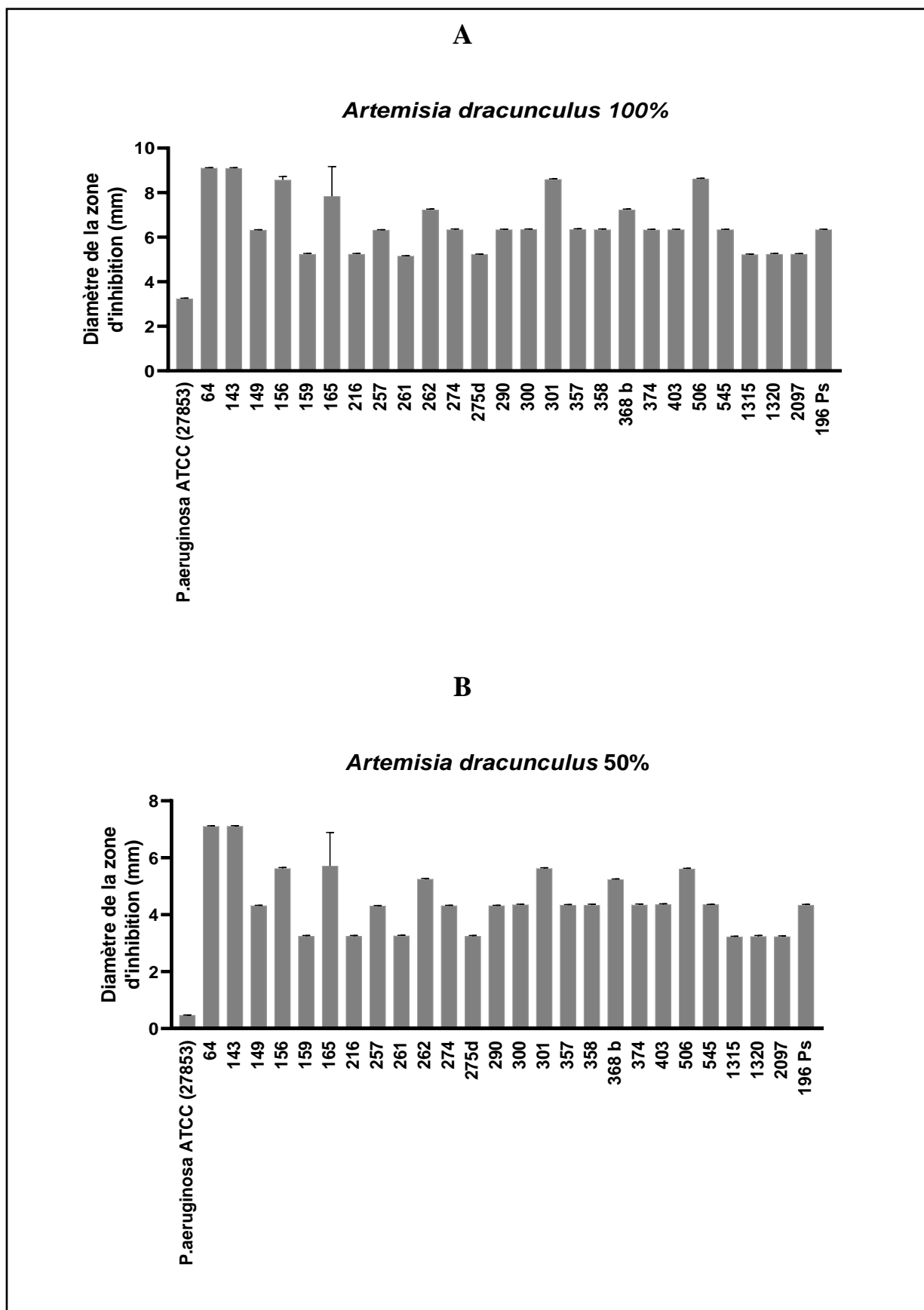
Un ensemble de 26 souches a été le sujet d'étude. La méthode de diffusion sur milieu gélosé a permis de déterminer l'action des 8 huiles essentielles testées sur différentes souches bactériennes. Selon **Swamy et al. (2016)** trois principaux facteurs peuvent influencer les résultats d'un test de l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle : la composition de l'huile essentielle, la solubilité de l'huile essentielle, le type de microorganisme et la vitesse de sa croissance.

6.1. Activité antibactérienne d'*Artemisia dracunculus L.*

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Artemisia dracunculus L.* sont mentionnés dans la figure 52 . Les résultats obtenus de l'huile brute (100%) présentaient des réactions variables des souches vis-à-vis à l'HE de *Artemisia dracunculus L.* et indiquaient que leur profil de résistance aux antibiotiques a beaucoup influencé celui à l'HE testée avec 84.62% de souches résistantes (diamètre <8mm), et 15.38% étaient sensibles (8mm < diamètre <10mm). Il existe une corrélation entre la composition chimique de l'HE et son activité antimicrobienne. Cependant pour les concentrations 50% et 25% toutes les souches étaient résistantes avec des diamètres d'inhibition <8mm. L'analyse statistique des résultats de

Résultats et discussion

l'activité antibactérienne de cette huile a montré une $p < 0.0001$ traduisant des différences significatives entre les résultats.



Résultats et discussion

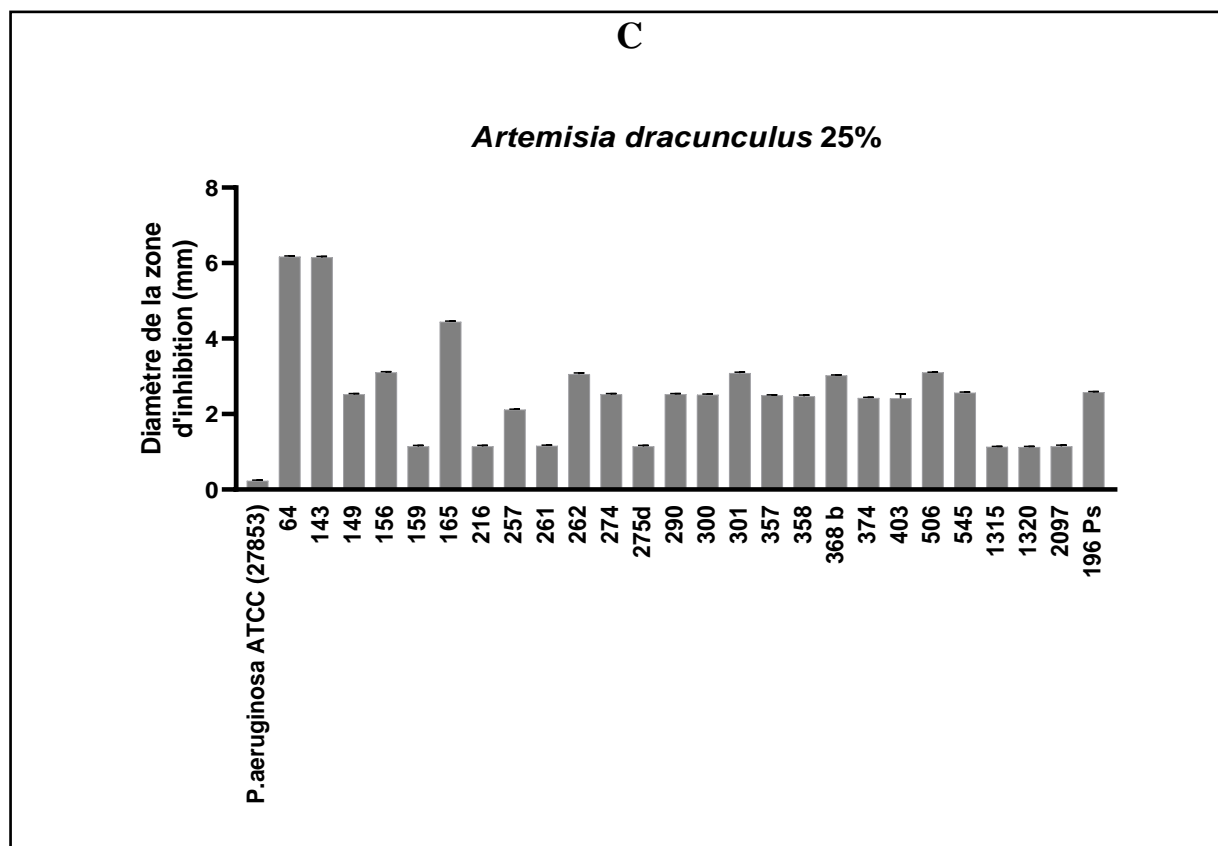


Figure.52. Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE d'*Artemisia dracunculus* L (N=27), A : huile brute (concentration 100%), B : concentration 50%, C : concentration 25%.

L'activité antibactérienne d'*Artemisia dracunculus*L peut être due à certains composés actifs possédant un cycle phénolique, sont considérés comme toxiques pour les micro-organismes et les composés alcaloïdes affectent les protéines extracellulaires et inhibent la croissance de ces derniers (Cowan, 1999). Les degrés variables de résistance des souches étudiées peuvent être dus à la fois à la tolérance intrinsèque des micro-organismes et à la nature et aux combinaisons de phytoconstitués présents dans l'huile essentielle (Norajit *et al.*, 2007).

Plusieurs études ont rapporté que les effets synergiques entre les composés actifs d'une huile essentielle tels que le α -pinène, le β -phellandrène, le linalol, le terpinène-4-ol, le α -terpinéol, le -caryophyllène, le germacrène D et l'oxyde de caryophyllène identifiés dans l'huile essentielle d'*A. dracunculus* peuvent participer à son action antimicrobienne (Liu *et al.*, 2018).

Osanloo *et al.* (2020) dans leur étude sur les HE des plantes médicinales ont indiqué l'effet bactéricide de l'HE d'*Artemisia dracunculus* sur la croissance de *P.aeruginosa*. Ainsi, l'HE d'*Artemisia dracunculus* avait un effet antibactérien contre la croissance de *P. aeruginosa*. Ainsi, l'HE d'*Artemisia dracunculus* avait un effet antibactérien contre la croissance de *P.*

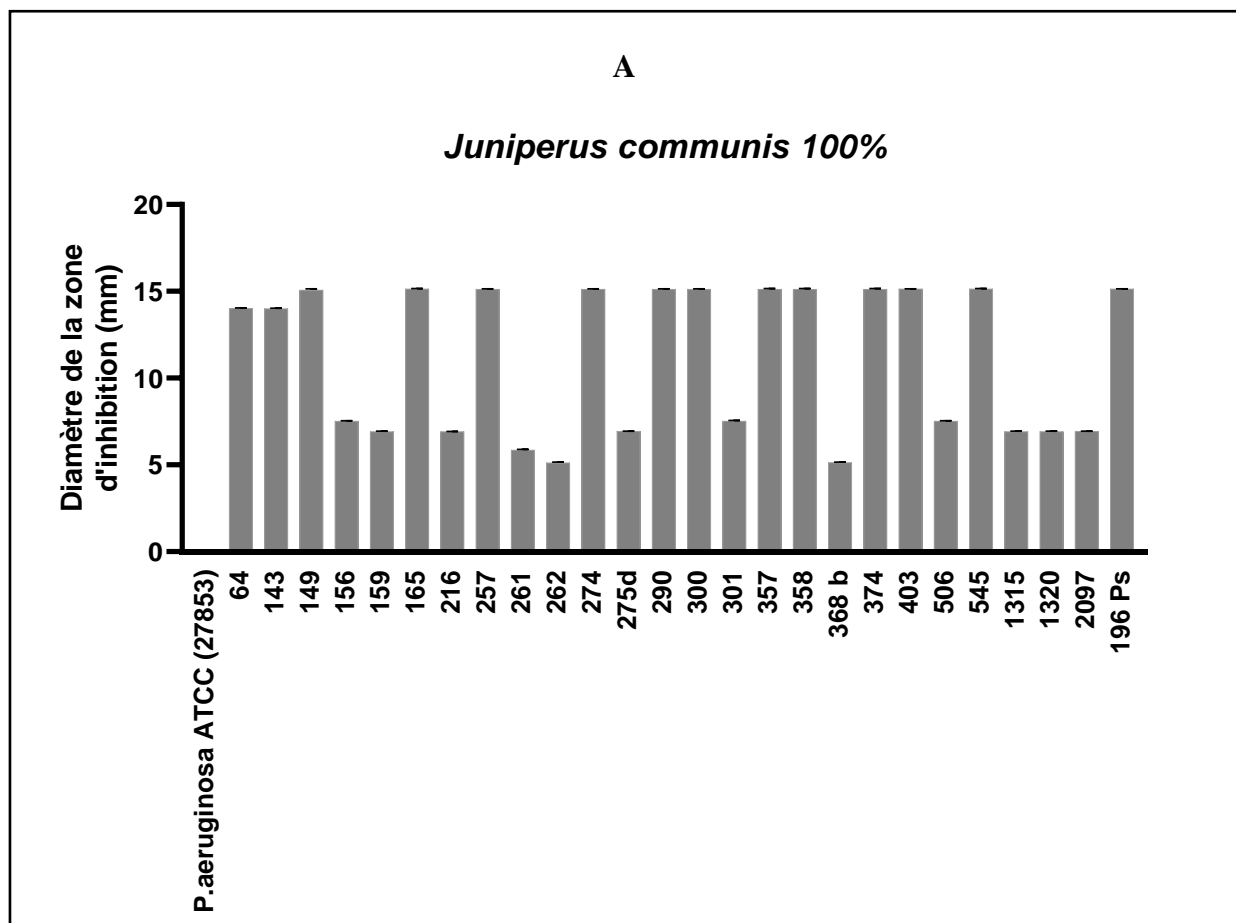
Résultats et discussion

aeruginosa (Abdollahnejad *et al.*, 2016). Et Ribeiro *et al.* (2016) ont indiqué une sensibilité de *P.aeruginosa* MDR à l'extrait hydroéthanolique d'estragon.

Mais Behbahani *et al.* (2017) ont signalé une résistance remarquable de *P.aeruginosa* contre l'HE d'estragon avec ses différentes concentrations. De même (Petrosyan *et al.*, 2018) ont trouvé une faible sensibilité à cette huile de *P.aeruginosa* étudié. Les huiles essentielles des parties aériennes d'*Artemisia arborescens* et d'*Artemisia judaica* ont montré une capacité antibactérienne réduite contre *P. aeruginosa*, *E. coli* et *E. cloacae* (Janačković *et al.*, 2015).

6.2. Activité antibactérienne de *Juniperus communis*

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de *Juniperus communis* sont indiqués sur la figure 53. Suivant les diamètres d'inhibition obtenus 53.85% des souches étudiées étaient très sensibles à l'HE testée (<16mm) pour les différentes concentrations ce qui reflète l'action bactéricide des composés actifs de l'HE de *J. communis*. Le reste des souches présentait une résistance avec des diamètres <8mm. L'huile brute a montré plus d'inhibition par rapport aux autres concentrations (50% et 25%). Les résultats étaient statistiquement différents avec $p < 0.0001$.



Résultats et discussion

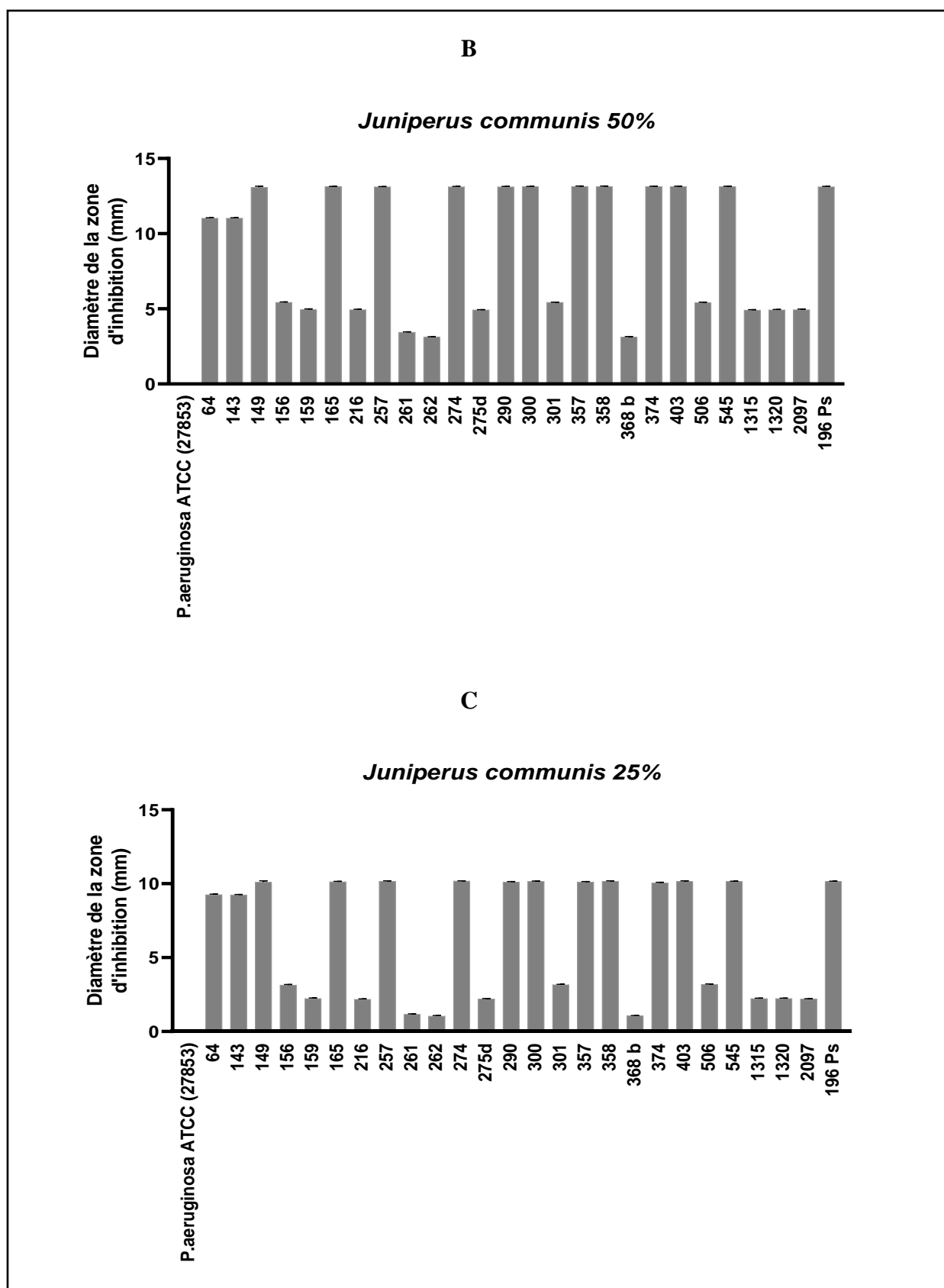


Figure.53. Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE de *Juniperus communis* (N=27), A : huile brute (concentration 100%), B : concentration 50%, C : concentration 25%.

Résultats et discussion

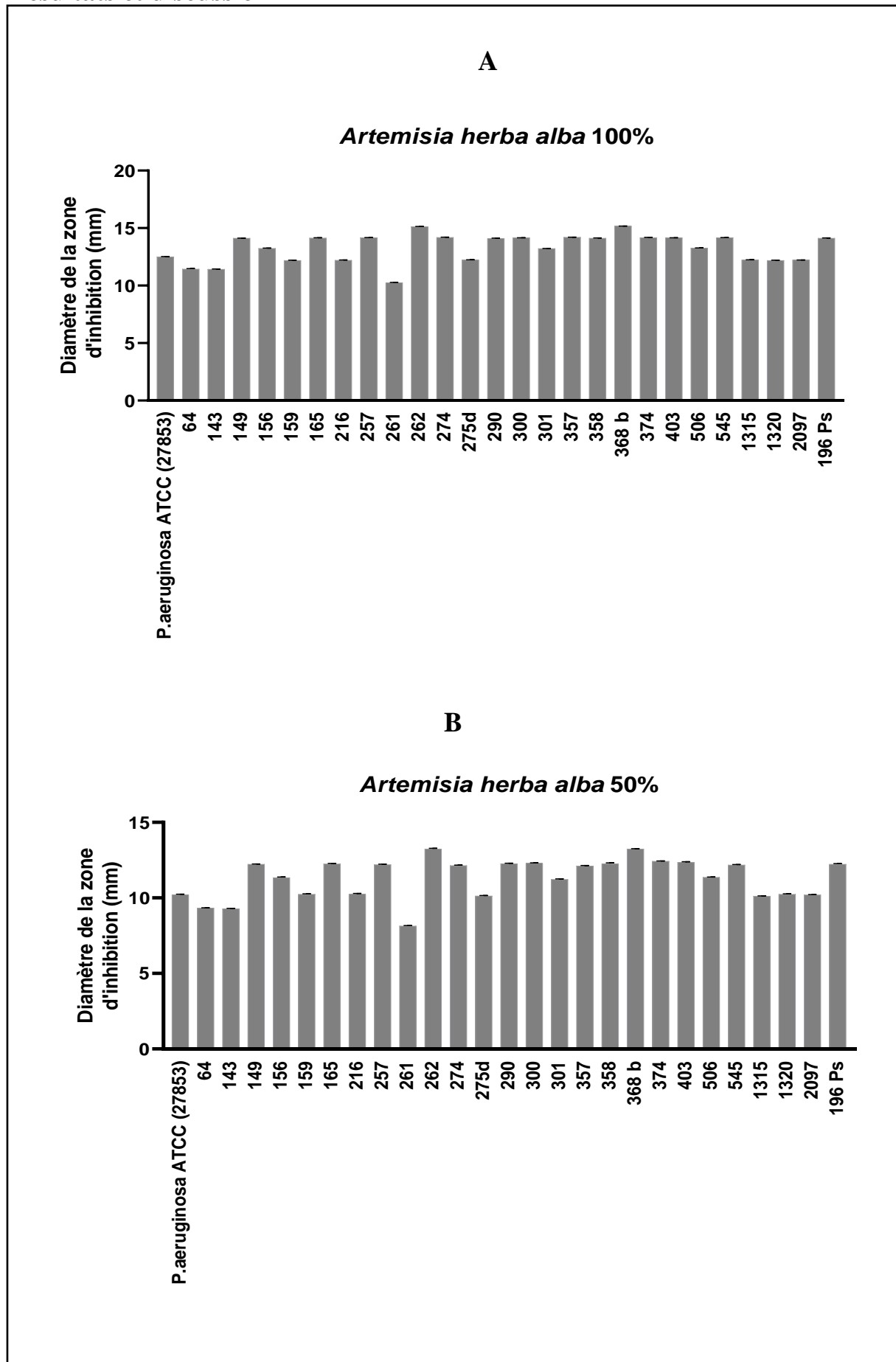
Les fractions les plus actives de l'huile essentielle de *J. communis* α -pinène et sabinène ont inhibé plusieurs souches bactériennes, *P. aeruginosa* DV5999 était le germe le moins sensible à tous les échantillons de l'HE du Genévrier commun. (Glišić *et al.*, 2007). Angioni *et al.* (2003) ont rapporté que l'activité antimicrobienne des huiles de *Juniperus communis* était généralement réduite contre *P.aeruginosa*, ce qui est en accord avec nos résultats. *P.aeruginosa* est connu pour avoir un niveau élevé de résistance intrinsèque à pratiquement tous les antibactériens et antibiotiques connus en raison de sa barrière membranaire très restrictive. L'HE de *Juniperus communis* inhibait les isolats cliniques de *P. aeruginosa* formatrices de biofilm (Camporese, 2013). L'huile essentielle de genévrier possède une activité bactéricide contre les souches bactériennes Gram-négatives testées (Pepeljnjak *et al.*, 2005). Mais pour l'HE du genévrier poussant à l'état sauvage au Kosovo de *P.aeruginosa* en était résistant pour les trois concentrations testées (1mg/l, 3mg/l et 5mg/l) (Haziri *et al.*, 2013).

6.3. Activité antibactérienne d'*Artemisia herba alba*

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE d'*Artemisia herba alba* sont regroupés dans la figure 54. Les résultats ont montré que l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* avait une activité antibactérienne variable contre toutes les souches testées. Les zones d'inhibition étaient de l'ordre de 10.23-15.18mm pour l'huile brute et entre : 8.12-13.28 mm et 6.2-11.28mm pour les concentrations 50% et 25% respectivement. Tous les résultats étaient statistiquement différents avec $p < 0.0001$. La quasi-totalité des souches basculaient entre sensibles et très sensibles pour les différentes concentrations, sauf 3 souches qui ont été résistantes (< 8 mm) pour la concentration 25%. D'après Ponce *et al.* (2003), toutes les souches étudiées étaient entre sensibles et très sensibles ce qui traduit l'efficacité antibactérienne de cette huile.

L'activité antibactérienne de l'HE d'*Artemisia herba alba* serait liée à ses composants monoterpènes oxygénés, diterpènes et sesquiterpènes (Zouari *et al.*, 2010). De plus, le camphre qui est le composant le plus abondant de l'HE d'*Artemisia herba-alba* présente une activité bactériostatique contre *P.aeruginosa* (Imelouane *et al.*, 2010). Le 1,8-cinéole un autre composant majeur de l'HE d'*Artemisia herba alba* a déjà été démontrées comme ayant de puissantes activités antimicrobiennes *in vitro* (Kordali *et al.*, 2005).

Résultats et discussion



Résultats et discussion

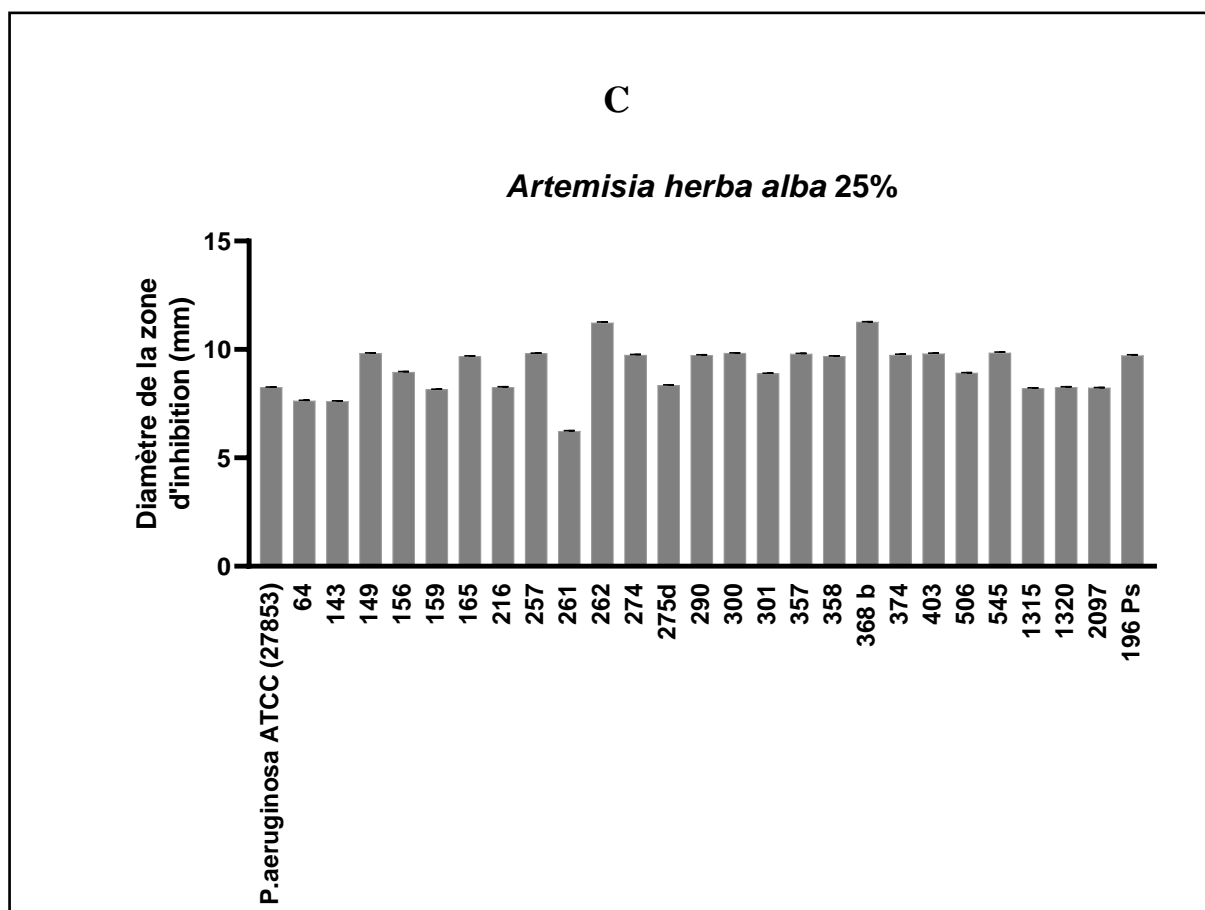


Figure.54. Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE d'*Artemisia herba alba* (N=27), A : huile brute (concentration 100%), B : concentration 50%, C : concentration 25%..

Certaines études ont montré que ces composés diffusent et endommagent l'intégrité et la fonction de la membrane cellulaire, modifient le potentiel membranaire, provoquent une perte du contenu cytoplasmique et entraînent des déficits du métabolisme énergétique et respiratoire dans les mitochondries (**Bakkali et al., 2008**). Sans oublier que l'efficacité biologique des huiles essentielles est liée à leurs différents constituants chimiques (majeurs, mineurs et leurs rapports mutuels) agissant soit de manière synergique, soit de manière antagoniste avec les composants majeurs (**Pavela et al., 2014**). La littérature actuelle rapporte le potentiel important de l'HE d'*A. herba-alba* comme agent antimicrobien contre les bacilles Gram-négatif (**Della Pepa et al., 2019**). En parallèle, les résultats obtenus par **Eltawaty et al. (2020)** ont montré une inhibition de la croissance des isolats cliniques de *P. aeruginosa* testés avec des diamètres d'inhibition 15,8 mm respectivement. En outre, l'activité antimicrobienne des huiles d'*A. herba-alba* originaires du sud de la Tunisie a été évaluée et les résultats ont montré qu'elles étaient actives contre les micro-organismes testés (**Mighri et al., 2010**).

