

N° d'ordre : 046/MASTER/2024

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de Master

Pour l'obtention du **diplôme de Master** en
Sciences Vétérinaires

THÈME

***Pseudomonas* chez quelques espèces de poissons de la
Méditerranée : Évaluation de la contamination,
identification des espèces et étude de la sensibilité aux
antibiotiques des souches isolées.**

Présenté par :

Melle **REDJEM Racha**

Soutenu publiquement, le 8 juillet 2024 devant le jury :

Mme **NOUICHI Siham**

MCA (CU Mila)

Présidente

Mme **MEZALI Lynda**

MCB (ENSV)

Promotrice

Mme **BAKOUR Leila**

MCB (ENSV)

Examinatrice

N° d'ordre : 046/MASTER/2024

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences vétérinaires

Mémoire de Master

Pour l'obtention du **diplôme de Master** en
Sciences Vétérinaires

THÈME

***Pseudomonas* chez quelques espèces de poissons de la
Méditerranée : Évaluation de la contamination,
identification des espèces et étude de la sensibilité aux
antibiotiques des souches isolées.**

Présenté par :

Melle **REDJEM Racha**

Soutenu publiquement, le 8 juillet 2024 devant le jury :

Mme **NOUICHI Siham**

MCA (CU Mila)

Présidente

Mme **MEZALI Lynda**

MCB (ENSV)

Promotrice

Mme **BAKOUR Leila**

MCB (ENSV)

Examinatrice

Déclaration sur l'honneur

Je soussignée **REDJEM Racha**, déclare être pleinement consciente que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés sous toute forme de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteurs ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized capital letter 'R' with a loop at the top and a tail that curves downwards and to the right.

Résumé

Alors que la demande en produits de la pêche et de l'aquaculture est en hausse en Algérie, à l'instar des autres pays du monde, un danger invisible se glisse dans notre assiette : *Pseudomonas*. Les bactéries de ce genre, naturellement présentes dans l'eau, peuvent contaminer et proliférer dans le poisson, nuire à sa qualité et à la santé du consommateur, notamment lorsqu'elles sont résistantes aux antibiotiques.

L'absence du critère *Pseudomonas* pour toutes les denrées alimentaires, y compris les produits de la pêche et de l'aquaculture, dans la réglementation Algérienne, soulève des questions quant à la préservation de la santé publique. Pour tenter de comprendre l'état des lieux, nous avons mené cette étude qui se concentre sur l'évaluation du niveau de contamination par *Pseudomonas* de 4 sites anatomiques prélevés de 5 espèces de poissons de la Méditerranée, échantillonnés chez des détaillants à Alger, ainsi que sur l'identification de l'espèce bactérienne et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches isolées.

Nos résultats ont montré que les 20 prélèvements étaient tous contaminés par *Pseudomonas* avec des charges bactériennes différentes. Le mucus était le plus contaminé chez *Sardinella aurita*, *Merlangius merlangus* et *Dentex gibbosus*, avec $2,43E+13$ UFC/écouvillon, $6,50E+04$ UFC/écouvillon et $3,90E+04$ UFC/écouvillon, respectivement. Chez *Scorpaena scrofa* et *Mullus surmuletus*, c'est la chair qui présentait la charge bactérienne la plus importante avec $9,00E+02$ UFC/g et $1,30E+05$ UFC/g, respectivement. Quatre espèces de *Pseudomonas* ont été identifiées : *P. fluorescens*, comme espèce prévalente, *P. aeruginosa*, *P. putida* et *P. mendocina*. Toutes les souches (n= 18) étaient résistantes à au moins 2 antibiotiques, et 66,67% étaient résistantes à au moins 3 antibiotiques. L'antibiorésistance a été exprimée uniquement pour la famille des bêtalactamines mais avec une résistance à l'imipénème signalée pour *P. fluorescens* et *P. putida*. La résistance la plus élevée a été observée chez l'espèce la plus prévalente *P. fluorescens*. Trois phénotypes de résistance ont été déterminés : Tc Ttc Ctx Imp, Tc Ttc Ctx et Tc Ttc. Le phénotype le plus répandu, Tc Ttc Ctx, étant associé à plusieurs espèces et à différents sites anatomiques prélevés.

Mots clés : *Pseudomonas*, poissons de Méditerranée, comptage, identification, antibiorésistance, phénotype de résistance.

Abstract

While the demand for fishery and aquaculture products is rising in Algeria, as in other countries around the world, an invisible threat is sneaking into our plates: *Pseudomonas*. Bacteria of this genus, naturally present in water, can contaminate and proliferate in fish, compromising its quality and the health of consumers, especially when they are resistant to antibiotics.

The absence of *Pseudomonas* criteria in Algerian regulations for all foodstuffs, including fishery and aquaculture products, raises questions about public health preservation. To understand the current situation, we conducted this study focusing on evaluating the level of *Pseudomonas* contamination from 4 anatomical sites sampled from 5 Mediterranean fish species, collected from retailers in Algiers. We also aimed to identify the bacterial species and study the antibiotic susceptibility of the isolated strains.

Our results showed that all the 20 samples were contaminated with *Pseudomonas*, with varying bacterial loads. Mucus was most contaminated in *Sardinella aurita*, *Merlangius merlangus*, and *Dentex gibbosus*, with 2.43E+13 CFU/swab, 6.50E+04 CFU/swab, and 3.90E+04 CFU/swab, respectively. In *Scorpaena scrofa* and *Mullus surmuletus*, the highest bacterial load was found in the flesh, with 9.00E+02 CFU/g and 1.30E+05 CFU/g, respectively.

Four species of *Pseudomonas* were identified: *P. fluorescens* was the most prevalent, followed by *P. aeruginosa*, *P. putida*, and *P. mendocina*. All strains (n=18) were resistant to at least 2 antibiotics, and 66.67% were resistant to at least 3 antibiotics. Antibiotic resistance was observed only for the beta-lactams class, with resistance to imipenem reported for *P. fluorescens* and *P. putida*. The highest resistance was observed in the most prevalent species, *P. fluorescens*. Three resistance phenotypes were determined: Tc Ttc Ctx Imp, Tc Ttc Ctx, and Tc Ttc. The most common phenotype, Tc Ttc Ctx, was associated with several species and various sampled anatomical sites.

Keywords: *Pseudomonas*, Fish of Mediterranean Sea, enumeration, identification, antimicrobial resistance, antimicrobial phenotype.

ملخص

بينما تتزايد الطلبات على منتجات الصيد وتربية الأحياء المائية في الجزائر، على غرار الدول الأخرى حول العالم، تتسلسل تهديدات غير مرئية إلى طبقتنا: البكتيريا الزائفة. تلوث هذه البكتيريا، التي تتواجد طبيعياً في المياه، يمكن أن ينتقل إلى الأسماك وينمو فيها، مما يؤثر على جودتها وصحة المستهلك، خاصة إذا كانت المقاومة للمضادات الحيوية.

غياب معيار البكتيريا الزائفة في التشريع الجزائري لجميع المواد الغذائية، بما في ذلك منتجات الصيد وتربية الأحياء المائية، يثير تساؤلات حول الحفاظ على الصحة العامة. لفهم الوضع الحالي، أجرينا هذه الدراسة التي تركز على تقييم مستوى التلوث ب البكتيريا الزائفة من 4 مواقع تشريرية مأخوذة من 5 أنواع من أسماك البحر الأبيض المتوسط، المأخوذة من بائعين في الجزائر، بالإضافة إلى تحديد نوع البكتيريا ودراسة حساسية المستعرات المعزولة للمضادات الحيوية.

أظهرت نتائجنا أن جميع العينات (20 عينة) كانت ملوثة بالبكتيريا الزائفة بأحمال بكتيرية متفاوتة. كان المخاط هو الأكثر تلوثاً في أنواع مثل *Sardinella aurita* و *Merlangius merlangus* و *Dentex gibbosus*، بـ E+13 2,43، و *UFC/écouvillon 6,50*، E+04 UFC/écouvillon 3,90، و *E+04 UFC/écouvillon* في أنواع مثل *Mullus surmuletus* و *Scorpaena scrofa*، تم العثور على أعلى تحميل بكتيري في لحم السمك، بـ E+02 9,00 و *E+05 UFC/g 1,30* و *E+05 UFC/g* على التوالي.

تم التعرف على أربعة أنواع من البكتيريا الزائفة: *P. fluorescens* كانت الأكثر انتشاراً، تلتها *P. aeruginosa*، و *P. putida* و *P. mendocina*. كانت جميع السلالات (n= 18) مقاومة على الأقل لمضادين حيويين، وكانت 66.67% مقاومة على الأقل لثلاثة مضادات حيوية. لوحظت مقاومة المضادات الحيوية فقط لعائلة البيتا لاكتام، مع وجود مقاومة للإيمبيبيديم لـ *P. fluorescens* و *P. putida*. لوحظت أعلى درجات المقاومة في النوع الأكثر انتشاراً، *P. fluorescens*. تم تحديد ثلاثة أنماط مقاومة *Tc Ttc Ctx Imp*، *Tc Ttc Ctx*، و *Tc Ttc Ctx* كان النمط الأكثر شيوعاً، مرتبباً بعدة أنواع ومواقع تشريرية مختلفة.

الكلمات الرئيسية: البكتيريا الزائفة، أسماك البحر الأبيض المتوسط، عد، تعريف، مقاومة للمضادات الحيوية، نمط المضادات الحيوية.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers ALLAH Le Tout-Puissant et Miséricordieux, qui m'a accordé la force et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce mémoire de Master.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à **Mme NOUICHI S.**, présidente du jury, pour l'honneur qu'elle m'a fait de le présider et pour ses précieux conseils et remarques constructives qui ont contribué à l'amélioration de mon mémoire.

Je remercie également **Mme BAKOUR L.**, examinatrice de ce mémoire, pour sa lecture attentive et ses suggestions pertinentes qui ont permis d'enrichir mon travail.

Ma reconnaissance s'adresse tout particulièrement à **Mme MEZALI L.**, ma promotrice, pour son encadrement précieux, sa patience, sa disponibilité et ses encouragements constants tout au long de ce Master. Ses conseils avisés et son expertise m'ont permis de progresser considérablement et de mener à bien ce mémoire.

Enfin, je tiens à remercier du fond du cœur toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à ma formation et à la réussite de ce mémoire. Votre soutien constant a été d'une valeur inestimable pour moi.

DEDICACES

Je dédie ce travail à moi-même.

À ma défunte grand-mère ;

À mes précieux parents ;

À mes deux frères, Timo et Midou ;

À mes tantes Bania et Mina ;

À ma cousine Ines ;

Et à tous mes chers amis.

RACHA R.

Liste des abréviations

AARN: Algerian Antimicrobial Resistance Network.

ADH: L-Arginine.

APH: Aminoglycoside phosphotransferase gene.

BHIB: Brain Heart Infusion Broth.

CDC: Centers for Disease Control and prevention.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

GLU : D-Glucose.

GN : Gélose nutritive.

IATS: International antigenic typing system.

MH : Milieu gélosé de Mueller-Hinton.

NO₃ : Potassium nitrate.

PAC : Acide phénylacétique.

PNPG : 4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside.

TMPD : tétraméthyl-p-phénylènediamin.

TSE : Tryptone Sel Eau.

UFC : Unité formant colonie.

URE: Urée.

