الجمهورية الجزائرية الديموقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى- جيجل

Université Mohamed-SeddikBenyahia -Jijel

M.MB.07/16

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie Appliquée et Science Alimentaire

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية و علوم التغذية

Mémoire De fin D'étude

En vue de l'obtention du diplôme : **Master Académique en Biologie**

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Etude de l'effet de la photosensibilisation des bactéries de l'environnement hospitalier résistantes aux antibiotiques

٥٨/٥٨

Membre de jury :

Président : Mr Y. Rahmoune

Examinateur : Mr T.Khennouf

Encadreur : M^me^S. Moussaoui

Présenté par :

Melle Bouidoune Saida

Melle Boumenakhe Nedjwa

جامعة محمد الصديق بن يحيى
مكتبة الكلية
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Saison : juin-2016

N° d'ordre :.....

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 2431

REMERCIEMENTS :

Avant toutes choses, nous remercions dieu, le tout puissant, pour nos avoir donné la force et la patience.

Nous remercions notre encadreur Mme S. Moussaoui d'avoir accepté de nous encadrer durant cette année, pour son aide, ses conseils et surtout sa grande patience.

Nous remercions vivement Mr Y. Rahmouned'avoir accepté de juger notre modeste travail

Nos vifs remerciements à Mre T. khannouf pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Aux personnels du laboratoire de microbiologie de l'université de Jijel pour leur aide.

Aux personnels de la bibliothèque centrale et la bibliothèque de la faculté des sciences

A tous nos amis

A tous les étudiants en master de la promotion 2016

A toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail

Saida et Nedjwa

Sommaire

Liste des abréviations i

Liste des figures ii

Liste des tableaux Vi

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les bactéries de l'environnement hospitalier résistant aux antibiotiques

Introduction 1

I.1. Définition 2

I.2. Quelques types des bactéries de l'environnement hospitalier 2

I.3. La résistance antibactérienne 3

I.4. Types de mécanismes de résistances 3

I.4.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique 4

I.4.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique 4

I.4.3. Pompes à efflux 4

I.4.4. Perméabilité réduite 5

I.4.5. Protection de la cible de l'antibiotique 6

I.4.6. Piégeage de l'antibiotique 7

Chapitre II : La photosensibilisation

Historique 8

II.1. Définition 8

II.2. Les types des photosensibilisateurs 8

II.2.1. Les photosensibilisateurs de première génération 9

II.2.2. Les photosensibilisateurs de deuxième génération 9

II.2.2.1.Les chlorines 10

II.2.2.2. Métallophtalocyanine de deuxième génération 10

II.3. L'oxygène singulier.....11

II.4. La source lumineuse.....11

II.5. Utilisation des photosensibilisateurs en thérapie.....12

II.5.1. Définition de la thérapie photodénamique.....12

II.5.2. Mécanisme de la thérapie.....12

Chapitre III : Mécanisme d'inactivation microbienne par la photosensibilisation

III.1. Définition.....13

III.2. Principe d'action.....13

III.2.1. Pénétration du photosensibilisant dans la bactérie.....13

III.2.2. Mécanismes d'inactivation bactérienne.....14

III.2.3. Les Agents antimicrobienne photosensibilisants.....15

Chapitre IV : Matériel et méthodes

IV.1. Matériel.....17

IV.2. Méthodes.....19

IV.2.1. Collecte des échantillons.....19

IV.2.1.1. Origine.....19

IV.2.1.2. Prélèvement des souches.....20

IV.2.2. Isolement et purification.....20

IV.2.3. Identification des souches bactérienne.....20

IV.2.4. Etude de la sensibilité aux antibiotiques avant la photosensibilisation.....22

IV.2.4.1. L'antibiogramme.....22

IV.2.5. Etude de l'effet de la photosensibilisation.....22

IV.2.5.1. La sensibilité des souches photosensibilisée aux antibiotiques après la photosensiblisation.....22

IV.2.5.2. Détermination de la sensibilité des souches photosensibilisées a l'Ampicilline par la méthode de dilution.....24

Chapitre V : Résultats et Discussion

V.1. les résultats de la sensibilité des souches aux antibiotiques avant la photosensibilisation.29

V.2. L'effet de la photosensibilisation après la photosensiblisation.....33

V.2.1. la sensibilité des souches photosensibilisées aux antibiotiques par les disques.....37

V.2.2.la sensibilité des souches photosensibilisées aux antibiotiques par la méhodes de dilution 37

Conclusion

Référence bibliographique

Annexes

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase

AK : Amikacine

AlPes : Métallophtalocyanine D'aluminium

AM :Ampicilline

AMX : Amoxicilline

ATB : Antibiotique

BM : Bleu de méthylène

BN : Bouillon nutritif

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CT : Colistine

CTX : Céfotaxime

Cz : Cifazoline

DMSO : Dimethylsufoxide

ECBU : Examen cytobactériologie des urines

GN : Gélose nutritive

H_20_2 : Eau oxygéné

Hp : Hématoporphyrine

HpD : Dérivé de l'Hématoporphyrine

I : Intermédiaire

IpM : Imipenème

K : Kanamycine

LDC : lysine double concentration

LPS : Lipopolysaccharide

MH : Mueller Hinton

ML1 : Médecine interne de lit

MPcs : Metallophthalocyanines

MTN : Médecine interne de table de nuit

O_2^- : Oxygène singulet

ODC : Ornithine double concentration

P : Penicilline

Pc : Phtalocyanine

PDI : Inactivation photodynamique

Pdp : Prélèvement distale protège

PDT : Photothérapie dynamique

PS : Photosensibilisateur

R : Résistante

RB : Rose bengal

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

RP2 : Réanimation de poigne

S : Sensible

SiPc : Métallophtalocyanine De siliciume

SxT : Sulfaméthoxazole + triméthoprime

TSI : Triple-sugeriron agar

ZnPc : Phtalocyanine de Zinc

Liste des figures

Numéro N°	Titre	Page
01	différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie gram négative	3
02	Structure de la paroi des bactéries Gram négative et Gram positif	5-6
03	Haematoporphyrin (Hp)	9
04	la métallophtalocyanine	10
05	Profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus en fonction de la longueur d'onde	12
06	représentation schématique du principe de la PDT	12
07	Mécanisme et action de la photosensibilisation sur la cellule	14
08	les déférentes étapes de la photosensibilisation	15
09	Irradiation des tubes et la microplaque par la lumière rouge pendant 30 mn	23
10	Détermination de la sensibité des souches photosensibiliséeaux antibiotique	25
11	Aspects macroscopiques des colonies de différentes souches isolées à partirde l'hôpital	26
12	Aspects microscopiques (coloration de Gram et observation à grossissement x100) des colonies de différentes souches isolées à partir de l'hôpital	27
13	Test de la catalase	28
14	Test de la coagulasse en tube	28
15	galerie API 20E pour identifier la souche ML1.	28
16	l'antibiogramme de la souche d'Acinetobacterbaumannii	30
17	la sensibilité d'Acinetobacter boumannii vis à vis à des différents antibiotiques	30
18	antibiogramme de vérification de la résistance de la souche*Acenitobacterspp* ML1	31
19	la sensibilité d'AcinetobacterSpp ML1 vis à vis à des différents antibiotique	31

20	**Les résultats de l'antibiogramme de la souche *S.aureus***	*32*
21	***la sensibilité de S. aureus : MTN1 vis à vis à des différents antibiotique***	*32*
22	**Les résultats de l'antibiogramme de la souche *S.aureus***	*33*
23	***la sensibilité de S. aureus : RP2 vis à vis à des différents antibiotiques.***	*33*
24	***Les résultats de l'antibiogramme des souches photosensibilisées***	*34*
25	***résultat de la methode des strie***	*37*
26	***résultat de la methode des puit***	*37*

Liste des tableaux

Numéro N°	titre	Page
01	les types de metallophtalocyanine	11
02	Les antibiotiques testés	19
03	Souche bactérien et leur origine	20
04	les suspensions bactériennes ensemencées par les concentrations des dilutions de métallophtalocyanine.	23
05	caractères culturaux des colonies des différentes souches isolées à partir de l'hôpital.	26
06	Description de l'aspect microscopique des différentes souches isolées à partir de l'hôpital.	27
07	principaux caractères biochimique des souches.	28
08	la lecture de la galerie de l'API de la souche ML1.	29
09	résultats de diamètre des zones d'inhibition de l'antibiogramme.	30
10	Les résultats de l'antibiogramme des souches photosensibilisées après la photosensiblisation.	34
11	La comparaison entre l'antibiogramme de souches testées avant et après la photosensibilisation	35

INTRODUCTION :

L'environnement hospitalier regroupe les aliments, l'eau, l'air, le linge, les déchets, les dispositifs médicaux et les surfaces. Le milieu hospitalier est régulièrement colonisées par des microorganismes. Ces microorganismes sont d'origines diverses et peuvent être issus de patients, du personnel soignant et des visiteurs. Ce milieu constituerais donc une niche écologique de bactéries multi résistantes pouvant être un réservoir à partir duquel des infections nosocomiales peuvent s'y développer **[1].**

Après un demi-siècle d'utilisation des antibiotiques, l'émergence et la dissémination de la résistance bactérienne à cette classe thérapeutique posent un problème de santé publique important dont la maîtrise constitue un défi pour les cliniciens, les microbiologistes, les hygiénistes et les autorités sanitaires **[2].** L'augmentation de la résistance aux antibiotiques se traduit dans la pratique hospitalière par une augmentation de la morbidité et parfois de la mortalité **[3].**

Pour le clinicien, la connaissance des espèces bactériennes les plus fréquemment rencontrées dans une pathologie et de leur sensibilité aux principaux antibiotiques est essentielle pour initier un traitement efficace **[4].**

Le mécanisme de photoinactivation microbiennes par la thérapie photodénamique (PDT) se révèle être un traitement antibactérien efficace, capable de tuer ou d'inactiver les bactéries, et basé sur l'activation d'un photosensibilisateur (PS) par la lumière visible, permettant la formation de l'espèce réactif de l'oxygène (ROS) comme oxygène singulet (O_2^-), produisant ainsi un effet phototoxique sur la cellule [5]. La PDT endommage différentes parties de la cellule microbienne et affecte différentes voies d'interaction dans les micro-organismes. Le développement de la résistance aux antibiotiques au PDT peut être exclu **[6].**

L'objectif de notre travail est basé sur la détermination de l'effet de la photosensibilisation sur la résistance bactérienne aux antibiotiques de plusieurs souches isolées au niveau de l'environnement hospitalier, et l'efficacité de métallophtalocyanine sur l'inactivation de la résistance bactérienne aux antibiotiques sans tuée la cellule bactérienne.

Chapitre I :

Les bactéries de l'environnement hospitalier résistantes aux antibiotiques

I.1. Définition :

A l'hôpital, les surfaces susceptibles d'entrer en contact avec le patient soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire de dispositifs médicaux ou les mains des personnes peuvent constituer des réservoirs microbiens. Toutes les espèces bactériennes isolées à partir de ces surfaces ne sont pas obligatoirement pathogènes mais les flores issuent de l'activité humaine comme les bactéries de la flore cutanée ou des flores muqueuses et certaines espèces bactériennes de la flore hydriques naturelles comme *Pseudomonas aeruginosa* peuvent être responsable d'infection liée aux soins **[07]**.

I.2. Quelques types des bactéries rencontrées dans l'environnement hospitalier :

I.2.1. Staphylococcus aureus :

A. Définition :

Staphylococcus aureus est comme tous les Staphylocoques une coque à Gram positif d'un diamètre d'environ 1 micromètre apparaissant en amas à l'examen microscopique.

Il est immobile, non sporulé et ne présente pas de capsule visible au microscope optique. On distingue les staphylocoques à coagulase positive comme *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* est d'abord un germe pyogène responsable de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses **[08]**.

B. Caractère de culture :

Il cultive facilement sur milieux ordinaires en aérobiose comme en anaérobiose en formant sur les milieux solides des colonies lisses, luisantes, bombées, plus ou moins pigmentées en jaune d'or, d'où l'appellation *Staphylococcus aureus* ou staphylocoque 'doré'. En milieu liquide il produit dans le bouillon un trouble homogène **[08]**.

I.2.2. Klebsiella pneumoniea :

A. Définition :

Klebsiella pneumoniea est un bacille à Gram négatif, immobile, aéro-anaérobie. Germe commensal du tube digestif et des voies aériennes supérieures, germe opportuniste impliqué dans des infections nosocomiales, généralement des infections urinaires **[09]**.

➢ ***Acinetobacter baumannii*** **:**

Définition :

Acinetobacter baumannii est un pathogène opportuniste, responsable d'infection nosocomiale sévère, causant de réelles difficultés thérapeutiques du fait de sa capacité à développer plusieurs mécanismes de résistances aux antibiotiques **[10].**

Acinetobacter baumannii est un bacille à Gram-négatif non-fermentant, Cette bactérie est fréquemment retrouvée en milieu hospitalier dans des milieux aqueux et humides (lavabo, savons, eau distillée, eau des systèmes d'humidification) **[11]**.

I.3. La résistance bactérienne :

La résistance aux antimicrobiens est un terme tout à fait relatif. En effet, il existe un grand nombre de définitions pour l'expression « résistance bactérienne aux antibiotiques», qui sont basées sur différents critères (génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques) et qui ne se regroupent pas forcément. Les définitions les plus fréquemment employées se fondent sur les critères microbiologiques (résistance in vitro) et sur les critères cliniques (résistance in vivo) **[12]**.

I.4. Types de mécanismes de résistance :

Les bactéries ont développé différents mécanismes afin de neutraliser l'action des agents antibactériens, les plus répandus étant l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification ou le remplacement de la cible de l'antimicrobien, l'efflux actif ou encore la pénétration réduite de la molécule. D'autres mécanismes tels que la protection ou la surproduction de la cible de l'antibiotique sont également décrits. Ils sont, cependant, plus rares et surtout associés à certaines classes de composés. La figure (1) présente une illustration de ces différents mécanismes de résistance au sein des bactéries Gram négatives **[12]**.