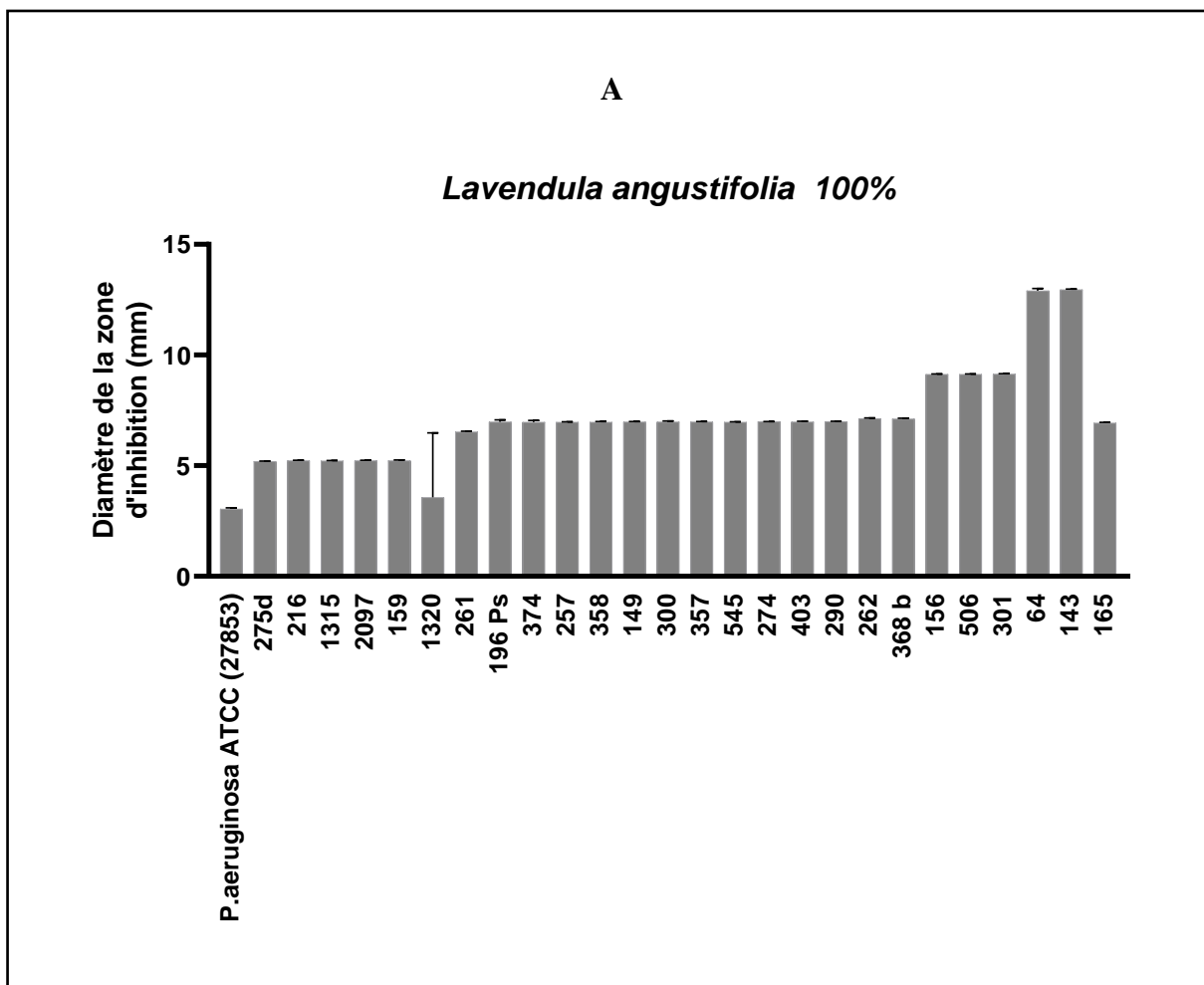
Résultats et discussion

Par contre, **Lakehal et al. (2017)** ont rapporté la résistance de *P.aeruginosa* à l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* avec a été une zone d'inhibition de 6mm. De même, l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* collectée du sud de la Tunisie était inactive sur *P. aeruginosa* (**Akrouit et al., 2010**) et celle collectée au Maroc, a montré une faible activité contre *P. aeruginosa* MDR (**Ed-Dra et al., 2021**).

6.4. Activité antibactérienne de *Lavandula angustifolia*

La figure 55 englobe les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE de *Lavandula angustifolia*.

L'HE de *Lavandula angustifolia* a montré une faible activité antibactérienne avec 84.62% des souches étaient résistantes dont leurs diamètres d'inhibition étaient <8mm et cela pour les différentes concentrations (100%, 50% et 25%). Le reste des souches étudiées présentaient un profil sensible avec moins de 13 mm de diamètre dans leurs zones d'inhibitions. Les résultats présentaient une différence statistique ($p < 0.0001$).



Résultats et discussion

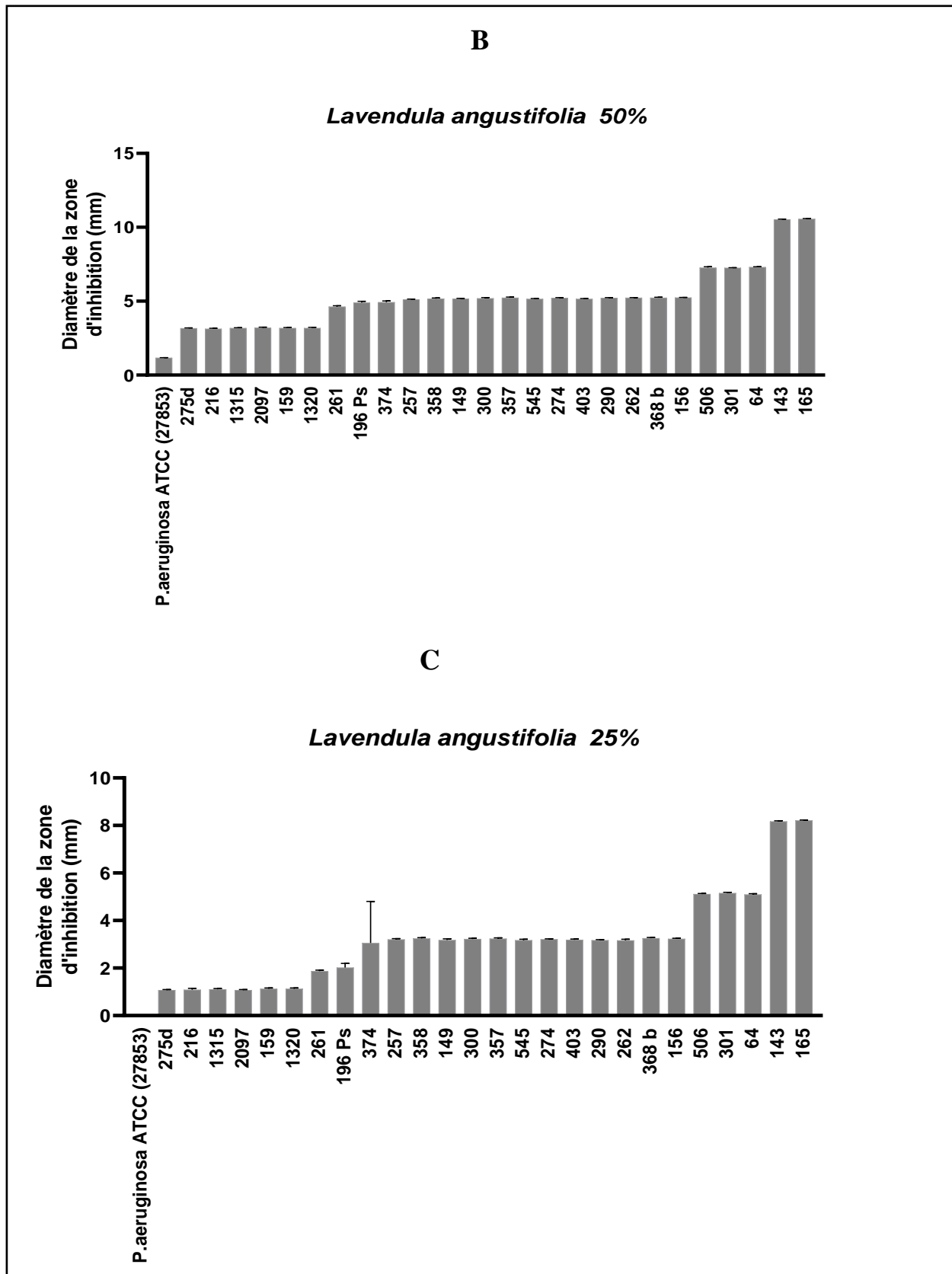


Figure.55. Activité antibactérienne des différentes concentrations de l’HE de *Lavandula angustifolia* (N=27), A : huile brute (concentration 100%), B : concentration 50%, C : concentration 25.

Résultats et discussion

Mahboobi et al. (2006) dans leur étude sur l'effet antibactérien des HEs, ont trouvé une grande activité bactéricide de l'HE de la lavande contre des souches MDR de *P. aeruginosa*. L'HE de *Lavandula angustifolia* a montré une bonne activité antibactérienne contre une gamme de bactéries, y compris *P. aeruginosa* (**Moon et al., 2004**).

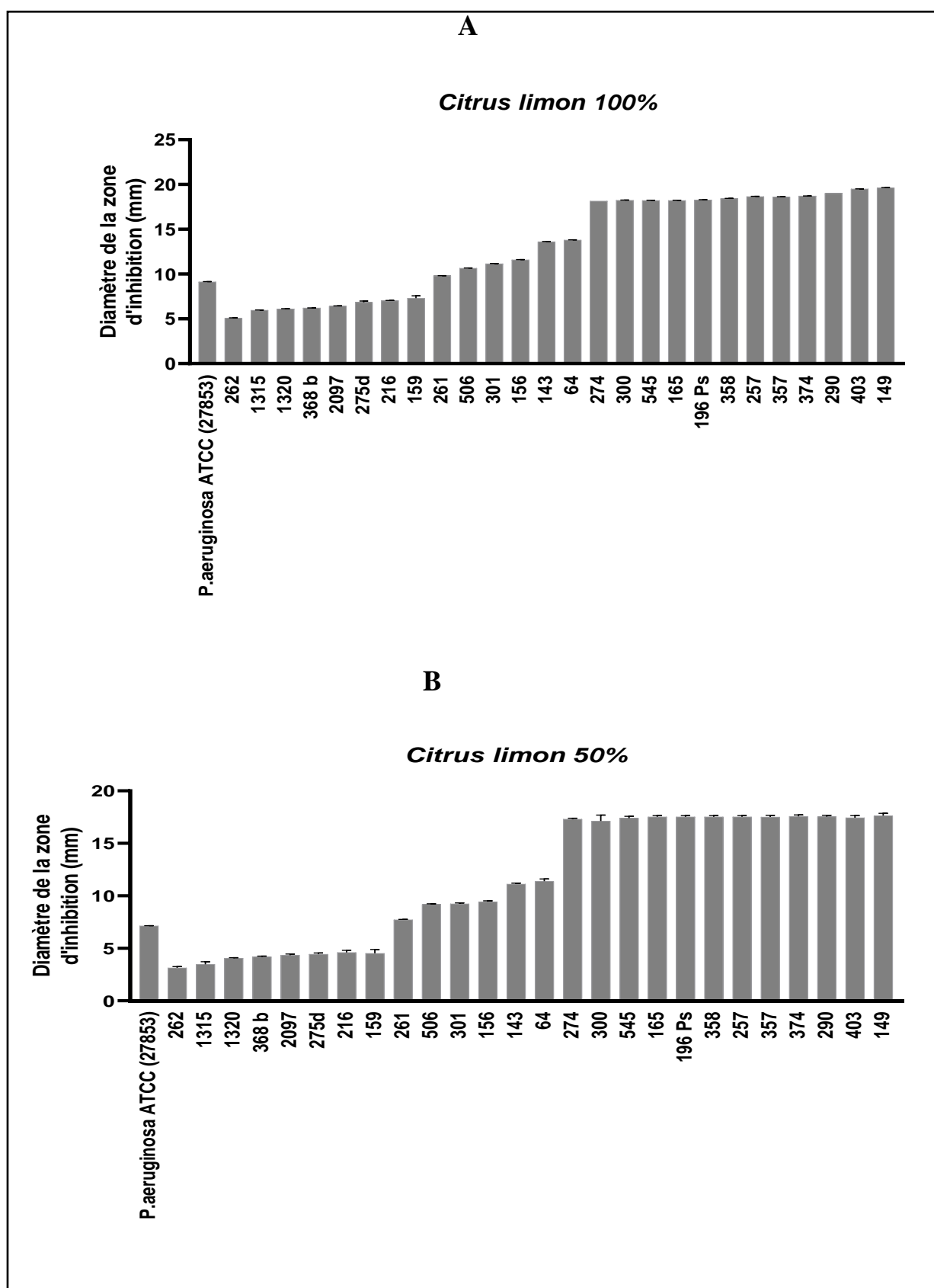
L'HE extraite de *L. angustifolia* collectée au Maroc a démontré la plus grande efficacité contre *P. aeruginosa* (**Moussi et al., 2019**). L'HE de la lavande avait une inhibition importante de la croissance des bactéries Gram-négatives (**Predoi et al., 2018**). Aussi **Andrrys et al. (2017)** dans leur étude sur plusieurs HE de *L. angustifolia* soumises à différentes conditions de culture ont montré une grande action antibactérienne sur les souches de *P.aeruginosa* testées. L'activité bactéricide des HE pourrait représenter une solution possible contre la diffusion toujours plus importante de la résistance aux antimicrobiens liée au mésusage des antibiotiques dans la pratique humaine et vétérinaire (**Amuka et al., 2013**). Il a été montré que la présence d'une grande quantité de composés phénoliques actifs dans l'HE tels que le linalol et l'acétate de linalyle présentait de fortes propriétés antimicrobiennes (**Sienkiewicz et al., 2011**). L'huile essentielle de sources naturelles peut traverser avec succès les parois cellulaires des bactéries et leur membrane cytoplasmique en induisant des troubles des macromolécules (acides gras, polysaccharides et phospholipides) (**Bakkali et al., 2008**). Les principaux composants actifs identifiés dans cette huile sont le linalol, l'acétate de linalyle, le caryophyllène, le terpinène-4-ol le bornéol, α -pinène, et terpinéol, ils sont considérés par un certain nombre d'études comme possédant un fort effet antimicrobien (**Blazekovic et al., 2011 ; Jianu et al., 2013**).

Une faible inhibition de la croissance de *P. aeruginosa* de l'HE de la lavande (**Prabuseenivasan et al., 2006**). Tous les isolats de *P. aeruginosa* étaient résistants même à la concentration la plus élevée de l'HE de *Lavandula angustifolia* (**Hossain et al., 2017**). Dans une étude australienne, l'HE de la lavande n'a pas montré aucune efficacité contre la croissance de *P. aeruginosa* (**Moon et al., 2006**). Dans l'étude de **Chemloul (2014)**, *Lavandula angustifolia* n'a pas montré une activité élevée contre les bactéries testées. *P.aeruginosa* était moins sensible à l'action de l'HE de la lavande dans l'étude de **Perovic et al. (2019)**.

Résultats et discussion

6.5. Activité antibactérienne de *Citrus limon*

Les résultats de l'activité antibactérienne sont donnés dans la figure 56



Résultats et discussion

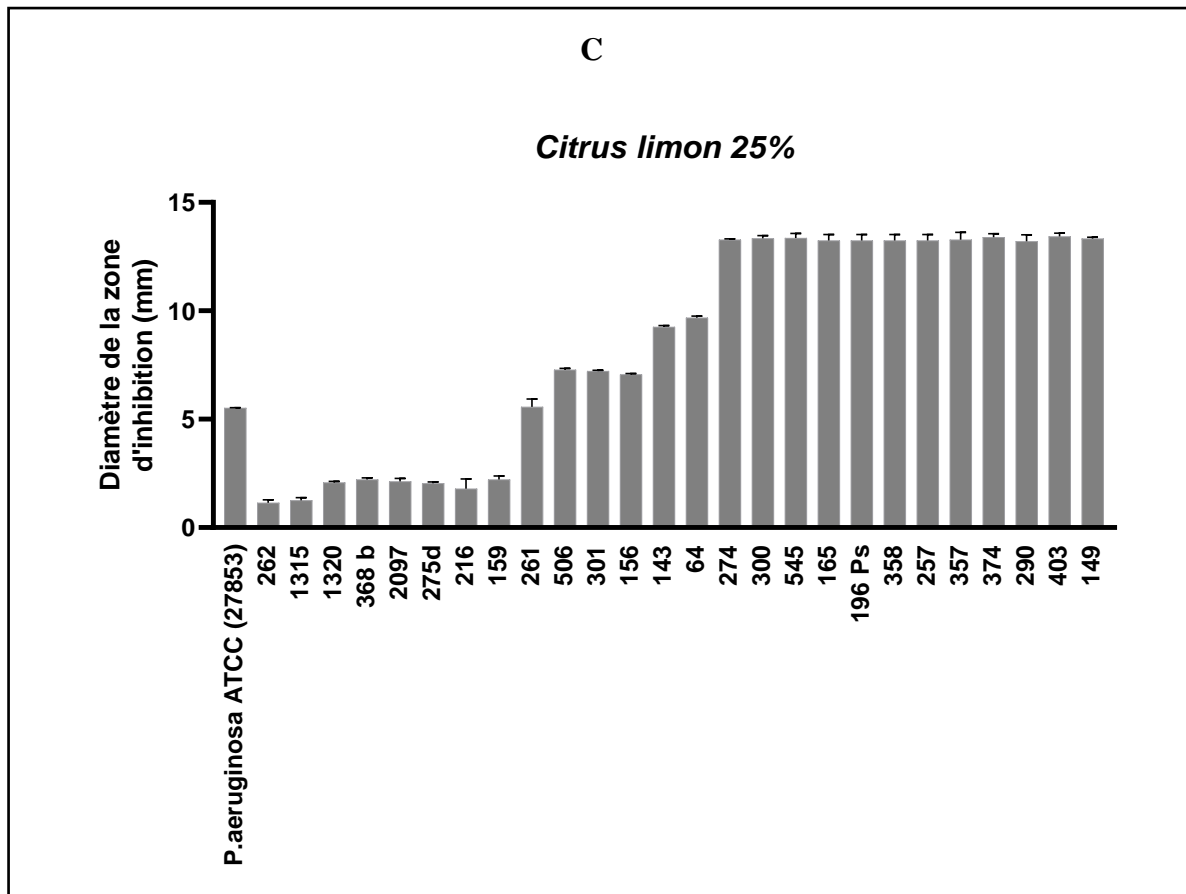


Figure.56. Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE de *Citrus limon* (N=27), A : huile brute (concentration 100%), B : concentration 50%, C : concentration 25%.

. Nos résultats montrent que les isolats MDR de *P.aeruginosa* ont montré une divergence dans leurs zones d'inhibition en contact avec l'HE de *Citrus limon*. Entre les trois concentrations testées les diamètres d'inhibition se situaient entre 1 et 19.65 mm ce qui permet de classer les souches en trois catégories : résistantes, sensibles et très sensibles. Pour la concentration 100% un total de 8 souches ont été résistantes, 10 souches résistantes pour la concentration 50% et pour la concentration 25%, 12 souches en ont été résistantes. Et donc la concentration 100% est celle qui avait plus d'effet inhibiteur sur la croissance des souches étudiées.

Il a été montré que de nombreuses huiles essentielles promettent une activité antimicrobienne importante contre les agents pathogènes nocifs qui résistent aux antibiotiques couramment utilisés, où ces huiles contiennent plusieurs composés actifs qui portent différents groupes fonctionnels qui leur font jouer un rôle important dans la lutte contre les agents pathogènes (Mimica-Dukic *et al.*, 2003).

Résultats et discussion

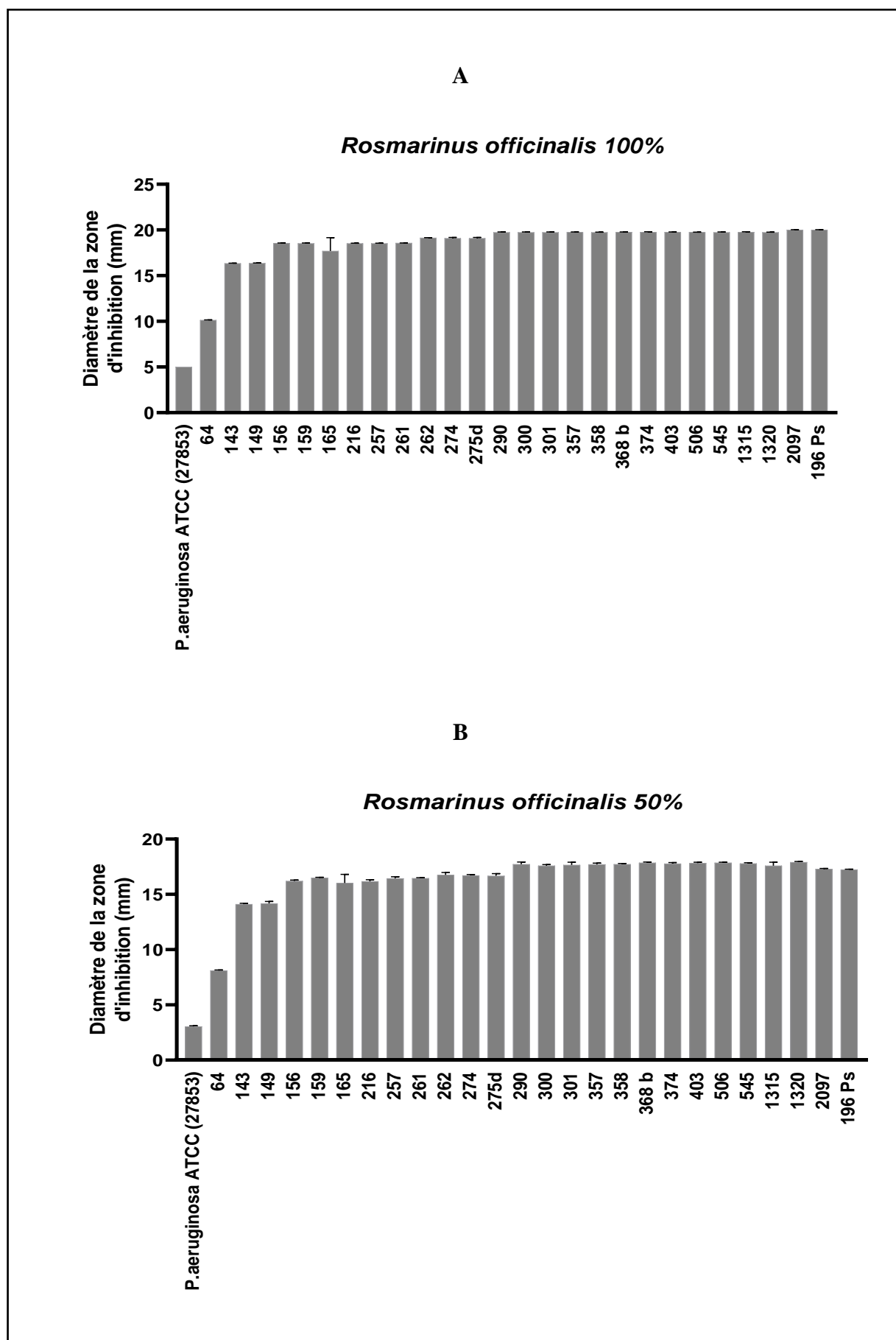
Les huiles essentielles d'agrumes représentent une classe importante de substances chimiques sécrétées par les plantes, présentant plusieurs avantages pour la santé humaine. Les principaux composés de l'huile essentielle de citron se sont avérés être le limonène (37,5%), β -pinène (17,9%) et α -pinène (Nikolić *et al.*, 2017). Les résultats de la majorité des études ont montré que l'huile essentielle de citron avait une certaine activité antimicrobienne associée aux composants phytochimiques monoterpéniques ou sesquiterpénique et leurs dérivés oxygénés. Cette huile hydrophobe peut atteindre l'espace périplasmique des cellules bactériennes à travers les protéines porines (Lambert *et al.*, 2001).

Les huiles essentielles de *Citrus limon* de Roumanie ont été les plus actives contre un certain nombre d'agents pathogènes (Man *et al.*, 2019). Osanloo *et al.* (2020) ont trouvé une activité antibactérienne de l'HE de *Citrus limon* contre *P. aeruginosa*. L'HE du citron présentait une grande activité antibactérienne contre *P. aeruginosa* (Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Nos résultats sont en accord avec les résultats d'une étude montrant que l'extrait de citron était très efficace à toutes les concentrations utilisées (25 %, 50 %, 75 % et 100 %) sur tous les *Pseudomonas aeruginosa* isolées chez des brûlés et la zone d'inhibition la plus élevée était de 45, 40, 30 et 25 mm pour des concentrations de 100 %, 75 %, 50 % et 25 % (v/v) respectivement (Basam *et al.*, 2018). En outre, l'HE de *Citrus limon*, extrait par hydrodistillation de citron récolté dans la région de Takariet wilaya de Bejaia, a montré une activité antimicrobienne importante sur des souches bactériennes à Gram négatif testées notamment *P. aeruginosa*. (Himed *et al.*, 2016). Cependant, Hammer *et al.* (1999) ont montré une faible efficacité de l'HE de *Citrus limon* contre *P. aeruginosa*.

6.6. Activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis L*

Les résultats de l'activité antibactérienne sont présentés dans la figure 57. L'HE de *Rosmarinus officinalis L* a montré une grande efficacité contre les souches étudiées dont la majorité étaient très sensibles (<20mm) et deux souches extrêmement sensibles sauf pour la souche de référence qui a été résistante à toutes les concentrations testées et seule une souche MDR était résistante à la concentration 25%. La concentration qui a le plus grand effet antibactérien était 100%. Les résultats obtenus pour l'huile de *Rosmarinus officinalis L* étaient statistiquement différents $p < 0.000.1$.

Résultats et discussion



Résultats et discussion

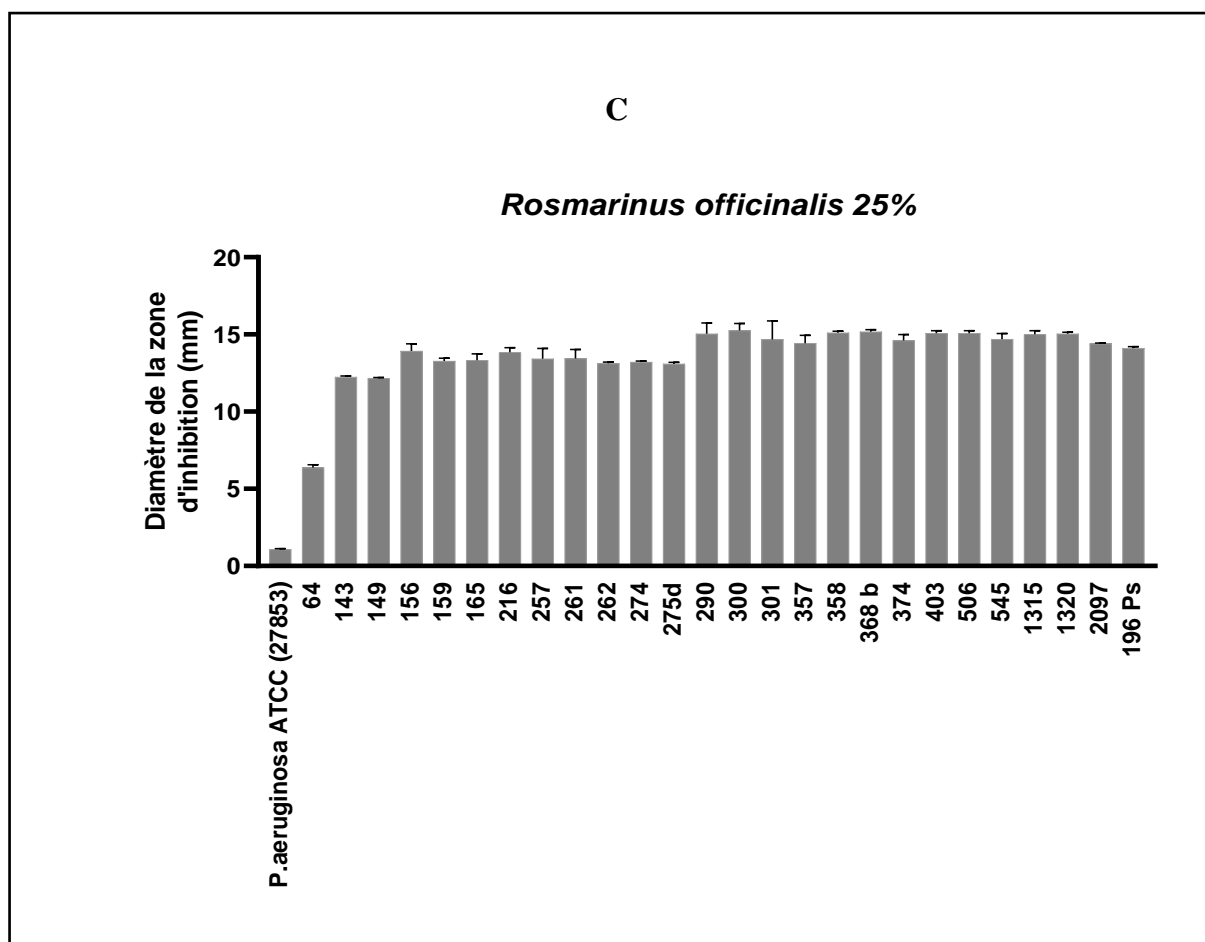


Figure.57. Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE de *Rosmarinus officinalis* L (N=27), A : huile brute (concentration 100%), B : concentration 50%, C : concentration 25%.

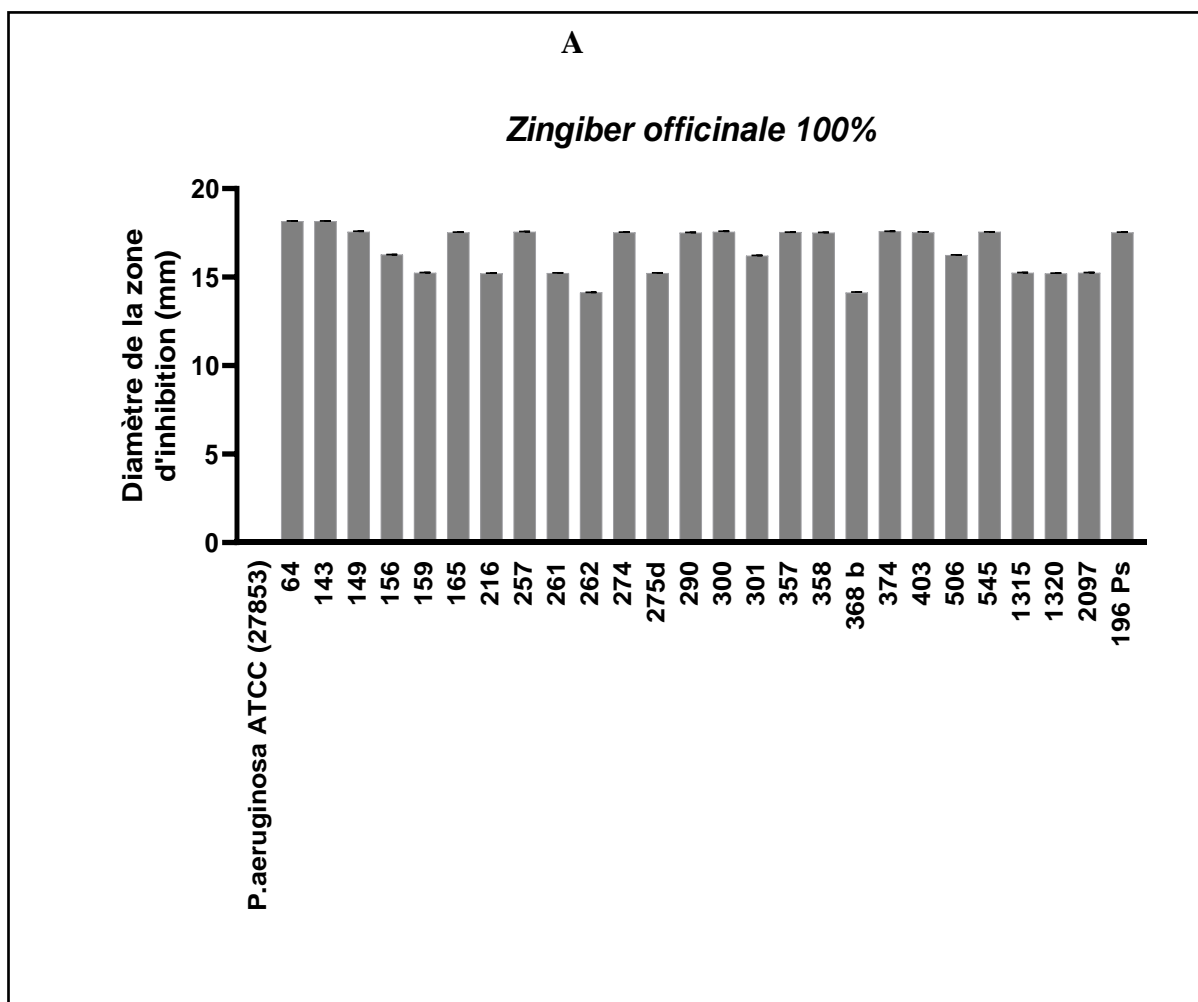
Les métabolites secondaires du romarin tels que les diterpènes phénoliques, le carnosol, l'acide carnosique, le carnosate de méthyle, le rosmanol et l'épirosmanol, et les acides phénoliques tels que les acides férulique, rosmarinique, chlorogénique et caféique, possèdent diverses activités biologiques, notamment l'activité antimicrobienne (**Klancnik et al., 2009**). L'action antibactérienne des huiles essentielles est due à des mécanismes différents, où le plus documenté est la rupture de la membrane cellulaire par les composés lipophiles. Les terpènes et les terpénoïdes sont des composés lipophiles qui traversent la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique, provoquant une perturbation de leur structure, altérant leur perméabilité. La perméabilisation génère généralement une cascade de réactions, parmi lesquelles on peut citer : la perte d'ions, la diminution du potentiel membranaire et l'effondrement des pompes à protons (**Dreger and Wielgus, 2013**).