Liste des tableaux

| | | |
|-----------------------|---|-------------|
| Tableau n°01 : | Taxonomie de <i>Pseudomonas</i> selon la classification du <i>Bergey's manual of systematic bacteriology</i> , seconde édition (volume 2, 2005) | P 04 |
| Tableau n°02 : | Les groupes génomiques de <i>Pseudomonas</i> spp. | P 06 |
| Tableau n°03 : | Les classes d'antibiotiques répandues efficaces contre les <i>Pseudomonas</i> spp. | P 10 |
| Tableau n°04 : | Les mécanismes de résistance acquise de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> contre trois classes d'antibiotiques | P 13 |
| Tableau n°05 : | Désignation et répartition des échantillons de poissons | P 15 |
| Tableau n°06 : | Désignation du matériel principal utilisé au cours de notre étude | P 16 |
| Tableau n°07 : | Valeurs critiques des diamètres de zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas</i> selon le CLSI (2014 ; 2024) | P 26 |
| Tableau n°08 : | Charge de contamination des poissons par <i>Pseudomonas</i> selon le site anatomique prélevé | P 30 |
| Tableau n°09 : | Prévalence globale des espèces de <i>Pseudomonas</i> | P 31 |
| Tableau n°10 : | Répartition des différentes espèces de <i>Pseudomonas</i> identifiées par site prélevé du poisson | P 31 |
| Tableau n°11 : | Taux global de l'expression clinique des 18 souches de <i>Pseudomonas</i> testées à 11 antibiotiques | P 32 |
| Tableau n°12 : | Taux de résistance global des 18 souches de <i>Pseudomonas</i> testées à 11 antibiotiques | P 33 |
| Tableau n°13 : | Taux d'expression clinique de 18 souches de <i>Pseudomonas</i> testées en fonction de l'antibiotique | P 34 |
| Tableau n°14 : | Taux de résistance des espèces de <i>Pseudomonas</i> aux antibiotiques ... | P 35 |
| Tableau n°15 : | Répartition des antibiotypes de 18 souches de <i>Pseudomonas</i> isolées de 5 espèces de poissons | P 36 |

Liste des figures

| | | |
|----------------------|--|-------------|
| Figure n°01 : | Les principaux mécanismes d'action d'antibiotiques | P 09 |
| Figure n°02 : | Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques | P 11 |
| Figure n°03 : | Mécanismes de résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> face à l'aztréonam | P 14 |

Liste des photographies

| | | |
|----------------------------|---|-------------|
| Photographie n°01 : | Différents sites anatomiques de prélèvement du poisson (ici rouget de roche) : (a) mucus, (b) branchies, (c) intestins, (d) chair | P 18 |
| Photographie n°02 : | Préparation des déluions décimales | P 18 |
| Photographie n°03 : | Encensement du milieu gélosé à la cétrimide | P 19 |
| Photographie n°04 : | Préparation des boites de Pétri, avec milieuensemencé, à l'incubation | P 19 |
| Photographie n°05 : | Aspect macroscopique des colonies présumptives de <i>Pseudomonas</i> (a) sur milieu gélosé à la cétrimide et (b) sur milieu gélosé à la cétrimide sous lumière UV | P 20 |
| Photographie n°06 : | Test positif de recherche de la catalase | P 22 |
| Photographie n°07 : | Test de recherche de la cytochrome oxydase | P 23 |
| Photographie n°08 : | Galerie API [®] 20NE inoculée | P 24 |
| Photographie n°09 : | Galerie API [®] 20NE après incubation préparée à la lecture | P 24 |
| Photographie n°10 : | Disques d'antibiotiques déposés sur gélose MHensemencée ... | P 28 |
| Photographie n°11 : | Les cryotubes utilisés pour la conservation des souches de <i>Pseudomonas</i> isolées | P 29 |

TABLE DES MATIERES

RESUMES

REMERCIEMENTS

DEDICACES

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTES DES FIGURES ET PHOTOGRAPHIES

INTRODUCTION 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1. LE GENRE *Pseudomonas*

| | | |
|-------|---|---|
| 1 | Généralités..... | 3 |
| 1.1 | Définition et historique | 3 |
| 1.2 | Taxonomie | 4 |
| 1.3 | Caractères généraux | 4 |
| 1.3.1 | Caractères morphologiques | 4 |
| 1.3.2 | Caractères cultureux | 4 |
| 1.3.3 | Caractères biochimiques..... | 5 |
| 1.3.4 | Caractères antigéniques | 5 |
| 1.3.5 | Caractères génomiques | 5 |
| 1.4 | Autres caractères..... | 6 |
| 1.4.1 | Production de pigments | 6 |
| 1.4.2 | Halophilie | 6 |
| 1.4.3 | Température optimale de croissance | 7 |
| 2 | <i>Pseudomonas</i> et denrées alimentaires d'origine animale..... | 7 |
| 2.1 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 7 |
| 2.2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 7 |

| | | |
|-----|---------------------------------|---|
| 2.3 | <i>Pseudomonas putida</i> | 8 |
|-----|---------------------------------|---|

CHAPITRE 2. *Pseudomonas* ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

| | | |
|-----|---|----|
| 1 | Classes d'antibiotiques | 9 |
| 2 | Familles d'antibiotiques actifs contre <i>Pseudomonas</i> | 9 |
| 3 | Types de résistances aux antibiotiques..... | 10 |
| 3.1 | La résistance naturelle | 10 |
| 3.2 | La résistance acquise | 10 |
| 4 | Mécanismes de résistance chez <i>Pseudomonas</i> | 12 |
| 4.1 | Résistance naturelle de <i>Pseudomonas</i> | 12 |
| 4.2 | Résistance acquise de <i>Pseudomonas</i> | 12 |

PARTIE PRATIQUE

| | | |
|---------|---|----|
| 1 | Matériel et méthodes | 15 |
| 1.1 | Période et lieu de l'étude | 15 |
| 1.2 | Echantillonnage | 15 |
| 1.3 | Matériel de prélèvement et d'analyse | 16 |
| 1.4 | Méthodes..... | 16 |
| 1.4.1 | Dénombrement de <i>Pseudomonas</i> | 16 |
| 1.4.1.1 | Prise d'essai, préparation de la suspension mère et des dilutions..... | 17 |
| 1.4.1.2 | Ensemencement du milieu sélectif et incubation..... | 19 |
| 1.4.1.3 | Lecture et expression des résultats..... | 19 |
| 1.4.2 | Identification du genre <i>Pseudomonas</i> et de ses espèces..... | 21 |
| 1.4.2.1 | Purification des isolats | 21 |
| 1.4.2.2 | Tests biochimiques métaboliques d'orientation pour l'identification du genre bactérien..... | 21 |
| 1.4.2.3 | Tests biochimiques métaboliques en galerie miniaturisée pour l'identification de l'espèce bactérienne | 23 |
| 1.4.3 | Etude de la sensibilité aux antibiotiques | 25 |

| | | |
|---------|---|-----------|
| 1.4.3.1 | Matériel biologique..... | 25 |
| 1.4.3.2 | Antibiotiques évalués..... | 25 |
| 1.4.3.3 | Technique..... | 27 |
| 1.4.3.4 | Lecture | 28 |
| 1.4.4 | Conservation des souches..... | 29 |
| 2 | Résultats | 30 |
| 2.1 | Charge bactérienne des poissons en <i>Pseudomonas</i> | 30 |
| 2.2 | Identification des espèces de <i>Pseudomonas</i> | 30 |
| 2.2.1 | Prévalence globale..... | 30 |
| 2.2.2 | Prévalence par espèce de poissons et site anatomique | 31 |
| 2.3 | Etude de la sensibilité aux antibiotiques..... | 32 |
| 2.3.1 | Antibiotiques concernés par l'expression clinique globale des souches de <i>Pseudomonas</i> isolées de poissons | 32 |
| 2.3.2 | Résistance des souches de <i>Pseudomonas</i> testées aux antibiotiques..... | 32 |
| 2.3.3 | Expression clinique des souches de <i>Pseudomonas</i> testées par antibiotique.. | 33 |
| 2.3.4 | Résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de <i>Pseudomonas</i> par espèce..... | 35 |
| 2.3.5 | Détermination des phénotypes de résistance de <i>Pseudomonas</i> | 35 |
| 3 | Discussion | 37 |
| | CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS..... | 42 |

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

INTRODUCTION

La demande croissante en produits de la pêche et de l'aquaculture en Algérie reflète une tendance mondiale alimentée par une population en pleine expansion, une urbanisation rapide, et une évolution des préférences alimentaires. Les produits aquatiques, essentiels pour la nutrition (FAO, 2024a), constituent une part significative de l'apport en protéines animales dans de nombreux pays, y compris l'Algérie. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la consommation de poissons en Algérie a considérablement augmenté ces dernières années, soulignant la nécessité d'une expansion et d'une diversification de la production aquacole pour répondre à cette demande croissante (FAO, 2024b). Les initiatives de la Banque mondiale et d'autres organismes internationaux visent à promouvoir une croissance durable de ce secteur pour répondre aux besoins alimentaires croissants tout en préservant les écosystèmes marins (ANONYME, 2024). Le poisson subit plusieurs étapes de transformation qui peuvent le contaminer et altérer sa qualité. La manipulation, la température de stockage et les méthodes d'emballage sont des facteurs critiques qui influencent directement la qualité du poisson (LATIFOU et al., 2019) et le rendent vulnérable à la contamination par des micro-organismes pathogènes et des micro-organismes d'altération tels que les *Pseudomonas*.

Le genre *Pseudomonas* représente un groupe de bactéries à Gram négatif psychrotrophes, largement répandues dans les eaux, le biotope des poissons. Ces bactéries sont connues pour leur grande capacité d'adaptation et leur résistance à des conditions environnementales variées. Elles font partie à la fois de la microflore d'altération et de la microflore pathogène, à l'exemple de *P. aeruginosa*, qui peut être responsable d'infections opportunistes chez les humains et les animaux. Ces infections sont particulièrement préoccupantes dans les contextes hospitaliers et chez les individus immunodéprimés, nécessitant souvent des traitements complexes et rigoureux en raison de leur résistance aux antibiotiques.

L'antibiorésistance, chez *Pseudomonas* entre autres micro-organismes, est un défi majeur pour la santé publique et fait objet d'une surveillance mondiale. Ces bactéries possèdent deux types de résistance, une résistance naturelle et une résistance acquise. La résistance naturelle est liée à leur structure cellulaire et à leurs mécanismes de défense innés, tandis que la résistance acquise résulte de l'exposition aux antibiotiques, ce qui favorise la sélection de souches résistantes, en raison de la pollution des eaux et des pressions

environnementales. Malgré la préoccupation croissante que constitue *Pseudomonas* et son impact potentiel sur la santé humaine et animale, la réglementation Algérienne sur la sécurité alimentaire n'inclue le critère « *Pseudomonas* » que pour certaines denrées de la catégorie « viande d'animaux de boucherie et dérivés ». Ce qui soulève des inquiétudes quant à la contamination potentielle des produits de la pêche et de l'aquaculture en particulier, par des souches résistantes de *Pseudomonas* et aux risques associés pour la santé publique.

Partant de ce contexte, la présente étude se concentre sur l'évaluation du niveau de contamination et de la caractérisation phénotypique des souches isolées de *Pseudomonas* de diverses espèces de poissons de la Méditerranée échantillonnées chez des poissonniers détaillants à Alger. Pour ce faire, notre travail est structuré en deux parties principales : une partie bibliographique composée de deux chapitres, l'un traitant du genre *Pseudomonas* et l'autre, sa résistance aux antibiotiques, et une partie pratique qui vise à atteindre plusieurs objectifs :

- ✓ Estimer la charge microbienne en *Pseudomonas* dans chaque espèce de poisson en fonction des sites anatomiques de prélèvement.
- ✓ Identifier les espèces de *Pseudomonas* selon l'espèce de poisson et le site prélevé.
- ✓ Evaluer la résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas*, et déterminer leurs profils d'antibiorésistance.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

LE GENRE *Pseudomonas*

CHAPITRE 1. Le genre *Pseudomonas*

1 Généralités

1.1 Définition et historique

Le nom du genre *Pseudomonas* dérive du grec ancien, combinant les mots **pseudo** (signifiant "faux") et **monas** (signifiant "unité") (CDC, 2012 ; ANONYME, 2024).