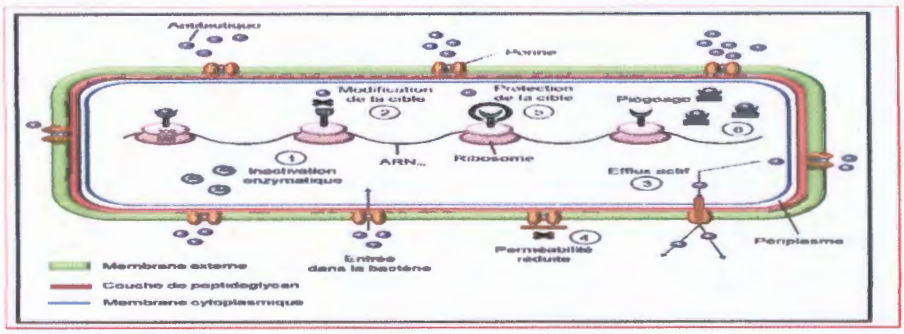


Figure (1) : différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie gram négative. **1** : inactivation enzymatique de l'antibiotique, **2** : modification de la cible de l'antibiotique, **3** :

efflux actif de l'antibiotique, **4** : perméabilité réduite, **5** : protection de la cible de l'antibiotique, **6** : piégeage de l'antibiotique. ARNm : acide ribonucléique messager **[12].**

I.4.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

L'inactivation enzymatique de l'antibiotique représente le principal mécanisme de résistance des bêta-lactames, des aminoglycosides et des phénicolés. On décrit également ce type de résistance pour le groupe MLS (macrolides, lincosamides, streptogramines), pour les tétracyclines, pour la phosphomycine et plus récemment pour les fluoroquinolones, bien que cette inactivation ne représente pas le mécanisme de résistance qui prévaut pour ces molécules. L'enzyme en modifiant le noyau actif de l'antibiotique par clivage ou par addition d'un groupement chimique, empêche la fixation de l'antimicrobien sur sa cible et provoque une perte d'activité. Parmi les réactions biochimiques catalysées par ces enzymes bactériennes, on peut citer des hydrolyses, des acétylations, des phosphorylations, des nucléotidylations, des estérifications, des réductions et des réactions d'addition d'un glutathion **[12]**.

I.4.2. Modification ou remplacement de la cible de l'antibiotique

La cible de l'antibiotique peut être structurellement modifiée ou remplacée, de telle sorte que le composé antibactérienne se lier et exercer son activité au niveau de la bactérie. La modification de la cible, mécanisme de résistance décrit presque pour tous les antibiotiques, est particulièrement importante pour les résistances aux pénicillines, aux glycopeptides et aux molécules du groupe MLS chez les bactéries Gram positives, et pour les résistances aux quinolones chez les bactéries Gram positives et Gram négatives. Ce type de résistance peut être la conséquence de l'acquisition de matériel génétique mobile codant pour une enzyme modifiant la cible de l'antibiotique, ou peut résulter d'une mutation au niveau de la séquence nucléotidique de la cible. Le remplacement de la cible de l'antibiotique est, quant à lui, un mécanisme décrit pour les sulfamidés, les diaminopyrimidines (triméthoprime) et les bêta-lactames dont *les Staphylococcus aureus* résistants à la Méthicilline (SARM) **[12]**.

I.4.3. Pompes à efflux

L'efflux actif, dirigé par des protéines transmembranaires connues sous le terme de pompes à efflux ou transporteurs actifs, est un mécanisme nécessitant de l'énergie et est utilisé par des bactéries et des cellules eucaryotes dont notamment les protozoaires, pour expulser à l'extérieur des métabolites et des composés toxiques étrangers tels que des antibiotiques et d'autres

médicaments. Ces pompes à efflux ont généralement une spécificité de substrats assez large, et seulement certaines d'entre elles confèrent une résistance aux antibiotiques. La résistance provient de la réduction de concentration en antimicrobien dans le cytoplasme de la bactérie, ce qui prévient et limite l'accès de l'antibiotique à sa cible. On classe ces pompes à efflux sur la base de leur spécificité de substrats et de la source d'énergie employée. Certains de ces transporteurs sont très spécifiques et on les appelle pompes SDR (pour specific drug-resistance), alors que d'autres agissent sur une multitude de molécules et on les nomme pompes MDR (pour multiple-drogue-résistance) **[12]**.

I.4.4. Perméabilité réduite :

Contrairement aux bactéries Gram positives, dont la structure enveloppante est assez simple, composée d'une paroi externe épaisse de peptidoglycanes que les antibiotiques traversent par simple diffusion, les bactéries Gram négatives jouissent quant à elles d'une enveloppe plus complexe et plus difficilement franchissable. Les figures 2a et 2b présentent la structure des bactéries Gram négatives et Gram positives **[12]**.

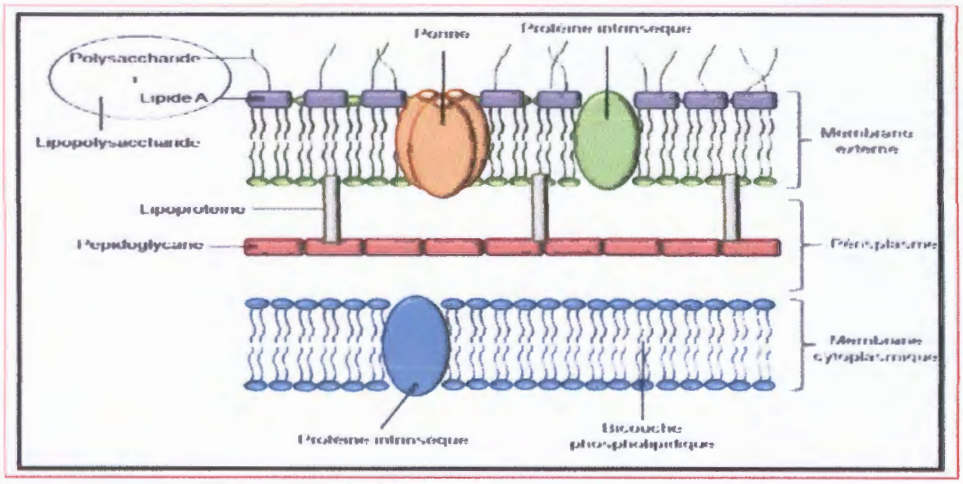


Figure (2a) : Structure de la paroi des bactéries gram négatives **[12]**.

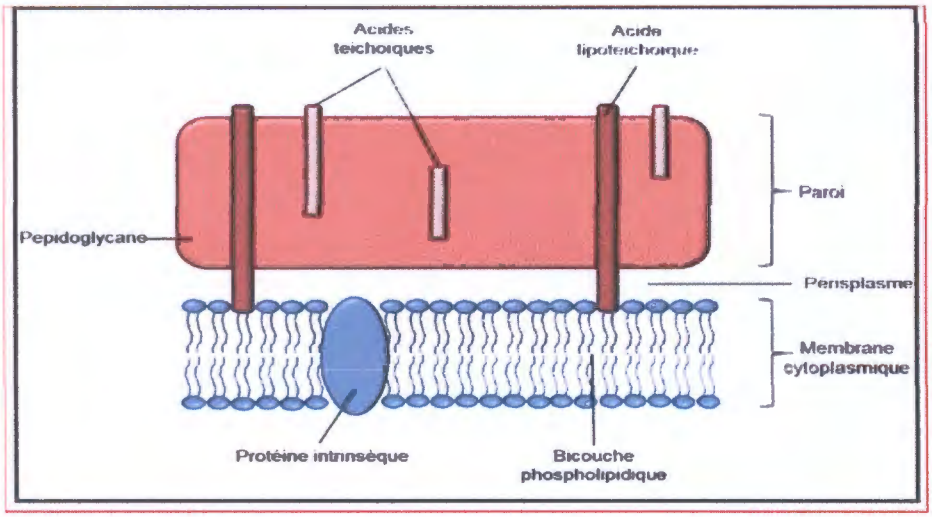


Figure (2b) : Structure de la paroi des bactéries gram positives **[12]**.

Ainsi, au sein des bactéries Gram négatives, les antibiotiques hydrophiles pénètrent dans la bactérie via des protéines transmembranaires nommées porines, alors que les molécules hydrophobes diffusent simplement à travers la couche phospholipidique. La membrane externe de certaines bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* est moins perméable que celle d'autres espèces, ce qui lui confère un niveau moins élevé de sensibilité aux antimicrobiens. En outre, des mutations au niveau des gènes qui codent pour les porines et qui conduisent à leur perte, ou à la réduction de leur taille ou encore à une diminution de leur expression, se traduiront par l'acquisition de bas niveaux de résistance vis-à-vis de nombreux antibiotiques. La diminution de la perméabilité est donc un mécanisme de résistance cliniquement très important chez les bactéries Gram négatives et plus précisément chez *Pseudomonas aeruginosa* et les Enterobacteriaceae, étant donné le large spectre d'antibiotiques qu'elle cible **[12]**.

I.4.5. Protection de la cible de l'antibiotique :

La protection de la cible de l'antibiotique est un mode de résistance bien connu pour la famille des tétracyclines et plus récemment décrit pour les quinolones et les fluoroquinolones. Ainsi, on ne dénombre pas moins de huit protéines de protection ribosomiale qui confèrent une résistance aux tétracyclines en les déplaçant de leur site de fixation par la création d'un encombrement stérique au niveau du ribosome. Ce mécanisme a été rapporté parmi différentes bactéries Gram négatives à travers le monde, et des analogues de ces gènes ont également été décrits chez des bactéries Gram positives. Les protéines en se fixant sur les topoïsomérases, cibles des fluoroquinolones, réduisent l'affinité de la famille d'antibiotiques pour leurs cibles **[12]**.

I.4.6. Piégeage de l'antibiotique :

Les bactéries sont capables de piéger un antibiotique en augmentant la production de sa cible ou en produisant une autre molécule possédant une affinité pour ce dernier. Il en résulte une diminution de l'antibiotique à l'état libre au niveau de la cible. Ainsi des mutations chromosomiques responsables d'une surproduction des cibles des sulfamidés et du triméthoprime ont été décrites chez de nombreuses espèces bactériennes. Ce mécanisme est également impliqué dans des bas niveaux de résistance aux glycopeptides chez certaines souches de *S. aureus*, et à la Tobramycine chez *E. coli* **[12]**.

Chapitre II : La photosensibilisation

Historique:

Le concept de photosensibilisation antimicrobienne apparaît en 1898 quand Oscar Raab décrit pour la première fois le phénomène photo toxique. L'association d'un colorant (l'acridine) et de lumière (les deux éléments pris séparément n'ayant pas d'action) entraîne la mort d'organismes vivants comme les paramécies. Par la suite, Tappeiner montre que les effets toxiques observés en présence de lumière ne sont pas dues à la chaleur. En 1904, Tappeiner suppose que l'oxygène est essentiel pour le processus et introduit le terme « d'action photodynamique ». Il démontre en particulier l'implication de l'oxygène pour la destruction des bactéries telles que *Proteus vulgaris* **[13].**

II.1. Définition:

La photosensibilisation utilise une substance promotrice de l'activité désinfectante de la lumière solaire faisant intervenir les espèces réactives de l'oxygène **[14].** Certains photosensibilisateurs peuvent exercer une activité photocytotoxique vis-à-vis d'un très grand nombre d'agents microbiens comme les bactéries. Cet effet antibactérien n'entraine pas de phénomènes de résistances de la part des bactéries car leur mode d'action à lieu essentiellement au niveau de la paroi bactérienne **[15].** Elle devrait avoir une composition pure, une durée de conservation stable, soit soluble dans l'eau ou dans un mélange de solvants aqueux non-toxiques, et produire un degré élevé de espèces réactive à l'oxygène (ROS) durant une période courte d'illumination **[16].**

II.2. Les types des photosensibilisateurs:

Les photosensibilisateurs sont classés en trois générations :

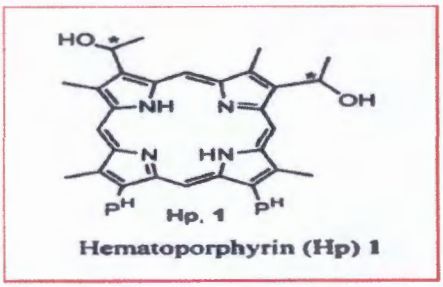
Première génération : Les dérivés d'Haematoporphyrine (HpD) et ses analogues.

Deuxième génération : Cette catégorie regroupe les porphyrines, les chlorines et les phtalocyanines sous forme substituée ou non par des groupements ou fonctions chimiques afin de modifier leurs propriétés chimiques et/ou photophysiques.

Troisième génération : sont des photosensibilisateurs (PS) de deuxième génération modifiés de manière à favoriser leur accumulation préférentielle dans la bactérie **[17]**.

II.2.1. Les Photosensibilisateurs de première génération :

Il s'agit de l'ensemble des premiers photosensibilisateurs (PS) historiquement utilisés, composés de Dérivé d'Haematoporphyrine (HpD) et du produit commercial des dérivés de Photofrine (Figure 3).



جامعة محمد الصديق بن يحيى
مكتبة الكلية
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Figure (3) : Haematoporphyrin (Hp) [18].

Les photosensibilisateurs ont été étudiés intensivement et employés dans le travail clinique expérimental. Malheureusement, il y a plusieurs inconvénients liés à eux. La sélectivité de ces photosensibilisateurs est pauvre. Ces composés absorbent seulement faiblement en rouge. Par exemple, Photofrine a un certain nombre de bande d'absorption entre 400 et 650 nanomètre, mais sa bande est plus faible à 630 nanomètre. L'irradiation à cette longueur d'onde peut seulement pénétrer la bactérie à une profondeur de 5 mm. En outre, les photosensibilisateurs de première génération sont des mélanges complexes et il n'a pas été possible d'isoler un composant très actif simple. Ceci rend la synthèse et l'activité biologique difficiles à se reproduire. En dépit de ces inconvénients, les photosensibilisateurs de première génération sont devenus des moyens utiles de lutter contre les bactéries et ont stimulé la recherche de nouveau photosensibilisateur de deuxième génération avec des caractéristiques améliorées **[17].**

II.2.2. Les Photosensibilisateurs de deuxième génération :

Ces molécules sont synthétiques et parfaitement définies, et présentent une faible toxicité en absence de lumière. La plupart absorbe fortement dans la partie rouge du spectre optique et possède un rendement quantique de formation d'oxygène singulet élevé. Les caractéristiques de ces composés en font ainsi de bon candidat pour l'utilisation en thérapie photodynamique. Parmi ces composants on trouve la molécule de type chlorine et les porphyrines et les bactériochlorines.