Résultats et discussion

Mourad et al. (2016) ont trouvé une activité très élevée de l'HE du romarin contre *P. aeruginosa*. Les résultats de l'étude démontrent que l'huile essentielle de **Saviuc et al. (2016)** *Rosmarinus officinalis* et l'un de ses composés majoritaires, le 1,8-cinéole (eucalyptol) présentait une très bonne activité antimicrobienne contre les souches de *P. aeruginosa* MDR.. Une activité antibactérienne très élevée de l'HE du romarin inhibant la croissance de *P. aeruginosa* (**Prabuseenivasan et al., 2006**). Ainsi que **Araby and El-Tablawy. (2016)** ont rapporté une activité antibactérienne élevée de l'HE du romarin contre tous les isolats cliniques de *P. aeruginosa* testés (MDR), avec une zone d'inhibition entre 13-30 mm. Toutefois, il a été constaté que l'activité de l'extrait de *Rosmarinus officinalis* était modérée contre les isolats de *P. aeruginosa* (**Manilal et al., 2021**)

6.7. Activité antibactérienne de *Zingiber officinale*

Les résultats de l'activité antibactérienne sont donnés dans la figure 58.



Résultats et discussion

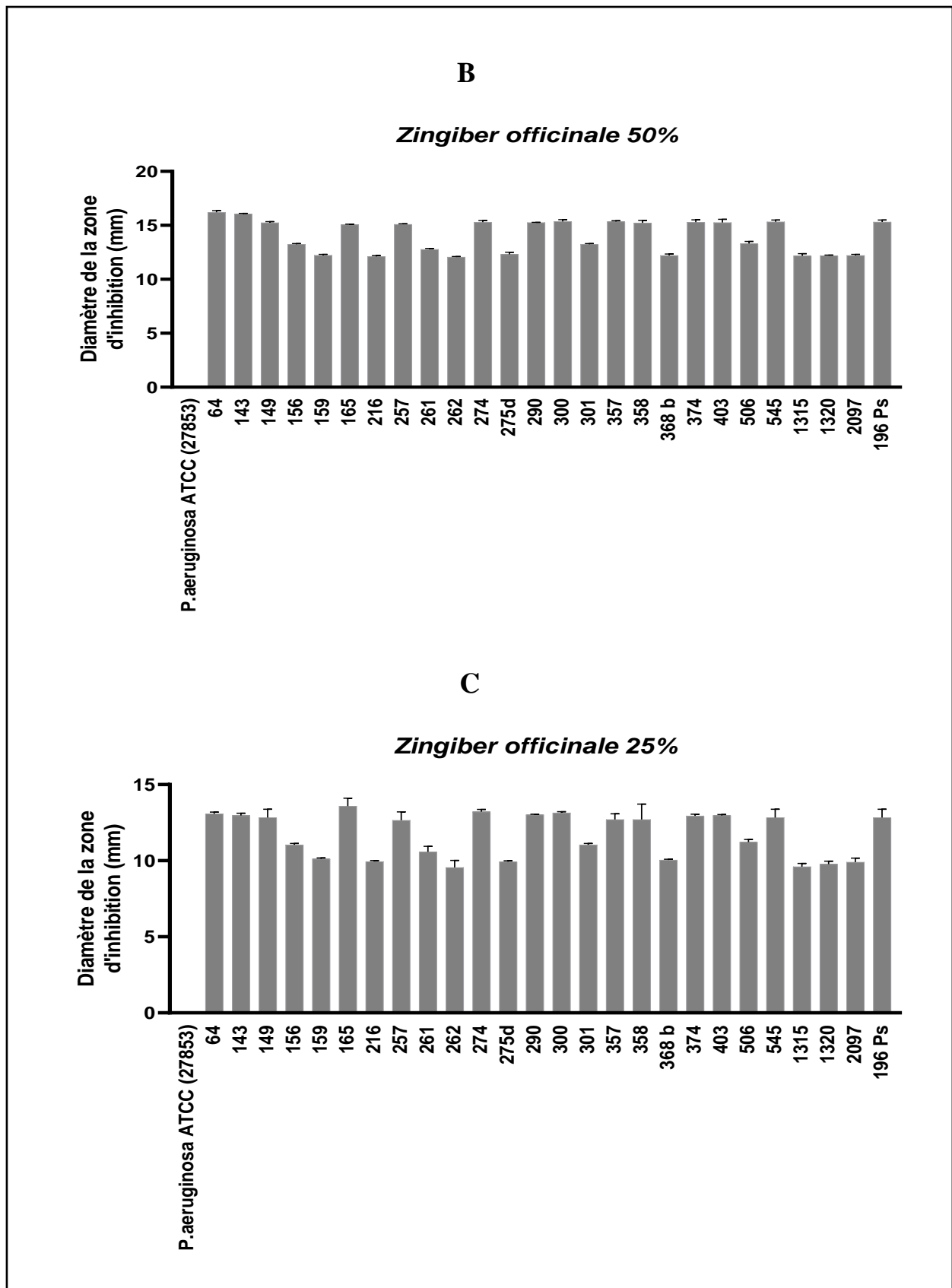


Figure.58. Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE de *Zingiber officinale* (N=27), A : huile brute (concentration 100%), B : concentration 50%, C : concentration 25%.

Résultats et discussion

Les résultats indiquaient de grands niveaux de sensibilité envers l'huile de gingembre testée de l'ensemble souches bactériennes. Toutes les souches étaient entre sensibles et très sensibles envers toutes les concentrations utilisées de l'HE du *Z.officinale* où les diamètres d'inhibition variaient de 9.04 mm à 18.17 mm. Mais, la souche de référence a présenté une résistance totale vis-à-vis cette huile avec ses différentes concentrations.

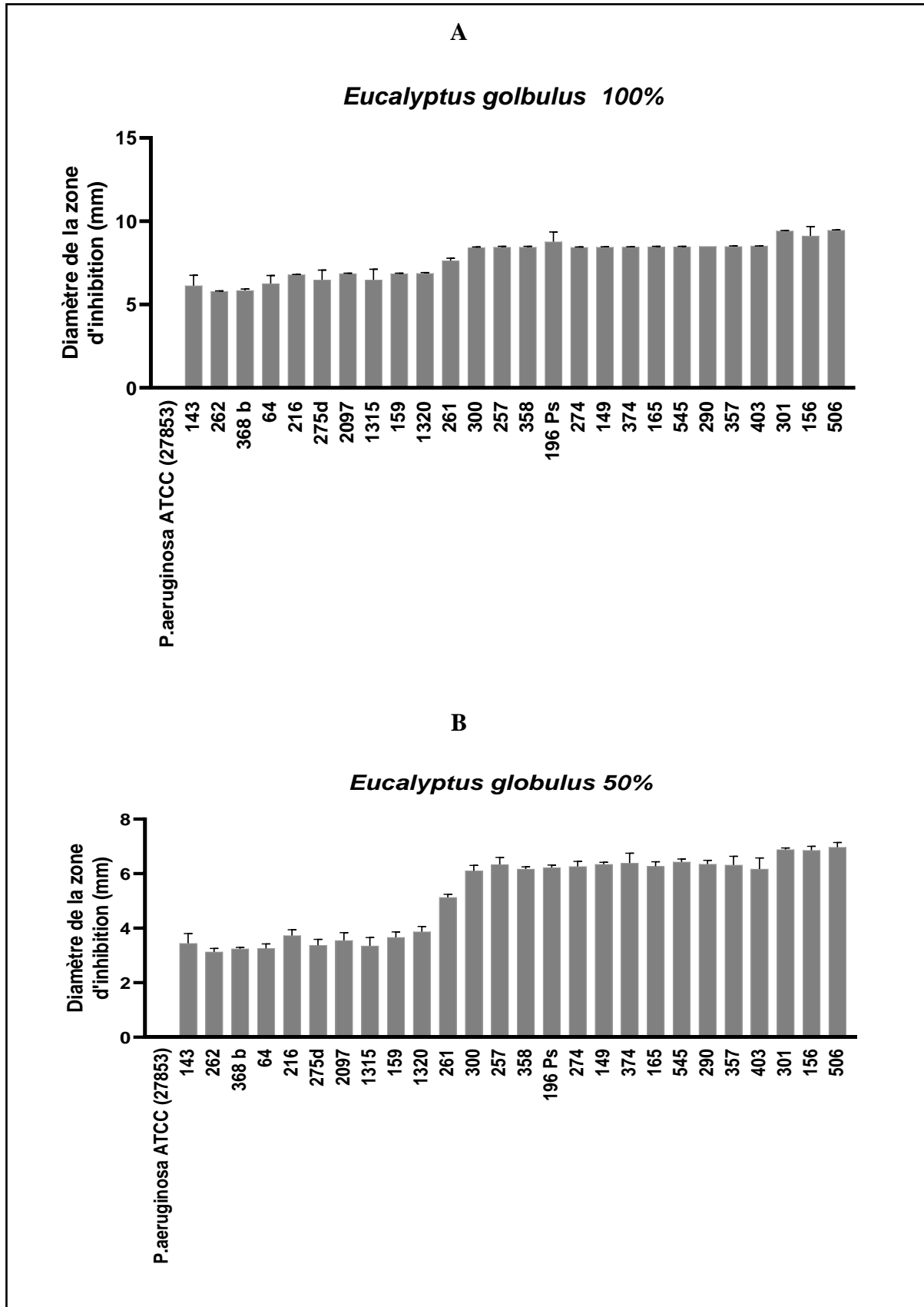
L'activité antimicrobienne remarquable des huiles essentielles et des extraits des plantes peut être due à des composés phénoliques et que l'huile essentielle de gingembre contient des quantités considérables de composés phénoliques (eugénol, shogaols, zingérone, gingérodols, gingérols, etc.), qui pourraient être responsables de cette puissance antimicrobienne (**Singh et al., 2008**). L'huile testée démontre une onhibition des souches étudiées cela laisse suggérer l'existence de cibles cellulaires, comme la membrane plasmique, puisque les constituants des huiles essentielles ont des propriétés lipophiles qui interagissent avec les membranes en modifiant leur fluidité et leur perméabilité (**Berger, 2007**).

Sharma et al. (2016) ont rapporté que les micro-organismes étaient plus sensibles à l'HE de gingembre que la tétracycline et le fluconazole utilisés comme contrôle positif. **Hassan et al. (2017)** ont démontré que *P. aeruginosa* était plus sensible à l'huile de gingembre. Les résultats obtenus dans notre étude corroborent ceux de qui ont observé que l'HE de gingembre présentait un effet inhibiteur maximal contre *P. aeruginosa* (**Mourad et al., 2016**). *Z.officinale* s'est avéré efficace pour inhiber la croissance de *P. aeruginosa* et provoque également l'inhibition de la formation de biofilm par ce germe (**Chakotiya et al., 2017**). Cela présente son potentiel contre *P. aeruginosa*, ce qui indique son utilité supplémentaire pour cibler les infections causées par cette bactérie au niveau préclinique et clinique. De même, **Osanloo et al. (2020)** ont rapporté l'inhibition de la croissance de *P. aeruginosa* par sous l'effet de l'HE de *Zingiber officinale*. L'extrait de *Zingiber officinale* a montré une faible activité antibactérienne contre les souches de *P. aeruginosa* (**Islam et al., 2014**). L'huile essentielle de rhizomes de *Zingiber officinale* du Brésil avec comme principaux composants α -zingiberène, α -farnésène, β -bisabolène et géraniol avait les diamètres de zone d'inhibition moins élevés pour *P. aeruginosa* (**Mesomo et al., 2013**). En outre, chez des bacilles Gram-négatifs, l'HE de *Zingiber officinale* a inhibée leur croissance en raison de la présence de constituants actifs tels que l'endobornéol et le gingérol (**Sivasothy et al., 2011**). Une étude sur 15 souches bactériennes a rapporté des résultats validant l'utilisation de *Z. officinale* comme altérnetaive naturelle pour traiter des maladies d'origine infectieuse possible (**Pfeiffer et al., 2006**).

Résultats et discussion

6.8. Activité antibactérienne d'*Eucalyptus globulus*

La figure 59 comprend les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE d'*Eucalyptus globulus*



Résultats et discussion

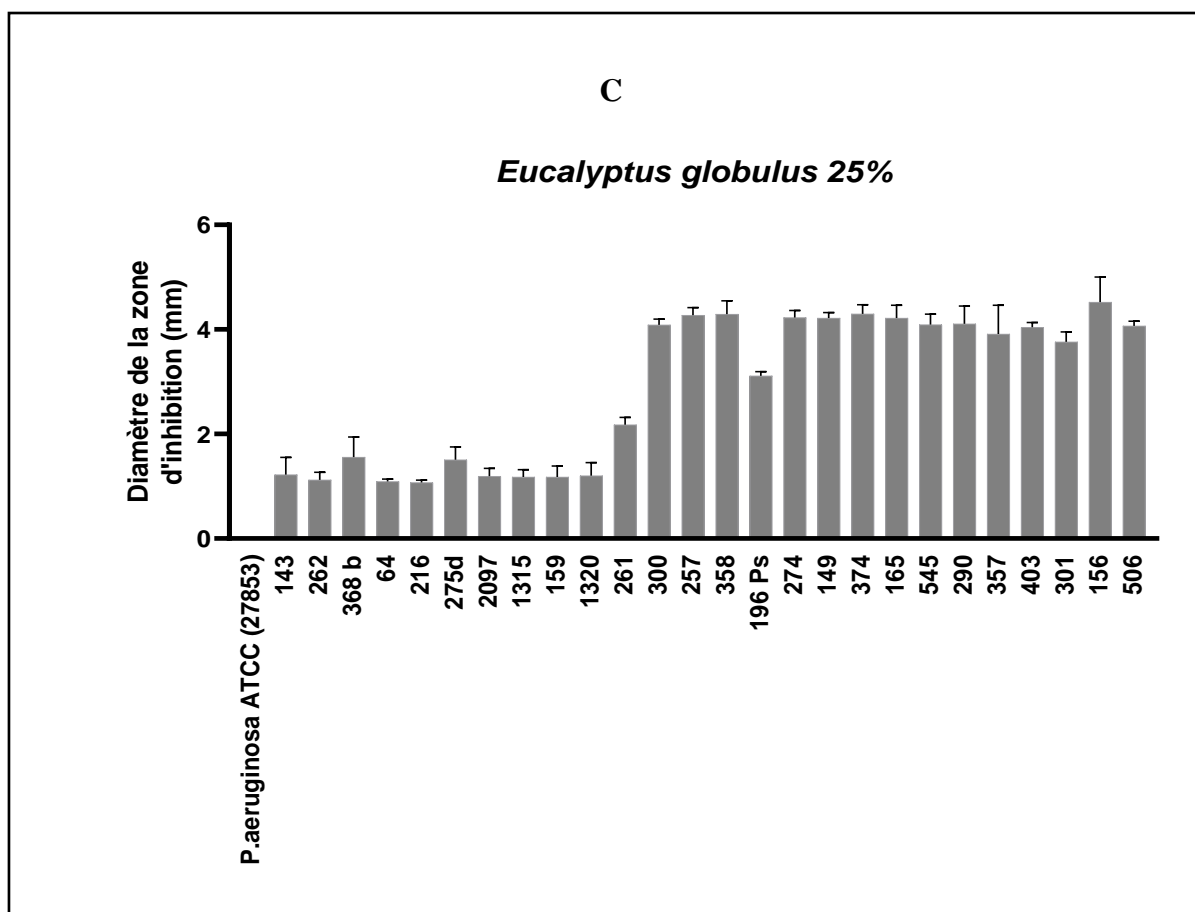


Figure.59. Activité antibactérienne des différentes concentrations de l'HE d'*Eucalyptus globulus* (N=27), A : huile brute (concentration 100%), B : concentration 50%, C : concentration 25%.

La lecture des diamètres des zones d'inhibition a révélé que la croissance de la majorité des souches de *P. aeruginosa* n'a pas été inhibée par l'HE d'eucalyptus. 12/26 souches ont été résistantes à la concentration 100% et le reste des souches étaient sensibles avec des diamètres <10mm. Tandis que pour les concentrations 50% et 25% toutes les souches ont été résistantes. Les résultats étaient statistiquement différents ($p < 0.0001$). Parmi les différentes huiles testées dans ce travail, seule l'HE d'*Eucalyptus globulus* qui a montré le plus faible effet antibactérien. Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles dépendent du type de leurs constituants chimiques et diffèrent par le mode d'action des composants majeurs (Swamy *et al.*, 2016).

Oyedeji *et al.* (1999) ont démontré des activités antibactériennes considérables sur les bactéries à Gram négatif des huiles essentielles de cinq variétés d'eucalyptus du Nigéria. L'huile essentielles d'*Eucalyptus citriodora* a été examinée pour l'activité antibactérienne et la zone d'inhibition pour *P. aeruginosa* était 10.9 ± 0.77 mm (Insuan and Chahomchuen, 2020). Le mécanisme d'action des HE consiste à perturber l'équilibre osmotique ce qui entraîne une perte des composants intracellulaires et provoque la mort cellulaire (Zengin and Baysal, 2014).

Résultats et discussion

Mota et al. (2015) ont présenté le même résultat pour l'HE d'eucalyptus mais **Kesbi (2011)** a rapporté l'efficacité de cette huile sur le *P. aeruginosa* par rapport aux autres bactéries.

L'HE d'eucalyptus était peu active contre *P. aeruginosa* MDR (**Mulyaningsih et al., 2011**). **Mourad et al. (2016)** ont rapporté que l'HE d'eucalyptus n'a pas montré aucune inhibition de la croissance de *P. Aeruginosa*. Selon la Coopération scientifique européenne en phytothérapie L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est particulièrement active contre les bactéries suivantes : *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*. En revanche, elle n'est pas active sur *Escherichia Coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* (**ESCOP, 2009**).

La faible efficacité des Eos est probablement due aux pertes des composés volatils de l'huile essentielle lors du stockage et/ou de l'extraction et à l'évaporation des composants volatils pendant la période d'incubation, ce qui réduirait la concentration des HE, et donc leur activité antibactérienne (**Chemloul, 2014**). Généralement, les huiles essentielles sont peu solubles dans l'eau, ce qui a induit de nombreux problèmes pour étudier leur activité antibactérienne, comme le rapporte **Kezzouna (2015)**.

Les résultats obtenus dans cette section ont permis de confirmer l'activité antibactérienne d'au moins 4 huiles essentielles sur gélose contre les souches MDR de *P.aeruginosa*. Il a été possible de conclure que les huiles essentielles de avaient une très importante activité contre cette bactérie. Trois concentrations ont été testées, les souches de *P.aeruginosa* ont montré une sensibilité pour la concentration 100%.

La différence entre les résultats obtenus pour chaque huile confirme que chaque huile possède un mécanisme d'action particulier et spécifique aux principes actifs et à leur quantité dans l'huile. Tous ces résultats nous révèlent que les HE possèdent effectivement un potentiel antimicrobien important exploitable dans le contrôle de la croissance des bactéries pathogènes et multirésistantes.

Conclusion

Conclusion

La sensibilité réduite aux antibiotiques est un problème mondial croissant et cela a été largement rapporté dans les isolats cliniques de *P.aeruginosa*, ce qui rend l'infection par cette bactérie difficile à traiter. *P. aeruginosa* est devenu résistant à de nombreux antimicrobiens, notamment les carbapénèmes, les aminoglycosides, les fluoroquinolones et la colistine, qui étaient considérés comme les antibiotiques les plus efficaces pour traiter les bactéries multirésistantes. L'Organisation Mondiale de la Santé a inclus cette espèce bactérienne dans le groupe critique de la liste des « agents pathogènes prioritaires, multirésistants aux antibiotiques», considérés parmi les plus menaçants pour la santé humaine et particulièrement dans les structures de soin. La menace persiste plus dans les pays en voie de développement suite à l'automédication, à la vente et la consommation anarchique des antibiotiques en dehors des structures légales.

Notre travail a porté sur un total de 277 isolats de *P. aeruginosa* non dupliqués des prélèvements émanant des services du CHU de Batna à l'Est Algérien. L'identification biochimique (API 20NE) et moléculaire par MALDI-TOF a confirmé la pureté des souches et a révélé une variabilité dans leur biotype. La majorité des isolats ont été détectés dans des prélèvements de pus, chez les patients brûlés de sexe masculin avec un intervalle d'âge de [20-40 ans].

L'étude de la résistance aux antibiotiques *in vitro* a indiqué différents niveaux de résistance selon les familles d'antibiotiques où la rifampicine et les β -lactamines ont enregistré les niveaux les plus élevés suivis par les aminoglycosides, cependant, la colistine et les fluoroquinolones semblaient avoir plus d'action sur nos isolats. On a constaté une prévalence de 26.87% de souches MDR avec l'absence totale de toute souche XDR et PDR.

La propagation des souches de *P. aeruginosa* multirésistantes en particulier celles qui produisent des MBL constitue une réelle préoccupation. Nous avons rapporté un taux de 19,38% de résistance aux carbapénèmes (CRPA) dont 14.1% présentaient une production de carbapénémase de type VIM-4. Ces souches étaient isolées essentiellement chez des brûlés appartenant à la tranche d'âge entre [0-10 ans] qui présentaient des capacités immunitaires réduites. Le typage moléculaire par PFGE de ces souches indiquait une cotransmission entre les patients, les résultats de MLST ont également montré l'incidence de plusieurs séquences types épidémiques telles que ST244 et ST381. La présence du même pulsotype chez deux patients différents occupant le même service ou non traduit la cotransmission de ces souches. La dissémination des isolats producteurs de carbapénémase est sujette aux variations

Conclusion

géographiques et la variabilité des mesures d'hygiène hospitalière, des facteurs épidémiologiques et des politiques d'utilisation des antibiotiques entre les différents établissements de santé à travers le monde.

La deuxième catégorie des souches CRPA est celle des souches surexprimant les pompes d'efflux avec des CMI de carbapénèmes élevées. Ces souches présentaient également une résistance associée aux aminoglycosides. Les résultats de clonalité génétique a montré une diversité de ST (ST244, ST 1076...etc.) et de pulsotypes avec une cotransmission de clones entre patients.

La résistance aux aminosides est courante et résulte généralement de l'inactivation de l'antibiotique par des enzymes AME codées par des plasmides ou des chromosomes ou par des mécanismes de résistance induits par mutation. Aucun gène n'a été identifié pour les souches résistantes aux aminoglycosides.

Nous rapportons aussi une résistance aux fluoroquinolones suite aux mutations des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. Il faut noter que ces souches appartenaient à plusieurs clones et avaient des différentes ST.

Nos résultats mettent l'accent sur l'apparition de souches résistantes à la colistine qui représentaient 1.76% de l'ensemble des isolats. Les mutations dans les systèmes à deux composants PHoPQ et PmrAB indique l'absence de résistance plasmidique. Le génotypage a révélé une différence dans les clones.

La réduction de l'utilisation aveugle et l'abus d'antibiotiques à large spectre, le respect de l'hygiène des mains, la détection précoce, l'éducation et la formation à la prescription d'antibiotiques, le nettoyage de l'environnement, les précautions de contact et la surveillance active sont des stratégies recommandées pour la prévention et la lutte contre la propagation de ces souches soi-disant « superbugs ». Sans oublier le fardeau socio-économique considérable imposé par l'antibiorésistance ce qui incite la recommandation d'une étroite surveillance de l'épidémiologie locale de ce pathogène.

Les biofilms sont une cause majeure d'infection bactérienne récurrente et récalcitrante, entraînant une augmentation de la morbidité chez le patient, une augmentation de la durée d'hospitalisation et une augmentation de la charge économique et de l'épuisement des ressources. Parmi les trois méthodes phénotypiques utilisées pour détecter la formation de biofilm, la méthode de C.R.A, la méthode TM et la méthode TCP. La sensibilité de détection

Conclusion

de souches formatrices de biofilm dépendait du type de méthode utilisée. On a pu détecter 24% de souches à formation positive de biofilm par CRA, 19% de forts producteurs de biofilm par TM et 27% de souches à formation intense de biofilm par TCP. Et donc on peut conclure que la TCP est une méthode avec une bonne reproductibilité et une bonne spécificité et la TM est considérée comme moins sensible. Cette méthode peut être utilisée en routine dans le laboratoire de microbiologie pour détecter la formation de biofilm. La prévalence élevée des isolats producteurs de biofilm, impliqués chez les patients brûlés, est un problème sérieux qui rend le traitement des infections des plaies difficile et compliqué. Le taux de souches MDR formatrices de biofilm variait entre 28.30% et 33.33%. La triste réalité est inquiétante en raison de la propagation de la formation de biofilm. La détection précoce de la formation de biofilm est une étape primordiale pour moduler les stratégies de traitement, prévenir et gérer les infections résultantes et ainsi réduire la mortalité et la morbidité.

La présente étude nous a permis d'évaluer et de comparer le potentiel antibactérien de 8 huiles essentielles ; *Juniperus communis*, *Eucalyptus globulus*, *Artemisia dracunculus L.*, *Citrus limon*, *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis L.*, *Zingiber officinale* et *Artemisia herba alba*. L'HE de *Zingiber officinale*, *Artemisia herba alba* et *Rosmarinus officinalis L* Les résultats obtenus s'avèrent prometteurs dans l'agrandissement de l'arsenal thérapeutique des huiles essentielles dotées de propriétés antimicrobiennes ce qui rend leur commercialisation utiles dans l'industrie pharmaceutique comme alternative aux antibiotiques pour la prévention et le traitement de *P.aeruginosa* MDR. Cependant quelques huiles n'ont pas montré une grande efficacité contre les souches testées voire même inefficace notamment *Eucalyptus globulus*, *Artemisia dracunculus L* et *Lavandula angustifolia*.

Perspectives et recommandations

En perspectives de ce travail, il serait intéressant de :

- Approfondir l'étude génétique des résistances étudiées chez *P.aeruginosa* notamment associés aux β -lactamines par la surexpression des systèmes d'efflux aussi que la résistance aux aminoglycosides qui peut nécessiter un séquençage au-delà des gènes et qui peut aller au génome entier afin d'identifier tous les supports génétiques contribuant à cette résistance ;
- La lutte efficace contre les biofilms nécessite la connaissance approfondie possible des mécanismes de leur formation rendue abordable par l'utilisation des méthodes fiables.
- Etude de la cinétique des facteurs contrôlant les étapes de formation de biofilm et la caractérisation des principaux supports géniques impliqués dans l'expression du biofilm ce qui pourrait contribuer à comprendre l'installation du biofilm et en mettre au point une thérapeutique adéquate ;
- Etudier l'action des antibiotiques au sein d'une matrice de biofilm à *P.aeruginosa* ;
- D'autres études toxicologiques et cliniques avec la détermination des CMI des huiles essentielles sont nécessaires pour bien comprendre l'action des huiles.