En 1882, Charles Gessard a découvert le genre *Pseudomonas*, un bacille à Gram négatif, strictement aérobic et de virulence relativement faible (CHEN et RUDOY, 2022).

En 1894, le botaniste allemand Walter Migula a introduit ce terme pour désigner un genre de bactéries caractérisées par la présence d'organes de motilité polaires et la formation rare de spores chez certaines espèces (CDC, 2012 ; ANONYME, 2024).

Cet organisme est ubiquiste, avec une prédilection pour les milieux humides, se trouvant principalement dans l'eau et le sol. Des espèces de *Pseudomonas* ont été identifiées dans le sol, l'eau, les plantes et les animaux (CHEN et RUDOY, 2022).

Pseudomonas est un agent pathogène opportuniste cliniquement important, responsable d'infections nosocomiales. En plus de provoquer des maladies graves, souvent mortelles, ces organismes présentent une résistance innée à de nombreux antibiotiques et peuvent développer de nouvelles résistances après une exposition aux agents antimicrobiens (CHEN et RUDOY, 2022).

Les bactéries du genre *Pseudomonas*, omniprésentes dans l'environnement, peuvent également contaminer les produits alimentaires et altérer leur qualité. Elles sont particulièrement actives à basses températures, affectant une large gamme de produits tels que les produits laitiers (lait, fromage), les œufs, la viande et le poisson. Elles produisent des enzymes (protéases, lipases) qui dégradent ces aliments, provoquant des changements de texture, goût et odeur. Certaines souches peuvent même causer des intoxications alimentaires. Ces bactéries représentent donc un défi pour la sécurité et la qualité alimentaires (ALQUATI et al., 2002).

CHAPITRE 1. Le genre *Pseudomonas*

1.2 Taxonomie

Le genre *Pseudomonas* est un groupe hétérogène et complexe d'organismes appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae* et à l'ordre des *Pseudomonadales* de la classe de *Gammaproteobacteria* (**Tableau n°01**) ; il compte 333 espèces identifiées à ce jour (**Anonyme, 2024**).

La caractérisation taxonomique de ces bactéries permet de les classer en fonction de leurs caractéristiques qualitatives et quantitatives (**PELADAN et al., 1984**).

Tableau n°01 : Taxonomie de *Pseudomonas* selon la classification du *Bergey's manual of systematic bacteriology*, seconde édition, volume 2, 2005 (DELARRAS, 2014).

| Niveau taxonomique | Catégorie |
|--------------------|----------------------------|
| Domaine | <i>Bacteria</i> |
| Phylum | <i>Proteobacteria</i> |
| Classe | <i>Gammaproteobacteria</i> |
| Ordre | <i>Pseudomonadales</i> |
| Famille | <i>Pseudomonadaceae</i> |
| Genre | <i>Pseudomonas</i> |

1.3 Caractères généraux

1.3.1 Caractères morphologiques

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des organismes en forme de bâtonnets, qui apparaissent sous le microscope comme des structures à Gram négatif, généralement droites ou légèrement courbées. Leur taille varie de 0,5 µm à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 µm à 5,0 µm de longueur. Asporulantes, la plupart sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles situés à l'extrémité de la cellule, bien que certaines espèces comme *P. mendocina* ou *P. stutzeri* puissent également posséder des flagelles latéraux de courte longueur dans certaines conditions de culture (**PALLERONI, 2015**).

1.3.2 Caractères cultureux

Les *Pseudomonas* n'ont pas d'exigences nutritives particulières et peuvent croître sur des milieux non enrichis. Les colonies apparaissent en 24 heures, se présentent plates, à bord irrégulier, et développent avec le temps un aspect irisé métallique. Un pigment vert brillant diffusible, caractéristique de *P. aeruginosa*, résulte de la combinaison de la pyoverdine

CHAPITRE 1. Le genre *Pseudomonas*

(pigment jaune-vert fluorescent commun aux espèces du groupe *fluorescens*) et de la pyocyanine (pigment bleu spécifique de *P. aeruginosa*). Une odeur aromatique de type seringa est souvent sentie. Certaines souches peuvent présenter des variations, comme des colonies non pigmentées ou colorées en brun ou en rouge, due à la production de pyomélanine ou pyorubrine, respectivement, et certaines souches se caractérisent par un aspect mucoïde, d'autres souches peuvent apparaître sous forme de colonies naines, rendant leur culture plus difficile (CLAVE, 2011).

1.3.3 Caractères biochimiques

Les *Pseudomonas* sont des bactéries qui tirent leur énergie des réactions enzymatiques d'oxydo-réduction, ce qui leur permet d'utiliser les nutriments comme sources de carbone et d'énergie. Parmi les caractéristiques biochimiques des *pseudomonas*, on note sa capacité à produire de la cytochrome C oxydase, d'où un test d'oxydase positif, ainsi que des enzymes telles que la nitrate réductase et la nitrite réductase, qui facilitent la conversion des nitrates en azote. De plus, cette bactérie est capable de dégrader l'arginine grâce à une arginine dihydrolase (ADH positive), ce qui contribue à sa diversité métabolique (JEANNOT et al., 2019).

1.3.4 Caractères antigéniques

Chez *P. aeruginosa*, un antigène somatique O thermostable détermine l'antigénicité spécifique. Cet antigène est constitué de divers polysaccharides formant les chaînes latérales du lipopolysaccharide (LPS), dont la longueur et la composition varient. Le sérotypage des souches, réalisé à l'aide d'antisérums spécifiques à cet antigène, permet d'identifier 17 sérotypes différents selon la classification du système international de typage antigénique (International antigenic typing system IATS). En général, 90% à 95 % des souches peuvent être typées avec ce système.

Il existe également un antigène flagellaire H, thermolabile, permettant un typage qui, combiné au typage O, permet de distinguer au moins 25 sérovars (CADY, 2006).

1.3.5 Caractères génomiques

Les *Pseudomonas* ont initialement été classés en cinq groupes génomiques, de l'ARN I à V, dont les espèces les plus connues sont présentées dans le **tableau n°02 (DELARRAS, 2014)**.

CHAPITRE 1. Le genre *Pseudomonas*

Tableau n°02 : Les groupes génomiques de *Pseudomonas* spp. (DELARRAS, 2014).

| Groupe génomique | Caractéristiques des espèces |
|--|---|
| Groupe I : 15 espèces (actuellement plus de 90 espèces) | Espèces fluorescentes, oxydase + : <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> |
| | Espèces fluorescentes, oxydase - : <i>P. syringae</i> , <i>P. viridiflava</i> |
| | Espèces non fluorescentes : <i>P. alcaligenes</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. stutzeri</i> |
| Groupe II : 8 espèces | <i>P. cepacia</i> , <i>P. pseudomallei</i> qui devient <i>Burkholderia</i> dans la famille des <i>Burkholderiaceae</i> |
| Groupe III : 12 espèces | <i>P. acidovorans</i> , <i>P. testosteroni</i> ,... etc. Deviens la famille des <i>Comamonadaceae</i> avec le genre <i>Comamonas</i> |
| Groupe IV : 2 espèces | <i>P. diminuta</i> , <i>P. vesicularis</i> devient le genre <i>Brevundimonas</i> |
| Groupe V : 1 espèce | <i>P. maltophilia</i> |

1.4 Autres caractères

1.4.1 Production de pigments

Les *Pseudomonas* spp. se caractérisent par leur capacité à synthétiser des pigments pyoverdines fluorescents et des pigments phénaziniques non fluorescents. L'analyse de ces pigments sur gélose King A et King B constitue un outil précieux pour l'identification précise de ces bactéries (DELARRAS, 2014).

1.4.2 Halophilie

L'une des méthodes fréquemment employées pour mettre en évidence le caractère halophile de certaines souches de *Pseudomonas* spp. consiste à observer leur croissance sur gélose nutritive additionnée de 10% de chlorure de sodium (NaCl 10%). Après ensemencement du milieu et incubation à une température de 30°C (GUIRAUD, 2012).

CHAPITRE 1. Le genre *Pseudomonas*

1.4.3 Température optimale de croissance

Elle est rapidement et approximativement déterminée en inoculant trois tubes de bouillon nutritif placés respectivement à 37°C, 30°C et 20°C. Après 24h ou plus, l'intensité des cultures est comparée (GUIRAUD, 2012).

2 *Pseudomonas* et denrées alimentaires d'origine animale

2.1 *Pseudomonas fluorescens*

P. fluorescens se distingue par son métabolisme et sa mobilité. Dotée d'une capacité d'oxydation positive, elle fermente le glucose mais ne métabolise pas le lactose. Sa mobilité est assurée par des flagelles polaires, lui permettant de se déplacer efficacement dans son environnement. Cette bactérie ubiquitaire colonise divers habitats, des sols aux racines des plantes, en passant par les végétaux et les eaux douces et marines (CHARAN *et al.*, 2011).

Entre 2020 et 2022, l'Italie du Nord a connu une augmentation préoccupante de la discoloration bleutée de la mozzarella, un phénomène alarmant pour les acteurs du secteur laitier. Cette coloration anormale est principalement attribuée à une contamination par *P. fluorescens* qui résulte de l'introduction de souches provenant de l'environnement à différents stades de la production ou de la manipulation. Ce type de contaminations peuvent survenir par l'intermédiaire de l'eau de lavage, des surfaces de contact ou par le personnel manipulant le fromage sans mesures d'hygiène adéquates (ARNABOLDI *et al.*, 2022).

2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire aux multiples facettes. Saprophyte dans l'environnement et commensale chez l'homme et les animaux, elle produit de la pyocyanine. Rarement, elle peut provoquer des gastro-entérites *via* des aliments contaminés par des lésions cutanées ou, plus rarement, par des fèces. De plus, elle peut se transformer en un pathogène opportuniste redoutable, surtout chez les individus fragilisés. (GUIRAUD, 2012 ; DELARRAS, 2014). Elle possède au moins 6 toxines (entérotoxine, exotoxine A, exoenzyme S, hémolysine, leucocidine et glycolipoprotéine) (GUIRAUD, 2012).

CHAPITRE 1. Le genre *Pseudomonas*

2.3 *Pseudomonas putida*

P. putida est une bactérie ubiquitaire qui se distingue particulièrement par son métabolisme intrinsèque extrêmement polyvalent lui permettant de supporter des stress physico-chimiques, ainsi que par ses capacités enzymatiques diversifiées, et une tolérance exceptionnelle aux xénobiotiques (**WEIMER et al., 2020**).

L'organisation et l'expression de divers clusters génétiques permettent la biosynthèse de composés complexes comme les céphalosporinases. L'adoption d'un mode de vie basé sur le biofilm, par opposition au mode planctonique, lui confère une tolérance accrue aux conditions de réaction sévères pendant les biotransformations (**WEIMER et al., 2020**).

Une étude menée par Papadopoulou et al en 2020 a révélé que la *Pseudomonas putida* peut altérer la viande lors d'un stockage en aérobie. Cette altération se caractérise par une augmentation du pH de la viande. Bien que la *P. putida* altère la viande plus lentement que d'autres bactéries, elle contribue tout de même à l'apparition de caractéristiques sensorielles désagréables telles que des odeurs anormales et la formation de viscosité à la surface de la viande, la rendant impropre à la consommation (**PAPADOPOULOU et al., 2020**).