En outre, ces substances devraient avoir une plus grande sélectivité pour le tissu de tumeur et être rapidement excrétées du corps. L'absorption dans la gamme du 675 /800 nanomètre est désirée, puisqu'elle a un effet pénétrant léger jusqu'à 2 /3 cm **[17]**.

II.2.2.1. Les chlorines :

Présentent deux propriétés importantes: rendement quantique élevé de l'oxygène singulet et la bande d'absorption intense à des longueurs d'onde par rapport à celles de porphyrines, où les tissus biologiques sont plus transparent à la lumière (650-660 nm). L'utilisation de chlorine dans APDT se sont avérés efficaces et sûr **[16].**

II.2.2.2. Métallophalocyanines de deuxième génération :

1. Définition :

Les métallophtalocyanines (MPcs) sont des macrocycles organométalliques qui résultent de la cyclotétramérisation du phtalonitrile ou de l'anhydride phtalique en présence d'un métal **[19]. (Figure 4)[20].**

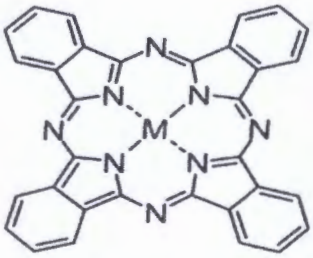


Figure (4): la métallophtalocyanine

Les phtalocyanines (PCS) sont une classe intéressante des composés qui montrent des stabilités chimiques et physiques. Le macrocycle de PC peut engager la plupart des ions en métal en sa cavité, par conséquent une masse de différents metallophthalocyanines (MPcs) a été synthétisée **[21].** Les métallophtalocyanines sont généralement peu solubles dans les solvants ordinaires; ce qui rend leur étude difficile. Pour remédier à cela, de nombreuses études ont proposé la variation du métal, la substitution des hydrogènes à la périphérie par d'autres éléments ou par des groupements d'éléments. Ces modifications structurales permettent d'une part, une amélioration notable de la solubilité et d'autre part d'importantes modulations de leurs propriétés physicochimiques. De nos jours, elles font l'objet de nombreux travaux dans les domaines de l'électronique moléculaire, des nanosciences, de la thérapie du cancer, de l'électro catalyse et de la conversion de l'énergie solaire **[19].**

2. Les types de métallophtalocyanine :

Il existe différents types de métallophtalocyanines.

Tableau (01) : Représente les déférents types de métallophtalocyanines [22].

Métale	Structure	Caractéristique
Métallophtalocyanine D'aluminium (AlPes)		Stables et relativement simple à Synthétiser en grande quantité avec un bon rendement
Métallophtalocyanine De zinc (ZnPcs)		Incorporent au centre du macrocycle un ion zinc (zn^2). Les ZnPcs sont hydrophobes.
Métallophtalocyanine De siliciume (SiPc)		Est une molécule n'ont pas d'isomères, ce qui permet d'obtenir des produits purs plus facilement.

II.3. L'oxygène dans la PDT :

➢ **L'oxygène singulet :**

L'oxygène singulet (O_2^-) est l'agent cytotoxique le plus important impliqué dans PDT. L'efficacité du photosensibilisateur est donc caractérisée par le rendement de quantité de l'oxygène singulet. La quantité des molécules de l'oxygène singulet (O_2^-) formées par la quantité d'énergie absorbé. L'émission du photon de l'état excitée de singulet de photosensibilisateur, connu sous le nom de fluorescence, peut aider dans le traitement, puisqu'elle permet la détection de la tumeur ou la quantification de la quantité du colorant absorbé par des cellules cibles **[23].**

II.4. Sources lumineuses :

La destruction sélective de la tumeur se fait à l'aide d'un PS ciblant la tumeur. Cependant, les tissus sains peuvent accumuler ce PS. Ainsi les zones illuminées sont elles aussi délimitées afin de préserver au maximum les tissus sains. On remarque que la pénétration tissulaire de la lumière est fonction de la longueur d'onde utilisée. Elle est d'autant plus profonde et plus intense que la lumière est proche de l'infrarouge. Quand les photons entrent dans un tissu une partie est réfléchie par la surface et le reste pénètre dans les tissus et est perdu ou absorbé par le chromophore (chromophore endogène ou exogène comme un PS) Figure (5).Le laser est la source optimale pour

une photo irradiation, car leur lumière est très intense, monochromatique et bien transmise par fibre optique **[24]**.

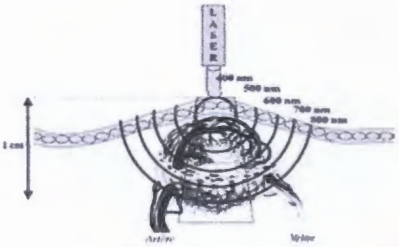


Figure (5): Profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus en fonction de la longueur d'onde **[25]**.

II.5. Utilisation des photosensibilisaeurs en thérapie :

II.5.1. La thérapie photo dynamique :

La thérapie Photodynamic (PDT) est un traitement thérapeutique prometteur pour différentes tumeurs et maladies non malignes. La technique exige la présence d'un colorant, une source lumineuse, et l'oxygène moléculaire **[26]**.

II.5.2. Mécanismes de la thérapie:

La photothérapie est une nouvelle technique de traitement du cancer qui fait appel à un agent photosensible localisé au niveau du tissu tumoral. L'activation par la lumière rend alors celui-ci cytotoxique. La première étape consiste à introduire généralement par voie intraveineuse l'agent photosensible. La tumeur qui a concentré cet agent est alors exposée à une lumière de longueur d'onde capable d'induire un mécanisme photochimique et dont les agents intermédiaires sont des espèces actives d'oxygène. L'interaction de ces espèces avec le milieu intracellulaire endommage les membranes et divers organites conduisant à la mort cellulaire **(Figure 6) [27]**.

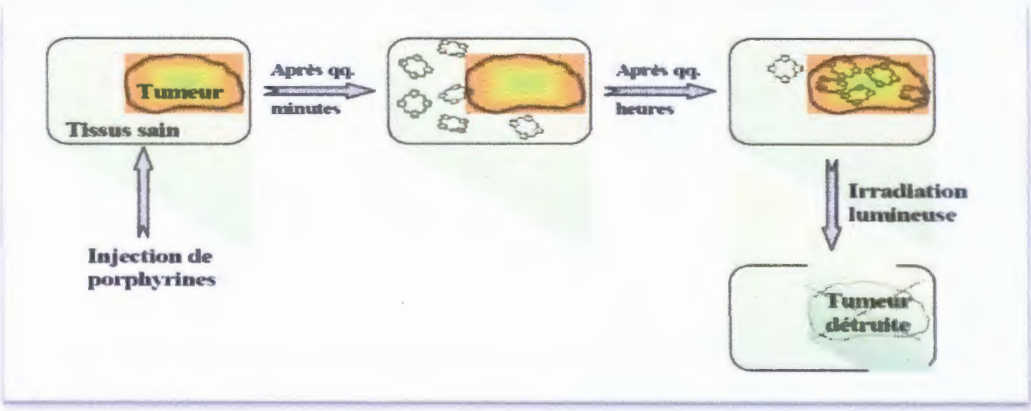


Figure (6) : représentation schématique du principe de la PDT **[27]**.

Chapitre III :

Mécanisme d'inactivation microbienne par la photosensibilisation

III.1. Définition :

Actuellement l'inactivation photodynamique des micro-organismes (PDI) est la direction la plus prometteuse pour la destruction de diverses bactéries. Le concept de l'inactivation photodynamique des micro-organismes suit les principes de la thérapie photodynamique (PDT) des tumeurs : colorants non-toxiques, les photosensibilisateurs localisent des cellules d'in/on, active par la lumière, pour produire de l'oxygène de singulet (O_2^-) et des radicaux libres qui sont toxiques aux cellules cible (micro-organismes) **[28]**.

Bien que la thérapie photodynamique (PDT) est actuellement appliqué dans l'élimination de cellule cancéreuse, plus d'attention a été prêtée à son application dans le traitement antimicrobien. En raison du nombre de plus en plus important des micro-organismes résistants aux antibiotiques, la recherche se concentre sur PDT comme modalité de chimiothérapie d'alternative **[29].**
Quel est le mécanisme de l'inactivation microbienne ?

III.2. Principe d'action :

III.2.1. Pénétration du photosensibilisant dans la bactérie :

Les bactéries Gram positif et Gram négatif diffèrent dans la composition de leur membrane cellulaire. Cette différence donne lieu à une réponse différente aux agents antimicrobiens selon le type de bactéries. Les bactéries Gram positif peuvent facilement incorporer des molécules telles que les photosensibilisants neutres ou anioniques et peuvent facilement être photo inactivées par celles-ci. Dans le cas des bactéries Gram négatif, la photoinactivation n'est pas aussi aisée puisqu'elles sont relativement imperméables aux médicaments neutres ou anioniques à cause de la surface membranaire hautement chargée négativement.

Malgré cela, il a été prouvé que plusieurs photosensibilisants étaient efficaces contre les bactéries Gram négatif, s'ils étaient administrés avec un agent capable de perturber suffisamment la paroi cellulaire de la bactérie pour permettre l'accès de la drogue et provoquer des dommages létaux à la cellule quand elle est exposée à la lumière. Ainsi des agents perturbateurs, comme la polymyxine B-nonapeptide, des oligomères de lysine et l'acide éthylène diamine tetraacétique (EDTA) ont été utilisés. Les photosensibilisants positivement chargés étaient actifs contre les bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif. C'est le cas des phénothiazines cationiques, des porphyrines, des phthalocyanines.

Malgré le potentiel et le large éventail de ces PS cationiques, quelques stratégies peuvent surmonter la faible affinité des photosensibilisants pour les bactéries Gram négatif.

Une stratégie différente a été proposée en attachant de façon covalente un photosensibilisant non cationique à des structures supérieures qui fournissent une grande affinité pour les cellules bactériennes, par exemple des polymères avec des groupes de base aminés tels que la polylysine ou le polyéthylènimine ou même des nanoparticules ou des biomolécules **[30]**.

III.2.2. Mécanismes d'inactivation bactérienne :

L'irradiation d'un photosensibilisant avec de la lumière à une longueur d'onde appropriée en présence d'oxygène produit des radicaux libres et de l'oxygène singulet qui provoquent des dommages cellulaires qui conduisent à des micro-organismes inactivées. PDI bactérienne repose sur trois concepts :

L'accumulation d'un agent photosensibilisant dans la cellule microbienne l'éclairage ciblé induit une activation photochimique de l'oxygène moléculaire dans son état excité (oxygène singulet) une espèce d'oxygène hautement réactives, l'oxygène singulet réagit avec différentes cibles de macromolécules voisins dans les bactéries et produisent un effet mortel à la cellule (Figure 7) **[30]**.

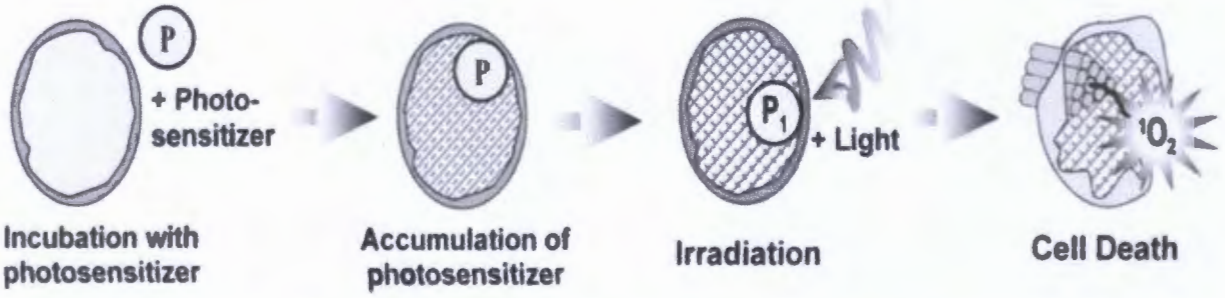


Figure (07): Mécanisme et action de la photosensibilisation sur la cellule: P – photosensibilisateur, P1 –excétation le photosensibilisateur après absorption la lumiere, $1O_2$ – réactif d'oxygène singulet [14].

Deux mécanismes oxydatifs ont été proposés pour expliquer les dommages microbiens photodynamiques au niveau moléculaire (Figure 08).

- **Dans la réaction de type I** : Le photosensibilisant interagit avec une biomolécule produisant des radicaux libres.

Ce processus se produit à travers le transfert d'électrons entre le photosensibilisateur dans l'état et les composants du système excité triplet, générant super oxyde radical anion.

- **la réaction de type II :** Est accepté comme la principale voie des dommages de cellules microbiennes photooxydation, par lequel l'oxygène moléculaire singulet est produit par le transfert d'énergie du photosensibilisateur dans l'état triplet **[30]**.

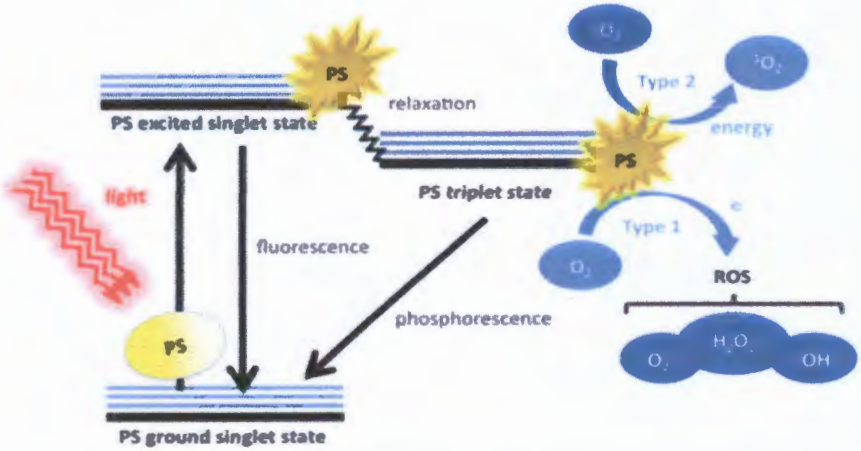


Figure (08) : les déférentes étapes de la photosensibilisation [31].