L'émergence des souches résistantes limite les options thérapeutiques, ainsi on doit recommander ce qui suit :

- Les hôpitaux algériens doivent développer de meilleures stratégies pour prévenir et contrôler les infections par la mise en œuvre de protocoles d'hygiène stricts pour contrôler la transmission croisée entre les patients, y compris des politiques d'utilisation des antibiotiques, l'isolement des patients atteints de souches MBL et des études de surveillance régulières.
- La compréhension de la résistance aux antibiotiques dans les hôpitaux algériens nécessite des études plus approfondies et de lancer des enquêtes épidémiologiques portant sur toutes les souches résistantes et leur transmission à travers les hôpitaux du pays.
- Il est aussi important d'avoir l'historique de chaque malade bien enregistré dans une base de données consistantes et informatisées qui pourra être communiquée entre l'hôpital et les centres d'aide première l'historique les différents établissements de santé en Algérie afin d'assurer une bonne traçabilité, positionner les foyers de contaminations et suivre la transmission des souches MDR ,
- Interdire toute vente d'antibiotique sans prescription médicale

Références bibliographiques

- Abd El-Baky, R.M., Masoud, S.M., Mohamed, D.S., Waly, N.G.F.M., Shafik, E.A., Mohareb, D.A., Elkady, A., Elbadr, M.M., Hetta, H.F., 2020. Prevalence and some possible mechanisms of colistin resistance among multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Drug Resist.* 13, 323–332. <https://doi.org/10.2147/IDR.S238811>
- Abdallah, N.M.A., Elsayed, S.B., Mostafa, M.M.Y., El-gohary, G.M., 2011. Biofilm forming bacteria isolated from urinary tract infection, relation to catheterization and susceptibility to antibiotics. *Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res.* 2(10), 172-178.
- Abdeltwab, N. M., Emara, M., El-Mahdy, T. S., 2019. First report of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates harboring blaGIM-gene in the Middle East Region. *Microbiology*, vol. 52.
- Abdollahnejad, F., Kobarfard, F., Kamalinejad, M., Mehrgan, H., Babaeian, M., 2016. Yield, chemical composition and antibacterial activity of *Artemisia dracuncululus* L. essential oils obtained by two different methods. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants.* 19(3), 574–581. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.963167>
- Abdulhaq, N., Nawaz, Z., Zahoor, M.A., Siddique, A.B., 2020. Association of biofilm formation with multi drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Excli J.* 19, 201–208. <https://doi.org/10.17179/excli2019-2049>
- Abidi, S. H., Sherwani, S. K., Siddiqui, T. R., Bashir, A., Kazmi, S. U., 2013. Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi-Pakistan. *BMC Ophthalmol.* 13, 57. <https://doi.org/10.1186/1471-2415-13-57>
- Acosta, N., Waddell, B., Heirali, A., Somayaji, R., Surette, M. G., Workentine, M. L., Rabin, H. R., Parkins, M. D., 2020. Cystic fibrosis patients infected with epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strains have unique microbial communities. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fcimb.2020.00173.
- Adam, M. A., Elhag, W. I., 2018. Prevalence of metallo- β -lactamase acquired genes among carbapenems susceptible and resistant Gram-negative clinical isolates using multiplex PCR, Khartoum hospitals, Khartoum Sudan, *BioMed Central Infectious Diseases*, vol. 18, no. 1, p. 668.
- Afshari, A., Pagani, L., Harbarth, S., 2012. Year in review 2011: critical care infection. *Crit Care.* 16:242.
- Aggoune-Khinache, N., Bensersa, D., Henniche, F.Z., Daoudi, M., Abdouni, M., Chabani, A., Tiouit, D., Naim, M., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* producteurs de metallo- β -lactamases en Algérie. *Medecine Et Maladies Infectieuses.* 39, 413-414. <http://doi.org/10.1016/J.MEDMAL.2008.11.001>
- Aghazadeh, M., Hojabri, Z., Mahdian, R., Nahaei, M. R., Rahmati, M., Hojabri, T., Pirzadeh, T., Pajand, O., 2014. Role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY(-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and burn patients. *Infect. Genet. Evol.* 24, 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.018>

- Aglarova, A., M., Zilfikarov, I. N., Severtseva, O. V., 2008. Biological characteristics and useful properties of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). Pharm. Chem. J. 42, 81–86. <https://doi.org/10.1007/s11094-008-0064-3>
- Aguilar-rodea, P., Zúñiga, G., Rodríguez-espino, B.A., Rodea, G.E., Reyes-lópez, A., Castellanos-cruz, M.C., Parra-ortega, I., Rosas-pérez, I., 2020. Genetic variations in mexab-oprm e ux pump regulators and their association with antibiotic resistance and sequence type in clinical and epidemiologically high-risk clones of *Pseudomonas aeruginosa* . Results 1–26. <https://doi:10.21203/rs.3.rs-56805/v1>
- Ahmed, Z. S., Elshafiee, E. A., Khalefa, H. S., Kadry, M., Hamza, D. A., 2019. Evidence of colistin resistance genes (*mcr-1* and *mcr-2*) in wild birds and its public health implication in Egypt. Antimicrob. Resist. Infect. Control. 8, 197. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0657-5>
- Aissa, K., 2012. Profil de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques aux services de réanimation à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de rabat entre 2006 et 2010.Thèse de doctorat. Université Mohammed V - faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.119p.
- Akpaka, P. E., Swanston, W. H., Ihemere, H. N., Correa, A., Torres, J. A., Tafur, J. D., et al., 2009. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. J. Clin. Microbiol. 47, 2670–2671. doi: 10.1128/jcm. 00362-09
- Akrout, A., Jani, H.E.I., Amouri, S., Neffati, M., 2010. Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* Asso, & *Thymus capitatus* Hoff. et Link. Growing wild in the Southern of Tunisia. Recent Res Sci Technol 2, 29-39.
- Al-Agamy, M.H., Shibl, A.M., Tawfik, A.F., Elkhizzi, N.A., Livermore, D.M., 2012. Extended-spectrum and metallo-beta-lactamases among ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Riyadh, Saudi Arabia. J Chemother 24: 97-100.
- Al-Agamy, M.H., Jeannot, K., El-Mahdy, T.S., Samaha, H.A., Shibl, A.M., Plésiat, P., Courvalin, P., 2016. Diversity of molecular mechanisms conferring carbapenem resistance to *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Saudi Arabia. Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4379686>
- Al Bayssari, C., Diene, S. M., Loucif, L., Gupta, S. K., Dabboussi, F., Mallat, H., Hamze, M., Rolain, J. M., 2014. Emergence of VIM-2 and IMP-15 carbapenemases and inactivation of oprD gene in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Lebanon. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 4966–4970. doi: 10.1128/ AAC.02523-13
- Al-Charrakh, A.H., Al-Awadi, S.J., Mohammed, A.S., 2016. Detection of metallo-β-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from public and private hospitals in Baghdad, Iraq. Acta Med Iran. 54:107-13.
- Alp, E., Damani N., 2015. Healthcare-associated infections in intensive care units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. J Infect Dev Ctries. 9(10):1040-5.
- Al-Saffar, M.F., Rahim, K., Saleha, S., Basit, A., Zhu, X., Ahmed, I., Huo, L., Zhang, P., Usman, B., Munir, S., Franco, O.L., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* as a powerful

- biofilm producer and positive action of amikacin against isolates from chronic wounds. *Jundishapur J. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.5812/jjm.57564>
- Ambler, R., Coulson, A., Frère, J., Ghuysen, J., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R. C., Tiraby, G., Waley, S. G., 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *The Biochemical journal*, 276 (Pt 1), 269–270. <https://doi.org/10.1042/bj2760269>
- Amuka, O., Okemo, P., Machocho, A., Mbugua, P., Njagi, E.M.N., Nyamache, A., 2013. The role of phytomedicine in the challenges of emerging, reemerging diseases; and pathogens resistance to antibiotics. *Int J Herb Med.* 1(4), 92–101. <https://doi.org/10.4314/bcse.v29i1.11>.
- An dhale, J.D., Misra, R. N., Gandham, N. R., Angadi, K. M., Jadhav, S. V., Vyawahare, C. R., Pawar, M., Hatolkar, S., 2016. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to drug resistance and biofilm formation from clinical samples in tertiary care hospital. *J Pharm Biomed Sci.* <https://doi.org/10.20936/jpbms/160259>
- Andrys, D., Kulpa, D., Grzeszczuk, M., Bihun, M., Dobrowolska, A., 2017. Antioxidant and antimicrobial activities of *Lavandula angustifolia* Mill. field-grown and propagated in vitro. *Folia Hort.* 29, 161–180. <https://doi.org/10.1515/fhort-2017-0016>
- Angioni, A., Barra, A., Russo, M., Coroneo, V., Dessiä, S., Cabras, P., 2003. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 3073- 3078. <http://dx.doi.org/10.1021/jf026203j>.
- Anvarinejad, M., Japoni, A., Razaatpour, N., Mardaneh, J., Abbasi, P., Amin Shahidi, M., Dehyadegari, M. A., Alipour, E., 2014. Burn patients infected with metallo-Beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: multidrug-resistant strains. *Arch. Trauma. Res.* 3(2), e18182. <https://doi.org/10.5812/at.18182>
- Anyanwu, M.U., Okpala, C.O.R., Chah, K.F., Shoyinka, V.S., 2021. Prevalence and traits of mobile colistin resistance gene harbouring isolates from different ecosystems in Africa. *Biomed Res. Int.* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6630379>
- Araby, E., El-Tablawy, S.Y., 2016. Inhibitory effects of rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) essential oil on pathogenicity of irradiated and non-irradiated *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 159, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.02.024>
- Araújo, D., Shteinberg, M., Aliberti, S., Goeminne, P. C., Hill, A. T., Fardon, T. C., Obradovic, D., Stone, G., Trautmann, M., Davis, A., Dimakou, K., Polverino, E., De Soyza, A., McDonnell, M. J., & Chalmers, J. D., 2018. The independent contribution of *Pseudomonas aeruginosa* infection to long-term clinical outcomes in bronchiectasis. *Eur Respir J.* 51: 1701953. <https://doi.org/10.1183/13993003.01953-2017>
- Arber, W., 2014. Horizontal gene transfer among bacteria and its role in biological evolution. *Life (Basel, Switzerland).* 4(2), 217–224. <https://doi.org/10.3390/life4020217>
- Arranz, E., Jaime, L., García-Risco, M.R., Fornari, T., Reglero, G., Santoyo, S., 2015. Anti-inflammatory activity of rosemary extracts obtained by supercritical carbon dioxide enriched in carnosic acid and carnosol. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, 674–681. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12656>

- Aruhomukama, D., Najjuka, C. F., Kajumbula, H., Okee, M., Mboowa, G., Sserwadda, I., Mayanja, R., Joloba, M.L., Kateete, D.P., 2019. blaVIM- and blaOXA-mediated carbapenem resistance among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the Mulago Hospital Intensive Care Unit in Kampala, Uganda, vol. 19, no. 1, p. 853.
- Aubert, D., Poirel, L., Ben Ali, A., Goldstein, F.W., Nordmann, P., 2001. OXA-35 is an OXA-10-related β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, Volume 48, Issue 5, November 2001, Pages 717–721. <https://doi.org/10.1093/jac/48.5.717>
- Auger, M., 2012. Formation de biofilm *in vitro* par des souches cliniques d'*Escherichia coli* : impact de la modification des conditions expérimentales. Mémoire docteur en pharmacie. Université de Nantes, France.90p.
- Avlessi, F., Alitonou, G.A., Djenontin, T S., Tchobo, F., Yèhouéno, B., Menut, C., Sohounhloùé, D., 2012. Chemical composition and biological activities of the essential oil extracted from the fresh leaves of *Chromolaena odorata* (*L. robinson*) growing in Benin. ISCA J. Biological Sci. 1(3), 7-13.
- Azimi, S., Hossein, S.K., Hossein, B.B., Saeed, S., Khadijeh, N., Asgharzadeh, M., Yousefi, M., Shahrivar, F., Aghazadeh, M., 2016. Presence of *exoY*, *exoS*, *exoU* and *exoT* genes, antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Northwest Iran. GMS Hyg. Infect. Control 11, 1–6. doi: 10.3205/dgkh000264. eCollection 2016.
- Baba Ahmed-Kazi T.Z., Arlet, G., 2014. Actualité de la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif en Algérie. Pathologie-biologie. 62(3), 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2014.01.005>
- Bachir, R.G., Benali, M., Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Asian Pac J Trop Biomed. 2012;2(9):739-742. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60220-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60220-2)
- Bagge, N., Ciofu, O., Hentzer, M., Campbell, J. I., Givskov, M., Høiby, N., 2002. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in *ampD*. Antimicrob. Agents Chemother. 46(11), 3406–3411. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3406-3411.2002>
- Baidya, S., Sharma, S., Mishra, S.K., Kattel, H.P., Parajuli, K., Sherchand, J.B., 2021. Biofilm formation by pathogens causing ventilator-associated pneumonia at intensive care units in a tertiary care hospital: an armor for refuge. Biomed Res. Int. 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8817700>
- Bajaj, Y.P.S., 1995. Medicinal and aromatic plants. Biotechnology in agriculture and forestry. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Edition.Pp.194-196.
- Baker, P., Hill, P. J., Snarr, B. D., Alnabelseya, N., Pestrak, M. J., Lee, M. J., Jennings, L. K., Tam, J., Melnyk, R. A., Parsek, M. R., Sheppard, D. C., Wozniak, D. J., Howell, P. L., 2016. Exopolysaccharidebiosynthetic glycoside hydrolase s can be utilized to disrupt to and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Sci. Adv. 2, e1501632.

- Bakir, S. H., Ali, F. A., 2016. Comparison of different methods for detection of biofilm production in multi- drug resistance bacteria causing pharyngotonsillitis. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*; 3(2):13-22.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol.* 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H. and Mathee, K., 2013. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic acids research*, 41(1), 120. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1039>
- Banar, M., Emaneini, M., Satarzadeh, M., Abdellahi, N., Beigverdi, R., Van Leeuwen, W.B., Jabalameli, F., 2016. Evaluation of mannosidase and trypsin enzymes effects on biofilm production of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *PLoS One* 11, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164622>
- Barken, K. B., Pamp, S. J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J. J., Klausen, M, Tolker-Nielsen, T., 2008. Roles of type IV pili, flagellum- mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* 10(9), 2331-2343. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x>
- Barrow, K., Kwon, D.H., 2009. Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 5150–5154. <https://doi.org/10.1128/AAC.00893-09>
- Basam, B.M., Najim S.Y., Shatti, Z.O., Adnan, W., 2018. Comparative study of antibacterial activity between the *Citrus limon* (Lemon) & *Citrus Aurantium* (Bitter Orange) extracts on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burns infections. *Mintage journal of Pharmaceutical & Medical Sciences.* 7, 20–23.
- Basha, A.M., El-Sherbiny, G.M., Mabrouk, M.I., 2020. Phenotypic characterization of the Egyptian isolates “extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*” and detection of their metallo- β -lactamases encoding genes. *Bull. Natl. Res. Cent.* 44. <https://doi.org/10.1186/s42269-020-00350-8>
- Bass, J.I.F., Russo, D.M., Gabelloni, M.L., Geffner, J.R., Giordano, M., Catalano, M., Zorreguieta, Á., Trevani, A.S., 2010. Extracellular DNA: a major proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Immunol.* 184, 6386–6395. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901640>
- Behbahani, B.A., Shahidi, F., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Mohebbi, M., 2017. Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *J. Food Meas. Charact.* 11, 847–863. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9456-3>
- Bellido, F., Veuthey, C., Blaser, J., Bauernfeind, A., Pechère, J. C., 1990. Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother.* 25(1): 57-68. <https://doi.org/10.1093/jac/25.1.57>
- Bellido, F., Martin, N.L., Siehnel, R.J., Hancock, R. E., 1992. Reevaluation, using intact cells, of the exclusion limit and role of porin OprF in *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane

- permeability. *J Bacteriol.* 174:5196–203. <https://doi.org/10.1128/jb.174.16.5196-5203.1992>
- Belodu, H. R. R., Karangate, N., Sonth, S., Anitha, M. R., Vijayanath, V., 2012. Antimicrobial susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical sources. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences.*96(8), 1065–1069
- Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H., Khedher, M., 2011. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations. *Ann. Biol. Clin.* 69(4), 393–403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>
- Ben Nejma, M., Sioud, O., Mastouri, M., 2018. Quinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from University Hospital in Tunisia. *3 Biotech* 8, 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1019-8>
- Berçot, B., Poirel, L., Nordmann, P., 2011. Updated Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection of 16S rRNA Methylases: High Prevalence Among NDM-1 Producers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 71 (4), 442–425. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.08.016>
- Berk, Z., 2016. Morphology and chemical composition in citrus fruit processing, New York: Elsevier. Pp. 13-29
- Berger, R.G., 2007. Bioactivity of essential oils and their components. *Flavors and fragrances: Chemistry, bioprocessing, and sustainability.* Germany: Springer, pp.88-90.
- Bert, F., Branger, C., Lambert-Zechovsky, N., 2002. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J. Antimicrob. Chemother.* 50(1), 11–18. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf069>
- Billings, N., Millan, M., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R., Ribbeck, K., 2013. The extracellular matrix Component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog.* 9:e1003526. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003526>
- Blazeković, B., Stanic, G., Pepeljnjak S., Vladimir-Knežević, S., 2011. In vitro antibacterial and antifungal activity of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel. ‘Budrovka’. *Molecules.* 16: 4241– 4253
- Bogaerts, P., Bauraing, C., Deplano, A., Glupczynski, Y., 2007. Emergence and dissemination of BEL-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51(4), 1584–1585. <https://doi.org/10.1128/AAC.01603-06>
- Bourafa, N., Chaalal, W., Bakour S., Lalaoui, R., Boutefnouchet, N., Diene, S. M., Rolain, J. M., 2018. Molecular characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli clinical isolates in Algeria. *Infection and Drug Resistance.* 11: 735- 742. <https://doi.org/10.2147/IDR.S150005>
- Boyle, K.E., Heilmann, S., van Ditmarsch, D., Xavier, J.B., 2013. Exploiting social evolution in biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* 16 (2), 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.01.003>

- Bradbury, R., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* in Tasmania. The University of Tasmania. PhD thesis.310p.
- Bradford, P., 2001. Extended-spectrum b-lactamase in the 21st century: characterization epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 14(4), 933-51. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- Bratu, S., Landman, D., Gupta, J., Quale, J., 2007. Role of AmpD, OprF and penicillin-binding proteins in beta-lactam resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* 56(Pt 6), 809–814. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47019-0>
- Breidenstein, E.B., de la Fuente-Núñez, C., Hancock, R.E., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 19:419–426. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., 2005. Volume Two. The *Proteobacteria*. Part A. Introductory essays. In G.M. Garrity (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Second Edition. Springer-Verlag, New York: [i]-xxvi, 1-304.
- Bruneton, J., 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris; Cachan : Éd. Tec & doc ; Éd. médicales internationales.
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods— A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253. [https://doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022). PMID: 15246235.
- Camporese, A., 2013. Attività in vitro degli oli Essenziali di *Eucalyptus smithii* e *Juniperus communis* su biofilms batterici e prospettive di efficacia nella terapia complementare inalatoria delle infezioni croniche e recidivanti delle via aeree superiori. *Infez. Med.* 21, 117–124.
- Castanheira, M., Mendes, R.E., Walsh, T.R., Gales, A.C., Jones, R.N., 2004. Emergence of the extended-spectrum beta-Lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 48 (6), 2344-2345. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2344-2345.2004>
- Castanheira, M., Deshpande, L. M., Costello, A., Davies, T. A., & Jones, R. N., 2014. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(7), 1804–1814. <https://doi.org/10.1093/jac/dku048>
- Chakotiya, A.S., Tanwar, A., Narula, A., Sharma, R.K., 2017. *Zingiber officinale*: Its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated by flow cytometry. *Microb. Pathog.* 107, 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.029>
- Chalhoub, H., Saenz, Y., Rodriguez-Villalobos, H., Denis, O., Kahl, B. C., Tulkens, P. M., Van Bambeke, F., 2016. High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of active efflux and porin alterations. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 740–743. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.012>

- Chambers, J. R., Sauer, K., 2013. The MerR-like regulator BrlR impairs *Pseudomonas aeruginosa* biofilm tolerance to colistin by repressing PhoPQ. *J. Bacteriol.* 195(20), 4678–4688. <https://doi.org/10.1128/JB.00834-13>
- Chaudhary, M., Payasi, A., 2014. Resistance Patterns and Prevalence of the Aminoglycoside Modifying Enzymes in Clinical Isolates of Gram Negative Pathogens. *Global J. Pharmacol.* 8, 73–79. <https://doi.org/10.5829/idosi.gjp.2014.8.1.8270>
- Chemloul, F., 2014. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* de la région de Tlemcen. Master's thesis, University Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 64p.
- Chen, Y., Sun, M., Wang, M., Lu, Y., Yan, Z., 2014. Dissemination of IMP-6-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST244 in multiple cities in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 33(7):1181-1187. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2063-5>
- Cherny, K.E., Sauer, K., 2019. *Pseudomonas aeruginosa* requires the DNA-Specific endonuclease endA to degrade extracellular genomic DNA to disperse from the biofilm. *J. Bacteriol.* 201(18), e00059-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00059-19>
- Chiang, W.C., Nilsson, M., Jensen, P.Ø., Høiby, N., Nielsen, T.E., Givskov M, Tolker-Nielsen ; T., 2013. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(5):2352-61. <https://doi.org/10.1128/AAC.00001-13>
- Chinbo, M., Moutachakkir, M., Addebous, A., El Khoudri, N., Chabaa, L., Soraa, N., 2014. Epidemiology and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Moroccan pediatric hospital: therapeutic guidelines. *Int. J. Innov. Sci. Res.* 11(2), 283-290.
- Cho, H.H., Kwon, K.C., Kim, S., Koo, S.H., 2014. Correlation between virulence genotype and fluoroquinolone resistance in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann. Lab. Med.* 34, 286–292. <https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.4.286>
- Choi, J., Lee, J., Kang, C., Ryeon, D., Peck, K.R., Song, J., Ko, K.S., Choi, J., Lee, J., Kang, C., Ryeon, D., Peck, K.R., Song, J., Ko, K.S., 2017. Emergence of colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone in South Korea *International journal of antimicrobial agents*, 49(6), 767–769. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.023>
- Cowan, M.M., 1999. Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H., 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun.* 37:318-326. <https://doi.org/10.1128/iai.37.1.318-326.1982>
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M., Beachey, E.H., 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 22:996–1006. <https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985>
- Chua, S.L., Hultqvist, L.D., Yuan, M., Rybtke, M., E Nielsen, T., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Yang, L., 2015. *In vitro* and *in vivo* generation and characterization of *Pseudomonas*

- aeruginosa* biofilm–dispersed cells via c-di-GMP manipulation. Nat. Protoc. 10, 1165–1180. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.067>
- Chrzanowski, L., Lawniczak, L., Czaczyk, K., 2012. Why do microorganisms produce rhamnolipids .World Journal of Microbiology and Biotechnology .28: 401-419. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0854-8>
- Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., Jensen, P.Ø., Wang, H., Høiby, N., 2015. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. Adv. Drug Deliv. Rev. 85, 7–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.017>
- Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., 2019. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. Front. Microbiol. 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00913>
- CLSI, 2011. Clinical Laboratory Standards Institute ; Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard-9th Ed. CLSI document M2-A9. 26:1. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Colvin, K.M., Irie, Y., Tart, C.S., Urbano, R., Whitney, J.C., Ryder, C., Howell, P.L., Wozniak, D.J., Parsek, M.R., 2011. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. Environ. Microbiol. 14, 1913–1928. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02657.x>
- Coughlan, L.M., Cotter, P.D., Hill, C., Alvarez-Ordóñez, A., 2016. New weapons to fight old enemies: Novel strategies for the (bio)control of bacterial biofilms in the food industry. Front. Microbiol. 7, 1641. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01641>
- Couic-Marinier, F., Lobstein, A., 2013. Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. Actualités pharmaceutiques. 52(525), 18-21. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2013.02.005>
- Couture, F., Lachapelle, J., Levesque, R.C., 1992. Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A and class D beta-lactamases. Mol Microbiol. 6(12):1693-1705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00894.x>
- Crespo, A., Blanco-Cabra, N., Torrents, E., 2018. Aerobic vitamin b12 biosynthesis is essential for *Pseudomonas aeruginosa* Class II ribonucleotide reductase activity during planktonic and biofilm growth. Front. Microbiol. 9, 986. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00986>
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., Dowson, C.G., 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Clinical Microbiology. 42:5644-5649 <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004>
- Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C., 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. J. Am. Oil Chem. Soc. 73, 645–652. <https://doi.org/10.1007/BF0251812>
- Daniau, C., Léon, L., Blanchard, H., Bernet, C., Caillet-Vallet, E., Glorion, S., Buonocore, L., Aupée, M., Péfau, M., Simon, L., Claver, J., Bajolet, O., Alfandari, S., Berger-Carbonne,

- A., Coignard B., 2020. Infections associées aux soins en établissement de santé : résultats de l'Enquête nationale de prévalence 2017, France. Bulletin épidémiologique hebdomadaire n°. 21, p. 412-423.
- D'Arcangelo, S., 2016. Persistence and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airway. Thèse de doctorat. Université de Toronto. 101p.
- Daury, L., Orange, F., Taveau, J. C., Verchère, A., Monlezun, L., Gounou, C., Marreddy, R. K., Picard, M., Broutin, I., Pos, K. M., Lambert, O., 2016. Tripartite assembly of RND multidrug efflux pumps. Nature Commun. 7, 10731. <https://doi.org/10.1038/ncomms10731>
- Delcour, A. H., 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. Biochim. Biophys. Acta. 1794(5), 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
- Demin, G., Yingying, Z., 2010. Comparative antibacterial activities of crude polysaccharides and flavonoids from *Zingiber officinale* and their extraction. Am J Trop Med, 5: 235-238.
- Dreger, M., Wielgus, K., 2013. Application of essential oils as natural cosmetic preservatives. Herba Pol. 59(4):142-56. <https://doi.org/10.2478/hepo-2013-0030>
- Descy, J., Meex, C., Melin, P., Hayette, M.P., Huynen, P., De Mol, P., 2010. Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute. Rev Med Liège. 65, 29-34.
- Della Pepa, T., Elshafie, H.S., Capasso, R., De Feo, V., Camele, I., Nazzaro, F., Scognamiglio, M.R., Caputo, L., 2019. Antimicrobial and phytotoxic activity of *Origanum heracleoticum* and *O. majorana* essential oils growing in Cilento (Southern Italy). Molecules. 24, 2576. <https://doi.org/10.3390/molecules24142576>
- de Kievit, T.R., 2009. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Environ Microbiol 11: 279–288. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01792.x>
- Diene, S.M., L'homme, T., Bellulo, S., Stremler, N., Dubus, J.C., Mely, L., Leroy, S., Degand, N., Rolain, J.M., 2013. ISPa46, a novel insertion sequence in the *oprD* porin gene of an imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from a cystic fibrosis patient in Marseille, France. International Journal of Antimicrobial Agents, 42:268-271. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.001>
- Dobre, A.A., Gagi, V., Niculita, P., 2011. Preliminary studies on the antimicrobial activity of essential oils against food borne bacteria and toxigenic fungi. Annals of the University "Dunarea de Jos" of Galati - Fascicle VI: Food Technology .35(2), 16-26.
- Dogonchi, A.A., Ghaemi, E.A., Ardebili A., Yazdansetad, S., Pournajaf, A., 2018. Metallo- β -lactamase-mediated resistance among clinical carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in northern Iran: a potential threat to clinical therapeutics. Tzu Chi Med J. 30(2):90–96. https://doi.org/10.4103/tcmj.tcmj_101_17
- Doi, Y., Arakawa, Y., 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clin Infect Dis. 45(1): 88-94. <https://doi.org/10.1086/518605>
- Doi, Y., Ghilardi, A. C., Adams, J., de Oliveira, G. D., and Paterson, D. L., 2007. High prevalence of metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among

- imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3388–3390. <https://doi.org/10.1128/AAC.00443-07>
- Donlan, R. M., 2001. Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* 7(2), 277–281. <https://doi.org/10.3201/eid0702.010226>
- Donlan, R. M., Costerton, J. W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 15 (2): 167-193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Dortet, L., Brechard, L., Poirel, L., Nordmann, P., 2013. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. *Clin Microbiol Infect.* 20(4), 340–344. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12318>
- Dou, Y., Huan, J., Guo, F., Zhou, Z., Shi, Y., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* prevalence, antibiotic resistance and antimicrobial use in Chinese burn wards from 2007 to 2014. *J. Int. Med. Res.* 45(3), 1124–1137. <https://doi.org/10.1177/0300060517703573>
- Dreier, J., & Ruggerone, P., 2015. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 6, 660. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00660>
- Dubois, V., Poirel, L., Marie, C., Arpin, C., Nordmann, P., Quentin C., 2002. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(3): 638-645. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.638-645.2002>
- Dubois, V., Arpin, C., Dupart, V., Scavelli, A., Coulanges, L., Andre, C., Fischer, I., Grobost, F., Brochet, J.P., Lagrange, I., Dutilh, B., Jullin, J., Noury, P., Larribet, G., Quentin, C., 2008. Beta-lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *J. Antimicrob. Chemother.* 62(2), 316–323. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn174>
- Dupont, P., Hocquet, D., Jeannot, K., Chavanet, P., Plésiat, P., 2005. Bacteriostatic and bactericidal activities of eight fluoroquinolones against MexAB-OprM-overproducing clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 55(4), 518–522. <https://doi.org/10.1093/jac/dki030>
- Dziri, O., Dziri, R., El Salabi, A.A., Chouchani, C., 2020. Carbapenemase producing gram-negative bacteria in Tunisia: History of thirteen years of challenge. *Infect. Drug Resist.* 13, 4177–4191. <https://doi.org/10.2147/IDR.S259562>
- Ed-Dra, A., Filali, F.R., Presti, V. Lo, Zekkori, B., Nalbone, L., Elsharkawy, E.R., Bentayeb, A., Giarratana, F., 2021. Effectiveness of essential oil from the *Artemisia herba-alba* aerial parts against multidrug-resistant bacteria isolated from food and hospitalized patients. *Biodiversitas* 22, 2995–3005. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220753>
- El Gamal, M. I., Oh, C. H., 2010. Current Status of carbapenem antibiotics. *Curr. Top. Med. Chem.* 10, 1882–1897. <https://doi.org/10.2174/156802610793176639>
- El-Mahdy, T. S., 2014. Identification of a novel metallo- β -lactamase VIM-28 located within unusual arrangement of class 1 integron structure in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Egypt. *Jpn J Infect Dis.* 67(5):382-4.