CHAPITRE 2

Pseudomonas et résistance aux antibiotiques

CHAPITRE 2. *Pseudomonas* et résistance aux antibiotiques

1 Classes d'antibiotiques

Les antibiotiques combattent les infections bactériennes en ciblant des mécanismes spécifiques. Certains, comme les pénicillines, fragilisent la paroi bactérienne, provoquant sa lyse. D'autres, comme les polymyxines, altèrent la membrane plasmique, entraînant la fuite de composés vitaux. La réplication et la transcription de l'ADN bactérien peuvent également être bloquées par des antibiotiques comme les quinolones. Un autre mécanisme clé consiste à inhiber la synthèse des protéines par fixation au ribosome ; c'est le cas des aminosides et des cyclines. Enfin, certains antibiotiques, comme les sulfamides, entravent la production des folates, essentiels à la croissance bactérienne (OPATOWSKI, 2020).

La **figure n°01** schématise ces différents mécanismes d'action des antibiotiques.

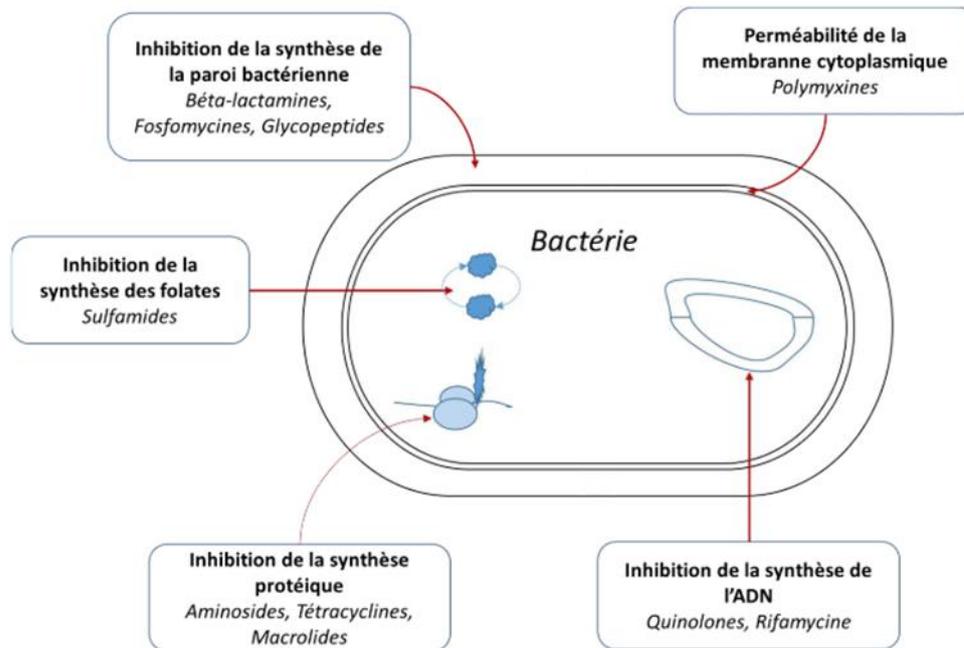


Figure n°01 : Les principaux mécanismes d'action des antibiotiques (OPATOWSKI, 2020).

2 Familles d'antibiotiques actifs contre *Pseudomonas*

Les espèces de *Pseudomonas*, en particulier *P. aeruginosa*, présentent un répertoire d'antibiotiques efficaces limité, généralement réservé à un usage hospitalier (JEANNOT et GUILLARD, 2019). Le **tableau n°03** présente une synthèse des antibiotiques couramment utilisés contre ces pathogènes.

CHAPITRE 2. *Pseudomonas* et résistance aux antibiotiques

Tableau n°03 : Les classes d'antibiotiques répandues efficaces contre les *Pseudomonas* spp. (JEANNOT et GUILLARD, 2019).

| Classe d'antibiotiques | Antibiotiques spécifiques |
|------------------------|--|
| Bêtalactamines | Pipéracilline-tazobactam, Ceftazidime, Céfépime, Ceftolozane-tazobactam, Ceftazidime-avibactam, Aztréonam, Imipénème et méropénème (carbapénèmes). |
| Aminoglycosides | Tobramycine et amikacine. |
| Fluoroquinolones | Ciprofloxacine. |
| Polymyxines | Polymyxine B et colistine. |

3 Types de résistances aux antibiotiques

3.1 La résistance naturelle

C'est une propriété intrinsèque de certaines espèces bactériennes qui les rend naturellement insensibles à l'action de ces agents antimicrobiens. Cette résistance peut s'expliquer par deux mécanismes principaux :

- Imperméabilité de la membrane cellulaire : La membrane externe des bactéries à Gram négatif peut constituer une barrière efficace contre certains antibiotiques, limitant leur pénétration dans la cellule bactérienne. C'est le cas de la pénicilline G, inactive sur les entérobactéries et *P. aeruginosa*.
- Production d'enzymes destructrices : Certaines bactéries possèdent des enzymes capables de dégrader les antibiotiques, les rendant inactifs. Ces enzymes, comme les bêtalactamases (pénicillinases, céphalosporinases), sont codées par des gènes présents sur le chromosome bactérien ou sur des plasmides. Elles sont synthétisées de manière constitutive ou inducible selon l'espèce bactérienne (LEZZAR, 2023).

3.2 La résistance acquise

Cette résistance survient lorsqu'une bactérie modifie son patrimoine génétique pour devenir insensible à un ou plusieurs antibiotiques. Ce phénomène peut se produire par deux mécanismes principaux :

CHAPITRE 2. *Pseudomonas* et résistance aux antibiotiques

- Mutations chromosomiques : Des mutations aléatoires dans le chromosome bactérien peuvent entraîner des modifications de la structure ou de la fonction de cibles antibiotiques, rendant la bactérie résistante. Ce type de résistance est généralement spécifique à un seul antibiotique et affecte des populations bactériennes entières.
- Acquisition de plasmides : Les plasmides sont des éléments génétiques extra chromosomiques capables de se transférer d'une bactérie à une autre par conjugaison. Ils peuvent porter des gènes codant pour la résistance à plusieurs antibiotiques simultanément, conférant aux bactéries une multirésistance. Cette transmission horizontale de la résistance est un facteur majeur de propagation des bactéries multirésistantes (LEZZAR, 2023).

La **figure n°02** schématise les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (OPATOWSKI, 2020).

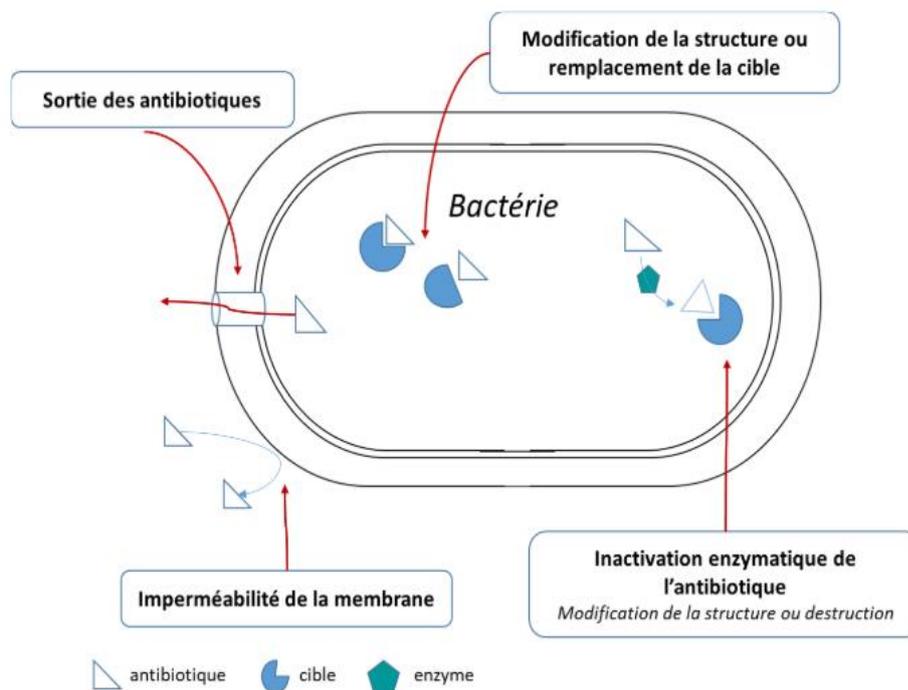


Figure n°02 : Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (OPATOWSKI, 2020).

CHAPITRE 2. *Pseudomonas* et résistance aux antibiotiques

4 Mécanismes de résistance chez *Pseudomonas*

Les *Pseudomonas*, présentent une résistance naturelle et acquise à une large gamme d'antibiotiques. Cette résistance est due à divers mécanismes, y compris la modification de la perméabilité membranaire, l'efflux actif, la production d'enzymes inactivatrices et la modification des cibles antibiotiques (CLAVE, 2011). Les mécanismes de résistance ont été particulièrement étudiés chez *P. aeruginosa*.

4.1 Résistance naturelle de *Pseudomonas*

P. aeruginosa est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques en raison :

- ✓ De sa membrane externe peu perméable aux petites molécules.
- ✓ De sa production constitutive d'un système d'efflux actif dénommé MexAB-OprM.
- ✓ De sa production inductible d'un système d'efflux actif dénommé MexXY (OprM).
- ✓ De sa production d'une β -lactamase inductible à large spectre, AmpC.
- ✓ De sa production d'une β -lactamase à spectre restreint, OXA-50.
- ✓ De sa production d'une enzyme modificateur des aminosides codée par le gène aph(3')-IIb (JEANNOT et GUIRAUD, 2019).

4.2 Résistance acquise de *Pseudomonas*

Le **tableau n°04** résume les principaux mécanismes de résistance de *P. aeruginosa* contre des antibiotiques communément utilisés

CHAPITRE 2. *Pseudomonas* et résistance aux antibiotiques

Tableau n°04 : Les mécanismes de résistance acquise de *P. aeruginosa* contre trois classes d'antibiotiques (CLAVE, 2011).

| Classe d'antibiotiques | Antibiotique | Mode d'action de l'antibiotique | Mécanisme de résistance |
|-------------------------|---|---|---|
| Bêtalactamines | Pénicillines Céphalosporines Carbapénèmes | Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne | - Hyperproduction de la céphalosporinase chromosomique - Pénicillinases plasmidiques - β -Lactamases à spectre étendu - Carbapéménases |
| Aminosides | Tobramycine Amikacine | Inhibition de la synthèse protéique | - Résistance par imperméabilité - Résistance par production d'enzymes inactivatrices (AAC aminoacetyltransférases, ANT nucléotidyltransférases, APH phosphotransférases) |
| Fluoroquinolones | Ciprofloxacine | Inhibition de la topoisomérase | -Modification d'affinité de la cible par mutations successives au niveau des gènes codant pour les topoisomérases (ADN gyrase et topoisomérase IV) -Diminution de la sensibilité à la ciprofloxacine |

CHAPITRE 2. *Pseudomonas* et résistance aux antibiotiques

Face à l'aztréonam, un antibiotique de la classe des bêtalactamines, les *Pseudomonas aeruginosa* peuvent muter leur ADN. Ces mutations désactivent notamment les gènes *nalD* et *mexR*, provoquant une surexpression des pompes MexAB-OprM qui expulsent l'aztréonam, rendant la bactérie résistante. Ces mécanismes sont schématisés dans la **figure n°03**, L'exposition répétée à cet antibiotique favorise donc l'apparition de ces mutations et la résistance bactérienne (VAILLANCOURT et JORTH, 2021).