III.2.3. Les Agents antimicrobiens photosensibilisants :

L'efficacité de la PDI nécessite une substance photosensible à une concentration adéquate, la lumière dans une longueur d'onde aussi proche que possible de l'absorption maximale de l'agent photosensibilisant avec une dose de lumière appropriée.

Un grand nombre de composés ayant une activité photodynamique sont maintenant disponibles : phénothiazines comme le bleu de méthylène (MB) ; xanthènes comme rose bengal (RB), phtalocyanines de zinc cationiques et anthraquinone dérivés comme hypéricine **[30].**

- **Le bleu de méthylène :**

Est largement connu comme un colorant histologique.

La couleur caractéristique de MB est causée par la forte bande d'absorption dans la région 550-700 nm avec absorptivité molaire maximum de 85.000 M- 1 cm -1 à 664nm.

De nombreuses études ont montré l'efficacité de MB pour réduire la survie des micro-organismes. Wainwright et al, ont montré l'activité photo bactéricide du MB contre les espèces d'enterocoque résistantes à la Vancomycine (400-1000 µmoles L -1) et les espèces de *Staphylococcus aureus* résistantes à la Méthicilline **[30].**

- **Le rose bengale** :

Est un composé cyclique qui contient trois cycles aromatiques dans un agencement linéaire et un atome d'oxygène dans le centre de la bague **[29].** Rose Bengale a un haut coefficient d'absorption dans la gamme de 450-600 nm et une tendance à transférer des électrons à partir de son état triplet excité, produisant des radicaux à long terme **[30].**

- **Hypericin :**

Est une colorante photo active normale et neutre. Ce colorant appartient à la classe chimique des phenanthro-perylene-quinones qui sont bio-synthétisées par des usines du genre Hypericum, dans lequel le plus commun est le Perforatum de Hypericum.

Substance naturelle a été utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise depuis des milliers d'années. Certaines études ont rapporté l'utilisation d'hypéricine comme agent antimicrobien puissant et cette efficacité peut être augmentée d'environ 100 fois si le pigment est simultanément exposé à la lumière visible lorsque hypericin génère des espèces réactives de l'oxygène (ROS) **[30].**

Chapitre IV :

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie à l'université de Jijel et l'hôpital de Jijel, durant la période Avril – juin de l'année 2016.

L'objectif de ce travail est l'étude de l'effet de la photosensibilisation des bactéries isolées de certains prélèvements pathologiques et de souches bactériennes isolées de l'environnement hospitalier et montrant une résistance aux antibiotiques.

IV.1. Matériel :

IV.1.1.Les souches isolées :

Plusieurs espèces bactériennes ont été isolées et identifiées génétiquement et biologique. Seulement cinq souches bactériennes ont été retenues parmi les souches isolées durant notre travail : *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniea, Acinetobacter baumannii, Acenitobacter spp.*

Le choix de ces souches est basé sur le fait qu'elles présentent un profil de résistance aux antibiotiques.

IV.1.2. Les milieux de culture :

Les différents milieux de culture utilisés :

- Bouillon à arginine dihydrolase (ADH) ;
- Bouillon ornithine double concentration (ODC) ;
- Bouillon lysine double concentration (LDC) ;
- Bouillon nutritif (BN) pour cultiver les souches indicatrices ;
- Gélose nutritive (GN) ;
- Gélose Mueller Hinton pour réaliser l'antibiogramme (milieux proposés par Mueller et Hinton (1941) pour tester la sensibilité ou la résistance des germes pathogènes envers les antibiotiques ;
- Gélose Hektoèn : pour la caractérisation et l'isolement des entérobactéries pathogènes à partir des prélèvements les plus divers ;
- Métallophtalocyanine de zinc;
- Gélose Chapman : Permet la croissance des bactéries halophiles, et l'inhibition des Gram- ; et pour isolée le Staphylococcus aureus.

IV.1.3. Appareillage :

Le matériel suivent a été utilisé tout au long du travail :

- Bec Bunsen ;
- Four pasteur (Contrôles) ;
- Bain marie ;
- Balance ;
- Becher ;
- Boites de pétri stériles ;
- Anse de platine ;
- Autoclave ;
- Pipettes pasteur ;
- Pipettes graduées ;
- Tubes stériles à essai ;
- Etuve (37 °C, 45 °C) ;
- Réfrigérateur ;
- Microscope optique ;
- Lames ;
- Ecouvillons stérile ;
- Lampe rouge ;
- Spatule ;

IV.1.4. Produits chimiques, réactifs et tampons :

Au cours de notre travail, nous avons utilisé :

- ✓ Violet de gentiane, lugol, alcool, fuschine et l'huile à émersion (coloration de gram).
- ✓ Eau oxygéné (H_20_2) pour le test e catalase.
- ✓ TSI. (triple-sugeriron agar)
- ✓ Mannitol mobilité.
- ✓ Eau physiologique stérile : pour la préparation des dilutions décimales.
- ✓ Eau distillée stérile.
- ✓ Kovacs
- ✓ DMSO (Dimethyl sufoxide) ;
- ✓ Plasma humain.

IV.1.5. Antibiotiques testés (disques) :

Les antibiotiques utilisés dans ce travail représentent dans le tableau (2) :

Tableau (2) : Représente les déférents antibiotiques utilisés.

Abréviations	Antibiotiques
K.	Kanamycine
IpM	Imipenème
P	penicilline
SxT	Sulfaméthoxazole + triméthoprime
Cz	cifazoline
CTX	céfotaxime
CT	colistine
AK	Amikacine
AM	ampicilline
AMX	amoxicilline

IV.2. Méthodes :

IV.2.1- Collecte des échantillons :

IV.2.1.1- Origine :

Les souches bactériennes utilisées lors de la réalisation des différentes parties expérimentales sont prélevé au niveau de laboratoire de Jijel (Les souches *Klebsiella pneumoniea* et *Acenitobacter baumannii* ont été identifiés dans laboratoire de l'hôpital de Jijel et leurs origines sont listées dans le **(tableau 03).** Et les souches *Staphylococcus aureus* et *Acenitobacter spp* sont identifié dans laboratoire de microbiologie, Université de Jijel).

Tableau 03 : Souches bactériennes et leurs origines.

sexe	Age	Service	Examen biologique	Résultat	Souche
Femme	Adulte 33 ans	Réanimation	ECBU	Positif	*Klebsiella pneumoniea*
Femme	Adulte	Réanimation	Pdp (prélèvement distale protège)	Positif	*Acenitobacter baumannii*

IV.2.1.2- Prélèvement :

Le milieu hospitalier sont colonisées par des microorganismes diverses et peuvent être issus de patients, du personnel soignant ou des visiteurs.

Nous avons réalisées deux (02) prélèvements de surfaces et de l'air de l'environnement hospitalier. Les prélèvements ont concernés les surfaces du matériel médical telles que les respirateurs, les couveuses, les surfaces des locaux telles que les lavabos et les surfaces fréquemment manipulées par le personnel soignant et les visiteurs telles que les poignées de porte, les robinets et les surfaces d'équipements de l'environnement immédiat des patients telles que les lits et les placards. Et les prélèvements de l'air tel que l'air des toilettes et l'air des salles des malades. Les prélèvements des surfaces ont été effectués à l'aide d'écouvillon humidifié à l'eau physiologique stérile et ensemencées directement dans des bouillons nutritifs et incubée à 37°C pendant 24H. Et les prélèvements de l'air ont été effectués à l'aide des boites de pétrie couler par la gélose nutritif reste ouvert certaines temps dans l'air et incubée à 37°c pendant 24H.

IV.2.2. Isolement et purification :

- A partir du milieu de conservation, un isolement des souches a été effectué sur gélose Chapman et Hectoèn, (pré enrichissement, enrichissement, isolement sur milieux sélectif) l'incubation a été réalisée à 37°C pendant 18 à 24 h en suite ont été effectués.

IV.2.3. Identification phénotypique des souches bactériennes :

IV.2.3.1. Coloration de Gram :

On retire les boites incubée et on réalise la coloration de Gram pour les boites qui ont un aspect douteux (formation de colonies).

La technique de coloration de Gram pratiquée se résume en :

- On faire un étalement de l'aliquote bactérien sur une lame puis fixation par la chaleur ;

- On recouvre le frottis d'une solution de violet de gentiane pendant 1 minute.
- Pour entrainer le violet, on recouvre la lame de lugol pendant 1 minute.
- On verse l'alcool acétone à la surface de la préparation placée obliquement et on observe sa couleur quand il s'écoule. il est d'abord violet, puis bleuté, puis incolore. C'est à ce stade qu'on arrêt cette étape.
- On procède à l'étape de lavage.
- On recouvre la lame par la solution de fuchsine et on laisse agir pendant 20 à 30 secondes.
- On lave à l'eau et on laisse sécher.
- On met ensuite une goutte d'huile de vaseline, on recouvre par une lamelle et on observe au microscope a objectif 100.

IV.2.3.2. Galerie biochimique classique :

Avant de réaliser l'identification biochimique, on fait une suspension bactérienne plus au moins laiteuse à une Gamme à 0,5 Mc farland à partir des colonies apparues.

A partir de cette suspension bactérienne on réalise une galerie biochimique par l'ensemencement des différents milieux :

- **TSI :** c'est une gélose utilisées pour différentier les nombre des enterobacteriaceae en se basant sur leur profile fermentaire de : glucose, lactose, saccharose, les gaz et la production d'H_2S, utilisée pour les bactéries Gram négatif.
- **Mannitol mobilité :** permet la recherche de deux caractères : utilisation ou non du mannitol, la mobilité du germe Gram positif.
- **Test de coagulasse :** On utilise le test de la coagulasse en tube comme marqueur d'identification des souches à Gram positif. Ce test consiste à incuber à 37°C, un mélange de la souche à tester et du plasma pendant 24h. Si la bactérie détient une coagulasse, alors on voit apparaitre un caillot en inclinant le tube **[32].**
- **Production de catalase :** L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant une à deux colonies de l'isolat de la souche Gram positif à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester.
- On incube ces milieux dans l'étuve pendant 24h à 37 °C.
- On fait la lecture par la comparaison des résultats des tubes avec le tableau des caractères biochimiques des entérobactéries.

IV.2.3.3- Galerie biochimique API 20E :

API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif. La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui constitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification **[33].**

IV.2.4- Etude de la sensibilité aux antibiotiques :

IV.2.4.1.L'antibiogramme :

On utilise les méthodes de diffusion en gélose :

- On réalise une suspension à une Gamme à 0,5 Mc farland à partir de culture pure (1 à 2 colonies dans de l'eau distillée) et ensemencée le milieu Mueller Hinton par des stries transversales, à l'aide d'un écouvillon de coton sur toute la surface de gélose, avec une répétition cette opération 2 à 3 fois, on tournant chaque fois la boit de 60° de façon a assuré un ensemencement uniforme de la gélose. On dépose les disques des antibiotiques à l'aide d'un distributeur de six cartouches et la 7ieme cartouche on la dépose à l'aide d'une pince stérile. On incube les boites à 37 °C à l'étuve. Après 16 à 18 heures d'incubation, les boites sont examinées.
- On mesure avec précision les diamètres d'inhibition à l'aide d'une règle. Et on compare les résultats aux valeurs critiques, figurant dans le tableau de lecture.
- On classe les bactéries dans l'une des catégories : sensible- intermédiaire ou résistante selon le diamètre d'inhibition **[34].**

IV.2.5- Etude de l'effet de la photosensibilisation :

Test de la photosensibilisation :

Cette méthode décrite par **Cleidson Valgas et *al.* (2007), Zuzanna drulis–kawa1et *al.* (2005)** a été appliquée avec quelque modification.

Le métallophtalocyanine de zinc a été stockée sous forme de poudre et a été conservé dans un flacon en verre à l'abri de la lumière. Nous avons préparé des solutions mères de métallophtalocyanine de zinc à 1mg/ml (1 mg de métallophtalocyanine de zinc avec 1 ml de DMSO) pour réaliser une série de dilution à des concentration (0,5 mg/ml) ,(0,25 mg/ml) ,(0,125 mg/ml) **[35 - 36].**

Dans des tubes contenant le bouillon nutritif, on prépare Cinq suspensions bactériennes de cinq souches (*Acinetobacter boumannii, Acinetobacter spp, Staphylococcus aureus1, Staphylococcus aureus 2, Klabsiella pneumoniea).*

On ensemence les cinq suspensions bactériennes par 10µl de chaque concentration de notremétallophtalocyanine de zinc comme représente **le tableau (04)** ci-dessous :

Tableaux 04 : représente les suspensions bactérienne ensemencée par le métallophtalocyanine de Zinc.

concentration de métallophtalocyanine / suspension bactérienne	1mg/ml	0,5mg/ml	0,25mg/ml	0,125mg/ml
Acinetobacter boumannii 10^6 UFC/ml	10µl	10µl	10µl	10µl
Acinetobacter spp 10^6 UFC/ml	10µl	10µl	10µl	10µl
Staphylococcus aureus1 10^6 UFC/ml	10µl	10µl	10µl	10µl
Staphylococcus aureus2 10^6 UFC/ml	10µl	10µl	10µl	10µl
Klabsiella pneumoniea UFC/ml	10µl	10µl	10µl	10µl

- A partir des solutions préparé dans le tableau (04) ; 40 µl de chaque tube ont été déposés dans chacun des 20 puits centraux d'une plaque de culture. Cette disposition facilite l'étape d'irradiation.
- Les solutions présentées dans le tableau (04) (20 tubes) et la microplaque préparée ont été irradié à la lumière rouge pendant 30 mn avec une longueur d'onde entre 600 à 680 nm figure (09) **[37].**

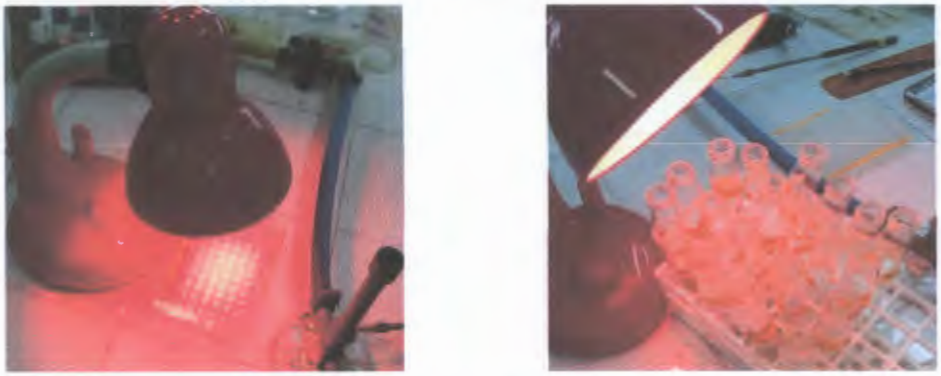


Figure (09) : Irradiation des tubes et la microplaque par la lumière rouge pendant 30 mn.