- Elogne, C.K., Kalpy, J.C., Yeo, A., Guessennd, N., Jean Claude, A., Tatianah, K.N., Sofia, O.B., Adele, K.N., Mireille, D., 2018. Antibiotic susceptibility and serotype patterns of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical isolates in Abidjan, Cote d'Ivoire. *African J. Microbiol. Res.* 12, 62–67. <https://doi.org/10.5897/ajmr2017.8757>
- El Solh, A. A., Alhajhusain, A., 2009. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.* 64, 229–238. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp201>
- El Zowalaty, M. E., Al Thani, A. A., Webster, T. J., El Zowalaty, A. E., Schweizer, H. P., Nasrallah, G. K., Marei, H. E., Ashour, H. M., 2015. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol.* 10(10), 1683–1706. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.48>
- El Zowalaty, M.E., Al Thani, A.A., Webster, T.J., El Zowalaty, A.E., Schweizer, H.P., Nasrallah, G.K., Marei, H.E., Ashour, H.M., 2015. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiol.* 10(10), 1683–706. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.15.48>
- Eladawy, M., El-Mowafy, M., El-Sokkary, M.M.A., Barwa, R., 2020. Effects of Lysozyme, Proteinase K, and Cephalosporins on Biofilm Formation by Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6156720>
- Elemam, A., Rahimian, J., Mandell, W., 2009. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clin Infect Dis.* 49(2):271-274. <https://doi.org/10.1086/600042>
- Eltawaty, S., Qowaidar, S., Alramli, A., 2020. Is essential oil of libyan *Artemisia herba alba* plant effective world journal of pharmaceutical research effective against multi-drug resistant *Pseudomonas*. <https://doi.org/10.20959/wjpr20204-17197>
- Estepa, V., 2014. Caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenémicos, integrones y tipificación molecular en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de diferentes orígenes. Thèse de doctorat. Université de Rioja. 344p.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical and Laboratory Standards Institute (EUCAST). Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group, 2016. http://www.eucast.org/guidance_documents/
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance in Surveillance Europe annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2016, 2017.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, 2019.
- European Scientific Cooperative On Phytotherapy. ESCOP Monographs Second Edition. Second Edition 2009. ESCOP, 2009.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezou, J., & Poole, K., 1998. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas*

- aeruginosa*. J. Bacteriol. 180(20), 5443–5447. <https://doi.org/10.1128/JB.180.20.5443-5447.1998>
- Fajardo, A., Hernando-Amado, S., Oliver, A., Ball, G., Filloux, A., Martinez, J. L., 2014. Characterization of a novel Zn²⁺-dependent intrinsic imipenemase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 69(11), 2972–2978. <https://doi.org/10.1093/jac/dku267>
- Fang, Z. L., Zhang, L. Y., Huang, Y. M., Qing, Y., Cao, K. Y., Tian, G. B., Huang, X., 2014. OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. Infect. Genet. Evol. 21, 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.027>
- Farinha, M. A., Conway, B. D., Glasier, L. M., Ellert, N. W., Irvin, R. T., Sherburne, R., Paranchych, W., 1994. Alteration of the pilin adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* PAO results in normal pilus biogenesis but a loss of adherence to human pneumocyte cells and decreased virulence in mice. Infect. Immun. 62(10), 4118–4123. <https://doi.org/10.1128/iai.62.10.4118-4123.1994>
- Feng, X., Zhang, Z., Li, X., Song, Y., Kang, J., Yin, D., Gao, Y., Shi, N., Duan, J., 2019. Mutations in gyrB play an important role in ciprofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Drug Resist. 12, 261–272. <https://doi.org/10.2147/IDR.S182272>
- Flemming, H. C., 2001. The perfect slime. Colloids and surfaces. B: Biointerfaces. 86: 251- 259. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.025>
- Fournier, D., Richardot, C., Müller, E., Robert-Nicoud, M., Llanes, C., Plésiat, P., Jeannot, K., 2013. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 68(8), 1772–1780. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt098>
- Gaballah, A., Elbaradei, A., Elsheredy, A., and Kader, O., 2018. Emergence of bla_{VEB} and bla_{GES} among VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Alexandria, Egypt. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 66(1), 131–142. <https://doi.org/10.1556/030.65.2018.044>
- Gabriel, A., Tarcisse, B.N., Rachel, M., Christian, K.A., Esther, O.N.N., 2019. Study of colistin resistance encoded by the *mcr-1* gene in community and clinical *Pseudomonas* in Brazzaville, Republic of Congo. J. Microb. Biochem. Technol. 11, 96-101. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000422>
- Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli, I., 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry. 102 (3), 898-904. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.035>
- Gales, A.C., Reis, A.O., Jones, R.N., 2001. Contemporary assessment of antimicrobial susceptibility testing methods for polymyxin B and colistin: review of available interpretative criteria and quality control guidelines. J Clin Microbiol. 39 (1), 183–190. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.183-190.2001>
- Gargano, M.L., Zervakis, G.I., Isikhuemhen, O.S., Giuseppe, V., Calvo, R., Giammanco, A., Fasciana, T., Ferraro, V., 2020. Ecology, phylogeny, and potential nutritional and

- medicinal value of a rare white “maitake” collected in a mediterranean forest. Diversity 2(6):230. <https://doi.org/10.3390/d12060230>
- Garrabé, E., Cavallo, J.D., Fabre, R., Hernandez, E., 1998. AntibioGramme par diffusion en gélose : essai de standardisation de l'inoculum par la méthode Presto ABG. Rev Fr Lab. 307:65-69. [https://doi.org/10.1016/S0338-9898\(98\)80221-7](https://doi.org/10.1016/S0338-9898(98)80221-7)
- Gba, K.M.K., Guessennd, N.K., Makaya, N.P.N.D., Konan, E.J.T.F., Tot,y A.A., N'guetta, S.P.A., 2018. Detection of metallo-beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in an Abidjan Hospital, Côte d'Ivoire. JMAB 8: 1-8.
- Gellatly, S.L., Hancock, R.E., 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis. 67(3), 159–173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>
- Gerlach, R. G., Hensel, M., 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of gram-negative pathogens. International Journal of Medical Microbiology. 297(6), 401–415. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.017>
- Ghafoor, A., Hay, I.D., Rehm, B.H., 2011. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. Appl. Environ. Microbiol. 77(15), 5238–5246. <https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>
- Ghrabi, Z., and Sand, R.L., 2008. *Artemisia herba alba* Asso. A guide to medicinal plants in north africa. 19 – 49p.
- Ghuysen, J. M., 1998. Bacterial resistance to antibiotics, an exemplary model of directed molecular evolution. Rev Med Liege. 53(9), 529-531.
- Gibb, A.P., Tribuddharat, C., Moore, R.A., Louie, T. J., Krulicki, W., Livermore, D. M., Palepou, M. F., Woodford, N., 2002. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla(IMP) allele, bla(IMP-7). Antimicrob Agents Chemother. 46(1), 255-258. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.1.255-258.2002>
- Gilarranz, R., Juan, C., Castillo-Vera, J., Chamizo, F.J., Artiles, F., Álamo, I., Oliver, A., 2013. First detection in Europe of the metallo-β -lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin. Microbiol. Infect. 19:E424–E427. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12248> .
- Girlich, D., Naas, T., Nordmann, P., 2004. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 48(6), 2043-2048. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2043-2048.2004>
- Giske, C.G., Rylander, M., Kronval, I G., 2003. VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. Antimicrob Agents Chemother. 47(9), 3034–3035. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.3034-3035.2003>
- Glišić, S.B., Milojević, S.Ž., Dimitrijević, S.I., Orlović, A.M., Skala, D.U., 2007. Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a comparison with some commercial antibiotics. J. Serbian Chem. Soc. 72, 311–320. <https://doi.org/10.2298/JSC0704311G>

- Gloag, E.S., German, G.K., Stoodley, P., Wozniak, D.J., 2018. Viscoelastic properties of *Pseudomonas aeruginosa* variant biofilms. *Sci. Rep.* 8(1), 9691. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28009-5>
- Goli, H.R., Nahaei, M.R., Rezaee, M.A., Hasani, A., Kafil, H.S., Aghazadeh, M., 2016. Emergence of colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Tabriz hospitals, Iran. *Iran. J. Microbiol.* 8, 62–69.
- Golia, S., Suhani, Manasa, S., Jyoti, 2016. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from various clinical isolates and its antimicrobial resistance pattern in a Tertiary Care Hospital. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 5(3), 247-53. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.503.030>
- Goncalves, I.R., Dantas, R.C.C., Ferreira, M.L., Deivid, Batistão, D.W.F., Gontijo-Filho, P.P., Ribas, R.M., 2017. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Braz j. microbiol.* 4(8), 211-217.
- Gorgani, N., Ahlbrand, S., Patterson, A., Pourmand, N., 2009. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* 34(5), 414–418
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J., & Nishino, T., 1995. The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(11), 2567–2569. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.11.2567>
- Guessend, N.K., Ouattara, M.B., Ouattara, N.D., Nevry, R.K., Gbonon, V., Tiekoura, K.B., Dosso, M., 2013. Étude des bactéries multi résistantes des effluents hospitaliers d'un centre hospitalier et universitaire (CHU) de la ville d'Abidjan (Côte d'Ivoire). *J. Appl. Biosci.* 69:5456- 5464. <https://doi.org/10.4314/jab.v69i0.95071>
- Guevara, A., Sierra, R.C., de Waard, J., 2012. Caracterización molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos de cuatro hospitales de Venezuela. *Rev Chilena Infectol* 2012; 29: 614-21. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000700005>
- Guilbaud, M., Bruzard, J., Bouffartigues, E., Orange, N., Guillot, A., Aubert-Frambourg, A., Monnet, V., Herry, J.-M., Chevalier, S., Bellon-Fontaine, M.N., 2017. Proteomic response of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhering to solid surfaces. *Front. Microbiol.* 8, 1465. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01465>
- Gurung, J., Khyriem, A.B., Banik, A., Lyngdoh, W.V., Choudhury, B., Bhattacharyya, P., 2013. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. *Indian J. Crit. Care Med.* 17, 214–218. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.118416>
- Gutiérrez, O., Juan, C., Cercenado, E., Navarro, F., Bouza, E., Coll, P., Pérez, J.L., Oliver, A., 2007. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 51:4329-4335. <https://doi.org/10.1128/AAC.00810-07>
- Gutu, A. D., Sgambati, N., Strasbourger, P., Brannon, M. K., Jacobs, M. A., Haugen, E., Kaul, R. K., Johansen, H. K., Høiby, N., Moskowitz, S. M., 2013. Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* phoQ mutants is dependent on additional two-component

- regulatory systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2204–2215. <https://doi.org/10.1128/AAC.02353-12>
- Guzvinec, M., Izdebski, R., Butic, I., Jelic, M., Abram, M., Koscak, I., Baraniak, A., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M., Tambic Andrasevic, A., 2014. Sequence types 235, 111, and 132 predominate among multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Croatia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58(10), 6277–6283. <https://doi.org/10.1128/AAC.03116-14>
- Hächler, H., Santanam, P., Kayser, F. H., 1996. Sequence and characterization of a novel chromosomal aminoglycoside phosphotransferase gene, aph (3')-IIb, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(5), 1254–1256. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.5.1254>
- Haji, S.H., 2018. Detection of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Clinical Specimens. *Zanco J. Pure Appl. Sci.* 30, 83–89. <https://doi.org/10.21271/zjpas.30.4.9>
- Hall, L. M., Livermore, D. M., Gur, D., Akova, M., Akalin, H. E., 1993. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37(8), 1637-1644. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.8.1637>
- Hameed, F., Khan, M.A., Muhammad, H., Sarwar, T., Bilal, H., Rehman, T.U., 2019. Plasmid-mediated *mcr-1* gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: First report from Pakistan. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 52, 1–6. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0237-2019>
- Hammadi, K.M., Yousif, A.A., 2014. Detection of slime material in *Staphylococcus aureus* bacteria from bovine mastitis by transmission electron microscope and Congo red agar method. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3(4), 304-309.
- Hammer, K.A., Carson C.F., Riley T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86: 985-990. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>
- Hammoudi, D., Moubareck, C. A., Kanso, A.,A., Nordmann, P., Sarkis, D. K., 2015b. Surveillance of carbapenem non-susceptible gram negative strains and characterization of carbapenemases of classes a, b and d in a lebanese hospital. *J. Med. Liban.* 63, 66–73. <https://doi.org/10.12816/0012553>
- Hammoudi Halat, D., Moubareck, C. A., Sarkis, D. K., 2017. Heterogeneity of carbapenem resistance mechanisms among gram-negative pathogens in Lebanon: results of the first cross-sectional nationwide study. *Microb. Drug Resist.* 23, 733–743. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0077>
- Hanson, N.D., Hossain, A., Buck, L., Moland, E.S., Thomson, K.S., 2006. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the united states producing an IMP metallo-β-lactamase, IMP-18. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(6), 2272-2273. <http://aac.asm.org/cgi/doi/10.1128/AAC.01440-05>
- Harika, K., Shenoy, V., Narasimhaswamy, N., Chawla, K., 2020. Detection of biofilm production and its impact on antibiotic resistance profile of bacterial isolates from chronic

- wound infections. *J. Glob. Infect. Dis.* 12, 129–134.
https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_150_19
- Hashem, H., Hanora, A., Abdalla, S., Shaeky, A., Saad, A., 2017. Dissemination of metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Egypt: mutation in blaVIM-4. *Apmis* 125: 499-505. <https://doi.org/10.1111/apm.12669>
- Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., Iqbal, M., 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian J. Infect. Dis.* 15, 305–311. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702011000400002>
- Hauser, R. A., Ozer, A. E., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Rev. Microbiol.* 9(3). Poster produced with support from Cubist Pharmaceuticals.
- Haziri, A., Faiku, F., Mehmeti, A., Govori, S., Abazi, S., Daci, M., Haziri, I., Bytyqi-Damoni, A., Mele, A., 2013. Antimicrobial properties of the essential oil of *Juniperus communis* (L.) growing wild in east part of Kosovo. *Am. J. Pharmacol. Toxicol.* 8, 128–133. <https://doi.org/10.3844/ajpts.2013.128.133>
- Henderson, A.H., Fachrial, E., Lister I.N.E. 2018. Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus limon*) Peel Extract Against *Escherichia coli*. *ASRJETS.* 39 (1) 268–273.
- Hernández, A., Yagüe, G., García Vázquez, E., Simón, M., Moreno Parrado, L., Canteras, M., Gómez, J., 2018. Nosocomial infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* (carbapenems included): predictive and prognostic factors. *Rev. Esp. Quimioter.* 31, 123–130.
- Hernando-Amado, S., Blanco, P., Alcalde-Rico, M., Corona, F., Reales-Calderón, J. A., Sánchez, M. B., Martínez, J. L., 2016. Multidrug efflux pumps as main players in intrinsic and acquired resistance to antimicrobials. *Drug Resist. Updat.* 28: 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.06.007>
- Heydari, S., Eftekhari, F., 2015. Biofilm Formation and β -Lactamase Production in Burn Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur J. Microbiol.* 8(3), e15514. <https://doi.org/10.5812/jjm.15514>
- Hickman, J.W., Harwood, C.S., 2008. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* 69: 376–389.
- Himed, L., Merniz, S., Barkat, M., 2016. Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle de *Citrus limon* (variété Lisbon) extraite par hydrodistillation, *Algerian J. Nat. Products.* 4 (1), 252-260.
- Hirsch, E. B., Tam, V. H., 2010. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res.* 10, 441–451. <https://doi.org/10.1586/erp.10.49>
- Hoang, S., Georget, A., Asselineau, J., Venier, A.-G., Leroyer, C., Rogues, A. M., Thiébaud, R., 2018. Risk factors for colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in patients hospitalized in intensive care units in France. *PloS One* 13, e0193300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193300>

- Hocquet, D., Dehecq, B., Bertrand, X., Plésiat, P., 2011. Strain-tailored double-disk synergy test detects extended-spectrum oxacillinases in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol. 49(6), 2262–2265. <https://doi.org/10.1128/JCM.02585-10>
- Hocquet, D., Plesiat, P., Dehecq, B., Mariotte, P., Talon, D., Bertrand, X., ONERBA, 2010. Nationwide investigation of extended-spectrum betalactamases, metallo-beta-lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. Antimicrob Agents Chemother. 54(8): 3512-3515. <https://doi.org/10.1128/AAC.01646-09>
- Hocquet, D., Muller, A., Blanc, K., Plésiat, P., Talon, D., Monnet, D. L., & Bertrand, X., 2008. Relationship between antibiotic use and incidence of MexXY-OprM overproducers among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 52(3), 1173–1175. <https://doi.org/10.1128/AAC.01212-07>
- Hocquet, D., Vogne, C., El Garch, F., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., Lomovskaya, O., Plésiat, P., 2003. MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. Antimicrob. Agents Chemother. 47(4), 1371–1375. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1371-1375.2003>
- Hoffman, L.R., Déziel, E., D'Argenio, D.A., Lépine, F., Emerson, J., McNamara, S., Gibson, R.L., Ramsey, B.W., Miller, S.I., 2006. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 19890–19895. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606756104>
- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G.L., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., Hola, V., Imbert, C., Kirketerp-Moller, K., Lebeaux, D., Oliver, A., Ullmann, A.J., Williams, C., 2014. ESCMID Study group for biofilms and consulting external expert Werner Zimmerli. 2015. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections. Clin. Microbiol. Infect. 21(1), S1–S25. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2014.10.024>
- Hoque, M.M., Ahmad, M., Khisa, S., Uddin, M.N., Jesmine, R., 2015. Antibiotic resistance pattern in “*Pseudomonas aeruginosa*” isolated from different clinical specimens. JAFMC Bangladesh. 11(1). <https://doi.org/10.3329/jafmc.v11i1.30669>
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N., Grau, S., 2019. Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Clin. Microbiol. Rev. 32(4), e00031-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>
- Hossain, S., Heo, H., De Silva, B.C.J., Wimalasena, S.H.M.P., Pathirana, H.N.K.S., Heo, G.J., 2017. Antibacterial activity of essential oil from lavender (*Lavandula angustifolia*) against pet turtle-borne pathogenic bacteria. Lab. Anim. Res. 33, 195. <https://doi.org/10.5625/lar.2017.33.3.195>
- Hou, W., Sun, X., Wang, Z., Zhang, Y., 2012. Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 53(9), 5624–5631. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9114>

- Hu, F., Guo, Y., Zhu, D, 2017. Surveillance of CHINET bacterial resistance in China. *Chin J Infect Chemother.* 17(5):481–491.
- Huh, K., Kim, J., Cho, S. Y., Ha, Y. E., Joo, E. J., Kang, C. I., Chung, D. R., Lee, N. Y., Song, J. H., Peck, K. R., Korean Network for Study on Infectious Diseases (KONSID), 2013. Continuous increase of the antimicrobial resistance among gram-negative pathogens causing bacteremia: a nationwide surveillance study by the Korean Network for Study on Infectious Diseases (KONSID). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76(4), 477–482. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.04.014>
- Hussen, B.M., 2020. Evaluating the prevalence of virulence factor gene and biofilm production in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical samples. *Zanco J. Pure Appl. Sci.* 32. <https://doi.org/10.21271/zjpas.32.4.13>
- Imelouane, B., El Bachiri, A., Ankit, M., Khedid, K., Wathelet, J.P., Amhamdi, H., 2010. Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia Herba-Alba* Asso grown in Morocco. *Banat's Journal of Biotechnology.* I (2): 48–55.
- Insuan and Chahomchuen, 2020. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil extracted from *Eucalyptus citriodora* leaf. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 48: 148–157. <https://doi.org/10.4014/mbl.1912.12016>
- Iregbu, K.C., Eze, S.O., 2015. *Pseudomonas aeruginosa* infections in a Tertiary Hospital in Nigeria. *Afr. J. Clin. Exper. Microbiol.* 16(1), 33-36. <https://doi.org/10.4314/ajcem.v16i1.6>
- Irie, Y., Borlee, B.R., O'Connor, J.R., Hill, P.J., Harwood, C.S., Wozniak, D.J., Parsek, M.R, 2012. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(50):, 20632-20636. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217993109>
- Islam, K., Rowsni, A.A., Khan, M., Kabir, S., 2014. Antimicrobial activity of ginger (*Zingiber officinale*) extracts against food-borne pathogenic bacteria. *Int. J. Sci. Environ. Technol.* 3: 867–871.
- Ito, R., Mustapha, M. M., Tomich, A. D., Callaghan, J. D., McElheny, C. L., Mettus, R. T., Shanks, R., Sluis-Cremer, N., Doi, Y., 2017a. Widespread fosfomycin resistance in gram-negative bacteria attributable to the chromosomal *fosA* Gene. *mBio*, 8(4), e00749-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00749-17>
- Ito, R., Tomich, A. D., McElheny, C. L., Mettus, R. T., Sluis-Cremer, N., Doi, Y., 2017b. Inhibition of fosfomycin resistance protein *fosA* by phosphonoformate (Foscarnet) in multidrug-resistant gram-negative pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61(12), e01424-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01424-17>
- Jacoby, GA., 2005. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.* 41 Suppl 2: S120–126. <https://doi.org/10.1086/428052>
- Jácome, P. R., Alves, L. R., Cabral, A. B., Lopes, A. C., Maciel, M. A., 2012. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45(6), 707–712. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822012000600010>

- Jafar, K., Wahab, A., Qayyum, A., Jamshed, S., 2014. Drug resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolates at PIMS Hospital, Islamabad. *J Chem Pharm Res.* 6(11): 715-9.
- Janačković, P., Novaković, J., Soković, M., Vujisić, L., Giweli, A. A., Stevanović, Z. D., Marin, P. D., 2015. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Artemisia judaica*, *A. herba alba* and *A. arborescens* from Libya. *Archives of Biological Sciences*, 67(2), 455–466. <https://doi.org/10.2298/ABS141203010J>
- Janvier, F., Jeannot, K., Tessé, S., Robert-Nicoud, M., Delacour, H., Rapp, C., Mérens, A., 2013. Molecular characterization of bla_{NDM-1} in a sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(7), 3408–3411. <https://doi.org/10.1128/AAC.02334-12>
- Javaid, N., Sultana, Q., Rasool, K., Gandra, S., Ahmad, F., Chaudhary, S.U., Mirza, S., 2021. Trends in antimicrobial resistance amongst pathogens isolated from blood and cerebrospinal fluid cultures in Pakistan (2011-2015): A retrospective cross-sectional study. *PLoS One* 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250226>
- Jennings, L.K., Storek, K.M., Ledvina, H.E., Coulon, C., Marmont, L.S., Sadovskaya, I., Secor, P.R., Tseng, B.S., Scian, M., Filloux, A., Wozniak, D. J., Howell, P. L., Parsek, M. R., 2015. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112:11353–11358. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503058112>
- Jeannot K., Plésiat P., 2016. Épidémiologie de la résistance aux β-lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal des Anti-infectieux*, 18(2), 52-63, <https://doi.org/10.1016/j.antinf.2015.11.001>
- Jeannot, K., Elsen, S., Köhler, T., Attree, I., van Delden, C., Plésiat, P., 2008. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(7), 2455–2462. <https://doi.org/10.1128/AAC.01107-07>
- Jiang, X., Zhang, Z., Li, M., Zhou, D., Ruan, F., Lu, Y., 2006. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 50(9), 2990–2995. <https://doi.org/10.1128/AAC.01511-05>
- Jianu, C., Pop, G., Gruia, A.T., Horhat, F.G., 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula intermedia*) grown in Western Romania. *Int. J. Agric. Biol.* 15: 772–776.
- Jiménez, A., Rodríguez, D., Baltodano, P., 2017. Vigilancia de la resistencia a los antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa*, 2013 - 2017. INCIENSA. Inst. Costarric. Investig. y Enseñanza en Nutr. y Salud. Cent. Nac. Ref. Bacteriol. 2013–2017.
- Jones, C.J., Wozniak, D.J., 2017. Psl Produced by Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* contributes to the establishment of biofilms and immune evasion. *mBio.* 8, e00864-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00864-17>

- Jovcic, B., Lepsanovic, Z., Suljagic, V., Rackov, G., Begovic, J., Topisirovic, L., Kojic, M., 2011. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(8): 3929-3931. <https://doi.org/10.1128/AAC.00226-11>
- Juan, C., Torrens, G., González-Nicolau, M., Oliver, A., 2017b. Diversity and regulation of intrinsic β -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 41(6), 781–815. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux043>
- Jung, G. B., Nam, S. W., Choi, S., Lee, G.J., Park, H.K., 2014. Evaluation of antibiotic effects on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using Raman spectroscopy and multivariate analysis. *Biomed. Opt. Express* 5:3238. <https://doi.org/10.1364/BOE.5.003238>
- Kalai Blagui, S., Achour, W., Abbassi, M. S., Bejaoui, M., Abdeladhim, A., Ben Hassen, A., 2007. Nosocomial outbreak of OXA-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Tunisia. *Clin Microbiol Infect.* 13(8), 794-800. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01757.x>
- Kamali, E., Jamali, A., Ardebili, A., Ezadi, F., Mohebbi, A., 2020. Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Res. Notes* 13: 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4890-z>
- Kang, C. I., Kim, S. H., Kim, H. B., Park, S. W., Choe, Y. J., Oh, M. D., Kim, E. C., Choe, K. W., 2003. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin. Infect. Dis.* 37(6), 745–751. <https://doi.org/10.1086/377200>
- Karadag, E., Samancioglu, S., Ozden, D., Bakir, E., 2017. Effects of aromatherapy on sleep quality and anxiety of patients. *Nur. Crit. Care.* 22(2), 105–112. <https://doi.org/10.1111/nicc.12198>
- Karami, P., Khaledi, A., Mashoof, R.Y., Yaghoobi, M.H., Karami, M., Dastan, D., Alikhani, M.Y., 2020. The correlation between biofilm formation capability and antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene Reports* 18. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100561>
- Kateete, D.P., Nakanjako, R., Namugenyi, J., Erume, J., Joloba, M.L., Najjuka, C.F., 2016. Carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* at Mulago hospital in Kampala, Uganda (2007-2009).5(1), 1308. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2986-7>
- Kesbi, A., 2011. Etude des propriétés physicochimique et évaluation l'activité biologique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* dans la région de Ouargla. Mémoire de Master. Université Kasdi Merbah, Ouargla. 67p.
- Kezzouna, R., 2015. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Juniperus phonicea* L. Mémoire de Master. Université Mohamed Khider, Biskra. 47p.
- Khalid, M.H., Afaf, A.Y., 2014. Detection of slime material in *Staphylococcus aureus* bacteria from bovine mastitis by transmission electron microscope and Congo red agar method. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(4), 304-309.

- Khalifa, H. O., Soliman, A. M., Ahmed, A. M., Shimamoto, T., Hara, T., Ikeda, M., Kuroo, Y., Kayama, S., Sugai, M., Shimamoto, T., 2017. High carbapenem resistance in clinical gram-negative pathogens isolated in Egypt. *Microb. Drug Resist.* 23(7), 838–844. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0339>
- Kiana, S., Behrouz, A., Fardad, R., 2016. Antibiotic resistance pattern and evaluation of metallo-beta lactamase genes (VIM and IMP) in *Pseudomonas aeruginosa* strains producing MBL enzyme, isolated from patients with secondary immunodeficiency. *Adv. Biomed. Res.* 5:124. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.186986>
- Kidd, T. J., Grimwood, K., Ramsay, K. A., Rainey, P. B., Bell, S. C., 2011. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 49(1), 263–268. <https://doi.org/10.1128/JCM.01421-10>
- Kidd, T. J., Ritchie, S. R., Ramsay, K. A., Grimwood, K., Bell, S. C., Rainey, P. B., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits frequent recombination, but only a limited association between genotype and ecological setting. *PloS One.* 7(9), e44199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044199>
- Kim, J. Y., Park, Y. J., Kwon, H. J., Han, K., Kang, M. W., Woo, G. J., 2008. Occurrence and mechanisms of amikacin resistance and its association with beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: a Korean nationwide study. *J. Antimicrob. Chemother.* 62(3), 479–483. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn244>
- Kim, K.S., Lee, S., Lee, Y.S., Jung, S.H., Park, Y., Shin, K.H., Kim, B.K., 2003. Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*. *J. Ethnopharmacol.*, 85: 69–72. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(02\)00338-0](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(02)00338-0)
- Kim, Y.J., Jun, Y.H., Kim, Y.R., Park, K.G., Park, Y.J., Kang, J.Y., Kim, S.I., 2014. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia; retrospective study of impact of combination antimicrobial therapy. *BMC Infect Dis.* 14–161. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-161>
- Kindu, M., Derseh, L., Gelaw, B., Moges, F., 2020. Carbapenemase-producing non-glucose-fermenting gram-negative bacilli in Africa, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Microbiol.* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9461901>
- Kiska, D. L., Gilligan, P. H., 2003. *Pseudomonas*. *The Manual of Clinical Microbiology*. P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller and R. H. Tenover. Washington, D.C., ASM Press. 1: 719–728.
- Klancnik, A., Guzej, B., Kolar, M.H., Abramovic, H., Mozina, S.S., 2009. *In vitro* antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *J. Food Prot.* 72: 1744–1752. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.8.1744>
- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R. L., Struelens, M. J., Tacconelli, E., Navarro Torné, A., Witte, W., Friedrich, A. W., 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles. European communicable disease bulletin.* 15 (41), 19688. <https://doi.org/10.2807/ese.15.41.19688-en>

- Köhler, T., Kok, M., Michea-Hamzhepour, M., Plesiat, P., Gotoh, N., Nishino, T., Curty, L. K., Pechere, J. C., 1996. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(10), 2288–2290. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.10.2288>.
- Köhler, T., Michéa-Hamzhepour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L. K., Pechère, J. C., 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 23(2), 345–354. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.2281594.x>
- Kong, K. F., Aguila, A., Schneper, L., Mathee, K., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* β -lactamase induction requires two permeases, AmpG and AmpP. *BMC Microbiol.* 10: 328. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-328>
- Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala A., Yildirim, A., 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J Agric Food Chem.* 53(24), 9452–8. <https://doi.org/10.1021/jf0516538> .
- Kritsotakis, E.I., Tsioutis, C., Roubelaki, M., Christidou, A., Gikas, A., 2011. Antibiotic use and the risk of carbapenem-resistant extended-spectrum- β - lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in hospitalized patients: results of a double case–control study. *J Antimicrob Chemother.* 66(6), 1383–91. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr116>
- Ktari, S., Mnif, B., Znazen, A., Rekik, M., Mezghani, S., Mahjoubi-Rhimi, F., & Hammami, A., 2011. Diversity of beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing metallo-beta-lactamase in two Tunisian hospitals. *Microb Drug Resist.* 17(1), 25-30. <https://doi.org/10.1089/mdr.2010.0104>
- Kwei, J., Halstead, F. D., Dretzke, J., Oppenheim, B. A., Moiemmen, N. S., 2015. Protocol for a systematic review of quantitative burn wound microbiology in the management of burns patients. *Syst. Rev.* 4: 150. <https://doi.org/10.1186/s13643-015-0137-9>
- Kwon, D. H., Lu, C. D., 2006. Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(5), 1615–1622. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1615-1622.2006>
- Lakehal, Cherifa, C., Zohra, B.F., 2017. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Artemisia Herba-Alba* Asso. from Djelfa. *Résumé. Agrobiologia.Net* 7, 491–501.
- Lambert, R., J., W., Skandamis, P., N., Coote P., Nychas G.J. E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J.Appl.Microbiol.* 91 : 453-462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>
- Lamendin, H., 2004. Huiles essentielles en diffusion atmosphérique. *Chir. Dent. Fr;* 1185: 78-80.

- Lamont, I. L., Martin, L. W., 2003. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, England)*. 149(Pt 4), 833–842. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26085-0>
- Landry, A. P., Cheng, Z., Ding, H., 2013. Iron binding activity is essential for the function of IscA in iron-sulphur cluster biogenesis. *Dalton Transactions*. 42(9), 3100-3106. <https://doi.org/10.1039/c2dt32000b>
- Latasa, C., Solano, C., Penades, J.R., Lasa, I., 2006. Biofilm-associated proteins. *C R Biol*.329 (11), 849-857. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2006.07.008>
- Lardry, J-M., Haberkorn, V., 2007. L’aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinesither Rev*. 61, 14-17. [https://doi.org/10.1016/S1779-0123\(07\)70308-X](https://doi.org/10.1016/S1779-0123(07)70308-X)
- Lau, C. H., Fraud, S., Jones, M., Peterson, S. N., Poole, K., 2012. Reduced expression of the rplU-rpmA ribosomal protein operon in mexXY-expressing pan-aminoglycoside-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 56(10), 5171–5179. <https://doi.org/10.1128/AAC.00846-12> .
- Lau, C.H.F., Krahn, T., Gilmour, C., Mullen, E., Poole, K., 2015. AmgRS-mediated envelope stress-inducible expression of the mexXY multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiologyopen*. 4(1), 121–135. <https://doi.org/10.1002/mbo3.226>
- Laurettil, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., Rossolini, G. M., 1999. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 43(7), 1584–90. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.7.1584>
- Lee, J. K., Lee, Y. S., Park, Y. K., Kim, B. S., 2005. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 25: 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.11.012>
- Lee, K., Kim, M. N., Kim, J. S., Hong, H. L., Kang, J. O., Shin, J. H., Park, Y. J., Yong, D., Jeong, S. H., Chong, Y., KONSAR Group, 2011. Further increases in carbapenem-, amikacin-, and fluoroquinolone-resistant isolates of *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa* in Korea: KONSAR study 2009. *Yonsei Med. J*. 52(5), 793–802. <https://doi.org/10.3349/ymj.2011.52.5.793>
- Leong, W.H., Lai, K.S., Lim, S.H.E., 2021. Combination therapy involving *Lavandula angustifolia* and its derivatives in exhibiting antimicrobial properties and combatting antimicrobial resistance: Current challenges and future prospects. *Processes*. 9(4), 609. <https://doi.org/10.3390/pr9040609>
- Lescat, M., Poirel, L., Nordmann, P., 2018. Rapid multiplex polymerase chain reaction for detection of *mcr-1* to *mcr-5* genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 92(4), 267–269. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.04.010>
- Lewis, K., 2011. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother*. 45: 999–1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>
- Li, X. Z., Nikaido, H., 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*. 69(12), 1555–1623. <https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>

- Li, X. Z., Nikaido, H., Poole, K., 1995. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(9), 1948–1953. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.9.1948>
- Li, X. Z., Patrick, P., Nikaido, H., 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clini. Microbiol. Rev.* 28(2), 337– 418. <https://doi.org/10.1128/cmr.00117-14>
- Li, Y., Petrova, O. E., Su, S., Lau, G. W., Panmanee, W., Na, R., Hassett, D. J., Davies, D. G., Sauer, K., 2014. BdlA, DipA and induced dispersion contribute to acute virulence and chronic persistence of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 10(6): e1004168. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004168>
- Li, X. Z., Zhang, L., Poole, K., 2000b. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 45(4), 433–436. <https://doi.org/10.1093/jac/45.4.433>
- Li, X. Z., Zhang, L., Srikumar, R., Poole, K., 1998. Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42(2), 399–403. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.2.399>
- Libisch, B., Watine, J., Balogh, B., Gacs, M., Muzslay, M., Szabó, G., Füzi, M., 2008. Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary. *Res Microbiol.* 159(3), 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.008>
- Liew, S. M., Rajasekaram, G., Puthuchery, S. D., Chua, K. H., 2018. Detection of VIM-2-, IMP-1-and NDM-1- producing multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 13: 271–273. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.01.026>
- Lima, J., Alves, L. R., Jacomé, P., Bezerra Neto, J. P., Maciel, M., Morais, M., 2018. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Braz. J. Infect. Dis.* 22(2), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.03.003>
- Lima, J.L., Alves, L.R., Da Paz, J.N.P., Rabelo, M.A., Maciel, M.A.V., De Morais, M.M.C., 2017. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-Associated pneumonia. *Rev. Bras. Ter. Intensiva* 29: 310–316. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20170039>
- Lin, J., Xu, C., Fang, R., Cao, J., Zhang, X., Zhao, Y., Dong, G., Sun, Y., Zhou, T., 2019. Resistance and heteroresistance to colistin in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Wenzhou, China. *Antimicrob Agents Chemother* 63: e00556-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00556-19>.
- Liu, T., Lin, P., Bao, T., Ding, Y., Lha, Q., Nan, P., Huang, Y., Gu, Z., Zhong, Y., 2018. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia dracunculus* L. var.