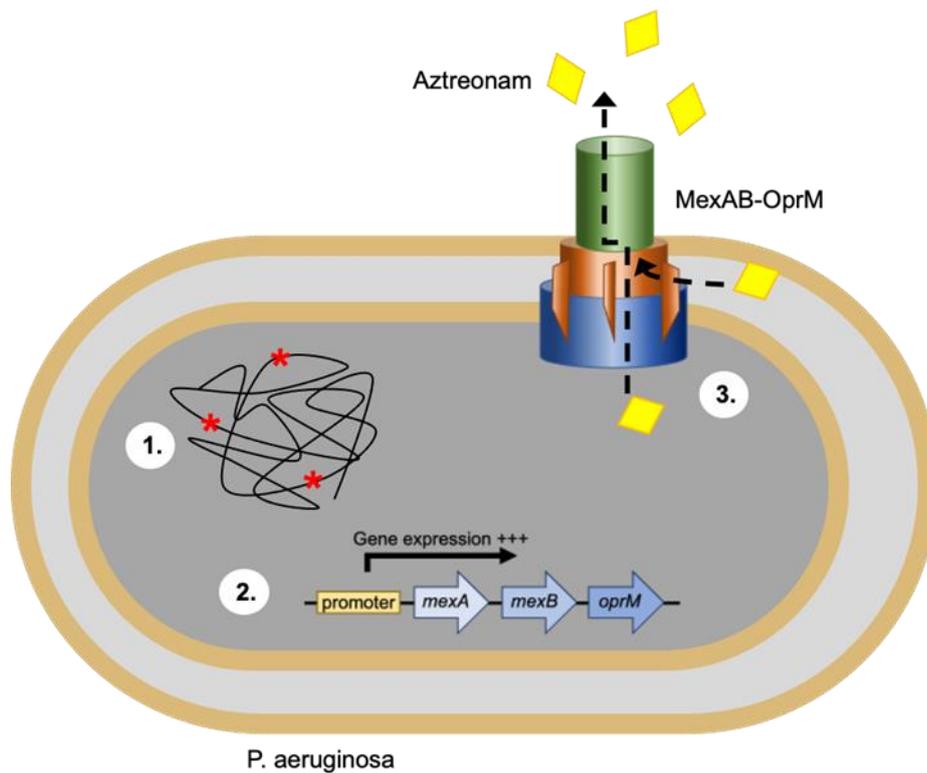


Figure n°03 : Mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa* face à l'aztréonam (VAILLANCOURT et JORTH, 2021).

- 1 : Sélection de mutations dans l'ADN de *P. aeruginosa* lors de l'exposition à l'aztréonam.
- 2 : Surexpression des gènes *MexAB-OprM* suite à des mutations inactivatrices dans les gènes *nalD* et *mexR*.
- 3 : Excrétion externe des molécules d'aztréonam par les pompes d'efflux *MexAB-OprM*.

PARTIE PRATIQUE

MATERIEL ET METHODES

Objectifs

Notre étude portant sur le comptage de *Pseudomonas* chez cinq espèces de poissons pêchées à Alger et à Tipaza, a pour objectifs :

- ✓ D'estimer la charge microbienne en *Pseudomonas* dans chaque espèce en fonction du site anatomique de prélèvement.
- ✓ D'identifier les espèces de *Pseudomonas* en fonction de l'espèce et du site anatomique de prélèvement.
- ✓ D'estimer la résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas*.
- ✓ De déterminer les antibiogrammes de ces souches testées aux antibiotiques.

1 Matériel et méthodes

1.1 Période et lieu de l'étude

Cette partie pratique de notre travail de master a été menée durant le mois de mars 2024, dans 2 poissonneries situées à Alger.

1.2 Echantillonnage

Nous avons prélevé 5 échantillons d'environ 200g de poissons mis en vente sur les étalages de 2 poissonniers détaillants qui se trouvent à Alger. Le 1^{er} échantillon provient de la baie d'Alger, tandis que les 4 autres proviennent de Cherchell, w. Tipaza. Chaque échantillon représente une espèce différente (**Tableau n°05**). Tous les échantillons ont été transportés dans une glacière vers le laboratoire pédagogique d'HIDAOA, et traités dans les 2 heures au maximum.

Tableau n°05 : Désignation et répartition des échantillons de poissons.

| Espèce | | n | Origine | N° poissonnerie |
|------------------|-----------------------------|---|--------------|-----------------|
| Nom vernaculaire | Nom scientifique | | | |
| Allache | <i>Sardinella aurita</i> | 1 | Baie d'Alger | 1 |
| Merlan | <i>Merlangius merlangus</i> | 1 | Cherchell | 2 |
| Rouget de roche | <i>Scorpaena scrofa</i> | 1 | | |
| Rouget de vase | <i>Mullus surmuletus</i> | 1 | | |
| Pageot acarné | <i>Dentex gibbosus</i> | 1 | | |

n : nombre d'échantillons.

1.3 Matériel de prélèvement et d'analyse

Pour mener à bien l'analyse microbiologique des poissons et la réalisation de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques, un ensemble spécifique de matériel de laboratoire a été utilisé.

La composition des milieux gélosés utilisés est précisée dans l'**annexe n°01**.

Tableau n°06 : Désignation du matériel principal utilisé au cours de notre étude.

| Utilisation | Matériel |
|--|---|
| Matériel de base | Bec Bunsen. Etuve (25°C, 37°C). Vortex. |
| Dénombrement | Balance (KERN PFB), boîtes de Pétri, diluant TSE, homogénéisateur Stomacher® (MAYO homogenius), compteur de colonies (FUNKE GERBER), écouvillons stériles, embouts à micropipette stériles, étaleurs en L stériles, gélose à la cétrimide, lames de bistouri, lampe de Wood, micropipette (SCI LOGEX), sacs Stomacher®, tubes à essai stériles. |
| Identification du genre et de l'espèce | Bandelettes d'oxydase, eau oxygénée, eau physiologique stériles, embouts à micropipette stériles, galeries API® 20NE, gélose nutritive (GN), micropipette (SCI LOGEX), réactifs pour tests biochimiques (NITRATE 1 & 2, TDA, KOVACS, VP1). |
| Etude de la sensibilité aux antibiotiques | Disques d'antibiotiques, gélose de Mueller-Hinton (MH), pied à coulisse digital. |

1.4 Méthodes

1.4.1 Dénombrement de *Pseudomonas*

En l'absence de normes de référence pour le comptage de *Pseudomonas* dans les produits de la pêche et de l'aquaculture, la norme ISO 13720 (2010), qui spécifie la méthode de dénombrement de *Pseudomonas* spp. dans la viande et les produits à base de viande, a été utilisée.

1.4.1.1 Prise d'essai, préparation de la suspension mère et des dilutions

Nous avons utilisé la norme ISO 6887-1 :1999, spécifiant les règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

Quatre prélèvements de 4 sites anatomiques différents, pour chaque échantillon de poisson, ont été effectués comme suit :

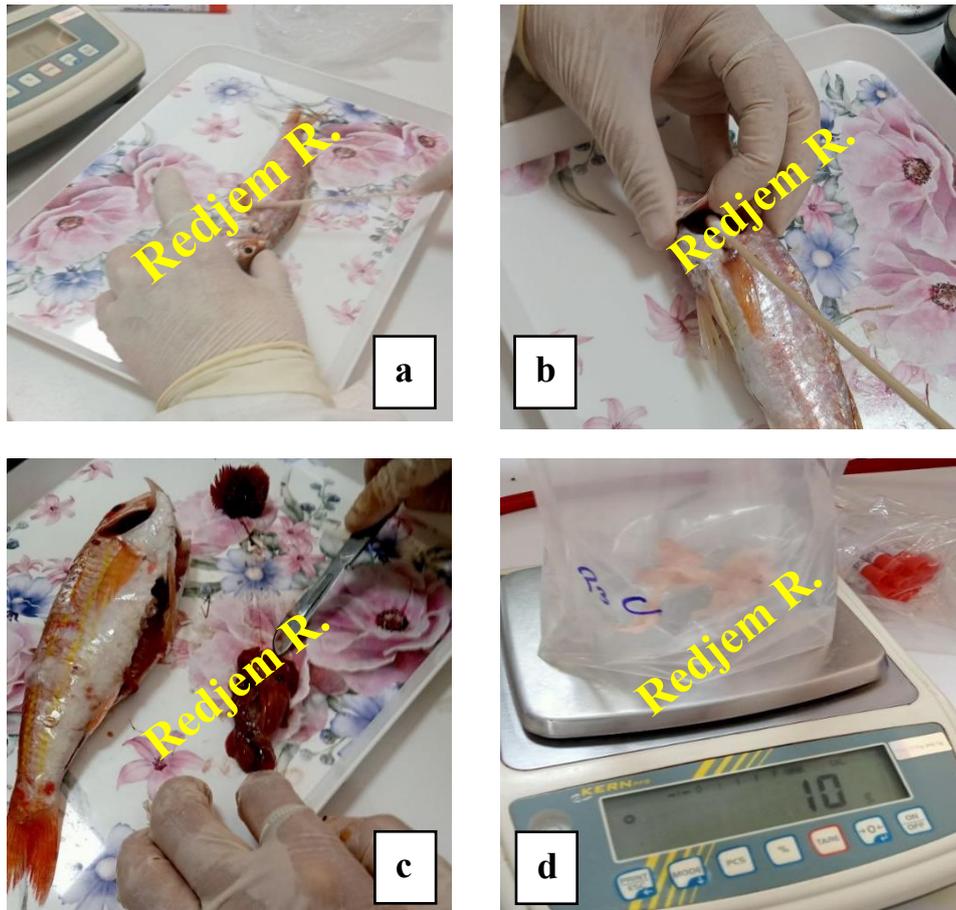
- **1 prélèvement de mucus**, à l'aide d'un écouvillon frotté sur la surface du poisson (**Photographie n°01a**).
- **1 prélèvement des branchies**, à l'aide d'un écouvillon frotté entre les branchies (**Photographie n°01b**).
- **1 prélèvement d'intestins**, en ouvrant la paroi abdominale à l'aide d'une lame bistouri et en les dégageant ; 10g ont été pesés (**Photographie n°01c**).
- **1 prélèvement de chair**, à l'aide d'une lame bistouri, nous avons prélevé 10g. (**Photographie n°01d**).

Les écouvillons ont été mis dans un sac Stomacher[®] stérile qui contient 90 mL de TSE. Concernant les deux derniers prélèvements, nous avons réalisé une prise d'essai de 10g d'intestins / de chair, directement dans un sac Stomacher[®] stérile, auxquels nous avons rajouté 90 mL de TSE.

Les préparations qui ont été homogénéisées dans l'appareil Stomacher[®] pendant 1 minute à la vitesse maximale 4, constitue les suspensions mères.

À partir de chaque solution mère (10^{-1}), nous avons préparé une série de dilutions décimales (de 10^{-2} à 10^{-5}) en transférant à chaque fois 1mL de la dilution 10^{-n} dans 9mL de TSE pour obtenir une dilution $10^{-(n+1)}$.

Nous avons répété ce processus pour chaque solution mère de chaque site de prélèvement des 5 échantillons (**Photographie n°02**).