Après l'irradiation par la lumière rouge, nous avons préparé cinq boite de Pétrie couler par la gélose nutritif, et ensemencé par 20µl de suspensions des souches bactériennes photosensibilisés à différentes concentrations : 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0125mg/ml préparé dans la microplaque irradiée (chaque boite ensemencé par une souche bactérienne).

Les tubes et les boites de Pétrie sont incubés à 37°c pendant 24 h.

IV.2.5.1. L'antibiogramme des souches photosensibilisées :

Pour réaliser ce test, la méthode de l'antibiogramme en milieu solide a été appliquée avec des souches photosensibilisée.

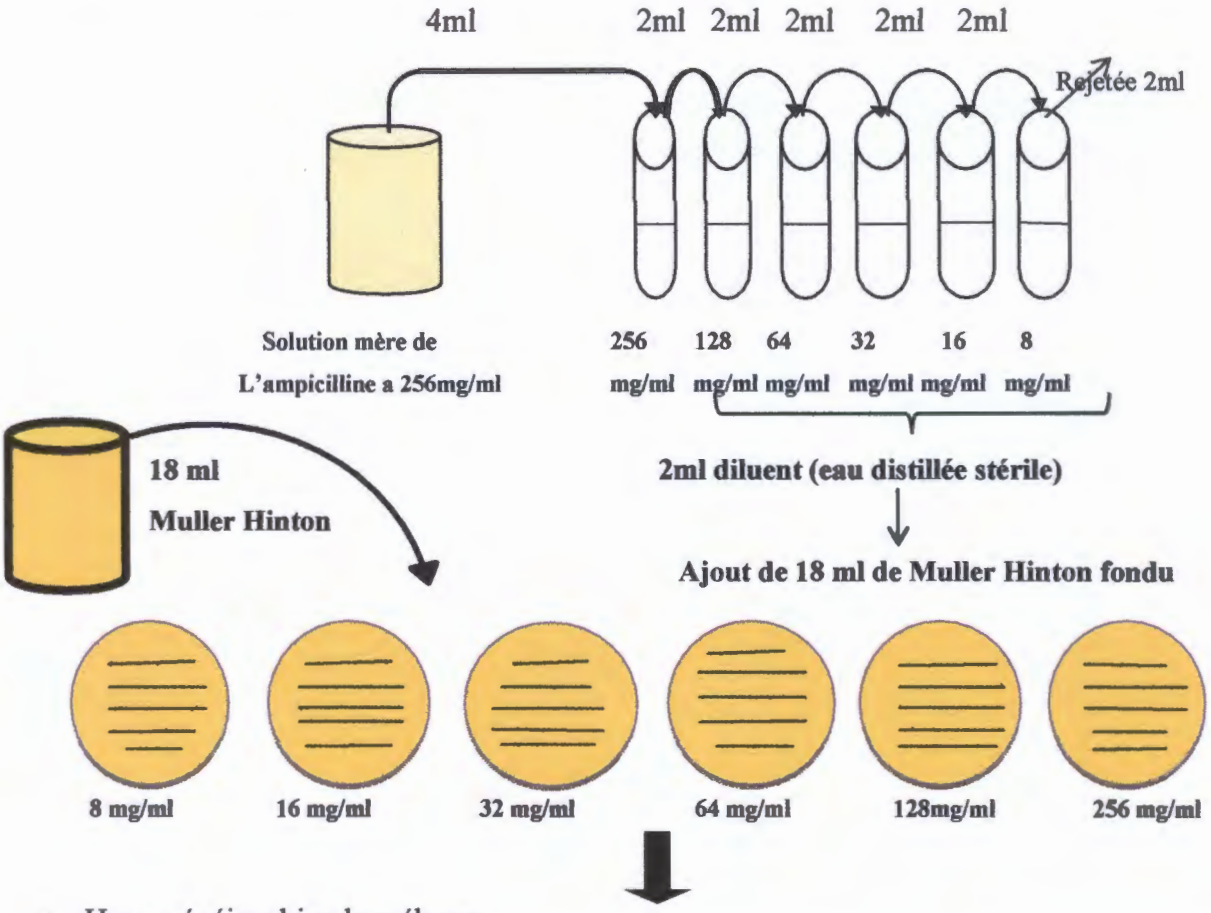
IV.2.5.2. Détermination de la sensibilité des souches photosensibilisées a l'Ampicilline par la méthode de dilution :

A. Préparation des concentrations d'Ampicilline :

- Dans un flacon stérile contenant un volume bien déterminé d'eau distillée stérile (10ml) nous avons ajouté une quantité bien définie de notre antibiotique d'Ampicilline en poudre de façon à obtenir une concentration égale à 256 mg/ml.
- Une gamme de concentration de notre Ampicilline allant de : 256 mg/ml à 8 mg/ml a été préparée à partir de la solution mère.

B. Méthode de dilution en milieu solide par les stries :

- Dans cette méthode les concentrations finales sont obtenues après addition dans les boites 2ml de chaque dilution d'Ampicilline à tester et de 18ml du milieu Mueller Hinton fondu.Après homogénéisation, la gélose va se solidifier.
- Après séchage, les boites sont ensemencées verticalement en stries par les cinq souches photosensibilisés avec une concentration de métallophtalocyanine de Zinc à 1 mg/ml (chaque souche représente une souche).
- Incuber les boites à 30°C pendant 18 à 24h.
- La figure (10) montre le protocole qui a été suivi pour la détermination de la sensibilité des souches photosensibilisées à l'Ampicilline par la méthode de dilution en milieu solide **[38].**



- Homogénéiser bien le mélange.
- Après solidification, les boites sont ensemencées avec une concentration de métallophtalocyanine de Zinc à 1 mg/ml de chaque souche à tester sous forme de stries parallèles à raison de 5 stries pour les 5 souches à tester.
- Les boites sont ensuite Incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

Figure (10) : Détermination de la sensibilité des souches photosensibilisées aux antibiotiques par la méthode de dilution en milieu solide [38].

C. Détermination de la viabilité de quelques colonies après photosensibilisation :

- Dans cette méthode les concentrations finales (128mg/ml, 64mg/ml) sont obtenues après addition dans les boites 2ml de chaque dilution d'ampicilline à tester et de 18ml du milieu Mueller Hinton fondu.
- Après homogénéisation, la gélose va se solidifier.
- Après séchage, les boites sont tracéespour avoir des carrées.
- A l'aide de cure dents stérile on dépose dans chaque carrées une colonie de chaque souche photosensibilisée à une concentration de 1mg/ml.
- Incuber les boites à 37°C pendant 18 à 24h.

Chapitre V :

Résultats et Discussions

1. Identification des souches bactériennes

- **Observations macroscopique :**

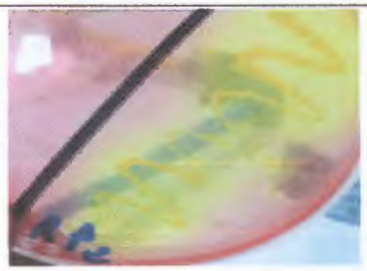
L'observation macroscopique consiste à décrire les colonies obtenues sur milieu solide après incubation de 37°C pendant 24H (taille, forme, pigmentation, contour, aspect,...). Le tableau (5) et figure (11) montre les différentes souches isolées.

Tableau 05 : caractères culturaux des colonies des différentes souches isolé à partir de l'hôpital.

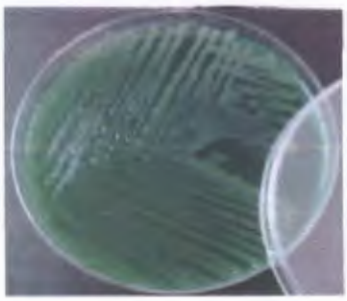
Code	service	lieu	Caractère culturaux des colonies
ML1	Médecine interne	Surface de lit	Colonies vert de taille moyenne de 1 à 2 mm de diamètre dans milieu bleu vert, la surface lisse et le contour régulier.
RP2	Réanimation	Surface de poignée	Colonies lenticulaire jaune de taille diférentes de 1 à 2 mm de diamètre et le milieu devienne jaune, de surface lisse et de contour régulier.
MTN	Médecine interne	Surface de table de nuit	Colonies lenticulaire jaune de taille différentes de 1 à 2 mm de diamètre et le milieu devienne jaune, de surface lisse et de contour régulier.

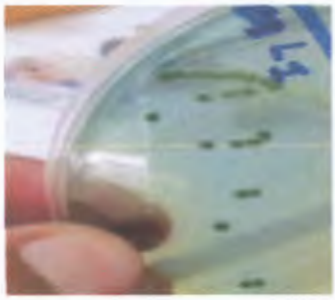
La figure (11) illustre l'aspect des colonies des différentes souches isolées :

(MTN)



(RP2)



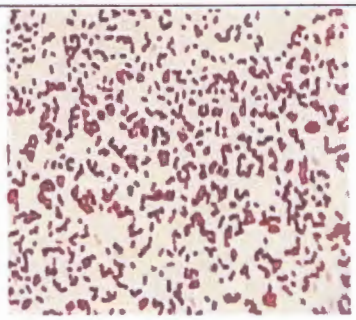


(ML1)

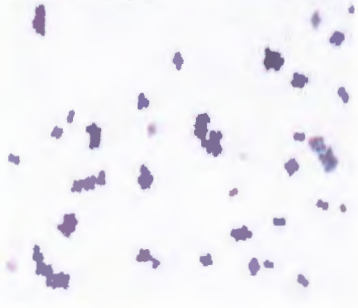
Figure (11) : Aspects macroscopiques des colonies de différentes souches isolées à partir de l'hôpital.

- **Observations microscopique :**

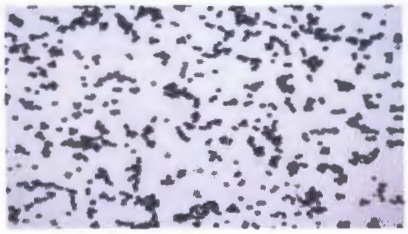
Les cellules étaient examinées sous microscope optique en immersion (x100) pour différencier la morphologie et la disposition des cellules après coloration de Gram la figure (12).



(ML1)



(RP2)



(MTN)

Figure (12) : Aspects microscopiques (coloration de Gram et observation à grossissement x100) des colonies de différentes souches isolées à partir de l'hôpital.

Comme le démontre les photos, les bactéries hospitalières se différentient par leurs caractères morphologiques (coques ou bacilles), par leur taille ainsi que par le type d'agencement des cellules. Une brève description est présentée dans le Tableau (6).

Tableau 06 : Description de l'aspect microscopique des différentes souches isolées à partir de l'hôpital.

Aspect microscopique			
Origine des souches	Gram	Forme des cellules	Association des cellules
Médecine interne de lit (ML1)	Négatif	Coccobacille	coccobacille isolé
Réanimation de poigne (RP2)	Positif	Coques (Cocci)	groupés en amas irréguliers : forme de grappes de raisin
Médecine interne de table de nuit (MTN)	Positif	Coques (Cocci)	groupés en amas irréguliers: forme de grappes de raisin

- **Galerie biochimique :**

Les résultats de l'étude des caractères biochimique par la galerie biochimique de toutes les souches testées sont représentés au-dessous.

✓ **Galerie classique :**

L'ensemble des caractères biochimique des souches à Gram positif (+) étudiés est résumé dans le Tableau (7).

Tableau 07 : principaux caractères biochimique des souches.

Caractère / Les souches	glucose	lactose	saccharose	H2S	Mannitol mobilité	catalase	Coagulasse
Réanimation de poigne (RP2)	+	+	+	-	+	+	+
Médecine interne de table de nuit (MTN)	+	+	+	-	+	+	+

(+) : positif, (-) : négatif

Figure (13) : Test de la catalase

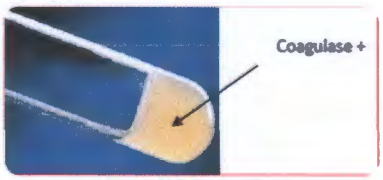


Figure (14) : Test de la coagulasse en tube

✓ **Galerie API 20E :**

Les résultats de l'API sont représentés dans la figure (15)

- Avant l'incubation :

- Après l'incubation :

Figure(15) : galerie API 20E pour identifier la souche ML1.

La lecture de la galerie de l'API doit se faire en se référant au Tableau de Lecture (8).

Tableau 08 : la lecture de la galerie de l'API de la souche ML1.

Tests / Souche	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
ML1	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+

- A partir de l'observation macroscopique et microscopique et les galeries biochimiques on a retenu pour notre étude trois souches bactériennes :

L'origine de souche	Le code	Souche présumée
médecine interne de table de nuit	MTN	*Staphylococcus aureus*
médecine interne de lit	ML1	*Acenitobacter spp*
réanimation de poignée	RP2	*Staphylococcus aureus*

V.1. Les résultats de la sensibilité des souches aux antibiotiques avant photosensibilisation:

Ce test permet de mettre en évidence les caractéristiques que possèdent certaines antibiotiques à simuler ou inhiber les souches une fois mises en contact. Les résultats relatifs à ce test sont présentés comme suit :

V.1.1. Antibiogramme *d'Acinetobacter baumannii* avant photosensibilisation:

La souche *Acinetobacter baumannii* montre des zones d'inhibition avec les antibiotique Imipenème (IPM), colistine (CT) à diamètres de 14mm, 12mm, respectivement (Figure (10) et annexe II) ce qui confirme que *l'Acinetobacter baumannii* est sensible vis –à-vis de ces antibiotiques.