- qinghaiensis Y. R. Ling (*Asteraceae*) from Qinghai-Tibet Plateau. *Industrial Crops and Products*. 125:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.085>
- Lister, P. D., Wolter, D. J., Hanson, N. D., 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22: 582–610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>.
- Livermore, D. M., 1992. Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 36(9), 2046-2048. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.9.2046>
- Livermore, D. M., 2003. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Infect. Dis.* 36(Suppl 1), S11–S23. <https://doi.org/10.1086/344654>
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., Plésiat, P., 2004. Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Overproducing MexAB-OprM and MexXY Efflux Pumps Simultaneously. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 1797–1802. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1797-1802.2004>
- Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., van Delden, C., Plésiat, P., 2011. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(12), 5676–5684. <https://doi.org/10.1128/AAC.00101-11>
- Llanes, C., Pourcel, C., Richardot, C., Plésiat, P., Fichant, G., Cavallo, J. D., Mérens, A., GERPA Study Group, 2013. Diversity of β -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *J Antimicrob Chemother.* 68(8),1763-1771. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt115>
- Llano-Sotelo, B., Azucena, E.F., Jr., Kotra, L.P., Mobashery, S., Chow, C.S., 2002. Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem. Biol.* 9: 455–463. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00125-4](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00125-4)
- López-Causapé, C., Cabot, G., Del Barrio-Tofiño, E., Oliver, A., 2018. The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* 9: 685. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00685> .
- Loveday, H. P., Wilson, J. A., Kerr, K., Pitchers, R., Walker, J. T., Browne, J., 2014. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. *J. Hosp. Infect.* 86(1), 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.010>
- List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, consulté le 12/02/2020.
- Luján-Roca, D., 2014. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 48(4), 465-474.
- Maatallah, M., Cheriaa, J., Backhrouf, A., Iversen, A., Grundmann, H., Do, T., Lanotte, P., Mastouri, M., Elghmati, M.S., Rojo, F., Mejdji, S., Giske, C.G., 2011. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. *PLoS One* 2011; 6(10), e25617. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025617>

- Macfarlane, E. L., Kwasnicka, A., Ochs, M. M., Hancock, R. E., 1999. PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol. Microbiol.* 34(2), 305–316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01600.x>
- Madouri, M., 2017. Formation de biofilm in vitro par des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* isolées de sondes urinaires. Mémoire de master. Université de Tlemcen. 66p.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., Monnet, D. L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mahboobi, M., Shahcheraghi, F., Feizabadi, M.M., 2006. Bactericidal effects of essential oils from clove, lavender and geranium on multi-drug resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran. J. Biotechnol.* 4(2), 137–140.
- Mahboubi, M., Farzin, N., 2009. Antimicrobial activity of *Artemisia sieberi* essential oil from central Iran. *Iranian Journal of Microbiology.* 1 : 43-48.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., Spratt, B. G., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95:3140e5. 95(6), 3140–3145. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>
- Man, A., Santacroce, L., Jacob, R., Mare, A., Man, L. 2019. Antimicrobial activity of six essential oils against a group of human pathogens: a comparative study. *Pathogens.* 8: 15–32. <https://doi.org/10.3390/pathogens8010015>
- Manilal, A., Sabu, K.R., Woldemariam, M., Aklilu, A., Biresaw, G., Yohanes, T., Seid, M., Merdekios, B., 2021. Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* against multidrug-resistant clinical isolates and meat-borne pathogens. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6677420>
- Mansour, S.A., Eldaly, O., Jiman-Fatani, A., Mohamed, M.L., Ibrahim, E.M., 2013. Epidemiological characterization of *P. aeruginosa* isolates of intensive care units in Egypt and Saudi Arabia. *East Mediterr Health J.* 19(1), 71–80.
- Marchandin, H., Jean-Pierre H., De Champs, C., Sirot, D., Darbas, H., Perigault, P. F., Carriere, C., 2000. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(1), 213-216. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.1.213-216.2000>
- Mataseje, L.F., Bryce, E., Roscoe, D., Boyd, D.A., Embree, J., Gravel, D., Katz, K., Kibsey, P., Kuhn M, Mouchili, A., Simor, A., Taylor, G., Thomas, E., Turgeon, N., Mulvey, M.R., 2012. Carbapenem resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-2010: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *J Antimicrob Chemother* 67: 1359-1367. <https://doi.org/10.1093/jac/dks046>

- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C. N., Engels, R., Zeng, E., Olavarietta, R., Doud, M., Smith, R. S., Montgomery, P., White, J. R., Godfrey, P. A., Kodira, C., Birren, B., Galagan, J. E., & Lory, S., 2008. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. PNAS USA 105(8), 3100–3105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711982105>
- Mathers, A.J., Peirano, G., Pitout, J.D., 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Rev. 28 (3), 565–591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>
- Mathlouthi, N., Areig, Z., Al Bayssari, C., Bakour, S., Ali El Salabi, A., Ben Gwierif, S., Zorgani, A. A., Ben Slama, K., Chouchani, C., Rolain, J. M., 2015. Emergence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates collected from some libyan hospitals. Microb. Drug Resist. 21(3), 335–341. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0235>
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T., Rattan, A., 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian J Med Microbiol. 24(1), 25-29. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.19890>
- Matsumoto, M., Shigemura, K., Shirakawa, T., Nakano, Y., Miyake, H., Tanaka, K., K., Kinoshita, S., Arakawa, S., Kawabata, M., Fujisawa, M., 2012. Mutations in the gyrA and parC genes and *in vitro* activities of fluoroquinolones in 114 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urinary tract infections and their rapid detection by denaturing high-performance liquid chromatography. Int J Antimicrob Agents.40:440-4. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.06.021>
- Mattick J. S., 2002. Type IV pili and twitching motility. Annu. Rev. Microbiol. 56, 289–314. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938>
- Mavroidi, A., Tzelepi, E., Tsakris, A., Miriagou, V., Sofianou, D., Tzouveleki, L.S., 2001. An integron-associated beta-lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. J Antimicrob Chemother. 48(5):627-630. doi:10.1093/jac/48.5.627
- Mazzariol, A., Aldegheri, M., Ligozzi, M., Lo Cascio, G., Koncan, R., Fontana, R., 2008. Performance of Vitek 2 in antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates with different mechanisms of beta-lactam resistance. J Clin Microbiol. 46(6):2095-8.
- Mellouk, F.Z., Bakour, S., Meradji, S., et al., 2017. first detection of vim-4-producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in northeastern (Annaba, Skikda) Algeria. Microb Drug Resist.23(3):335-344. doi:10.1089/mdr.2016.0032
- Memar, M.Y., Pormehrali, R., Alizadeh, N., Ghotaslou, R., Baghi, H.B. 2016. Colistin, an option for treatment of multiple drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Physiol Pharmacol. 20, 130e136.
- Mendoza, L.C., and Caballero, C.A.V., 2016. *Pseudomonas aeruginosa*: estado del arte. Universidad Libre de Barranquilla. Monografía de la especialidad de medicina.112p.

- Meradji, S., Barguigua, A., Bentakouk, M.C., Nayme, K., Zerouali, K., Mazouz, D., Chettibi, H., Timinouni, M., 2016. Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria. *Burns* 42, 906–918. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.02.023>
- Meradji, S., 2017. *Pseudomonas aeruginosa*: Facteurs de virulence et évaluation de la résistance aux bêta-lactamines et aux quinolones. Université Badji Mokhtar –Annaba. Thèse de doctorat. 233p.
- Mérens, A., Janvier F., et al.,2012. "Phénotypes de résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*." *Revue Francophone des Laboratoires*. 445: 59-74.
- Mesaros, N., Glupczynski, Y., Avrain, L., Caceres, N.E., Tulkens, P.M., Van Bambeke, F., 2007. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59 (3), 378–386.
- Mesomo, M.C., Corazza, M.L., Ndiaye, P.M., Dalla Santa, O.R., Cardozo, L., Scheer, A.D.P., 2013. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. *J. Supercrit. Fluids* 80, 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.03.031>
- Mighri, H., Hajlaoui, H., Akrouf, A., Najjaa, H., Neffati, M., 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes Rendus Chimie*, 13(3), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2009.09.008>
- Miller, G. H., Sabatelli, F. J., Hare, R. S., Glupczynski, Y., Mackey, P., Shlaes, D., Shimizu, K., Shaw, K. J., 1997. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. *Clin Infect Dis.* 24(1), S46-62. https://doi.org/10.1093/clinids/24.supplement_1.s46
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Mihajlovic, B., Matavulj, M., 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med.* 69: 413–9. <https://doi.org/10.1055/s-2003-39704>
- Mirsalehian, A., Nakhjavani, F., Bahador, A., Jabalamoli, F., Beikvardi, R., Goli, H. 2011. Prevalence of MBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Tehran Univ Med J.* 68: 563-569. <http://tumj.tums.ac.ir/article-1-299-en.html>
- Mishra, M., Byrd, M.S., Sergeant, S., Azad, A.K., Parsek, M.R., McPhail, L., Schlesinger, L.S., Wozniak, D.J., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Psl polysaccharide reduces neutrophil phagocytosis and the oxidative response by limiting complement-mediated opsonization. *Cell Microbiol.* 14, 95–106. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01704.x>
- Miyoshi-Akiyama, T., Kuwahara, T., Tada, T., Kitao, T., Kirikae, T., 2011. Complete genome sequence of highly multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* NCGM2.S1, a representative strain of a cluster endemic to Japan. *J. Bacteriol.* 193(24), 7010. <https://doi.org/10.1128/JB.06312-11>

- Mohanapriya, M., Ramaswamy, L., Rajendran, R. 2013. Health and medicinal properties of lemon (*Citrus limonum*). International Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine, 3(1),1095–1100.
- Mohanasoundaram, K.M., 2011. The antimicrobial resistance pattern in the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital; 2008-2010 (A 3 Year Study). J. Clin. Diagnostic Res. 5: 491–494.
- Mohanty, S., Baliyarsingh, B., Kumar Nayak, S., 2020. Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: A Concise Review. Antimicrob. Resist. - A One Heal. Perspect. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88706>
- Montalegre, R., 2016. Evaluation du risque d'émergence de résistances de *Pseudomonas aeruginosa* à différents antibiotiques antitypocyaniques en réanimation. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. 94p.
- Moon, T., Cavanagh, H.M.A., Wilkinson, J.M., 2004. Lavender as an antibacterial essential oil - are all lavenders equal? AICA National Conference, P. 46
- Moon, T., Wilkinson, J., Cavanagh, H., 2006. Antibacterial activity of essential oils, hydrosols and plant extracts from Australian grown *Lavandula* spp. Int. J. Aromather. 16(1), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijat.2006.01.007>
- Morales, E., Cots, F., Sala, M., Comas, M., Belvis, F., Riu, M., Salvadà, M., Grau, S., Horcajada, J.P., Montero, M.M., Castells, X., 2012. Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. BMC Health Serv. Res. 12. <https://doi.org/10.1186/1472-6963-12-122>
- Moradali, M.F., Ghods, S., Rehm, B.H.A., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7: 39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039> .
- Mota, V.S., Turrini, R.N.T., Poveda, V.B., 2015. Antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus* oil, xylitol and papain : a pilot study. Revista da Escola de Enfermagem da USP. 49(2), 215-219. <https://doi.org/10.1590/S0080-623420150000200005>
- Mourad, M., Salih, S.-R., Elaasser, M., Safwat, N., Ibrahim, M., 2016. Antibacterial Activity of Certain Medicinal Plant and Their Essential Oils on the Isolated Bacteria From Uti Patients. Int. J. Adv. Res. 4: 1510–1530. <https://doi.org/10.21474/ijar01/2551>
- Moussi, I.M., Houda, F., Said, A.H., Kaotar, N., Mohammed, T., Imane, R., Farid, H., 2017. Phytochemical composition and antibacterial activity of Moroccan *Lavandula angustifolia* Mill. J. Essent. Oil Bear. Plants. 20: 1074–1082. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1363000>
- Mubita C, Syakalima M, Chisenga C, Munyeme M, Bwalya M, Chifumpa G, Hang'ombe, B.M., Sinkala, P., Simuunza, M., Fukushi, H., Isogai, H., Yasuda, J., Isogai, E., 2008. Antibigrams of faecal *Escherichia coli* and Enterococci species isolated from pastoralist cattle in the interface areas of the Kafue basin in Zambia - Short communication. 78 (2), 179–185
- Muderris, T., Durmaz, R., Ozdem, B., Dal, T., Unaldi, O., Aydogan, S., Celikbilek, N., Acikgoz, Z.C., 2018. Role of efflux pump and oprD porin expression in carbapenem

- resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. J. Infect. Dev. Ctries. 12 : 1–8. <https://doi.org/10.3855/jidc.9486>
- Mugnier, P., Dubrous, P., Casin, I., Arlet, G., Collatz, E., 1996. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 40(11), 2488-2493. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.11.2488>
- Mukherjee, S., Bassler, B.L., 2019. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. Nat. Rev. Genet. 17, 371–382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>
- Mulet, X., Moyá, B., Juan, C., Macià, M. D., Pérez, J. L., Blázquez, J., Oliver, A., 2011. Antagonistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance mechanisms in planktonic but not biofilm growth. Antimicrob. Agents Chemother. 55(10), 4560–4568. <https://doi.org/10.1128/AAC.00519-11>
- Muller, C., Plésiat, P., Jeannot, K., 2011. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 55(3), 1211-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.01252-10>
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Reichling, J., Wink, M., 2011. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. Pharm. Biol. 49, 893–899. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.553625>
- Murugan, N., Malathi, J., Therese, K.L., Madhavan, H. N., 2018. Application of six multiplex PCR's among 200 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* for the detection of 20 drug resistance encoding genes. Kaohsiung J Med Sci. 4(2),79–88. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2017.09.010>
- Naas, T., Bonnin, R.A., Cuzon, G., Villegas, M.-V., Nordmann, P., 2013. Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Antimicrob. Chemother. 68, 1757–1762. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt094>.
- Naas, T., Nordmann, P., 1999. OXA-type β -lactamases. Curr Pharm Des 5, 865–879.
- Nathwani, D., Raman, G., Sulham, K., Gavaghan, M., Menon, V., 2014. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. Antimicrob. Resist. Infect. Control. 3(1): 32. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-3-32>
- Navon-Venezia, S., Ben-Ami, R., Carmeli, Y., 2005. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. Curr. Opin. Infect. Dis. 18(4), 306–313. <https://doi.org/10.1097/01.qco.0000171920.44809.f0>
- Neonakis, I. K., Scoulica, E. V., 2003. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates in a university hospital in Greece: detection of SHV-5 in *Pseudomonas aeruginosa* and prevalence of SHV-12. Microb Drug Resist. 9(2), 161-165.
- Neves, M. T., Lorenzo, M. E., Almeida, R. A., & Fortaleza, C. M., 2010. Antimicrobial use and incidence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a teaching hospital: an ecological approach. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 43(6), 629–632. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822010000600005>

- Nguyen, K. V., Nguyen, T. V., Nguyen, H., & Le, D. V., 2018. Mutations in the *gyrA*, *parC*, and *mexR* genes provide functional insights into the fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Vietnam. *Infect. Drug Resist.* 11, 275–282. <https://doi.org/10.2147/IDR.S147581>
- Nichols, D.P., Caceres, S., Caverly, L., Fratelli, C., Kim, S.H., Malcolm, K., Poch, K.R., Saavedra, M., Solomon, G., Taylor-Cousar, J., Moskowitz, S., Nick, J.A., 2013. Effects of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection. *J. Surg. Res.* 183:767–776. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.02.003>.
- Nikokar, I., Tishayar, A., Flakiyan, Z., Alijani, K., Rehana-Banisaeed, S., Hossinpour, M., Amir-Alvaei, S., Araghian, A., 2013. Antibiotic resistance and frequency of class 1 integrons among *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from burn patients in Guilan, Iran. *J. Microbiol.* 5(1), 36–41.
- Nikolić, M.M., Jovanović, K.K., Marković, T.L., Marković, D.L., Gligorijević, N.N., Radulović, S.S., Kostić, M., Glamočlija, J.M., Soković, M.D., 2017. Antimicrobial synergism and cytotoxic properties of *Citrus limon* L., *Piper nigrum* L. and *Melaleuca alternifolia* (Maiden and Betche) Cheel essential oils. *J. Pharm. Pharmacol.* 69: 1606–1614. <https://doi.org/10.1111/jphp.12792>
- Norajit, K., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., 2007. Antibacterial effect of five *Zingiberaceae* essential oils. *Molecules.* 12(8), 2047–2060. <https://doi.org/10.3390/12082047>
- Nordmann, P., Ronco, E., Naas, T., Duport, C., Michel-Briand, Y., Labia, R., 1993. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(5), 962–969. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.5.962>
- Nordmann, P., Guibert, M., 1998. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 42(2), 128-131.
- Nouri, R., Ahangarzadeh Rezaee, M., Hasani, A., Aghazadeh, M., Asgharzadeh, M., 2016. The role of *gyrA* and *parC* mutations in fluoroquinolones-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran. *Braz J Microbiol.* 47(4), 925-930. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.016>
- Oberholzer, A., Keel, M., Zellweger, R., Steckholzer, U., Trentz, O., Ertel, W., 2000. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *J Trauma* 48: 932-937. <https://doi.org/10.1097/00005373-200005000-00019>
- Observatoire National de l’Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques (ONERBA) : rapport synthétique d’activité 2018 / Annual Report 2018. www.onerba.org.
- Odumosu, B. T., Adeniyi, B. A., Chandra, R., 2015. Occurrence of aminoglycoside-modifying enzymes genes (*aac*(6’)-I and *ant*(2’)-I) in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Southwest Nigeria. *Afri. Health Sci.* 15(4), 1277–1281. <https://doi.org/10.4314/ahs.v15i4.29>

- . Oh, H., Stenhoff, S., Jalal, S., Wretling, B., 2003. Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microb. Drug Resist.* 8:323–328. <https://doi.org/10.1089/107662903322762743>
- Oie, S., Fukui, Y., Yamamoto, M., Masuda, Y., Kamiya, A., 2009. *In vitro* antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Infect Dis.* 9:123. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-123>
- Okamoto, K., Gotoh, N., Nishino, T., 2002. Extrusion of penem antibiotics by multicomponent efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46(8), 2696–2699. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2696-2699.2002>
- Okii, M., Iyobe, S., Mitsuhashi, S., 1983. Mapping of the gene specifying aminoglycoside 3'-phosphotransferase II on the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *J. Bacteriol.* 155(2), 643–649. <https://doi.org/10.1128/jb.155.2.643-649.1983>
- Olaitan, A.O., Morand, S., Rolain, J.M., 2014. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 5:643. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T., Jehl, F., 2019. Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *Front. Microbiol.* 10: 2894. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02894>
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., Juan, C., 2015. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 21(22), 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2015.08.002>
- Oliveira, D. M. P. D., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., Walker, M. J., 2020. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 33. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>
- Oluwatosin, A., Ek, O., Kt, A., Tm, O., Ij, A., 2019. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* resistance in clinical isolates from selected hospitals in Oyo State, Nigeria 1–5. <https://doi.org/10.35248/2471-9315.19.5.164>
- OMS, 2017. Monitoring and Evaluation of the Global Action Plan on Antimicrobial Resistance (AMR): Regional Expert Consultation on Monitoring and Evaluation of AMR Interventions.
- OMS, 2014. Rapport mondial de l'OMS sur la résistance aux antimicrobiens. En ligne]. Disponible sur <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/fr/>
- Ong, C. T., Tessier, P. R., Li, C., Nightingale, C. H., Nicolau, D. P., 2007. Comparative *in vivo* efficacy of meropenem, imipenem, and cefepime against *Pseudomonas aeruginosa* expressing MexA-MexB-OprM efflux pumps. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57(2), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.06.014>
- Osanloo, M., Ghaznavi, G., Abdollahi, A., 2020. Surveying the chemical composition and antibacterial activity of essential oils from selected medicinal plants against human pathogens. *Iran. J. Microbiol.* 12 : 577–583. <https://doi.org/10.18502/ijm.v12i6.5032>

- Osawa, K., Shigemura, K., Kitagawa, K., Fukuda, T., Takasaka, A., Wakabayashi, S., Sato, K., Yamamichi, F., Shirakawa, T., Fujisawa, M., 2019. Molecular characteristics of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine in Hyogo, Japan. *Japan Int J Urol.* 26(1),127-133. <https://doi.org/10.1111/jju.13818>
- Oteo-Iglesias, J., 2019. Active surveillance of antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 37(1), 26–31. <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01361-y>
- O'Toole, G. A., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30(2), 295–304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
- Otterlei, M., Sundan, A., Skjak-Braek, G., Ryan, L., Smidsrod, O., Espevik, T., 1993. Similar mechanisms of action of defined polysaccharides and lipopolysaccharides: characterization of binding and tumor necrosis factor- α induction. *Infect Immun.* 61: 1917-1925.
- Ouchar mahamati, O., Tidjani, A., Ssavadojo, A., Abakabirmahamati A., Somda, M. K., Traore, A. S., 2013. Isolement et caracterisation des bacteries productrices des biofilms issues des produits alimentaires.Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. 7(2), 187-210.
- Oussou, K.R., 2009. Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Thèse de Doctorat. Université de Cocody-Abidjan. 241p
- Oyedeji, A.O., Ekundayo, O., Olawore, O.N., Adenivi, B.A., Koenig, W.A., 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *Fitoterapia.* 70(5), 526-528.
- Pachori, P., Goyalwal, R., Gandhi, P., 2019. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes & Diseases.* 6(2), 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.04.001>
- Pamp, S.J., Tolker-Nielsen, T., 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 189(6), 2531-9. <https://doi.org/10.1128/JB.01515-06>
- Pan, Y. P., Xu, Y. H., Wang, Z. X., Fang, Y. P., Shen, J. L., 2016. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* 198, 565–571. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1215-7>
- Palleroni, N.J., 2010. The *Pseudomonas* story. *Environ. Microbiol.* 12 (6): 1377-83. doi: [10.1111/j.1462-2920.2009.02041.](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02041.)
- Parad, R. B., Gerard, C. J., Zurakowski, D., Nichols, D. P., Pier, G. B., 1999. Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. *Infect Immun.* 67: 4744–4750. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4744-4750.1999>
- Parkins, M.D., Pitout, J.D.D., Church, D.L., Conly, J.M., Laupland, K.B., 2007. Treatment of infections caused by metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region. *Clin Microbiol Infect.* 13(2), 199–202. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01591.x>

- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R., 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:757–784. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x>
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O., 2018b. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Patzer, J., Toleman, M.A., Deshpande, L.M., Kaminska, W., Dzieranowska, D., Bennett, M.B., Jones, R.N., Welsh, T.R., 2004. *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual blaVIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998–2001). *J Antimicrob Chemother* 53: 451-456. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh095>
- Pavela, R., 2014. Acute synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. *Ind. Crops Prod.* 60: 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.030>
- Pepeljnjak, S., Kosalec, I., Kalodera, Z., Blažević, N., 2005. Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Pharm.* 55(4), 417–422.
- Perez, L. R., Antunes, A. L., Freitas, A. L., Barth, A. L., 2012. When the resistance gets clingy: *Pseudomonas aeruginosa* harboring metallo- β -lactamase gene shows high ability to produce biofilm. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31(5), 711–714. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1363-2>
- Perez, L. R., Machado, A. B., Barth, A. L., 2013. The presence of quorum-sensing genes in *Pseudomonas* isolates infecting cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Curr. Microbiol.* 66(4), 418–420. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0290-5>
- Perovic, S., Pantovic, S., Scepanovic, V., Perovic, A., Zivkovic, V., Damjanovic-Vratnica, B., 2019. Evaluation of antimicrobial activity and activity on the autonomic nervous system of the lavender essential oils from Montenegro. *Prog. Nutr.* 21, 584–590. <https://doi.org/10.23751/pn.v21i3.8385>
- Petrosyan, M.T., Sahakyan, N.Z., Trchounian, A.H., 2018. Chemical composition and antimicrobial potential of essential oil of *Artemisia dracunculus* L. cultivated at high altitude Armenian landscape. *Chem Biol.* 52(2), 116–21. <https://doi.org/10.46991/PYSU:B/2018.52.2.116>
- Pfeiffer, E., Heuschmid, F.F., Kranz, S., Metzler, M., 2006. Microsomal hydroxylation and glucuronidation of [6]-gingerol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton. 54(23), 8769-8774. <https://doi.org/10.1021/jf0622351>
- Pfizer, 2020. Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance. Available at: <https://atlas-surveillance.com>.
- Philippon, L. N., Naas, T., Grout, M., Franklin, M., Ohman, D. E., 1997. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(10), 2188-2195. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1895-1901.2001>

- Picao, R.C., Poirel, L., Gales, A.C., Nordmann, P., 2009. Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 3908–3913. <https://doi.org/10.1128/AAC.00453-09>
- Piddock L. J., 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 19(2), 382–402. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>
- Pier, G.B., Ramphal, R., 2005. *Pseudomonas aeruginosa*. In G. L. Mandell & J. E. Bennett (Ed.), Mandell.
- Pier, G. B., Coleman, F., Grout, M., Franklin, M., Ohman, D. E., 2001. Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect. Immun.* 69(3), 1895–1901. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1895-1901.2001>
- Pitt, T. L., 1998. *Pseudomonas, Burkholderia*, and related genera, p. 1109– 1138. In B. I. Duerden (ed.), *Microbiology and microbial infections*, vol. 2. Oxford University Press Inc., New York, NY.
- Plésiat, P., Jeannot, K., 2018. Mutations in gene *fusA1* as a novel mechanism of aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 62 (2): e01835 17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01835-17>
- Poirel, L., Le Thomas I., Naas, T., Karim, A., Nordmann, P., 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 44(3), 622-632. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.622-632.2000>
- Poirel, L., P. Gerome, P., De Champs, C., Stephanazzi, J., Naas, T., Nordmann, P., 2002. Integron-located OXA-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(2), 566-569. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.566-569.2002>
- Poirel, L., Lebossi E., Castro, M., Fèvre, C., Foustoukou, M., Nordmann, P., 2004. Nosocomial outbreak of extended-spectrum betalactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(6), 2277-2279. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.6.2277-2279.2004>
- Poirel, L., Brinas, L., Fortineau, N., Nordmann, P., 2005. Integron-encoded GES-type extended-spectrum betalactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(8), 3593-3597. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3593-3597.2005>
- Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., 2010b. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(1), 24–38. <https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>
- Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P., 2001. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 70:119-123.
- Pollini, S., Maradei, S., Pecile, P., Olivo, G., Luzzaro, F., Docquier, J. D., Rossolini, G. M.,

2013. FIM-1, a new acquired metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(1) 410-416.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01953-12>
- Ponce, A.G., Fritz, R., Del Valle, C., Roura, S.I., 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT - Food Sci. Technol.* 36: 679–684.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00088-4)
- Poole K., 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(2), 479–487. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.479-487.2005>
- Poole K., 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* 39(3), 162–176. <https://doi.org/10.1080/07853890701195262>
- Poole K., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front. Microbiol.* 2, 65.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>
- Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X. Z., Nishino, T., 1996. Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 21(4), 713–724. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.281397.x>
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C., Neshat, S., 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* 175(22), 7363–7372. <https://doi.org/10.1128/jb.175.22.7363-7372.1993>
- Potron, A., Poirel, L., Nordmann, P., 2015. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 45(6), 568–585.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>
- Pournajaf, A., Razavi, S., Irajian, G., Ardebili, A., Erfani, Y., Solgi, S., Yaghoubi, S., Rasaeian, A., Yahyapour, Y., Kafshgari, R., Shoja, S., Rajabnia, R., 2018. Integron types, antimicrobial resistance genes, virulence gene profile, alginate production and biofilm formation in Iranian cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infez. Med.* 26(3), 226–236.
- Pournaras, S., Tsakris, A., A., Maniati, M., Tzouvelekis, L. S., Maniatis, A. N., 2002. Novel variant bla_{VIM-4} of the metallo-beta-lactamase gene bla_{VIM-1} in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(12), 4026-4028.
<https://doi.org/10.1128/AAC.46.12.4026-4028.2002>
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., Ignacimuthu, S., 2006. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med.* 6: 1–8.
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-39>
- Predoi, D., Iconaru, S. L., Buton, N., Badea, M. L., Marutescu, L., 2018. Antimicrobial activity of new materials based on lavender and basil essential oils and hydroxyapatite. *Nanomaterials.* 8(5). <https://doi.org/10.3390/nano8050291>
- Prince, A. A., Steiger, J. D., Khalid, A. N., Dogrhamji, L., Reger, C., Eau Claire, S., Chiu, A. G., Kennedy, D. W., Palmer, J. N., Cohen, N. A., 2008. Prevalence of biofilm-forming