Photographie n°01 : Différents sites anatomiques de prélèvement du poisson (ici rouget de roche) : (a) mucus, (b) branchies, (c) intestins, (d) chair (Photos personnelles)

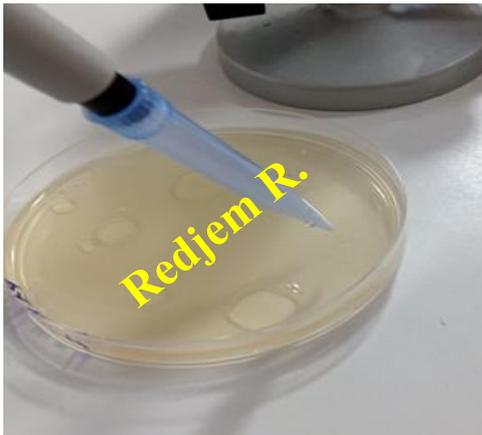


Photographie n°02 : Préparation des dilutions décimales (Photo personnelle).

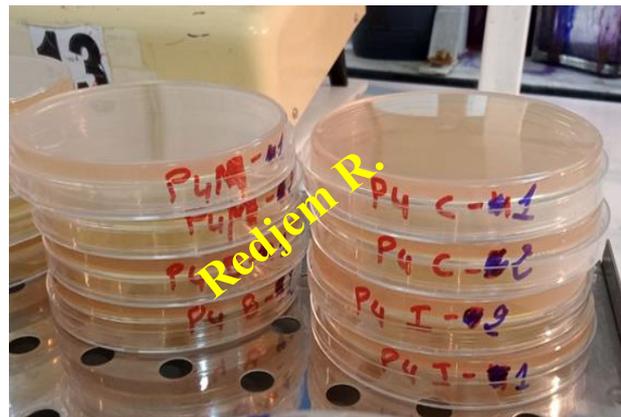
1.4.1.2 Ensemencement du milieu sélectif et incubation

Le milieu gélosé à la cétrimide a été utilisé comme milieu d'isolement sélectif pour le dénombrement de *Pseudomonas* dans le poisson. Une fois les boîtes de Pétri préparées (coulées et identifiées), l'isolement a été réalisé, comme suit, par la technique d'ensemencement du milieu en surface à partir des dilutions décimales :

- À l'aide d'une micropipette, transférer 0,1 mL de la dilution sur la surface du milieu gélosé à la cétrimide (**Photographie n°03**).
- Utiliser un étaleur stérile en forme de L pour répartir uniformément l'inoculum sur la surface de la gélose de chaque boîte de Petri.
- Continuer l'étalement jusqu'à ce que la surface de la gélose soit complètement sèche.
- Incuber les boîtes ensemencées et identifiées dans une étuve à 25°C pendant 24-48h (**Photographie n°04**).



Photographie n°03 : Encensement du milieu gélosé à la cétrimide (Photos personnelle).

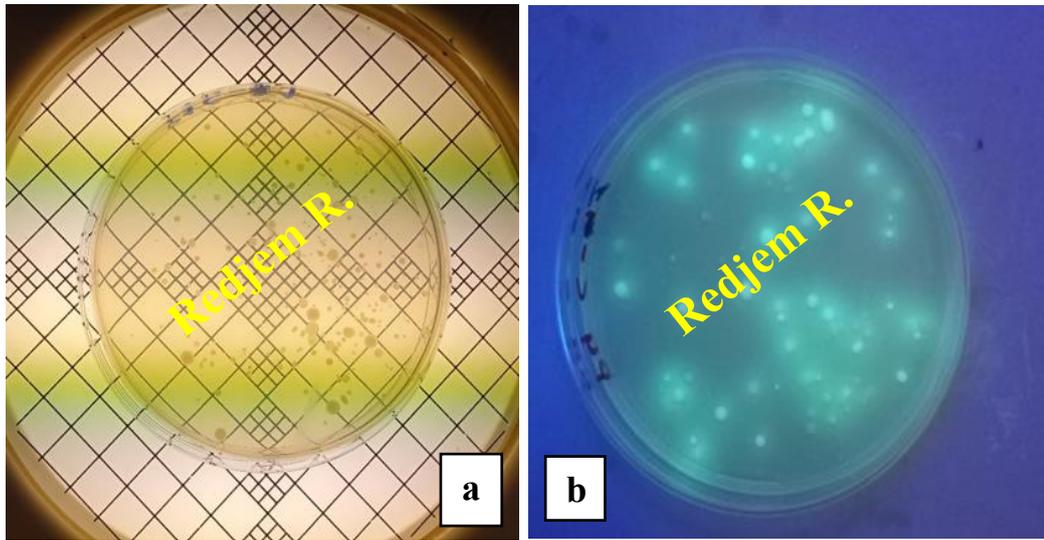


Photographie n°04 : Préparation des boîtes de Pétri, avec milieu ensemencé, à l'incubation (Photos personnelles).

1.4.1.3 Lecture et expression des résultats

Sur un milieu gélosé à la cétrimide, les colonies présumptives de *Pseudomonas* peuvent présenter diverses formes. Elles apparaissent lisses bombées et brillantes mais aussi plates, rugueuses et striées ; leur forme peut être ronde avec un bord net et régulier, et parfois dentelé ; leur couleur varie de blanchâtre ou jaunâtre à rosâtre ou rougeâtre

(**Photographie n°05a**) ; certaines colonies sont caractérisées par une fluorescence réactive à la lumière ultra-violette (UV, lampe de Wood) (**Photographie n°05b**).



Photographie n°05 : Aspect macroscopique des colonies présumptives de *Pseudomonas* (a) sur milieu gélosé à la cétrimide et (b) sur milieu gélosé à la cétrimide sous lumière UV (Photos personnelles).

À la lecture, compter uniquement les colonies de deux dilutions successives présentant entre 15 et 300. La concentration du prélèvement en bactéries a été calculée :

- Selon la norme ISO 7218/Amd.1 : 2001, pour les prélèvements dont les sites anatomiques ont été pesés (intestins et chair), en appliquant l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum c}{(V \times 1,1 \times d)}$$

Où :

N : est la concentration du prélèvement en bactéries.

$\sum c$: est la somme des colonies comptées sur les deux boîtes retenues de deux dilutions successives et dont au moins une contient au minimum 15 colonies.

V : est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue parmi les deux boîtes.

Les résultats sont exprimés en UFC/g.

- Selon la norme ISO 18593 (2004) spécifiant des méthodes horizontales pour le prélèvement d'échantillons sur les surfaces, pour les prélèvements dont les sites anatomiques ont été écouvillonnés (mucus et branchies), en appliquant l'équation suivante, relative à une surface écouvillonnée non déterminée :

$$N_{sw} = N \times F \times D$$

Où :

N_{sw} : est la concentration du prélèvement écouvillonné en bactéries.

N : est la somme des colonies comptées sur la boîte retenues.

F : est le volume en millilitre de la dilution mère.

D : est l'inverse de la dilution utilisée.

Les résultats sont exprimés en UFC/écouvillon.

1.4.2 Identification du genre *Pseudomonas* et de ses espèces

1.4.2.1 Purification des isolats

Préalablement aux tests d'indentification bactérienne, il est indispensable de disposer de cultures pures et jeunes de 18-24h. À partir de la culture obtenue sur milieu gélosé à la cétrimide, jusqu'à 5 colonies présomptives et parfaitement isolées de *Pseudomonas* ont été choisies et prélevées pour ensemencement de la gélose nutritive. L'incubation a été faite à 25°C pendant 24h.

1.4.2.2 Tests biochimiques métaboliques d'orientation pour l'identification du genre bactérien

- **Test de catalase**

Ce test consiste à mettre en évidence le caractère « catalase + » des *Pseudomonas* en mettant une fraction de la colonie à tester, obtenue sur GN, en contact avec une quantité suffisante de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

Le test se déroule comme suit :

- Déposer une petite goutte d'eau oxygénée sur la lame de microscopie.
- Utiliser une anse stérile pour prélever une fraction de la colonie à partir d'une culture bactérienne pure et jeune de 18-24h, et la déposer sur la goutte d'eau oxygénée.
 - Le test est positif si présence d'effervescence (**Photographie n°06**).
 - Le test est négatif si absence d'effervescence.



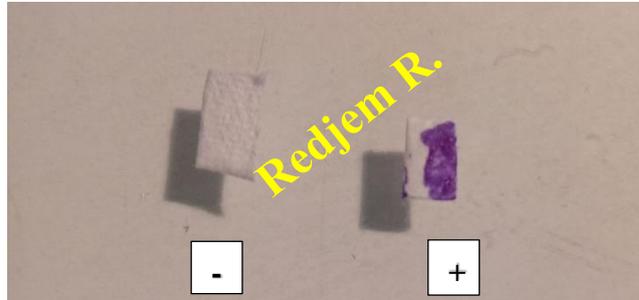
Photographie n°06 : Test positif de recherche de la catalase (Photo personnelle).

- **Test d'oxydase**

Le test de l'oxydase repose sur l'activité catalytique de la cytochrome oxydase (CytOx). Cette enzyme présente chez la plupart des *Pseudomonas*, est capable d'oxyder un composé réducteur présent dans un réactif spécifique, généralement le tétraméthyl-p-phénylènediamine (TMPD) de formule chimique $C_8 H_{12} N_2$. Le TMPD incolore est oxydé en un composé coloré bleu ou violet en présence de la cytOx active.

Le test se déroule comme suit :

- Prélever, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, une fraction d'une colonie à partir d'une culture pure et jeune de 18-24h.
- Étaler sur une bandelette oxydase.
 - Le test est positif si apparition de couleur violette dans 30 secondes.
 - Le test est négatif si absence de couleur violette dans 30 secondes.



Photographie n°07 : Test de recherche de la cytochrome oxydase (Photo personnelle).

1.4.2.3 Tests biochimiques métaboliques en galerie miniaturisée pour l'identification de l'espèce bactérienne

Nous avons utilisé un des systèmes manuels et standardisés les plus courants pour l'identification biochimique rapide ; il s'agit du système API[®] basé sur la détermination de l'indice du profil analytique (Analytic Profile Index).

Le système API[®] 20NE permet l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries, et consiste en une galerie composée de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

La procédure, telle qu'elle a été établie par le fabricant, consiste en plusieurs étapes successives :

- **Préparation de la galerie :** Assembler le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation, puis verser environ 5 mL d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Ensuite, étiqueter la référence de la souche à identifier sur la languette latérale de la boîte. Enfin, sortir la galerie de son emballage individuel et la placer dans la boîte d'incubation.
- **Préparation de la suspension bactérienne :** À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, prélever entre 1 et 4 colonies présentant la même morphologie, à partir d'une

culture pure et jeune de 18-24h, et réaliser, dans 2 mL d'eau physiologique stérile, une suspension de turbidité ajustée à 0,5 de McFarland. La suspension bactérienne doit être utilisée immédiatement

- **Inoculation de la galerie :** Utiliser la suspension bactérienne préparée pour remplir les tubes des tests NO₃ à PNPG sans toucher aux cupules, en utilisant une pipette Pasteur stérile. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, placer la pointe de la pipette contre le côté de la cupule et incliner légèrement la boîte d'incubation vers l'avant. Ensuite, ouvrir une ampoule d'API AUX Medium, ajouter environ 200µL de la suspension précédente, et mélanger doucement avec la pipette pour éviter les bulles. Puis, remplir les tubes et les cupules des tests [GLU] à [PAC] en veillant à ce que le niveau soit horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave, car un remplissage incorrect pourrait fausser les résultats. Ajouter ensuite de l'huile de paraffine dans les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour créer une atmosphère anaérobie (**Photographie n°08**). Enfin, refermer la boîte d'incubation et la placer à une température de 29°C ± 2°C pendant 24 heures (± 2 heures).



Photographie n°08 : Galerie API® 20NE inoculée (Photo personnelle).

- **Lecture de la galerie**

L'interprétation des résultats des réactions après incubation (**Photographie n°12**), se fait à partir du tableau de lecture qui se trouve dans la fiche technique fournie par le fabricant (**Annexe n°02**).