Contrairement, avec les antibiotiques Amikacine (Ak_{30}), Sulfaméthoxazole + Triméthoprime (SXT), Céfotaxime (CTX), Cifazoline (CZ), (OF) il n'y a aucune zones d'inhibition ce qui traduit que *l'Acinetobacter baumannii* est résistante vis-à-vis à ces antibiotiques.

Les résultats de l'antibiogramme *d'Acinetobacter baumannii* présentés dans la figure (07).

V.1.3. Antibiogramme d'*Acenitobacter spp* (ML1) avant photosensibilisation:

D'après les résultats obtenus dans la photo 08, l'antibiogramme d'*Acinetobacter SPP* représente des zones d'inhibition de diamètre 25mm, 35mm avec les antibiotiques Céporexine (CN), Imipenème (IPM) respectivement, (Figure 19 et annexe III), donc l'*Acenitobacter spp* est sensible vis–à-vis de ces antibiotiques.

Par contre avec les antibiotiques Amikacine (AM), Cifazoline (CZ) il n'ya aucune zones d'inhibition donc l'*Acenitobacter spp* est résistante.

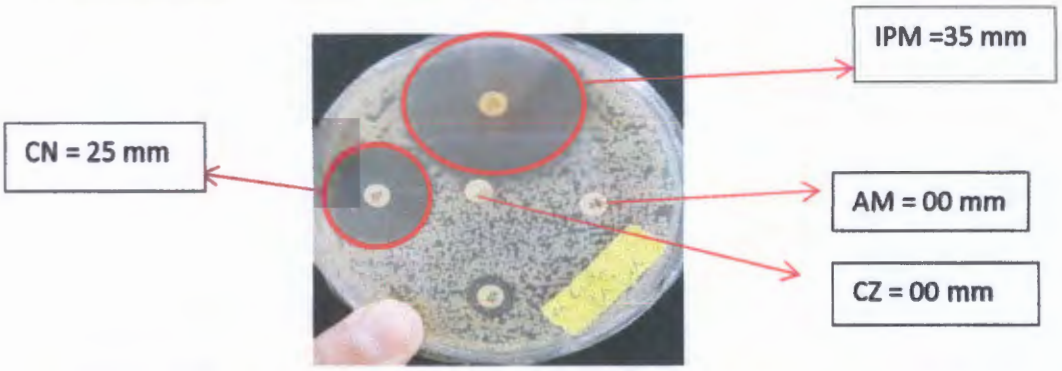


figure (18) : antibiogramme de la résistance de la souche Acenitobacter spp ML1.

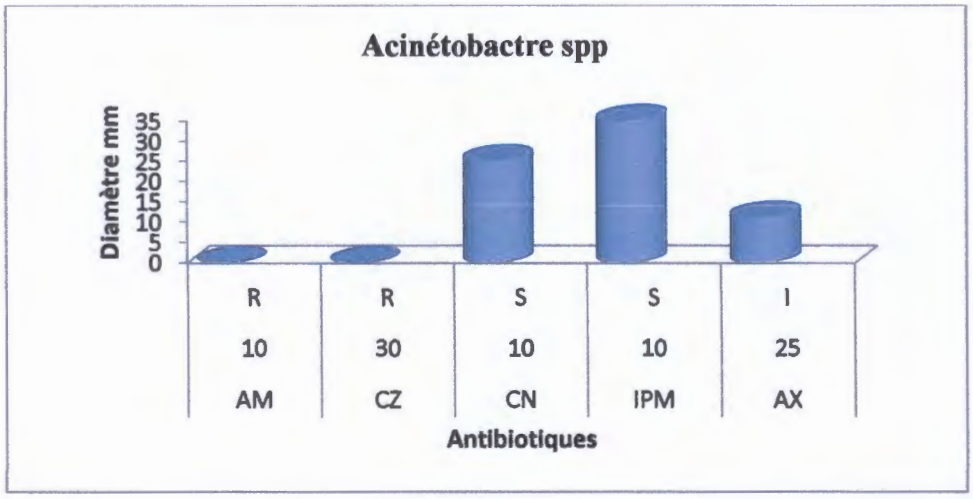


Figure (19) : la sensibilité d'Acinetobacter spp ML1 vis à vis à des différents antibiotiques.

V.1.4. Antibiogramme de souche *Staphylococcus aureus* (*MTN1*) avant photosensibilisation:

Les antibiotiques Kanamycine (K), Colistine (CT), Céporexine (CN), ont un effet inhibiteur plus ou moins important sur *Staphylococcus aureus* à des zones d'inhibition avec des diamètres différents : 15mm, 16mm, 23mm. Respectivement (Figure 21 et annexe IV) de ce fait

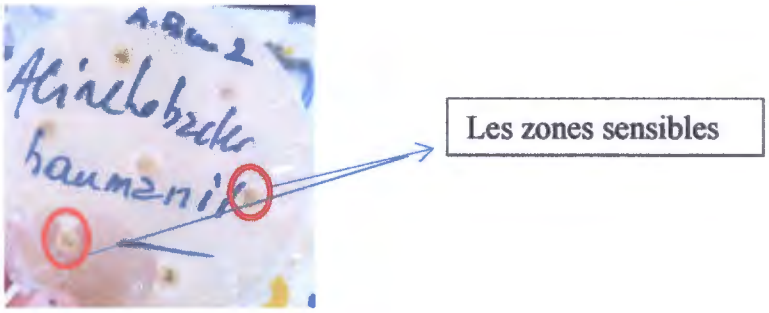


Figure (16) : l'antibiogramme de la souche d'Acinetobacter baumannii

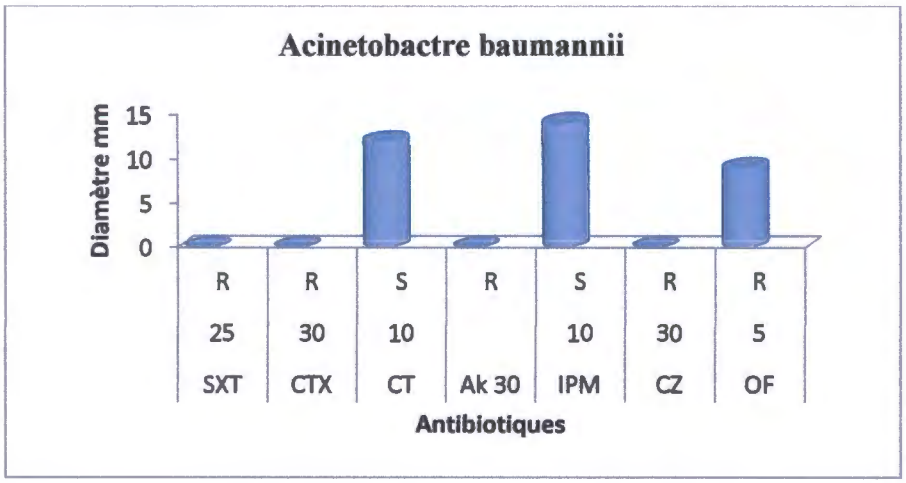


Figure 17 : la sensibilité d'Acinetobacter boumannii vis à vis à des différents antibiotiques

V.1.2. Antibiogramme de *Klebsiella pneumoniea* avant photosensibilisation:

Le tableau (17) montre que la souche *Klebsiella pneumoniea* sensible à l'antibiotique Amikacine (Ak_{30}) et d'autre antibiotique comme Ampicilline (AM_{10}), Amoxicilline (AMX), Céfotaxime (CFX_{25}) sont résistes.

Tableau 09 : résultats de diamètre des zones d'inhibition de l'antibiogramme.

ATB	AM_{10}	AMX	CTX_{25}	AK_{30}
R/S	**R**	**R**	**R**	**S**
CMI	**> = 32**	> = 32	> = 64	**< = 2**

S : sensible / R : résistant

Staphylococcus aureus est sensible vis –à-vis à ces antibiotiques. Par ailleurs avec les antibiotiques (AX), Penicilline (P) aucune zone d'inhibition n'est observée donc *Staphylococcus aureus* est résiste (figure 20).

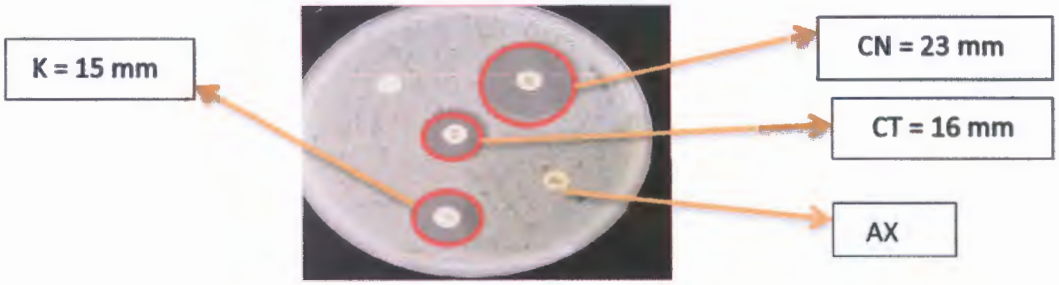


Figure (20) : Les résultats de l'antibiogramme de la souche Staphylococcus aureus

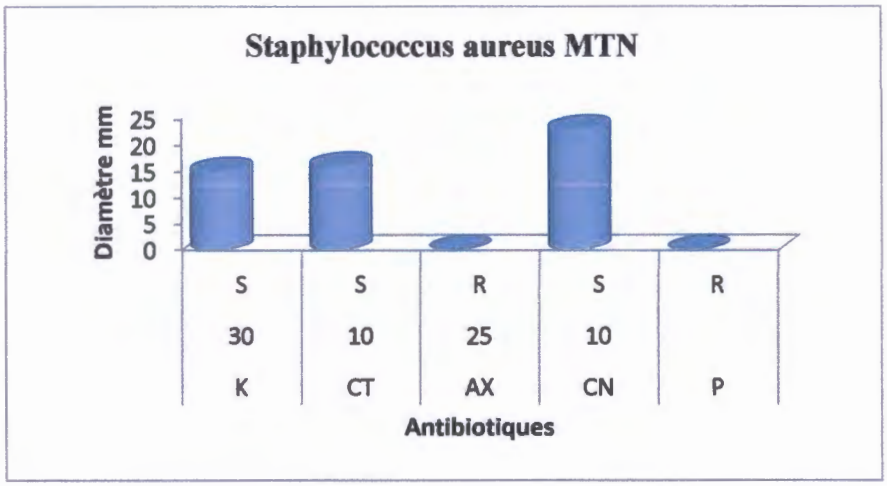


Figure (21) : la sensibilité de Staphylococcus aureus : MTN1 vis à vis à des différents antibiotiques.

V.1.5. Antibiogramme de *Staphylococcus aureus* (RP2) avant photosensibilisation :

Les résultats montrent une zones d'inhibition à 34mm autour l'antibiotique Imipenème (IPM), figure (23), (figure 22) ce qui confirme que *Staphylococcus aureus* est sensible vis –à-vis à ce antibiotique. Par contre aucune zone d'inhibition avec les antibiotiques Amikacine (AMC), Cifazoline (CZ), Sulfaméthoxazole + Triméthoprime (SXT) de ce fait que *Staphylococcus aureus* est résistante à ces antibiotiques.

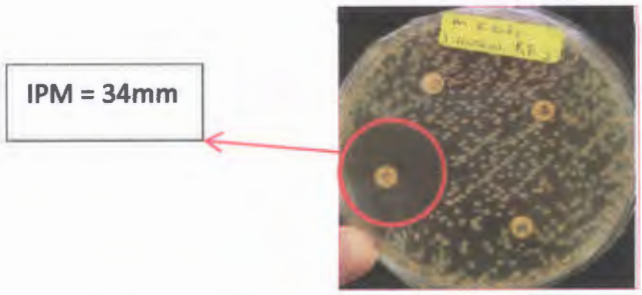


Figure (22) : Les résultats de l'antibiogramme de la souche *Staphylococcus aureus*

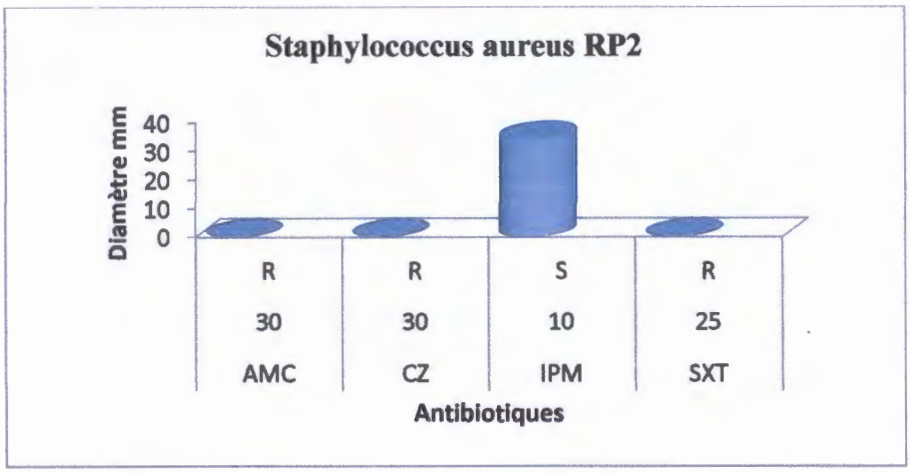


Figure (23) : la sensibilité de Staphylococcus aureus : RP2 vis à vis à des différents antibiotiques.

Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grande, plus la souche est sensible à l'antibiotique testée. Plus il est petit plus la bactérie est résistante. Le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité antibactérienne des antibiotiques sur les souches testées.