- bacteria in chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol.* 22(3), 239–245. <https://doi.org/10.2500/ajr.2008.22.3180>
- Radovanovic, R.S., Savic, N.R., Ranin, L., Smitran, A., Opavski, N.V., Tepavcevic, A.M., Ranin, J., Gajic, I., 2020. Biofilm Production and Antimicrobial Resistance of Clinical and Food Isolates of *Pseudomonas spp.* *Curr. Microbiol.* 77, 4045–4052. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02236-4>
- Rahim, K., Saleha, S., Basit, A., Zhu, X., Ahmed, I., Huo, L., Zhang, P., Usman, B., Munir, S., Franco, O.L., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* as a powerful biofilm producer and positive action of amikacin against isolates from chronic wounds. *Jundishapur J. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.5812/jjm.57564>
- Ramadan, R.A., Gebriel, M. G., Kadry, H. M., Mosallem, A., 2018. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of carbapenemase genes and E-test evaluation of colistin-based combinations. *Infection and Drug Resistance.* 11, 1261–1269.. <https://doi.org/10.2147/IDR.S170233>
- Raman, G., Avendano, E.E., Chan, J., Merchant, S., Puzniak, L., 2018. Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: A systematic review and meta-analysis. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 7: 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0370-9>
- Ramirez, M. S., Tolmasky, M. E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* 13(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003>
- Ramsey, D. M., Wozniak, D. J., 2005. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol. Microbiol.* 56(2), 309–322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04552.x>
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., El Jaziri, M., 2015. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed. Res. Int.* 759348. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
- Rawling, E. G., Brinkman, F. S., Hancock, R. E., 1998. Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. *J. Bacteriol.* 180(14), 3556–3562. <https://doi.org/10.1128/JB.180.14.3556-3562.1998>
- Rehman, A., Patrick, W.M., Lamont, I.L., 2019. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: New approaches to an old problem. *J. Med. Microbiol.* 68, 1–10. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000873>
- Remold, S. K., Brown, C. K., Farris, J. E., Hundley, T. C., Perpich, J. A., Purdy, M. E., 2011. Differential habitat use and niche partitioning by *Pseudomonas* species in human homes. *Microb. Ecol.* 62(3), 505–517. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9844-5>
- Rewatkar, A.R., 2013. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*- Biofilm formation Methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8: 36-40. <https://doi.org/10.9790/3008-0853640>

- Ribeiro, A., Barros, L., Calhella, R.C., Carocho, M., Ćirić, A., Sokovic, M., Dias, M.M., Santos-Buelga, C., Barreiro, M.F., Ferreira, I.C.F.R., 2016. Tarragon phenolic extract as a functional ingredient for pizza dough: Comparative performance with ascorbic acid (E300). *J. Funct. Foods* 26, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.08.019>
- Riccio, M.L., Pallecchi, L., Fontana, R., Rossolini, G.M., 2001. In70 of plasmid pAX22, a bla(VIM-1)-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(4):1249-1253. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1249-1253.2001>
- Robin, F., Aggoune-Khinache, J., Delmas, N., Naim, M., Bonnet, R., 2010. Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:466–470. <https://doi.org/10.1128/AAC.00017-09>
- Rossi Gonçalves, I., Dantas, R.C.C., Ferreira, M.L., Batistão, D.W. da F., Gontijo-Filho, P.P., Ribas, R.M., 2017. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. *Brazilian J. Microbiol.* 48, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.004>
- Roux, A., Chigo J-M., 2006. Les biofilms bactériens. *Communication, Bull. Acad. Vét.* 261-268.
- Ruh, E., Gazi, U., Güvenir, M., Süer, K., Çakır, N., 2016. Antibiotic resistance rates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumonia* isolated from a university-affiliated hospital in North Cyprus. *Turk Hij. Den. Biyol. Derg.* 73(4), 333-44. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2016.82653>
- Ruiz-Martínez, L., López-Jiménez, L., Fusté, E., Vinuesa, T., Martínez, J. P., Viñas, M., 2011. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 38(5), 398-402. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.06.016>
- Saadatian, M., Aghaei, M., Sarahpour, M., Balouchi, Z., 2013, *Global Journal of Medicinal Plant Research*, 1(2) “Chemical composition of lavender (*Lavandula officinalis* L.) Extraction extracted by two solvent concentrations”. 214-217.
- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., Prince, A. S., 2005. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 171(11), 1209–1223. <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1044SO>
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., Bestervelt, L. L., 2013. Microbial siderophores: a mini review. *J. Basic Microbiol.* 53(4), 303–317. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100552>
- Sakyo, S., Tomita, H., Tanimoto, K., Fujimoto, S., Ike, Y., 2006. Potency of carbapenems for the prevention of carbapenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot.* 59:220-228. <https://doi.org/10.1038/ja.2006.31>
- Salma, R., Dabboussi, F., Kassaa, I., Khudary, R., Hamze, M., 2013. GyrA and parC mutations in quinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Nini Hospital in north Lebanon. *J Infect Chemother.* 19(1):77–81. <https://doi.org/10.1007/s10156-012-0455-y>

- Sánchez, P., Linares, J. F., Ruiz-Díez, B., Campanario, E., Navas, A., Baquero, F., Martínez, J. L., 2002. Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants. J. Antimicrob. Chemother. 50(5), 657–664. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf185>
- Sanchez, C.J., Mende, K., Beckius, M.L., Akers, K.S., Romano, D.R., Wenke, J.C., Murray, C.K., 2013. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infect. Dis. 13, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-47>
- Sanz-García, F., Hernando-Amado, S., Martínez, J.L., 2018. Mutational evolution of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to ribosome-targeting antibiotics. Front Genet 9:451. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00451>
- Sasidharan, I., Nirmala, M.A., 2010. Comparative chemical composition and antimicrobial activity fresh and dry ginger oils (*Zigiber officinale Roscoe*). Int J Curr Pharmaceut Res. 2: 40-43.
- Sati, S C., Savita J., 2010. Antibacterial potential of leaf extracts of *Juniperus communis* L. from Kumaun Himalaya. African Journal of Microbiology Research 4: 1291-1294.
- Satir, B.S., Elkhalfa, A. I., Ali, M. A., El Hussein, Elkhidir, I. M., Enan, K. A., 2016. Detection of Carbapenem resistance genes among selected Gram Negative bacteria isolated from patients in-Khartoum State, Sudan. Clinical Microbiology. 5(6). <https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000266>
- Saviuc, C., Gheorghe, I., Coban, S., Drumea, V., Chifiriuc, M.C., Banu, O., Bezirtzoglou, E., Lazăr, V., 2016. *Rosmarinus officinalis* essential oil and eucalyptol act as efflux pumps inhibitors and increase ciprofloxacin efficiency against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* MDR strains. Rom. Biotechnol. Lett. 21: 11796–11804.
- Saxena, S., Banerjee, G., Garg, R., Singh, M., 2014. Comparative study of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients of lower respiratory tract infection. J. Clin. Diagnostic Res. 8, 9–11. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7808.4330>
- Schneider, I., Keuleyan, E., Rasshofer, R., Markovska, R., Queenan, A.M., Bauernfeind, A., 2008. VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany. Antimicrob Agents Chemother. 52(8):2977-2979. <https://doi.org/10.1128/AAC.00175-08>
- Schniederjans, M., Koska, M., Häußler, S., 2017. Transcriptional and mutational profiling of an aminoglycoside-resistant *Pseudomonas aeruginosa* small-colony variant. Antimicrob. Agents Chemother. 61. <https://doi.org/10.1128/AAC.01178-17>
- Schwarz, S., Johnson, A.P., 2016. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. J Antimicrob Chemother. 71(8), 2066–2070. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw274>
- Schweizer, H.P., 2003. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genet Mol Res. 2(1), 48–62
- Sebiomo, A., Awofodu, A.D., Awosanya, A.O., Awotona, F.E., Ajayi, A.J., 2011. Comparative studies of antibacterial effect of some antibiotics and ginger (*Zingiber officinale*) on two pathogenic bacteria. J. Microbiol. Antimicrob. 3: 18-22.

- Sefraoui, I., Berrazeg, M., Drissi, M., Rolain, J. M., 2014. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microb Drug Resist.* 20(2), 156-161. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0161>
- Sefraoui, I., 2015. Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'Ouest algérien. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen. 94p.
- Seiffert, S. N., Hilty, M., Perreten, V., Endimiani, A., 2013. Extended- spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug Resist. Updat.* 16, 22–45. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.12.001>
- Sela, F., Karapandzova, M., Stefkov, G., Kulevanova, S., 2011. Chemical composition of berry essential oils from *Juniperus communis* L. (*Cupressaceae*) growing wild in Republic of Macedonia and assessment of the chemical composition in accordance to European Pharmacopoeia. *Macedonian Pharm. Bull.* 57, 43–51.
- Selim, S., El Kholy, I., Hagagy, N., El Alfay, S., Aziz, M.A., 2015. Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 29 (1), 152–156. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.981065>
- Senda, K., Arakawa, Y., Nakashima, K., Ito, H., Ichiyama, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M., 1996. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(2),349–53. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.2.349>
- Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., Raoult, D., 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49(4), 543–551. <https://doi.org/10.1086/600885>
- Seupt, A., Schniederjans, M., Tomasch, J., Häussler, S., 2021. Expression of the mexxy aminoglycoside efflux pump and presence of an aminoglycoside-modifying enzyme in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates are highly correlated. *Antimicrob. Agents Chemother.* 65. <https://doi.org/10.1128/AAC.01166-20>
- Shahada, F., Chuma T., Tobata, T., Okamoto, K., Sueyoshi, M., Takase, K., 2006. Molecular epidemiology of antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar *Infantis* from poultry in Kagoshima, Japan. *Int J Antimicrob Agents.* 28:302-307. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.07.003>
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Danish Rizvi, S. M., Kamal, M. A., 2015. Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *Saudi J. Biol. Sci.* 22(1), 62–64. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.06.001>
- Sharma, P.K., Singh, V., Ali, M., 2016. Chemical composition and antimicrobial activity of fresh rhizome essential oil of *Zingiber Officinale Roscoe*. *Pharmacognosy Journal* 8 (3), 185- 190. <http://dx.doi.org/10.5530/pj.2016.3.3>

- Shim, S., Kim, S., Choi, D. S., Kwon, Y. B., Kwon, J., 2011. Anti-inflammatory effects of [6]-shogaol: potential roles of HDAC inhibition and HSP70 induction. *Food Chem Toxicol.* 49(11), 2734–2740. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.012>
- Shrestha, R., Nayak, N., Bhatta, D. R., Hamal, D., Subramanya, S. H., Gokhale, S., 2019. Drug resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in a tertiary care hospital of Nepal. *Nepal Medical College Journal*, 21(2),110–116. <https://doi.org/10.3126/nmcj.v21i2.25109>
- Shriram, V., Khare, T., Bhagwat, R., Shukla, R., Kumar, V., 2018. Inhibiting bacterial drug efflux pumps via phyto-therapeutics to combat threatening antimicrobial resistance. *Front. Microbiol.* 9, 2990. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02990>
- Sienkiewicz, M., Łysakowska, M., Cieławierz, J., Denys, P., Kowalczyk, E., 2011. Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Med Chem.* 7(6), 674–689. <https://doi.org/10.2174/157340611797928488>
- Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., Kallen, A., Limbago, B., Fridkin, S., National Healthcare Safety Network (NHSN) Team, Participating NHSN Facilities, 2013. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 34(1):1–14. <https://doi.org/10.1086/668770>
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A., Levy, S.B., Jackson, R.W., 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35: 652–680. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>
- Singh, G., Kapoor, I.P.S., Singh, P., de Heluani, C.S., de Lampasona, M.P., Catalan, C.A.N., 2008. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3295–3302. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.017>
- Singla, N., Thind, R.K., Mahal, A.K., 2014. Potential of *Eucalyptus* oil as repellent against house rat, *Rattus rattus*. *Sci World J.* 2014; <https://doi.org/10.1155/2014/249284>
- Sirocchi, V., Caprioli, G., Cecchini, C., Coman, M.M., Cresci, A., Maggi, F., Papa, F., Ricciutelli, M., Vittori, S., Sagratini, G., 2013. Biogenic amines as freshness index of meat wrapped in a new active packaging system formulated with essential oils of *Rosmarinus officinalis*. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64, 921–928. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.809706>
- Sivasothy, Y., Chong, W.K., Hamid, A., Eldeen, I.M., Sulaiman, S.F., Awang, K., 2011. Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade and their antibacterial activities. *Food Chemistry.* 124:514-517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.062>
- Sjolander, I., Hansen, F., Elmanama, A., Khayyat, R., Abu-Zant, A., Hussein, A., et al., 2014. Detection of NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Palestine. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.11.002>
- Smith, D.J., Ramsay, K.A., Yerkovich, S.T., Reid, D.W., Wainwright, C.E., Grimwood, K., Bell, S. C., & Kidd, T. J., 2016. *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance in

- Australian cystic fibrosis centres. *Respirology*. 21(2), 329–337.
<https://doi.org/10.1111/resp.12714>
- Smitha, S., Lalitha, P., Prajna, V.N., Srinivasan, M., 2005. Susceptibility trends of *Pseudomonas* species from corneal ulcers. *Indian J Med Microbiol*. 23: 168–171.
<https://doi.org/10.4103/0255-0857.16588>
- Solórzano-Santos, F., and Miranda-Navales, M. G., 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *curr. opin. Biotechnol*. 23, 136–141.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.005>
- Sønderholm, M., Kragh, K.N., Koren, K., Jakobsen, T.H., Darch, S.E., Alhede, M., Jensen, P.Ø., Whiteley, M., Kühn, M., Bjarnsholt, T., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* aggregate formation in an alginate bead model system exhibits in vivo-like characteristics. *Appl. Environ. Microbiol*. 83. <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-17>
- Spiers, A. J., Buckling, A., Rainey, P. B., 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology (Reading, England)*. 146 (Pt 10), 2345–2350.
<https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2345>
- Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N., Poole, K., 1998. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother*. 42(1), 65–71.
<https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.65>
- Srinivasa, R.R., Karthika, R.U., Singh, S.P., Shashikala, Kanungo, R., Jayachandran, S., Prashanth, K., 2008. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Indian J Med Microbiol*. 26(4):333-337. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.43566>
- Staudinger, B.J., Muller, J.F., Halldórsson, S., Boles, B., Angermeyer, A., Nguyen, D., Rosen, H., Baldursson, O., Gottfreðsson, M., Guðmundsson, G.H., Singh, P. K., 2014. Conditions associated with the cystic fibrosis defect promote chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 189, 812–824.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201312-2142OC>
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B.S., Vabic-Vlahovic, M., 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40 : 175–179.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Olson, M. V., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406(6799), 959–964.
<https://doi.org/10.1038/35023079>
- Strateva, T., Yordanov, D., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol*. 58(Pt 9), 1133–1148.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.009142-0>
- Strepel, N., Neidig, A., Nusser, M., Geffers, R., Vieillard, J., Lesouhaitier, O., Brenner-Weiss, G., Overhage, J., 2013. Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor

- production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE. 8(12), e82240. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082240>
- Subedi, D., Vijay, A.K., Kohli, G.S., Rice, S.A., Willcox, M., 2018. Nucleotide sequence analysis of NPS-1 β -lactamase and a novel integron (In1427)-carrying transposon in an MDR *Pseudomonas aeruginosa* keratitis strain. J. Antimicrob. Chemother. 73, 1724–1726. <https://doi.org/10.1093/jac/dky073>.
- Sugawara, E., Nikaido, H., 1994. OmpA protein of *Escherichia coli* outer membrane occurs in open and closed channel forms. J. Biol. Chem. 269(27), 17981–17987.
- Sugawara, E., Nestorovich, E. M., Bezrukov, S. M., Nikaido, H., 2006. *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. J. Biol. Chem. 281(24), 16220–16229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600680200>
- Suzuki, M., Suzuki, S., Matsui, M., Hiraki, Y., Kawano, F., Shibayama, K., 2014. A subclass B3 metallo- β -lactamase found in *Pseudomonas alcaligenes*. J. Antimicrob. Chemother. 69, 1430–1432. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt498>
- Swamy, M.K., Akhtar, M.S., Sinniah, U.R., 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. Evid-Based Complement. Alternat. Med. 3012462. <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>
- Tafti, F.A., Eslami, G., Zandi, H., Barzegar, K., 2020. Mutations in Nalc gene of Mex AB-OprM efflux pump in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds in Yazd, Iran. Iran. J. Microbiol. 12: 32–36. <https://doi.org/10.18502/ijm.v12i1.2514>
- Tahmasebi, H., Dehbashi, S., Arabestani, M.R., 2020. Prevalence and molecular typing of colistin-resistant pseudomonas aeruginosa (Crpa) among β -lactamase-producing isolates: A study based on high-resolution melting curve analysis method. Infect. Drug Resist. 13: 2943–2955. <https://doi.org/10.2147/IDR.S264796>
- Tawfik, A. F., Shibl, A. M., Aljohi, M. A., Altammami, M. A., Al-Agamy, M. H., 2012. Distribution of ambler class A, B and D beta-lactamases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Burns 38, 855–860. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.01.005>
- Teixeira, B., Rodulfo, H., Carreño, N., Guzmán, M., Salazar, E., De Donato, M., 2016. aminoglycoside resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cumana, Venezuela. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 58: 13. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658013>
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. Journal of Clinical Microbiology, 33:2233-2239. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>
- Terzi, H.A., Kulah, C., Ciftci, I.H., 2014. The effects of active efflux pumps on antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. World J Microbiol Biotechnol. 30: 2681–2687. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1692-2>
- Thaller, M.C., Borgianni, L., Di Lallo, G., Chong, Y., Lee, K., Dajcs, J., Stroman, D., Rossolini, G.M., 2011. Metallo-beta-lactamase production by *Pseudomonas otitidis*: a species-

related trait. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 118–123.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01062-10>

- Therrien, C., Levesque, R. C., 2000. Molecular basis of antibiotic resistance and beta-lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. *FEMS Microbiol. Rev.* 24(3), 251–262. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00541.x>
- Tolker-Nielsen, T., 2015. Biofilm development. *Microbiol. Spectr.* 3(2).
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014>
- Tomás, M., Doumith, M., Warner, M., Turton, J. F., Beceiro, A., Bou, G., Livermore, D. M., Woodford, N., 2010. Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(5), 2219–2224. <https://doi.org/10.1128/AAC.00816-09>
- Touati A., Achour W., Abbassi, M.S., Ben Hassen, A., 2007. Détection des gènes ica et de la production de slime parmi des souches de *Staphylococcus epidermidis* isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques. *Pathologie Biologie.* 55: 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2007.03.003>
- Touati, M., Diene, S. M., Dekhil, M., Djahoudi, A., Racherache, A., Rolain, J. M., 2013. Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(5), 2426–2427. <https://doi.org/10.1128/AAC.00032-13>
- Treepong, P., Kos, V.N., Guyeux, C., Blanc, D.S., Bertrand, X., Valot, B., Hocquet, D., 2018. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin. Microbiol. Infect.* 24, 258–266. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.06.018>
- Trigueros, N.S., 2015. Factores de riesgo de adquisición de *Pseudomonas aeruginosa* y comparación de dos estrategias de uso de antibióticos (rotación frente a mezcla) en pacientes críticos: impacto en la adquisición de microorganismos resistentes y desenlaces clínicos. Thèse de doctorat. Université de Barcelona. 209p.
- Tseng, B.S., Zhang, W., Harrison, J.J., Quach, T.P., Song, J.L., Penterman, J., Singh, P.K., Chopp, D.L., Packman, A.I., Parsek, M.R., 2013. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ. Microbiol.* 15, 2865–2878. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12155>
- Tuméo, E., Gbaguidi-Haore, H., Patry, I., Bertrand, X., Thouverez, M., a Talon, D., 2008. Are antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalised patients recovered in the hospital effluents? *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 211: 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.02.010>
- Ulbricht, C., Abrams, T.R., Brigham, A. Ceurvels, J., Clubb, J., Curtiss, W., Kirkwood, C. D., Giese, N., Hoehn, K., Iovin, R., Isaac, R., Rusie, E., Serrano, J. M., Varghese, M., Weissner, W., Windsor, R. C., 2010. An evidence-based systematic review of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the natural standard research collaboration. *J. Diet. Suppl.* 7(4), 351–413. <https://doi.org/10.3109/19390211.2010.525049>

- Ullah, N., Güler, E., Güvenir, M., Arıkan, A., Süer, K., 2019. Isolation, identification, and antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* strains from various clinical samples in a University Hospital in northern Cyprus. *Cyprus J. Med. Sci.* 4(3), 225-228. <https://doi.org/10.5152/cjms.2019.931>
- Uskudar-Guclu, A., Guney, M., Sig, A.K., Kilic, S., Baysallar, M., 2019. Arising prevalence of OXA-48 producer *Escherichia coli* and OXA-48 with NDM co-producer *Klebsiella pneumoniae* strains. *Revista Romana de Medicina de Laborator*, vol. 27, no. 3, pp. 319–326. <https://doi.org/10.2478/rmlm-2019-0030>
- Vakulenko, S. B., Mobashery, S., 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(3), 430–450. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.430-450.2003>
- van Mansfeld, R., Willems, R., Brimicombe, R., Heijerman, H., van Berkhout, F. T., Wolfs, T., van der Ent, C., Bonten, M., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *P. aeruginosa* sequence types. *J. Clin. Microbiol.* 47:4096–4101. <https://doi.org/10.1128/JCM.01462-09>
- van Vuuren, S. F., Suliman, S., Viljoen, A. M., 2009. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Lett. Appl. Microbiol.* 48(4), 440–446. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02548.x>
- Vasiljević, Z., Jovčić, B., Ćirković, I., Đukić, S., 2014. An examination of potential differences in biofilm production among different genotypes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biol. Sci.* 66(1),117–121. <https://doi.org/10.2298/ABS1401117V>
- Vaziri, F., Peerayeh, S. N., Nejad, Q. B., Farhadian, A., 2011. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (aac (6')-I, aac (6')-II, ant (2'')-I, aph (3')-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 66(9), 1519–1522. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322011000900002>
- Verma, A., Arora, S. K., Kuravi, S. K., Ramphal, R., 2005. Roles of specific amino acids in the N terminus of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response. *Infect. Immun.* 73(12), 8237–8246. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8237-8246.2005>
- Vidaur, L., Sirgo, G., Rodríguez, A. H., Rello, J., 2005. Clinical approach to the patient with suspected ventilator-associated pneumonia. *Respir. Care.* 50(7), 965–974.
- Vila, J., Martinez, J.L., 2008. Clinical impact of over-expression of efflux pump in non fermentative gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. *Curr Drug Targets.* 9: 797-807. <https://doi.org/10.2174/138945008785747806>
- Villegas, M.V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J.N., Lopez, J.A., Quinn, J.P., & the Colombian Nosocomial Resistance Study Group, 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 51:1553-1555. <https://doi.org/10.1128/AAC.01405-06>

- Vimal, M., Vijaya, P.P., Mumtaj, P., Farhath, M.S.S., 2013. Antibacterial activity of selected compounds of essential oils from indigenous plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 5(1), 248–253.
- Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K., EPIC II Group of Investigators, 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. 302(21), 2323–2329. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>
- Vettoretti, L., Floret, N., Hocquet, D., Dehecq, B., Plésiat, P., Talon, D., Bertrand, X., 2009. Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 28(10), 1217–1222. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0767-8>
- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., Nordmann, P., 2005. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(2), 306–325. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>
- Walsh, T.R., 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 36 (suppl 3), S8-S14. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(10\)70004-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(10)70004-2)
- Walther-Rasmussen, J., Hoiby, N., 2007. Class A carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 470–482. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm226>
- Wanis, M., Walker, S.A., Daneman, N., Elligsen, M., Palmay, L., Simor, A., Cartotto, R., 2016. Impact of hospital length of stay on the distribution of Gram negative bacteria and likelihood of isolating a resistant organism in a Canadian burn center. *Burns*. 42: 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2015.07.010>
- Wang, W., Li, C. Y., Wen, X. D., Li, P., Qi, L. W., 2009. Simultaneous determination of 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol and 6-shogaol in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: Application to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877(8-9), 671–679. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.021>
- Wang, J., Zhou, J.Y., Qu, T.T., Shen, P., Wei, Z.Q., Yub, Y.S., Li, L.J., 2010. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35:486–491. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.014>
- Wareham, D. W., Curtis, M. A., 2007. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates. *Int. J. Med. Microbiol.* 297(4), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.02.004>
- Wei, Q., Tarighi, S., Dötsch, A., Häussler, S., Müsken, M., Wright, V. J., Cámara, M., Williams, P., Haenen, S., Boerjan, B., Bogaerts, A., Vierstraete, E., Verleyen, P., Schoofs, L., Willaert, R., De Groote, V. N., Michiels, J., Vercammen, K., Crabbé, A., Cornelis, P., 2011. Phenotypic and genome-wide analysis of an antibiotic-resistant small colony variant (SCV) of *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS One*. 6(12), e29276. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029276>
- Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., Edwards, J. R., Sievert, D. M., 2016. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-

- associated infections: Summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2011-2014. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 37(11), 1288–1301. <https://doi.org/10.1017/ice.2016.174>
- Weldhagen, G. F., Poirel, L., Nordmann, P., 2003. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(8), 2385–2392. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2385-2392.2003>
- Wi, Y. M., Choi, J. Y., Lee, J. Y., Kang, C. I., Chung, D. R., Peck, K. R., Song, J. H., Ko, K. S., 2017. Emergence of colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone in South Korea. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 49(6), 767–769. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.023>
- Wiley, J. M., Sherwood, L. M., Woolverton, C. J., 2009. Prescott's Principles of Microbiology. New York: McGraw-Hill.
- Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., Brinkman, F. S., 2016. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* 44(D1), D646–D653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1227>
- Woegerbauer, M., Zeinzinger, J., Springer, B., Hufnagl, P., Indra, A., Korschineck, I., Hofrichter, J., Kopacka, I., Fuchs, R., Steinwider, J., Fuchs, K., Nielsen, K.M., Allerberger, F., 2014. Prevalence of the aminoglycoside phosphotransferase genes *aph(39)-IIIa* and *aph(39)-IIa* in *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* and *Staphylococcus aureus* isolates in Aust. *J. Med. Microbiol.* 63. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.065789-0>
- Wolter, D. J., Kurpiel, P. M., Woodford, N., Palepou, M. F., Goering, R. V., Hanson, N. D., 2009b. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 557–562. <https://doi.org/10.1128/AAC.00734-08>
- Woronuk, G., Demissie, Z., Rheault, M., Mahmoud, S., 2011. Biosynthesis and therapeutic properties of *Lavandula* essential oil constituents. *Planta Med.* 77(1): 7–15. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250136>
- Wright, L.L., Turton, J.F., Livermore, D.M., Hopkins, K.L., Woodford, N., 2015. Dominance of international 'high-risk clones' among metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK. *J Antimicrob Chemother* 70: 103-110. <https://doi.org/10.1093/jac/dku339>
- Yakupogullari, Y., Otlu, B., Dogukan, M., Gursoy, C., Korkmaz, E., Kizirgil, A., Ozden, M., Durmaz, R., 2008. Investigation of a nosocomial outbreak by alginate-producing pan-antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Infect Control.* 36(10), 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2008.07.006>
- Yan, J.J., Hsueh, P.R., Ko, W.C., Luh, K.T., Tsai, S.H., Wu, H.M., Wu, J. J., 2001. Metallo- β -Lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme.

- Yan, J. J., Hsueh, P. R., Lu, J. J., Chang, F. Y., Ko, W. C., Wu, J. J., 2006. Characterization of acquired beta-lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 58(3), 530–536. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl266>
- Yang, X., Xing, B., Liang, C., Ye, Z., Zhang, Y., 2015. Prevalence and fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital of South China. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8: 1386–1390.
- Yang, S. K., Yap, P. S. X., Krishnan, T., Yusoff, K., Chan, K. G., Yap, W. S., Lai, K. S., & Lim, S. H. E., 2018. Mode of action: Synergistic interaction of peppermint (*Mentha x piperita* L. Carl) essential oil and meropenem against plasmid-mediated resistant *E. coli*. *Rec. Nat. Prod.* 12(6), 582-594. <https://doi.org/10.25135/rnp.59.17.12.078>
- Y  t  rian, E., 2010. Bases moléculaire de la maturation et de la sécrétion de la pyoverdine chez *Pseudomonas aeruginosa*. Université de Strasbourg. France. 178p.
- Yin, S., Chen, P., You, B., Zhang, Y., Jiang, B., Huang, G., Yang, Z., Chen, Y., Chen, J., yuan, Z., Zhao, Y., Li, M., Hu, F., Gong, Y., Peng, Y., 2018. Molecular typing and carbapenem resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Chinese burn center from 2011 to 2016. *Front. Microbiol.* 9 : 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01135>
- Yin, Y., Gong, F.Y., XinWu, X., Sun, Y., Li Y., Chen, T., Xu, Q., 2008. Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *Ethnopharmacol* 120: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.029>
- Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato, H., Arakawa, Y., 2003. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* 362(9399), 1888-1893. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14959-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14959-8)
- Yoon E-J, Kim, D., Lee H., Lee, H.S., Shin, J.H., Park, Y.S., Kim, Y.A., Shin, J.H., Shin, K.S., Uh, Y., Jeong, S.H. 2019. Mortality dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections and the influence of defective OprD on mortality: prospective observational study. *J Antimicrobial Chemotherapy.* 74: 2774–2783. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz245>
- Zafer, M. M., Al-Agamy, M. H., El-Mahallawy, H. A., Amin, M. A., Ashour, S. E. D., 2015. Dissemination of VIM-2 producing *Pseudomonas aeruginosa* ST233 at Tertiary Care Hospitals in Egypt. *BMC Infectious Diseases.* 1(15), 122. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0861-8>
- Zafer, M. M., Al-Agamy, M. H., El-Mahallawy, H. A., Amin, M. A., Ashour, S.E.D., 2014. Antimicrobial resistance pattern and their beta-lactamase encoding genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cancer patients. *BioMed Research International.* 2014 :101635. <https://doi.org/10.1155/2014/101635>
- Zaidi, F.Z., Dali-Yahia, R., Zenati, K., Yazli, L., Lounes, M., Aberkane, S., Jean Pierre, H., Barraud, O., Godreuil, S., Touati, A., 2020. Characterization of VIM-4 Producing clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from western Algeria: Sequence Type and Class 1

integron description. *Microb. Drug Resist.* 26: 1437–1441.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0225>

- Zakaria, A., Rhmtallah, M., Abdo, Z.M., Ismail, M.F., Ali, A.H. Mohammed Hamad, M.N., 2020. Molecular detection of colistin resistance gene *mcr-1* in Gram negative rods isolated from hospitalized patients in Khartoum State. *Saudi J. Pathol. Microbiol.* 5(8), 380–384. <https://doi.org/10.36348/sjpm.2020.v05i08.005>
- Žáková, A., Talábová, E., Giamarellou, H., Mačičková, T., Micháľková-Papajová, D., Bagová, M., Benczeová, S., Jakab, A., Kettner, M., 2001. Comparison of aminoglycoside resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Slovakia and Greece. *Biologia, Bratislava.* 56, 617–23.
- Zengin, H., Baysal, A.H., 2014. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules* 19 (11), 17773-17798.
<https://doi.org/10.3390/molecules191117773>
- Zhao, W.H., Hu, Z.Q., 2011. Epidemiology and genetics of VIM-type metallo- β -lactamases in Gram-negative bacilli. *Future Microbiology*, 6(3), 317–333.
<https://doi.org/10.2217/fmb.11.13>
- Zhao, W.H., Hu, Z.Q., 2015. Acquired metallo- β -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. *Future Microbiol.* 10(5), 873-887. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.18>
- Zhang, Y., Li, Y., Zeng, J., Chang, Y., Han, S., Zhao, J., Fan, Y., Xiong, Z., Zou, X., Wang, C., Li, B., Li, H., Han, J., Liu, X., Xia, Y., Lu, B., Cao, B., 2020. Risk factors for mortality of inpatients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in China: Impact of resistance profile in the mortality. *Infect. Drug Resist.* 13: 4115–4123.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S268744>
- Ziebuhr, W., Lossner, I., Krimmer, V., Hacker, J., 2001. Methods to detect and analyze phenotypic variation in biofilm-forming staphylococci. *Met Enzymol.* 336:195-205.
[https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(01\)36590-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(01)36590-4)<https://doi.org/10.2147/IDR.S268744>
- Zoghalmi, A., Kanzari, L., Boukadida, J., Messadi, A.A., Ghanem, A., 2012. Profil épidémiologique et résistance aux antibiotiques des Souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au centre de Traumatologie et Grands Brûlés en Tunisie durant trois ans. *Tunisie Medicale* 90, 803–806.
- Zouari, S., Zouari, N., Fakhfakh, N., Bougatef, A., Ayadi, M. A. Neffati, M., 2010. Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba alba* Asso. *Journal of Medicinal Plants Research.* 4 (10), 871–880.
- Zubko, E. I., Zubko, M. K., 2013. Co-operative inhibitory effects of hydrogen peroxide and iodine against bacterial and yeast species. *BMC Res. Notes.* 6: 272.
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-272>

Production scientifique

Original Article

Occurrence of VIM-4 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an Algerian hospital

Manel Merradi¹, Ahmed Kassah-Laouar^{2,3}, Ammar Ayachi⁴, Nouzha Heleili⁴, Taha Menasria⁵, Didier Hocquet⁶, Pascal Cholley⁶, Marlène Sauget⁶

¹ Department of Microbiology and Biochemistry, Faculty of Natural and Life Sciences University of Batna 2, Batna, Algeria

² Faculty of Medicine, University of Batna 2, Batna, Algeria

³ Central Laboratory of Medical Biology, Anti-Cancer Center, Batna, Algeria

⁴ Department of Veterinary Sciences, Veterinary and Agricultural Sciences Institute, University of Batna 1, Batna, Algeria

⁵ Department of Applied Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University of Tebessa, Tebessa, Algeria

⁶ Hospital Hygiene, Regional University Hospital Center, Besançon, France

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most common nosocomial pathogens, known with a wide resistance to antimicrobials. Carbapenemases producing *Pseudomonas aeruginosa* is a growing global public health concern as this pathogen is easily transmissible among patients. Metallo-Beta-lactamases is the most important class of these carbapenemases with their broad-spectrum resistance profile. This study was conducted to investigate the prevalence of MBL-producing *P. aeruginosa* collected in an Algerian hospital.