Photographie n°09 : Galerie API® 20NE après incubation préparée à la lecture (Photo personnelle).

- **Interprétation**

L'identification des espèces de *Pseudomonas* a été effectuée à l'aide d'un identifieur API® 20NE, version 7.0., en se basant sur le profil analytique obtenu.

1.4.3 Etude de la sensibilité aux antibiotiques

1.4.3.1 Matériel biologique

Une fois le genre *Pseudomonas* confirmé et l'espèce identifiée, une souche par prélèvement positif a été soumise à un test de sensibilité aux antibiotiques selon la méthode des disques basée sur la diffusion en milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH).

1.4.3.2 Antibiotiques évalués

La sensibilité des souches a été testée à onze antibiotiques : Ticarcilline (TC 75). Ticarcilline + Acide clavulanique (TTC 85). Céfotaxime (CTX 30). Imipenème (IMP 10). Norfloxacin (NOR 10). Ciprofloxacine (CIP 5). Lévofloxacine (LEV 5). Gentamicine (CN 10). Amikacine (AK 30). Tobramycine (TOB 10). Colistine (CT 10).

Ces onze antibiotiques appartiennent à quatre familles ; chaque famille ayant des mécanismes d'action et des cibles distincts, à savoir : les bêtalactamines, les fluoroquinolones, les aminosides et les polymyxines.

Les disques d'antibiotiques utilisés (Famille et sous-famille, nom et abréviation) avec leurs charges ainsi que les diamètres critiques de l'interprétation sont mentionnés dans le **tableau n°07**.

Tableau n°07 : Valeurs critiques des diamètres de zones d'inhibition pour *Pseudomonas* selon le CLSI (2014 ; 2024).

| Antibiotiques | | | Charge des disques (μg) | Diamètres critiques (mm) | | | |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---|--------------------------|-----------|-------|-----------|
| Famille et sous-famille | Nom | Abréviation | | R | I | S | |
| Bêtalactamines | Pénicillines | Ticarcilline | TC | 75 | ≤ 15 | 16-23 | ≥ 24 |
| | | Ticarcilline + Acide clavulanique | TTC | 75/10 | ≤ 15 | 16-23 | ≥ 24 |
| | Céphalosporines | Céfotaxime | CTX | 30 | ≤ 14 | 15-17 | ≥ 18 |
| | Carbapénèmes | Imipénème | IMP | 10 | ≤ 15 | 16-18 | ≥ 19 |
| Fluoroquinolones | 2 ^{ème} génération | Norfloxacine | NOR | 10 | $12 \leq$ | 13-16 | ≥ 17 |
| | 3 ^{ème} génération | Ciprofloxacine | Cip | 5 | $15 \leq$ | 16-20 | ≥ 21 |
| | 3 ^{ème} génération | Levofloxacine | Lev | 5 | ≤ 13 | 14-16 | ≥ 17 |
| Aminosides | | Gentamicine | CN | 10 | ≤ 12 | 13-14 | ≥ 15 |
| | | Amikacine | AK | 30 | ≤ 14 | 15-16 | ≥ 17 |
| | | Tobramycine | TOB | 10 | ≤ 12 | 13-14 | ≥ 15 |
| Polymyxines | Polymyxines E | Colistine | CT | 10 | ≤ 10 | - | ≥ 11 |

1.4.3.3 Technique

Nous avons utilisé la technique préconisée par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), recommandée par l'OMS et adoptée par l'AARN (Algerian Antimicrobial Resistance Network).

- **Préparation du milieu de culture MH**

- Mettre le milieu gélosé MH à fondre dans l'autoclave.
- Verser le milieu MH en surfusion dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, de manière à obtenir une épaisseur de 4 mm. L'ensemencement doit être effectué dans les 15 minutes suivant la préparation de l'inoculum.

- **Préparation de l'inoculum**

- Préparer une culture pure et jeune de 18-24h sur GN.
- Prélever quelques colonies bien isolées et identiques à l'aide d'une pipette Pasteur stérile.
- Suspendre les colonies dans 5 mL d'eau physiologique stérile à 0,9 % et homogénéiser.
- Ajuster la suspension bactérienne en ajoutant soit de la culture, soit de l'eau stérile pour atteindre une turbidité équivalente à 0,5 McFarland.

- **Ensemencement des boîtes de MH**

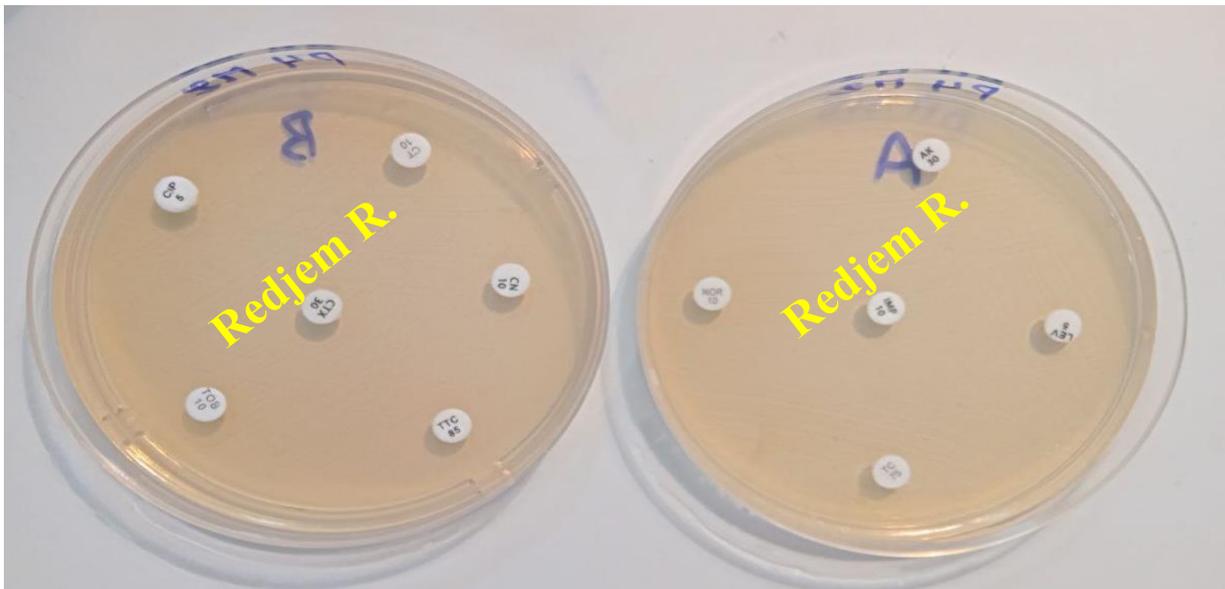
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, puis le presser fermement contre la paroi interne du tube pour éliminer l'excès de liquide.
- Étaler l'écouvillon sur toute la surface sèche de la gélose MH en effectuant des stries serrées de haut en bas.
- Répéter cette opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, tout en faisant pivoter l'écouvillon sur lui-même.
- Compléter l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- **Application des disques d'antibiotiques**

- Déposer 5 disques d'antibiotiques sur une boîte de Pétri et 6 disques sur une autre, en utilisant deux boîtes par souche. Les disques doivent être espacés de 24 mm de centre à centre (**Photographie n°10**).

- Appliquer chaque disque d'antibiotique à l'aide d'une pince stérile. Une fois en place, ne pas déplacer le disque.

- Incuber immédiatement les boîtes pendant à 35°C pendant 18-24h.



**Photographie n°10 : Disques d'antibiotiques déposés sur gélose MH
ensemencée (Photo personnelle).**

1.4.3.4 Lecture

Le diamètre de la zone d'inhibition de chaque disque d'antibiotique évalué, a été mesuré avec un pied à coulisse digital. Les résultats ont été comparés aux valeurs critiques (**Tableau n°06**) afin de classer la souche testée dans l'une des trois catégories cliniques suivantes : Résistant (R), Intermédiaire (I) ou Sensible (S).

La multirésistance est déterminée comme étant la résistance à au moins 3 antibiotiques appartenant à des familles d'antibiotiques différentes.

1.4.4 Conservation des souches

Les souches caractérisées ont été conservées dans 3 mL de milieu gélosé spécifique. L'ensemencement a été réalisé par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur stérile chargée de la culture pure et jeune obtenue sur milieu gélosé MH. Après incubation à 37°C pendant 18-24h, les souches, stockées à l'abri de la lumière et à température ambiante, peuvent être conservées de 6 mois à 1 an.

Pour une conservation à long terme, le milieu BHIB a été ensemencé à partir de la même culture bactérienne obtenue sur milieu gélosé MH. Après incubation à 37°C pendant 18-24h, la culture a été suspendue dans une solution de glycérol à 20%, et mis dans des cryotubes (**Photographie n°11**) en respectant le ratio en mL 0,3 : 0,7. Le stockage s'effectue à - 80°C.



Photographie n°11 : Conservation des souches de *Pseudomonas* dans des cryotubes (Photo personnelle).

RESULTATS

2 Résultats

2.1 Charge bactérienne des poissons en *Pseudomonas*

L'expression des résultats du dénombrement de *Pseudomonas* chez les 5 espèces de poissons prélevés à différents sites anatomiques, a montré que les 20 prélèvements étaient contaminés ; ce qui correspond à la contamination de tous les sites de tous les poissons.

Par site anatomique prélevé, la charge de contamination était plus élevée dans le mucus pour *Sardinella aurita*, *Merlangius merlangus* et *Dentex gibbosus*, avec 2,43E+13 UFC/écouvillon, 6,50E+04 UFC/écouvillon et 3,90E+04 UFC/écouvillon, respectivement. Chez *Scorpaena scrofa* et *Mullus surmuletus*, la chair était la plus contaminée par *Pseudomonas* avec des charges respectives de 9,00E+02 UFC/g et de 1,30E+05 UFC/g (**Tableau n°08**).

En comparant les charges bactériennes dans la chair des différentes espèces, celle de *Mullus surmuletus*, estimée à 1,30E+05 UFC/g, était la plus importante (**Tableau n°08**).

Tableau n°08 : Charge de contamination des poissons par *Pseudomonas* selon le site anatomique prélevé.

| Espèce | Site anatomique prélevé | | | |
|-----------------------------|-------------------------|-----------|-----------|-----------------|
| | Mucus | Branchies | Intestins | Chair |
| | UFC/écouvillon | | UFC/g | |
| <i>Sardinella aurita</i> | 2,43E+13 | 3,40E+04 | 4,00E+03 | 1,70E+04 |
| <i>Merlangius merlangus</i> | 6,50E+04 | 6,00E+02 | 2,00E+02 | 4,00E+02 |
| <i>Scorpaena scrofa</i> | 5,00E+02 | 2,00E+02 | 1,00E+02 | 9,00E+02 |
| <i>Mullus surmuletus</i> | 7,50E+04 | 2,00E+02 | 3,10E+03 | 1,30E+05 |
| <i>Dentex gibbosus</i> | 3,90E+04 | 1,00E+03 | 2,90E+04 | 3,50E+04 |

2.2 Identification des espèces de *Pseudomonas*

2.2.1 Prévalence globale

Globalement, 4 espèces de *Pseudomonas* ont été identifiées, à savoir : *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. mendocina* ; l'espèce la plus prévalente étant *P. Fluorescens*. *P. aeruginosa* a été isolé avec un taux de l'ordre de 15%. Toutefois, l'identification de l'espèce n'a pas été établie pour 2 isolats de *Pseudomonas* (**Tableau n°09**).