V.2. L'effet de la photosensibilisation après la photosensiblisation:

V.2.1. La sensibilité des souches photosensibilsé aux antibiotiques :

Les résultats de l'antibiogramme des souches photosensibilisées, *Staphylococcus aureus, Acinetobacter.spp, Acinetobacter boumannii, Klebsiella pneumoniea* testées en présence des antibiotiques Sulfaméthoxazole + Triméthoprime (SXT_{25}), Penicilline (P), (AX_{25}), Imipenème (IPM_{10}), Amoxicilline acide (AMC_{30}), Colistine (CT_{10}), respectivement sont présentés dans la figure (24) et le tableau (10).

Les résultats obtenus indique que la souche *Staphylococcus aureus* montre une sensibilité à l'antibiotiques testés Sulfaméthoxazole + Triméthoprime (SXT_{25}) avec un diamètre 20mm, par contre une résistante à l'antibiotiques Pénicilline (P) et la souche *Acinetobacter. SPP* présente une zone d'inhibition de 16mm pour l'antibiotique AX_{25}, mais l'*Acinetobacter boumannii* elle est

sensible à l'Imipenème (IPM_{10}) avec un diamètre 37mm et résiste à l'amoxicilline acide (AMC_{30}). Pour l'antibiotique colistine (CT_{10}) une zone d'inhibition de diamètre 13mm chez *Klebsiella pneumoniea et Acinetobacter boumannii.*

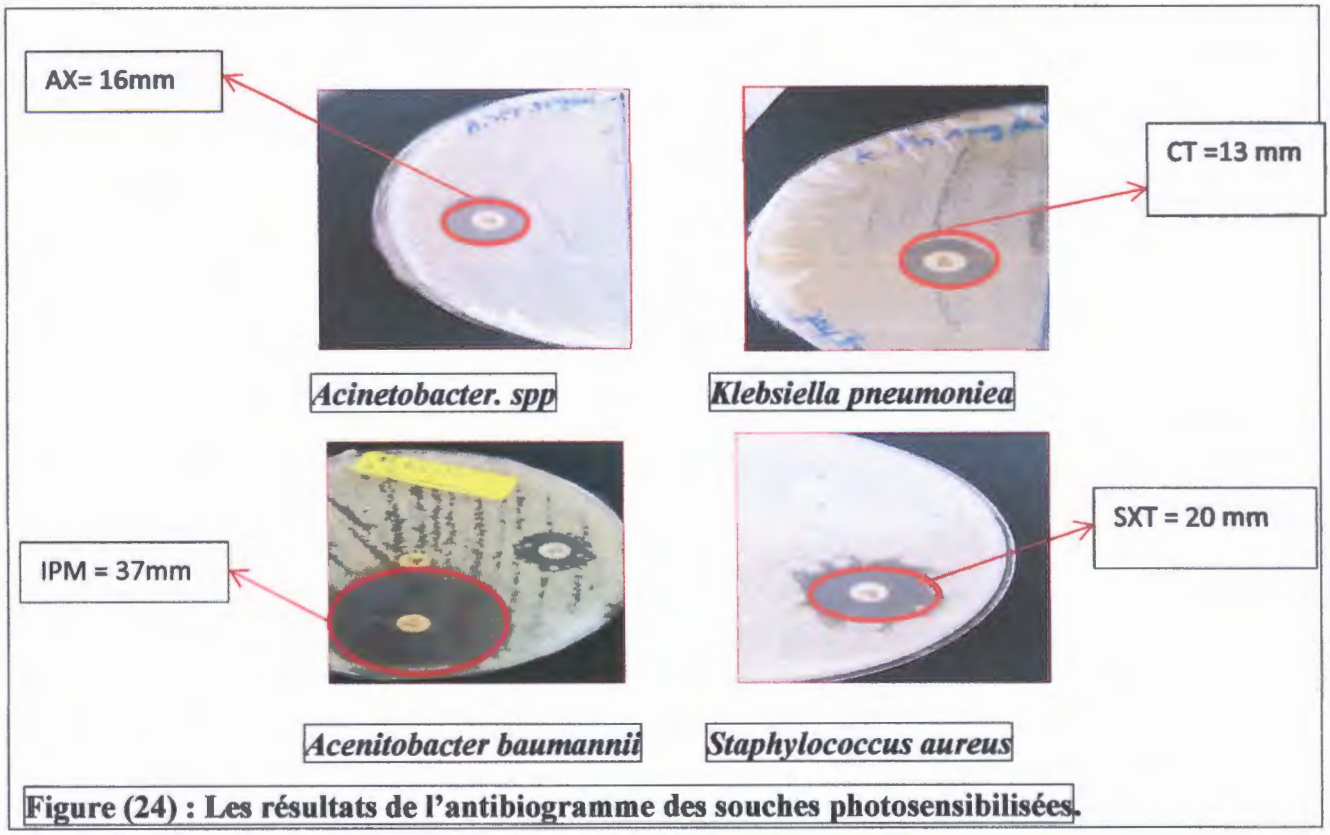


Figure (24) : Les résultats de l'antibiogramme des souches photosensibilisées.

Tableau 10 : résultats de diamètre des zones d'inhibition de l'antibiogramme après la photosensiblisation

Les souches	ATB	R/S	Diamètre (mm)
Staphylococcus aureus	SXT_{25}	**S**	20
	P	**R**	00
Acinetobacter. spp	AX_{25}	**I**	16
Acinetobacter boumannii	IPM_{10}	**S**	37
	AMC_{30}	**R**	00
	CT_{10}	**I**	13
Klabsiella pneumoniea	CT_{10}	**I**	13

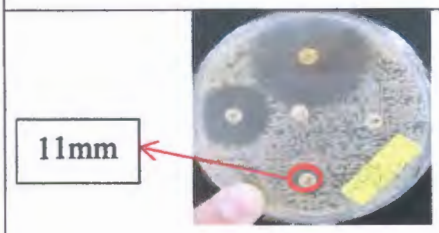
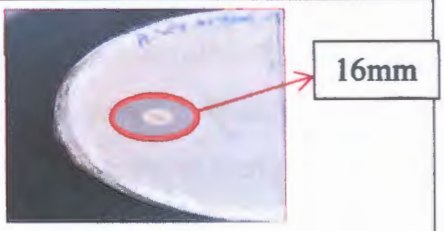
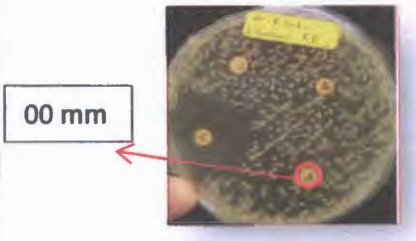
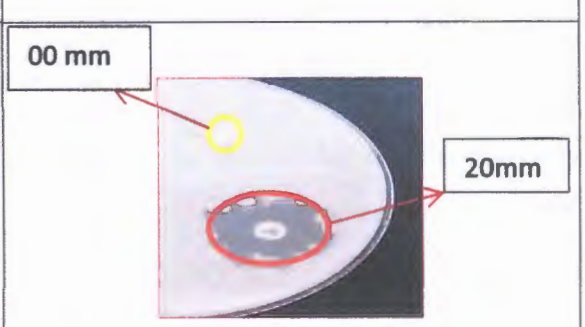
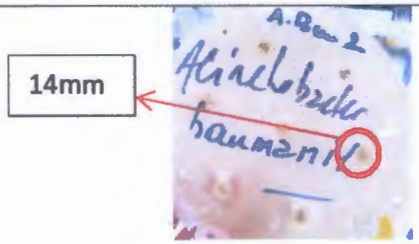
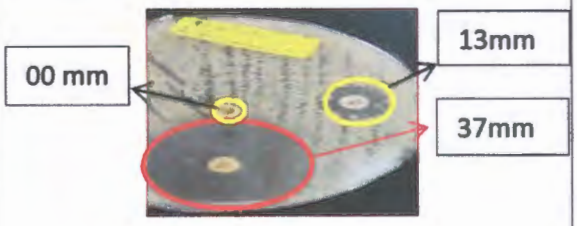
S : sensible

I : ntermédiaire

R : Résiste

La comparaison entre les résultats de l'antibiogramme des souches testées non photosensibilisées et les résultats de l'antibiogramme des souches photosensibilisées sont représenté dans le tableau (11).

Tableau(11) : La comparaison entre l'antibiogramme de souches testées avant et après la photosensibilisation

Avant la photosensibilisation	**Après la photosensibilisation**
 ***Acinetobacter. Spp*** à AX_{25}	 ***Acinetobacter. Spp*** à AX_{25}
 *Staphylococcus aureus* à SXT_{25}	 *Staphylococcus aureus* à SXT_{25}
 *Acenitobacter baumannii* ***à*** IPM_{10}	 *Acenitobacter baumannii* ***à*** IPM_{10}

Le test d'antibiogramme permet d'identtifier les souches *Staphylococcus aureus, Acinetobacter spp, Acinetobacter boumannii, Klebsiella pneumoniea,* résistantes aux antibiotiques Sulfaméthoxazole + Triméthoprime (SXT_{25}), AX_{25}, Imipenème (IPM_{10}), Colistine (CT_{10}), avec des diamètres de 00 mm, 11mm, 14 mm, 00 mm,respectivement.

Par contre les mêmes souches (*Staphylococcus aureus, Acinetobacter spp, Acinetobacter boumannii, Klebsiella pneumoniea)* testées après sensibilisaion au phtallocyanine de Zinc ont

Conclusion

L'identification microbiologique et la caractérisation des bactéries hospitalières résistantes aux antibiotiques ont été abordées.

A l'issue de ce qui a été réalisé, cinq souches ont été isolées. Les résultats de la microbiologie classique ont permis une identification des souches résistantes aux antibiotiques tels que *Staphylococcus aureus, Acinetobacter spp, Acinetobacter boumannii, Klebsiella pneumoniea.*

La progression de la résistance aux antibiotiques pose un défi majeur en termes de santé publique. L'élaboration d'une stratégie nationale contre la résistance aux antibiotiquesest basée sur la détermination de l'effet de la photosensibilisation sur la résistance bactérienne aux antibiotiques.

L'étude du pouvoir de métallophtalocyanine de zinc et la lumière rouge nous a permis de voir les effets d'inhibition contre la résistance bactérienne.

L'étude de la résistance et la sensibilité des souches photosensibilisé aux antibiotiques a montré globalement que la plus part des souches traité sont sensible aux antibiotiques testés.

L'étude de la méthode de diffusion a révélé que le métallophtalocyanine possède une activité inhibitrice vis-à-vis de plus de 50% des souches testées avec des zones d'inhibition significative.

L'étude de la méthode de dilution en milieu solide à donner 40% de viabilité des souches testé et 60% d'inhibition des souches.

A l'instar des résultats obtenus au cours de notre expérimentation, les souches photosensibilisée donnée un résultat mieux que les souches non photosensibilisées.

La photosensibilisation est un processus suivant lequel un changement photochimique ou photophysique se manifeste au niveau d'une entité moléculaire, comme conséquence de l'absorption initiale de radiations par une autre entité moléculaire appelée photosensibilisateur ou agent photosensibilisant (PS).

Malgré l'existence de plusieurs recherches concernant l'inactivation photodynamique de bactéries résistantes aux antibiotiques, l'application de ces derniers reste toujours appliquée dans la thérapie.

Ce modeste travail nous pousse à proposer l'appplication de cette méthode à fin d'essayer de diminuer et d'éradiquer les bactéries résistantes aux antibiotiques qui pose un grand problème de santé publique.

RÉFÉRENCE:

1. Méité S; Boni-cissé C ; Monemo P ; Mlan Tanoa Ap ; Faye-Ketté H ; Dosso H. (2010). surveillance microbiologique des surfaces au niveau d'un établissement hospitalier de niveau tertiaire : exemple du chu de yopougon, abidjan, côte d'ivoire. J, sci, pharm, boil. 11. 73-81.
2. Goldmann D A; Huskins W C. (1997). Control of nosocomial antimicrobial resistant bacteria: a strategic priority for hospitals worldwide. Clin Infe Disea, Univ Chica, 24, 39–45.
3. Ammerlaan H S M; Harbarth S; Buiting A G M; Crook D W; Fitzpatrick F; Hanberger H; Herwaldt L A; van Keulen P H J; Kluytmans J A J W; Kola A; Kuchenbecker R S; Lingaas E; Meessen N; Morris-Downes M –m; Pottinger J M; Rohner P; dos Santos R P; Seifert H; Wisplinghoff H; Ziesing S; Walker A S; Bonten M J M. (2013). Secular Trends in Nosocomial Bloodstream Infections: Antibiotic-Resistant Bacteria Increase the Total Burden of Infection. (56), 6, 798-805.
4. Goldmann Da ; Weinstein Ra ; Wenzel Rp ; Tablan Oc ; Duma Rj ; Gaynes Rp ; et *al.* (1996). Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant micro-organisms in hospitals. A challenge to hospital leadership. Jama. 275(3): 234–40.
5. Quintero B; Miranda M. A. (2000). Mechanisms of photosensitization inducedby drugs: a general survey. Ars Pharm. 41:1; 27-46.
6. Staicu A ; Pascu A ; Nuta A ; Sorescu A ; Raditoiu V ; Pascu M L. (2013). Studies about phthalocyanine photosensitizers to be used in photodynamic therapy. Roma Rep in Physic, 65, 3, 1032–1051.
7. Rouillon S ; Ourdanabia S ; Jamart S ; Hernandez C ; Meunier O. (2006). Etude de l'efficacité d'un produit détergent désinfectant pour sols et surfaces sur les souches bactériennes isolées à partir de l'environnement hospitalier. Patho Biol 54 325-330.
8. Wainwright, M., Phoenix, D.A., Laycock, S.L., Wareing, D.R., Wright, P.A. "Photobactericidal activity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant strains of Staphylococcus aureus," FEMS Microbiol. Lett. 160 (2), 177–81 (1998).
9. Brisse S; Grimont F; Grimont P A D. (2006) .The Genus klebsiella. 6:159–196
10. Lahsoune M ; Boutayeb H ; Zerouali K ; Belabbes H ; El mdaghri N. (2007). Prévalence et état de sensibilité aux antibiotiques d'acinetobacter baumannii dans un chu marocain.

prevalence and in vitro antimicrobial susceptibility patterns of acinetobacter baumannii strains in a moroccan university hospital. Médecine et maladies infectieuses 37 828–83.