Methodology: All Metallo- β -lactamase (MBL)-producing *P. aeruginosa* isolates recovered from patients during a 2 years period (2015-2016) were studied using a combination of phenotypic and molecular typing methods (susceptibility testing, molecular characterization of carbapenemase-encoding genes, multi-locus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis).

Results: A total of twenty-six MBL producing *P. aeruginosa* of 188 isolates were investigated. The burns unit ranked in the first position of the majority of identified cases with 73.07%. About 73.07% of total MBL isolates were mainly isolated from pus samples. The studied isolates were subjected to the molecular typing, in which 4 different DraI-PFGE patterns and 3 sequences type were assigned (ST244, ST381, and ST1076), and all isolates were revealed positive for VIM-4.

Conclusions: We report the third description of *bla*_{VIM-4} in Algeria indicating the emergence and spread of carbapenemase-encoding genes among *P. aeruginosa* in the hospital environment.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; antibiotic resistance; MBL; VIM-4; PFGE; sequence type.

J Infect Dev Ctries 2019; 13(4):284-290. doi:10.3855/jidc.10679

(Received 05 July 2018 – Accepted 20 December 2018)

Copyright © 2019 Merradi *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen that is considered as a major cause of many infections [1]. Its high genetic plasticity enables it to colonize a wide variety of environments and infect almost all anatomical sites [2]. It is responsible for severe hospital-acquired infections especially for the patients compromised by underlying disease, age or immune deficiency (burns, cystic fibrosis, meningitis, abscess, urinary tract infections, catheter-associated infections, and ocular infections) [3]. The intrinsic and acquired resistance of *P. aeruginosa* against many different types of antibiotics, in particular,

β -lactams complicates the treatment of these infections, often associated with high mortality rates.

P. aeruginosa has become increasingly resistant to broad-spectrum cephalosporins leading to the use of the last lines agents such as carbapenems [4]. As a result of the intensive use of these molecules, *P. aeruginosa* jeopardizes therapy and developed a resistance that threatened health care systems [5].

An important mechanism of carbapenem resistance is the production of carbapenemases often seen in the clinical isolates of *P. aeruginosa* [6]. The most important carbapenemases are zinc-dependent Metallo-beta-lactamases with a resist pattern to almost all β -lactams. The known MBLs of *Pseudomonas aeruginosa* are IMP (active on IMiPenem), SPM (Sao Paulo Metallo- β -lactamase), AIM (Australia IMipenemase), GIM (German IMipenemase), VIM

(Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase), and more recently NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase) and FIM-1 (Florence IMipenemase) where the VIM type enzymes were prevalent and most frequently detected worldwide in *P. aeruginosa* [7].

Metallo- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* has been extensively reported from different countries in the world [8]. However, data on the prevalent carbapenems resistant phenotypes are limited and poorly investigated in Algeria [9-13]. This work is one among the fewest studies conducted on hospitals in Algeria aiming to project the light on the state of the antibiotic resistance, its level and the main emergent mechanisms. Thus, using a combination of molecular typing methods, a study was conducted to better understand the prevalence and current distribution of MBLs producing clinical isolates of *P. aeruginosa* recovered from the university hospital of a medium-sized city (Batna, North-Eastern Algeria).

Methodology

Bacterial isolates

During the period from January 2015 to December 2016, 188 non-redundant clinical isolates of *P. aeruginosa* were recovered from different pathological samples (pus, blood, urine, cerebrospinal fluid, pleural fluid, throat swab, ascites and others) obtained from hospitalized patients and outpatients consulting the University Hospital Center of Batna (Northeastern Algeria) (Table 1); a structure of 635 beds.

The isolates were presumptively identified by routine tests; colony morphology, pigmentation, isolation on cefrimide agar, oxidase test, and API 20NE System (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France). For further analysis, MBL-producing isolates were identified using matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) with Microflex LT control software (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany).

Antibiotic susceptibility and MBL phenotypic determination

Antibiotic susceptibility testing was performed according to the recommendations of the Clinical Laboratory Standards Institute [14] using the disk diffusion method on Mueller Hinton agar. Fourteen antimicrobial agents were tested including; ticarcillin (75 μ g), piperacillin (100 μ g), ticarcillin/clavulanic acid (75/10 μ g), ceftazidime (30 μ g), imipenem (10 μ g), aztreonam (30 μ g), amikacin (30 μ g), tobramycin (10 μ g), gentamicin (10 μ g), netilmicin (30 μ g), ciprofloxacin (5 μ g), levofloxacin (5 μ g) fosfomicin

(50 μ g+ 50 μ gG6P) and rifampicin (30 μ g). The antibiotic disks and the used media were purchased from (HiMedia, Mumbai, India). The plates were inoculated with a 1/100 dilution of 0.5 McFarland suspension and incubated at 37°C for 24 hours and the diameters of zones of inhibition were compared to reference values [14] to determine the susceptibility or resistant pattern of the isolates. *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used as a wild-type for quality control. The production of Metallo- β -lactamases was screened using the Modified Hodge test (MHT) and the double disk synergy test (DDST) according to the CLSI guidelines [14].

Molecular typing

Twenty-six *Pseudomonas* isolates were selected for their resistance to all beta-lactams except the aztreonam (MBL strains) and subjected to molecular analysis.

Metallo- β -lactamases molecular identification

Carbapenem-hydrolyzing enzyme-encoding genes were determined by polymerase chain reaction (PCR) for the simultaneous detection of *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} and *bla*_{NDM} using primers and conditions as described by Ellington *et al.* [15] and Poirel *et al.* [16]. All amplified products were then sequenced.

Pulsed Field Gel Electrophoresis Typing (PFGE)

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis was performed as described by Talon *et al.* [17] to study the epidemiological relatedness of these isolates. Genomic DNA was digested with *Dra*I (Roche Diagnostics, Meylan, France) at 37°C according to the manufacturer's instructions and the restriction fragments were separated in 1.2% agarose gels. The PFGE was carried out at 6V/cm for 24 hours using the CHEF DR III apparatus (Bio-Rad, Hercules, USA) and gels were stained with ethidium bromide. The relatedness of each PFGE fingerprint was determined using the unweighted pair group method and GelCompar software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) for cluster analysis and to establish a DNA similarity matrix *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 was included as a reference to compare the gels. The banding patterns were interpreted based on the criteria proposed by Tenover *et al.* [18].

Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

The epidemiological relatedness of *P. aeruginosa* was studied by multilocus sequence typing (MLST) as described [19]. The following seven housekeeping genes (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA*, and *trpE*)

were used for the characterization. Alleles and sequence type (ST) assignment were performed at the *P. aeruginosa* MLST website (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>).

Data analysis

Frequencies of *P. aeruginosa* isolates recovered from different wards were calculated as the percentage of a number of isolates to the total of surveyed patients

hospitalized in different units. Pearson's Chi-squared test (χ^2) was performed to test the statistical significance of differences between groups and the statistical significance was defined as $P < 0.05$.

Results

Epidemiological survey

During the study period, 188 *P. aeruginosa* were isolated, including (63.3%) male and (36.7%) female

Table 1. Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* among the hospitalized patients.

Variable	Admitted patients (n/%)	P-value	Patients associated with MBL, n (%)	P-value		
Gender						
Males	119 (63.3)	< 0.001	19 (9.5)	0.01		
Females	69 (36.7)		7 (3.5)			
Age						
Mean \pm SD	37.6 \pm 17.86	< 0.001	22.94 \pm 18.76	NS		
0-10	51 (27.13)		9 (34.6)			
10-20	26 (13.83)		5 (19.2)			
20-40	61 (32.45)		5 (19.2)			
40-60	32 (17.02)		7 (26.9)			
60-90	18 (9.57)		0			
Hospital ward						
Burns	68 (36.17)	< 0.001	19 (73.07%)	< 0.001		
Neurosurgery	27 (14.36)		2 (7.69)			
ICU	24 (12.76)		0			
Hematology	13 (6.91)		2 (7.69%)			
Internal medicine	10 (5.31)		0			
Traumatology	10 (5.31)		1 (3.84)			
External	10 (5.31)		0			
Nursery	7 (3.72)		1 (3.84)			
Endocrinology	4 (2.13)		0			
Nephrology	3 (1.6)		0			
Surgery	3 (1.6)		0			
Cardiology	3 (1.6)		0			
Pediatrics	3 (1.6)		1 (3.8)			
Emergency	2 (1.06)		0			
Forensic medicine	2 (1.06)		0			
Orthopedics	1 (0.53)		0			
Specimen						
Pus	114 (60.64)		< 0.001		19 (73.07)	< 0.001
Blood	17 (9.04)				1 (3.84)	
Cerebrospinal fluid	16 (8.51)	1 (3.84)				
Tracheal protected	14 (7.45)	0				
Urine	9 (4.8)	1 (3.84)				
Catheter	4 (2.13)	1 (3.84)				
Pleural fluid	4 (2.13)	0				
Throat swab	3 (1.6)	1 (3.84)				
Urinary catheter	3 (1.6)	2 (7.69)				
Bladder catheter	2 (1.06)	0				
Ascites	1 (0.53)	0				
Adenitis	1 (0.53)	0				
Skin wound	1 (0.53)	0				
Other	1 (0.53)	0				
Total	188 (100)			26 (13.82)		

NS. Not significant.

with a sex ratio of 1.72 and a mean age of 37.6 ± 17.86 years (Table 1). All patients were hospitalized at the time of *Pseudomonas* isolation, with the exception of 10 cases identified during outpatient visits. As shown in Table 1, burns, neurosurgery and intensive care unit (ICU) grouped the majority identified cases with 36.17%, 14.36%, and 12.76% respectively. In addition, hematology, internal medicine, traumatology, and external medicine shared frequencies ranged from 5.31% to 6.91% of total confirmed cases. *P. aeruginosa* strains are mainly isolated from pus sample (60.64%). Further, blood samples, cerebrospinal fluid and tracheal protected represent 7.47% to 9.04% of the total isolated sources of *P. aeruginosa*.

Antimicrobial susceptibility

The results of the antimicrobial susceptibility rates of the total clinical isolates are presented in (Table 2). Various resistance levels to β -lactam tested drugs were noted including ticarcillin (32%), ticarcillin/clavulanic acid (35.11%), piperacillin (26.06%) and imipenem (20.75%). The aminoglycoside resistance rates ranged from (31%) amikacin, (32%) netilmicin, (26.06%) tobramycin and (26%) for gentamicin. Whereas ciprofloxacin, levofloxacin, and fosfomycin were categorized as the effective molecules on the tested strains.

As shown in Table 1, twenty-six isolates (13.82%) of *P. aeruginosa* presented a positive double disk synergy test and a positive modified Hodge test. These isolates were mainly recovered from pus samples (73.07%, $P < 0.001$) of hospitalized burned patients for the antibiotic susceptibility test, MBLs isolates were found to be highly resistant (100%) to ticarcillin,

ticarcillin/clavulanic acid, piperacillin, imipenem, ceftazidime, and tobramycin (Table 2). No resistance was detected against aztreonam, levofloxacin, ciprofloxacin and fosfomycin. In this study, we focused on the production of MBL as carbapenem-resistance pattern; other mechanisms of resistance to carbapenems are not the subject of this paper.

Molecular typing

PCR analysis of the selected isolates revealed positive results for a *bla*_{VIM-4} gene in all MBL strains (100%, 26/26) (Figure 1). In addition, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM} were not detected in any of the tested strains. The DNA fingerprint patterns of the studied strains revealed four different clusters. Cluster 1, grouped most of the isolates (15 strains) showing a significant resistant homogeneity. As shown in Figure 1, three different sequence types were noted (ST244, ST381, and ST1076) in which the most frequent ST was ST244 with 18 isolates in total.

Discussion

Our results showed that *P. aeruginosa* strains were mainly isolated in burns unit (pus samples) which is due to the fact that skin damage (traumatic or surgical wounds and burns) is a factor contributing to *P. aeruginosa* infections [20]. Patients hosted in high-risk units with reduced immune defenses appear to be susceptible to pathogens infections as *P. aeruginosa* infections, also selection pressure from the prescription of broad-spectrum antibiotics enhancing bacterial infection. Further, and according to Oberholzer et al. [21] sex is considered as a risk factor and the incidence of infection increases significantly in

Table 2. Antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* isolates.

Antibiotics	Antibiotic susceptibility (%)					
	Total <i>P. aeruginosa</i> (N = 188)			MBL <i>P. aeruginosa</i> (N = 26)		
	Resistant	Intermediate	Sensitive	Resistant	Intermediate	Sensitive
Ticarcillin (TIC)	32	0	68	100	0	0
Ticarcillin-clavulanic acid (TCC)	35.11	0	64.89	100	0	0
Piperacillin (PIP)	26.06	0	73.94	100	0	0
Imipenem (IMP)	20.75	1.06	78.19	100	0	0
Ceftazidime (CAZ)	15.00	0.53	84.47	100	0	0
Aztreonam (ATM)	0	1.06	98.94	0	0	100
Amikacin (AK)	31	3.91	65.09	96.15	0	3.85
Gentamicin (GEN)	26	3.19	70.81	96.15	0	3.85
Netilmicin (NET)	32.00	0.53	67.47	96.15	0	3.85
Tobramycin (TOB)	26	2.66	71.34	100	0	0
Rifampicin (RIF)	90	9.04	0.96	92.31	3.85	3.85
Levofloxacin (LEV)	2	1	97	0	0	100
Fosfomycin (FOS)	2.66	0	97.34	0	0	100
Ciprofloxacin (CIP)	0	0	100	0	0	100

men (*P. aeruginosa* infections are more common in men especially with burn wounds).

P. aeruginosa is a major pathogen of nosocomial infections and known for its wide range of antimicrobial resistance, the increased antimicrobial exposure lead to the selection of resistant organisms [22]. The results of the antimicrobial susceptibility patterns of the all isolated *P. aeruginosa* showed various resistance levels to β -lactam tested drugs and aminoglycoside (with no resistance to aztreonam, levofloxacin, ciprofloxacin and fosomycin of MBL strains). Our data stand in contrast with those reported by Meradji et al. [12] where high rates of resistance to ticarcillin, piperacillin and ciprofloxacin were noted.

The emergence and spread of clinical carbapenemase-producing *P. aeruginosa* (MBLs) has become a serious concern and health care problem around the world [23]. The MBL prevalence is 13.82% which is similar to that in Côte d'Ivoire (12.5%) [24], but lower than that in Egypt 68.7% [25]. The presence of VIM-type enzymes was responsible of carbapenem resistance in our MBL-producing isolates. The *bla*_{VIM-4} carrying *P. aeruginosa* isolates were detected in 6 different wards of the hospital mainly in burns, neurosurgery, hematology, traumatology, pediatrics and nursery and associated with three different clones (ST244, ST381, and ST1076), indicating the gene spread and the clonal dissemination which affect the prevalence and the distribution of carbapenemase-encoding genes in the hospital environment. This

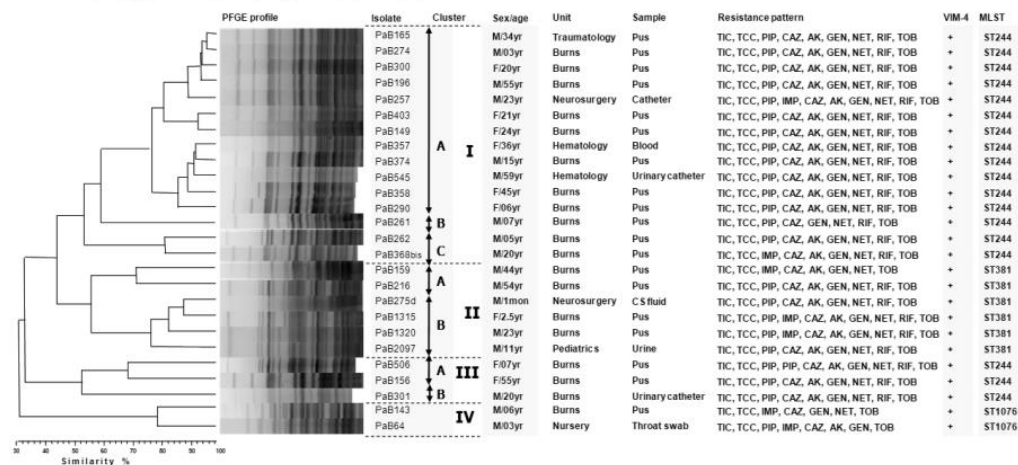
situation is in general restricted to specific patient and locations, where patients are often exposed to broad-spectrum antimicrobial agents and with an increased risk of cross-transmission of resistant germs [26].

The *bla*_{VIM-4} genes have been reported in several countries around the world, including Greece [27], Sweden [28], Poland [29], Hungary [30], Canada [31], Egypt [32] and other European countries [33], mainly detected among related *P. aeruginosa* clones which are encoded by an integron-borne gene cassette with high dissemination potential.

Few reports of VIM class MBL isolates in Algeria were depicted, the first one was the *bla*_{VIM-19} described in five *Enterobacteriaceae* clinical isolates [9], then the *bla*_{VIM-2} has been noted in *P. aeruginosa* clinical strains [10,11] and the *bla*_{VIM-4} gene that has been recently reported among clinical isolates of *P. aeruginosa* [13, 34], by this study we report the third detection of VIM-4 gene carrying *P. aeruginosa* in Algeria indicating its widespread in the hospital environment.

Pseudomonas aeruginosa is well known by its epidemic population with several sequence types as ST111, ST175, ST235, ST 244 and ST 395 that are commonly associated with outbreaks [35]. MBLs are commonly associated with epidemic high-risk clones [36]. The clone belonging to ST244 was the most frequent in our study and corresponded to the second most prevalent Mediterranean *P. aeruginosa* clone [37] and further was detected in Asia [38]. Similarly, the ST1076 clone was also reported among clinical isolates

Figure 1. Dra1 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profiles and resistance patterns of 26 VIM-4 positive *P. aeruginosa* isolates. CAZ, ceftazidime; GEN, gentamicin; TCC, ticarcillin-clavulanic acid; TIC, ticarcillin; TOB, tobramycin; NET, netilmicin; RIF, rifampicin; AK, amikacin; PIP, piperacillin; IMP, imipenem; M, male; F, female.



of *P. aeruginosa* in Algeria [11,13] with imipenem-susceptible and VIM-4 producing *P. aeruginosa*, also Sefraoui et al. [10] detected the ST 381 in imipenem-susceptible strains of *P. aeruginosa*. In contrast, a study conducted by Mathlouthi et al. [39] showed that the ST911 and ST235 were the most frequent clones in Libya. Treepong et al. [35] reported the clonal spread of ST 235 with antibiotic resistance genes in isolates of *P. aeruginosa* across countries and continents. We report the first detection of ST 244 and ST 381 in VIM-4 producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria.

Conclusion

In conclusion, these results revealed a particular concern that the carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* (VIM-4) have been detected and dramatically spread in Algerian hospitals, with a dominance of the clone ST244 mainly isolated from burns unit. These findings suggest that the emergence of these resistant strains limit the therapeutic options and threaten public health. Thus, suggesting that hospitals need to develop better strategies to prevent and control infections by the implementation of strict hygiene protocols to control cross-transmission between patients including antibiotic use policies, isolation of patients with MBL strains and regular surveillance studies. The understanding of the antibiotic resistance in the Algerian hospitals needs more in-depth studies focusing on all resistant strains and their transmission across the hospitals and the creation of a consistent epidemiological data network connecting all hospitals in the country.

Acknowledgements

The authors are thankful to the technical assistance of the Hospital Hygiene, Regional University Hospital Center, Besançon, France for welcoming us and helping us to achieve the molecular characterization, and also to Dr. Messala Amina for her precious contribution in strains collection. No fund was received for this study.

References

- Gellatly SL, Hancock RE (2013) *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 67: 159-173.
- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 13: 560-78.
- Chatterjee M, Anju CP, Biswas L, Kumar VA, Mohan CG, Biswas R (2016) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol* 306: 48-58.
- Breidenstein EB, Fuente-Núñez C, Hancock RE (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 19: 419-426.
- Jeong SJ, Yoon SS, Bae IK, Jeong SH, Kim JM, Lee K (2014) Risk factors for mortality in patients with bloodstream infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact of bacterial virulence and strains on outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 80: 130-135.
- Picão RC, Poirel L, Gales LC, Nordmann P (2009) Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3908-3913.
- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM (2011) Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams. *Lancet Infect Dis* 11: 381-393.
- Souli M, Galani I, Giamarellou H (2008) Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill* 13: 190-145.
- Robin F, Aggoune-Khinache N, Delmas J, Naim M, Bonnet R (2010) Novel VIM metallo-beta-lactamase variant from clinical isolates of Enterobacteriaceae from Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother* 54: 466-470.
- Touati M, Diene SM, Dekhil M, Djahoudi A, Racherache A, Rolain JM (2013) Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2426-2427.
- Sefraoui I, Berrazeg M, Drissi M, Rolain JM (2014) Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microb Drug Resist* 20: 156-161.
- Meradji S, Barguigua A, Zerouali K, Mazouz D, Chettibi H, Elmdaghri N, Timimouni M (2015) Epidemiology of carbapenem non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Eastern Algeria. *Antimicrob Resist Infect Cont* 4: 27.
- Mellouk FZ, Bakour S, Meradji S, Al-Bayssari C, Bentakouk MC, Zouyed F, Djahoudi A, Boutefnouchet N, Rolain JM (2016) First detection of VIM-4-producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda). *Microb Drug Resist* 23: 335-344.
- Clinical and Laboratory standard institute (CLSI) (2011) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21st informational supplement. CLSI document M100-S21 (ISBN 1-56238-742-1)
- Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N (2007) Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 59: 321-322.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P (2011) Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:119 –123.
- Talon D, Dupont MJ, Lesne J, Thouverez M, Michel-Briand Y (1996) Pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological tool for clonal identification of *Aeromonas hydrophila*. *J Appl Bacteriol Mar* 80: 277-282.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-

- field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33: 2233-2239.
19. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG (2004) Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol 42: 5644-5649.
 20. Nichols DP, Caceres S, Caverly L, Fratelli C, Kim SH, Malcolm KC, Saavedra M, Solomon G, Taylor-Cousar J, Moskowitz SM, Nick JA (2013) Effects of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection. J Surg Res 183: 767-776.
 21. Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, Ertel W (2000) Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. J Trauma 48: 932-937.
 22. Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL (2007) Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. J Antimicrob Chemother 60: 1206-1215.
 23. Lin KY, Lauderdale TL, Wang JT, Chang SC (2014) Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Taiwan: Prevalence, risk factors, and impact on outcome of infections. J Microbiol Immunol Infect 49: 52-59.
 24. Gba KMK, Guessem NK, Makaya NPND, Konan EJTF, Toty AA, N'guetta SPA (2018) Detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in an Abidjan Hospital, Côte d'Ivoire. JMAB 8: 1-8.
 25. Zafer MM, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, El Din Ashour S (2015) Dissemination of VIM-2 producing *Pseudomonas aeruginosa* ST233 at tertiary care hospitals in Egypt. BMC Infect Dis 15: 122.
 26. Fridkin SK (2001) Increasing prevalence of antimicrobial resistance in intensive care units. Crit Care Med 29: 64-68.
 27. Pournaras P, Tsakris A, Maniati M, Tzouveleki LS, Maniatis AN (2002) Novel variant (blaVIM-4) of the metallo-beta-lactamase gene blaVIM-1 in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 46: 14026-14028.
 28. Giske CG, Rylander M, Kronvall G (2003) VIM-4 in a carbapenem-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. Antimicrob Agents Chemother 47: 3034-3035.
 29. Patzer J, Toleman MA, Deshpande LM, Kaminska W, Dzianowska D, Bennett MB, Jones RN, Welsh TR (2004) *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual blaVIM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (1998–2001). J Antimicrob Chemother 53: 451-456.
 30. Libisch B, Muzslay M, Gacs M, Minarovits J, Knausz M, Watine J, Ternak G, Kenez E, Kustos I, Rokusz L, Szeles K, Balogh B, Fuzi M (2006) Molecular epidemiology of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas sp.* isolates in Hungary. Antimicrob Agents Chemother 50: 4220-4223.
 31. Mataseje LF, Bryce E, Roscoe D, Boyd DA, Embree J, Gravel D, Katz K, Kibsey P, Kuhn M, Mounchili A, Simor A, Taylor G, Thomas E, Turgeon N, Mulvey MR (2012) Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-2010: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). J Antimicrob Chemother 67: 1359-1367.
 32. Hashem H, Hanora A, Abdalla S, Shaeky A, Saad A (2017) Dissemination of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Egypt: mutation in blaVIM-4. Apmis 125: 499-505.
 33. Castanheira M, Deshpande LM, Costello A, Davies TA, Jones RN (2014) Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-2011 in 14 European and Mediterranean countries. J Antimicrob Chemother 69: 1804-1814.
 34. Meradji S, Barguigua A, Bentakouk MC, Nayme K, Zerouali K, Mazouz D, Chettibi H, Timinouni M (2016) Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria. Burns 42: 906-918.
 35. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, and Hocquet D (2018) Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. Clin Microbiol Infect 24: 258-266.
 36. Wright LL, Turton JF, Livermore DM, Hopkins KL, Woodford N (2015) Dominance of international 'high-risk clones' among metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK. J Antimicrob Chemother 70: 103-110.
 37. Maatallah M, Cheriaa J, Backhrout A, Iversen A, Grundmann H, Do T, Lanotte P, Mastouri M, Elghmati MS, Rojo F, Mejdji S, Giske CG (2011) Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235. PLoS One 6: 25617.
 38. Chen Y, Sun M, Wang M, Lu Y, and Yan Z (2014) Dissemination of IMP-6-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST244 in multiple cities in China. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 33: 1181-1187.
 39. Mathlouthi N, Areig Z, Al Bayssari C, Bakour S, El Salabi AA, Ben Gwief S, Zorgani AA, Ben Slama K, Chouchani C, Rolain JM (2015) Emergence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates collected from some Libyan hospitals. Microb Drug Resist 21: 335-341.

Corresponding author

Ayachi Ammar. Pr
 Department of Veterinary Sciences, Veterinary and Agricultural Sciences Institute, University of Batna 1, St. Chadid Boukhlof, Batna 05000, Algeria.
 Tel: 00213-553-61-31-17
 Email: aayachi54@yahoo.fr

Conflict of interests: No conflict of interests is declared.

Annexes

Annexes

Annexe1 : Tableau de Lecture de la galerie API 20 NE (Bio-Mérieux).

Tests	Substrats	Réactions Enzymatiques	Résultats	
			Négatifs	Positifs
No3	Potassium nitrate	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1+NIT2 (2 à5 min)	
			Incolore	Rose-rouge
			ZN (5min)	
			Rose	Incolore
TRP	L-tryptophane	Réduction des nitrates en nitrites	JAMES (immédiat)	
			Incolore/vert-pale/ jaune	Rose
GLU	D-glucose	Fermentation du glucose	Bleu à vert	Jaune
ADH	L-arginine	Arginine du glucose	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	Urée	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine citrate de fer	Hydrolyse (B-glucosidase) (esculine)	Jaune	Grise/marron/noir
GEL	Gèlatine	Hydrolyse protéase gélatine	Pas de diffusion de pigment	Diffusion de pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-B-D-galactopyranoside	B-galactosidase (para-nitophényl-B-D-galactopyranoside)	Incolore	Jaune
GLU	D-glucose	Assimilation (glucose)	Transparence	Trouble
ARA	D-arabinose	Assimilation (arabinose)	Transparence	Trouble
MNE	D-mannose	Assimilation (mannose)	Transparence	Trouble
MAN	D-mannitol	Assimilation (mannitol)	Transparence	Trouble
NAG	N-acétylglucosamine	Assimilation (N-acétylglucosamine)	Transparence	Trouble
MAL	D-maltose	Assimilation (maltose)	Transparence	Trouble
GNT	potassium gluconate	Assimilation (potassium gluconate)	Transparence	Trouble
CAP	acide caprique	Assimilation (acide caprique)	Transparence	Trouble
ADI	acide adipique	Assimilation (acide adipique)	Transparence	Trouble
MLT	acide malate	Assimilation (acide malate)	Transparence	Trouble
CIT	trisodium citrate	Assimilation (trisodium citrate)	Transparence	Trouble
PAC	Acide Phénylacétique	Assimilation (Acide Phénylacétique)	Transparence	Trouble

Annexe 2 : Liste des antibiotiques testés pour *Pseudomonas aeruginosa* (CLSI, 2011)

Famille d'antibiotique	Antibiotiques testés	Charge de disques	Diamètres critiques (mm)		
			R	I	S
β- lactamines	Ticarcilline	75 µg	14		15
	Ticarcilline +ac.clavulanique	75/10µg	14		15
	Pipéracilline	100 µg	17		18
	Ceftazidime	30 µg	14	15-17	18
	Aztréonam	30 µg	15	16-21	22
	Imipénème	10 µg	13	14-15	16
Aminoglycosides	Amikacine	30 µg	14	15-16	17
	Gentamicine	10 µg	12	13-14	15
	Nétilmicine	30 µg	12	13-14	15
	Tobramycine	10 µg	12	13-14	15
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	5µg	15	16-20	21
	Lévofloxacine	5µg	13	14-16	17
Fosfomycines	Fosfomycine	50µg + 50µg G6P	<14		≥14
	Rifampicine	30 µg	<14	14-18	≥19