11. Jans B; Glupczynski P Y ; Suetens C ; Van Cleemput E. (2004). Enquête épidémiologique relative à acinetobacter baumannii producteur de blse (type veb-1) en Belgique. Ins Sci S Pub Ser Epi.

12. Muylaert A; Mainil J G. (2012). Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». Ann Méd Vét, 156, 109- 123.

13. Lamarche F ; Garcia G ; Krouit M ; Ringot C ; Barrière M ; Granet R ; Saad N. (2009). utilisation de la photothérapie dynamique pour la lutte antimicrobienne. congrès photomed. Univ lim.

14. Luksiene Z. (2005). New approach to inactivation of harmful and pathogenic microorganisms by photosensitization. An O view, F Tech Biotech, 43 (4) 411–418, 1330-9862.

15. Ergaieg K. (2006). Photoinactivation de bactéries d'intérêt sanitaire en condition de simulation solaire en présence de photosensibilisants synthétiques et/ou naturels, sous la direction de rené seux, contributeur : jean-huguesmorneau

16. Rosa L P; Silva F C. (2014). Antimicrobial photodynamic therapy: a new therapeutic option to combat infections. J Med Microb Diagn. 3:4, 2161-070. 3 • 4 • 1000158.

17. Maria C ; Derosa ; robert J ; Crutchley. (2002). Photosensitized singlet oxygen and its applications. Coord Chem Rev 233/234, 351/371.

18. Ethan D; Sternberg; Dolphin D. Brickner C. (1998). Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. Chem, Univ of Brit Colum, C. Univ of Calif at Berk, U.S.A. 54 4151-4202.

19. Ouédraogo S; Bangoura M; Bayo K; guel B ; fabre P L. (2011). Etude d'une série de phtalocyanines de cobalt et de zinc par électrochimie. J, Soc, Ouest-afr, Chim. 031, 60 -71.

20. Claessens C G; Blau W J; Cook M; Hanack M; Nolte R J M; Torres T; and Woèhrle D. (2001). Phthalocyanines and Phthalocyanine analogues: the quest for applicable optical properties. Inv Rev. mona r chem. 132, 3-11.

21. Medyouni R; Hamdi A; Ben Hsouna A; Al-Ayed A S; Soleiman H A; Zaghrouba F; and bruneau C. (2013). Synthesis of a novel antibacterial metal free and metallophthalocyanines appending with four peripheral coumarin derivatives and their separation of structural isomers. Heteroc, 87, 11, 2283 – 2297.

22. Manneville V. (2006). Les phtalocyanines utilisées en cancérologie expérimentale et clinique synthèse d'une métallophtalocyaninc de zinc vectorisable pour des applications en thérapie photodynamique. THESE de Doctorat en Pharmacie: Université Henri Poincaré - Nancy l, faculte de pharmacie

23. Zimcik P; Novakova V; Miletin M; Kopecky K. (2008). Azaphthalocyanines containing pyrazine rings with focus on the alkylheteroatom, aryl and heteroaryl substitution and properties important in photodynamic therapy. Depart Pharmac Chemi and Drug Cont, Facu Pharma in Hrad Kral, Charl Univ in Prag, Heyrov 1203, 50005, Mac het cyc 1(1) 21-29.

24. Wilson A C; Malham G M; Thomsen R J; Harvey J D; Baguley B C. (1996). Determination of the activation spectrum of aluminium phthalocyanine chloride against cultured meningioma cells using a tunable laser. J, Cli Neuro 3, 252-256.

25. Garcia G, maillard P. La lumière pourrait-elle traiter le cancer par interactions « lumière-vivant », cent univ par-sud, ors, fran 91405.

26. Marmo Moreira L; Dos Santos F V; Pereira Lyon J ; Maftoum-Costa M; Pacheco-Soares C; Soares Da Silva N. (2008). Photodynamic therapy: porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers, aust. J. Chem., 61, 741–754.

27. Garcia G. (2006). Nouveaux macrocycles tétrapyrroliques et dérivés vectorisables en photothérapie – porphyrines et chlorinespolyaminées et trimères. Thèse 44 : Doct univ limog. Discip - spéci : chim appli - chim subst natur.

28. Paronyan M H. (2014). photoinactivation of gram-positive and gram-negative microorganisms by cationic porphyrins. Biol. J Arm, 3 (66).

29. Al-ahmad A; Tennert C; Karygianni L; Wrbas K T; Hellwig E; Altenburger M J. (2013). antimicrobial photodynamic therapy using visible light plus water-filtered infrared-a (wira) J Med Microb. 62, 467–473.

30. A melo W C. M; Castro L F; Dal'mas R M. M. T. S and Perussi J R. (2011).Effectiveness of photodynamic therapy on gram-negative bacteria. Sci ag microb patho: com cur res, techno adv, 662-667.

31. Denis T G St; Dai T; Izikson L; Astrakas C; Anderson R R; Hamblin M R; Tegos G p. (2011). Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. Vir 2:6, 509-520.

32. Victor R; Lachica F; Weiss K F; Deibel, R H. (1969). Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by staphylococcus aureus. Applied microbiology. Amer Soc for Microb. PRI IN U.S.A. 18, 1,126-127.

33. Al SehlawiZ S; Almohana A M; Al thahab A A. (2014). Isolation and identification of acinetobacter baumannii clinical isolates using novel methods; j of bab univ and applied sci/ (3) (22).

34. Soussy C J. (2004). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Cent Hosp Univ Hen Mon.

35. Valgas c; machado de souza s; smânia e f a; smânia jr a. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, braz j of microb 38:369-380.

36. Drulis–Kawa1 Z; Bednarkiewicz A; Bugla1 G; Strek W, Doroszkiewicz1 W. (2005).The susceptibility of anaerobic bacteria isolated from periodontal diseases to photodynamic inativation with fotolon (chlorin e6). Pol jof microb. 54, 4, 305 310.

37. Tang Hi M; Hamblin M R; Yow C M N. (2007) a comparative in vitro photoinactivation study of clinical isolates of multidrug-resistant pathogen. J of inf and chemother. 13, 2, 87-91.

38. Koba K ; Sanda K ; Raynaud C ; Nenonene Y A ; Millet J ; Chaumont J P. (2005). Activites antibacteriennes des huiles essentielles de trois cymbopogon sp. Africains vis-avis de germes pathogenes d'animaux de compagnie. Journal. 148: 202-206.

39. Raghavendra Reddy N., Ragul M; Esther Nalini H., Arun Kumar Prasad P; Renuka Devi R; Thirumalai S. (2014). Photodynamic therapy: a novel approach for periodontal pathogens. Inter J Innov Res Rev, 2347 – 4424. 2 (4). 9-17.

40. Wainwright M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (pact), journal of antimicrobial chemotherapy. J Antimicrob Chemothe 42, 13–28.

41. Huang L; Terakawa M; Zhiyentayev T; Huang Y Y; Sawayama Y; Jahnke A, Tegos G P; Wharton T; Hamblin M R. (2010). Novel cationic fullerenes as broad-spectrum light-activated antimicrobials. NIH Pub Acs Auth Manuscr 6(3): 442–452.

42. Drulis–Kawa1 Z; Bednarkiewicz A; Bugla1 G; Stręk W; Doroszkiewicz W. (2006). Bactericidal effects of the fotolon (chlorin e6) on gram–negative and gram–positive strains isolated from wound infections. 15, 2, 279–283. 1230–025X.

Annexe I :

Tabtleau (0) : la liste des antibiotiques

abréviations	antibiotiques	Concentration dans le disque µg	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
			Résistant (mm ou -)	Intermédiaire (mm ou -)	Sensible (mm ou +)
K.	kanamycine	30	13	14 - 17	18
IpM	Imipenème	10	13	14-15	16
P	penicilline	-	28	-	29
SxT	Sulfaméthoxazole + triméthoprime	25	-	-	-
Cz	cifazoline	30	14	15-17	18
CTX	céfotaxime	10	14	15-22	23
CT	Colistine	10	13	-	13
AK	Amikacine	30	2	-	2
AM	ampicilline	10	20	21 - 28	29

Tableau (1): résultats de diamètre des zones d'inhibition de l'antibiogramme d'acinetobacter boumannii.

ATB	SXT 25	CTX 30	CT 10	Ak 30	IPM 10	CZ 30	OF 5
R/S	R	R	S	R	S	R	R
Diamètre (mm)	0	0	12	0	14	0	9

S : sensible / R : résistant

Tableau (2) : résultats de diamètre des zones d'inhibition de l'antibiogramme d'acinetobacter .SPP.

ATB	AM 10	CZ 30	CN 10	IPM 10	AX 25
R/S	R	R	S	S	I
Diamètre (mm)	0	0	25	35	11

S : sensible / R : résistant /I : intermédiaire

Membre de jury :	Présenté par :
Président: Mr Y. Rahmoune	M^lle^Bouidoune Saida
Examinateur : Mr T. Khennouf	M^lle^BoumenakheNedjwa
Encadreur : Mme S. Moussaoui	

Thème

Etude de l'effet de la photosensibilisation des bactéries de l'environnement hospitalier résistantes aux antibiotiques

Résumée

Le milieu hospitalier est régulièrement colonisé par des microorganismes résistants aux antibiotiques. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques se traduit dans la pratique hospitalière par une augmentation de la morbidité et parfois de la mortalité. Pour étudié l'inactivation de la résistance bactérienne aux antibiotiques des souches. On a réalisé une série des prélèvements de l'environnement hospitalier pour isolé des souches résistante aux antibiotiques tel que *Staphylococcus aureus, Acinetobacter spp, Acinetobacter boumannii, Klabsiella pneumoniea.* L'inactivation photodynamique des micro-organismes (PDI) est la direction la plus prometteuse pour la destruction des diverses bactéries. Le test de photosensibilisation a été effectué par l'application d'un metallophtalocyanine de Zinc et la lumière rouge sur les cinq souches utilisé. L'activité antibactérienne a été testée sur les cinq souches cliniques par la méthode de diffusion en disque et la méthode de dilution en milieu solide. La méthode de diffusion a révélé que le métallophtalocyanine possède une activité inhibitrice vis-à-vis de plus de 50% des souches testées avec des zones d'inhibition bien déterminé. Et la méthode de dilution en milieu solide à donner 40% de viabilité des souches testé et 60% d'inhibition des souches. Les résultats montrent que les bactéries Gram positif sont plus sensibles à la photoinactivationque les bactéries Gram négatif. L'inactivation photodynamique a montré que le métallophtalocyanine étudiée est dotée d'une action bactériostatique vis-à-vis des souches testées de *Staphylococcus aureus, Acinetobacter spp, Acinetobacter boumannii, Klabsiella pneumoniea.*

Les motes clés : Bactéries, Résistance, Antibiotique, Métallophtalocyanine, Inactivation photodynamique.

Abstract

The hospital is regularly colonized by micro-organisms resistant to antibiotics.The increase in resistance to antibiotics is translated in practice hospital by an increase in morbidity and sometimes in mortality.For studied the inactivation of bacterial antibiotic resistance of strains can produce a series of samples of the isolated environment for hospital strains resistant to antibiotics such as: *Staphylococcus aureus, Acinetobacter spp, Acinetobacter boumannii, Klabsiella pneumoniea.* The photodynamic inactivation of micro-organisms (PDI) is the most promising direction for the destruction of the various bacteria. The test of photosensitization was carried out by the application of Zinc metallophtalocyanine and the red light on the five strains used. The antibacterial activity was tested on five clinical strains by disk diffusion method and the solid medium dilution method. The method of diffusion revealed that the métallophtalocyanine has an inhibiting activity with respect to more than 50% of the stocks tested with zones of inhibition well defined. And method of dilution in solid medium to give 40% of viability of the stocks tested and 60% of inhibition of the stocks. The results show that the Gram-positive bacteria are more susceptible to photoinactivation as Gram negative bacteria. The photodynamic inactivation showed that the métallophtalocyanine studied is equipped with a bacteriostatic action with respect to the strains tested of *Staphylococcus aureus, Acinetobacter spp, Acinetobacter boumannii, Klabsiella pneumoniea.*

***Key* word**: Bacterial, Resistance, Antibiotic, Metallophtalocyanin, Photodynamique inactivation.

ملخص:

تعتبر المستشفى المكان الاكثر عرضة للكائنات الحية الدقيقة المقاومة للمضادات الحيوية، زيادة مقاومة المضادات الحيوية في المستشفى يؤدي إلى زيادة الامراض وأحيانا يؤدي الى الموت ، لدراسة تثبيط مقاومة المضادات الحيوية للبكتيرية, يمكننا عزل سلسلة من العينات من بيئة المستشفى للسلالات المقاومة للمضادات الحيوية وهذه السلالات: *Staphylococcus aureus, Acinetobacter spp, Acinetobacter boumannii, Klabsiella pneumoniea*. التثبيط الضوئي للكائنات الحية الدقيقة هو الاتجاه الأكثر استعمالا لتدمير العديد من البكتيريا، يتم اختبار حساسية الضوء بتطبيق metallophtalocyanine de Zinc والضوء الاحمر على خمس سلالات معزولة .وتم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا في خمس سلالات باستخدام طريقة القرص و طريقة التخفيف في الوسط الصلب. كشفت طريقة القرص أن metallophthalocyanine لديه نشاط كابح أكثر من 50٪ من السلالات المختبرة مع وجود مناطق تثبيط .طريقة التخفيف في الوسط الصلب اعطت نسبة السلالات الحية40٪ونسبة السلالات المثبطة 60٪.واظهرت النتائج أن البكتيريا إيجابية الجرام أكثر عرضة للتعطيل ضوئي عن البكتيريا سالبة الجرام. أظهر التعطيل الضوئي أن metallophthalocyanine de Zinc لديه عمل تثبيطي للسلالات المختبرة: *Staphylococcus aureus, Acinetobacter spp, Acinetobacter boumannii, Klebsiella pneumoniea*

الكلمات المفتاحية: بكتيريا , المقاومة , المضادات الحيوية , ميثالوفثالوسيانين, التثبيط الضوئي.

المكتبة المركزية