Tableau n°09 : Prévalence globale des espèces de *Pseudomonas*.

| Espèce de <i>Pseudomonas</i> | n | % |
|-------------------------------------|-----------|-------------|
| <i>P. aeruginosa</i> | 3 | 15% |
| <i>P. fluorescens</i> | 10 | 50% |
| <i>P. putida</i> | 3 | 15% |
| <i>P. mendocina</i> | 2 | 10% |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | 2 | 10% |
| Total | 20 | 100% |

2.2.2 Prévalence par espèce de poissons et site anatomique

P. fluorescens était l'espèce la plus communément identifiée chez tous les poissons. Cette espèce a été isolée de tous les sites anatomiques choisis pour prélèvement : à la fois des branchies, intestins et chair de *Merlangius merlangus*, ainsi que de la chair de tous les poissons sauf *Mullus surmuletus*.

P. aeruginosa a été retrouvé dans les intestins de *Sardinella aurita*, ainsi que dans le mucus et les branchies de *Dentex gibbosus*.

P. putida a été isolé du mucus de *Merlangius merlangus*, ainsi que des intestins et de la chair de *Mullus surmuletus*.

P. mendocina n'était présent que dans les intestins de deux espèces de poissons : *Sardinella aurita* et *Scorpaena scrofa* (**Tableau n°10**).

Tableau n°10 : Répartition des différentes espèces de *Pseudomonas* identifiées par site prélevé du poisson.

| Espèce | <i>Sardinella aurita</i> | <i>Merlangius merlangus</i> | <i>Scorpaena scrofa</i> | <i>Mullus surmuletus</i> | <i>Dentex gibbosus</i> |
|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|
| | n (site anatomique de prélèvement) | | | | |
| <i>P. aeruginosa</i> | 1 (I) | 0 | 0 | 0 | 2 (M, B) |
| <i>P. fluorescens</i> | 2 (M, C) | 3 (B, I, C) | 2 (B, C) | 2 (M, B) | 1 (C) |
| <i>P. putida</i> | 0 | 1 (M) | 0 | 2 (I, C) | 0 |
| <i>P. mendocina</i> | 0 | 0 | 1 (I) | 0 | 1 (I) |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | 1 (B) | 0 | 1 (M) | 0 | 0 |

n: nombre de souches.

M : mucus ; B : branchies ; I : intestins ; C : chair.

2.3 Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Un total de 18 souches de *Pseudomonas* caractérisées dans l'espèce, ont été soumises aux tests de sensibilité aux antibiotiques ; les 2 souches *Pseudomonas* spp. n'ont pas fait l'objet de ce test.

2.3.1 Antibiotiques concernés par l'expression clinique globale des souches de *Pseudomonas* isolées de poissons

Globalement, les 18 souches isolées à partir de 4 sites anatomiques différents de 5 espèces de poissons, et testées à 11 antibiotiques de 4 familles différentes, ont globalement montré une résistance à 4 antibiotiques et une sensibilité réduite à 2 d'entre eux, appartenant tous à la famille des bêtalactamines ; ce qui porte le taux de résistance et de sensibilité réduite 36,36% et 18,18%, respectivement (**Tableau n°11**).

Tableau n°11 : Distribution des antibiotiques selon l'expression clinique des 18 souches de *Pseudomonas* isolées de poissons.

| Catégorie clinique | Sensibilité | Sensibilité réduite | Résistance |
|--------------------|-------------|---------------------|------------|
| % | 63,64% | 18,18% | 36,36% |
| Nombre d'ATB | 7 | 2 | 4 |

ATB : antibiotiques.

2.3.2 Résistance des souches de *Pseudomonas* testées aux antibiotiques

La totalité des souches de *Pseudomonas* testées (n= 18) étaient résistantes à au moins 2 antibiotiques, parmi lesquelles, 12 (66,67%) ont exprimé une résistance à au moins 3 antibiotiques : 10 souches (55,56%) étaient résistantes à 3 antibiotiques et 2 souches (11,11%) résistantes à 4 antibiotiques (**Tableau n°12**).

Tableau n°12 : Taux de résistance global des 18 souches de *Pseudomonas* isolées de poissons.

| Expression clinique | Nombre d'antibiotiques | n | % |
|---------------------|------------------------------------|-----------|---------------|
| Sensibilité | Aucun | 0 | 0% |
| Résistance | À un seul antibiotique | 0 | 0% |
| | À au moins deux antibiotiques : | 18 | 100% |
| | - à deux antibiotiques | 6 | 33,33% |
| | - à au moins trois antibiotiques : | 12 | 66,67% |
| | . à 3 antibiotiques | 10 | 55,56% |
| . à 4 antibiotiques | 2 | 11,11% | |

n: nombre de souches.

2.3.3 Expression clinique des souches de *Pseudomonas* testées par antibiotique

Nos résultats révèlent que la résistance concerne uniquement la famille des bêta-lactamines, représentée par 4 antibiotiques évalués appartenant à 3 sous-familles différentes. Une résistance de 100% a été exprimée pour les pénicillines, en évaluant la ticarcilline et la ticarcilline associée à l'acide clavulanique, alors que le taux de résistance était de l'ordre de 66,67% à la céfotaxime, une céphalosporine de 3^{ème} génération, et de 11,11% pour les l'imipénème qui fait partie des carbapénèmes.

Pour les 7 antibiotiques représentant les 3 familles des fluoroquinolones, des aminosides et des polymyxines, aucune résistance n'a été observée (**Tableau n°13**).

Tableau n°13 : Taux d'expression clinique de 18 souches de *Pseudomonas* testées en fonction de l'antibiotique.

| Antibiotique | | | Résistance | | Sensibilité réduite | | Sensibilité | |
|------------------|---|-------------------|------------|--------|---------------------|--------|-------------|--------|
| Famille | Nom | Charge de disques | n | % | n | % | n | % |
| Bêtalactamines | Ticarcilline (TC) | 75 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| | Ticarcilline + Acide clavulanique (TTC) | 75/10 | 18 | 100% | 0 | 0% | 0 | 0% |
| | Céfotaxime (CTX) | 30 | 12 | 66,67% | 6 | 33,33% | 0 | 0,00% |
| | Imipénème (IMI) | 10 | 2 | 11,11% | 3 | 16,66% | 13 | 72,22% |
| Fluoroquinolones | Ciprofloxacine (CIP) | 5 | 0 | 0% | 0 | 0% | 18 | 100% |
| | Norfloxacine (NOR) | 10 | 0 | 0% | 0 | 0% | 18 | 100% |
| | Lévofloxacine (LEV) | 5 | 0 | 0% | 0 | 0% | 18 | 100% |
| Aminosides | Tobramycine (TOB) | 10 | 0 | 0% | 0 | 0% | 18 | 100% |
| | Amikacine (AK) | 30 | 0 | 0% | 0 | 0% | 18 | 100% |
| | Gentamicine (CN) | 10 | 0 | 0% | 0 | 0% | 18 | 100% |
| Polymyxines | Colistine (CT) | 10 | 0 | 0% | 0 | 0% | 18 | 100% |

2.3.4 Résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas* par espèce

Les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques par espèce de *Pseudomonas* sont représentés dans le **tableau n°14**.

Les souches caractérisées dans l'espèce la plus prévalente, *P. fluorescens*, étaient toutes résistantes aux antibiotiques ; 60% ayant montré une résistance à 3 antibiotiques, et 10% une résistance à 4 antibiotiques.

Les 3 souches de *P. aeruginosa* testées ont exprimé une résistance à 2 antibiotiques.

Les souches de l'espèce *P. putida* ont montré une résistance de 66,67% à 3 antibiotiques, et de 33,33% à 4 antibiotiques.

Dans l'espèce *P. mendocina*, toutes les souches testées étaient résistantes à 3 antibiotiques.

Tableau n°14 : Taux de résistance des espèces de *Pseudomonas* aux antibiotiques.

| Espèce | | Résistance | | |
|-------------------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 4 antibiotiques | 3 antibiotiques | 2 antibiotiques |
| <i>P. aeruginosa</i> (n= 3) | n | 0 | 0 | 3 |
| | % | 0% | 0% | 100% |
| <i>P. fluorescens</i> (n= 10) | n | 1 | 6 | 3 |
| | % | 10% | 60% | 30% |
| <i>P. putida</i> (n= 3) | n | 1 | 2 | 0 |
| | % | 33,33% | 66,67% | 0% |
| <i>P. mendocina</i> (n= 2) | n | 0 | 2 | 0 |
| | % | 0% | 100% | 0% |

n: nombre de souches.

2.3.5 Détermination des phénotypes de résistance de *Pseudomonas*

Trois antibiotypes ont été déterminés (**Tableau n°15**).

Le phénotype de résistance **Ttc Tc Ctx Imp** est associé à 2 espèces de *Pseudomonas*, à savoir *P. fluorescens* et *P. putida*, isolés respectivement du mucus et de la chair de *Mullus surmuletus*.

Les souches des 3 espèces *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. mendocina* ont en commun le phénotype de résistance **Ttc Tc Ctx** ; ce phénotype prédominant (n= 10) est associé à des souches de *P. fluorescens* isolées des 5 poissons et de différents sites anatomiques.

Le phénotype de résistance **Ttc Tc** est associé aux deux espèces *P. aeruginosa* et *P. fluorescens*, pour des souches isolées de différents sites et des espèces *Sardinella aurita*, *Merlangius merlangus* et *Dentex gibbosus*.

Tableau n°15 : Répartition des antibiotypes de 18 souches de *Pseudomonas* isolées de 5 espèces de poissons.

| Antibiotype | Nb. ATB | <i>P. aeruginosa</i> | | <i>P. fluorescens</i> | | <i>P. putida</i> | | <i>P. mendocina</i> | |
|-----------------------|---------|----------------------|------------|-----------------------|---------------------------|------------------|---------|---------------------|----------|
| | | n | Origine | n | Origine | n | Origine | n | Origine |
| Ttc Tc Ctx Imp | 4 | 0 | - | 1 | P4C | 1 | P4M | 0 | - |
| Ttc Tc Ctx | 3 | 0 | - | 6 | P1M,P2C; P3B+C;P4I;P5C | 2 | P2M;P4B | 2 | P3I; P5I |
| Ttc Tc | 2 | 3 | P1I;P5M +B | 3 | P1C; P2 B+I | 0 | - | 0 | - |
| n | | 3 | | 10 | | 3 | | 2 | |

n : nombre de souches ; Nb. ATB : nombre d'antibiotiques.

P1 : *Sardinella aurita* ; P2 : *Merlangius merlangus* ; P3 : *Scorpaena scrofa* ; P4 : *Mullus surmuletus* ; P5 : *Dentex gibbosus*.

M : mucus; B : branchies; I : intestins; C : chair.

DISCUSSION

3 Discussion

Notre étude, portant sur le comptage des *Pseudomonas* chez cinq espèces de poissons pêchés en Méditerranée (baie d'Alger et mer de Cherchell à Tipaza), et vendus chez deux détaillants situés à Alger, a révélé une contamination généralisée des quatre sites anatomiques prélevés pour analyse, à savoir le mucus de la peau, les branchies, les intestins et la chair.

Le niveau de contamination était important, avec des charges bactériennes plus élevées observées dans le mucus et la chair de toutes les espèces étudiées. Parmi ces dernières, *Scorpaena scrofa* et *Mullus surmuletus* présentaient les charges bactériennes les plus élevées dans la chair, avec des concentrations respectives de $9,00E+02$ UFC/g et $1,30E+05$ UFC/g (**Tableau n°08**).

Ces résultats corroborent ceux de certaines études consultées sur la contamination du poisson par *Pseudomonas*. En Algérie, une étude réalisée sur *Sardinella aurita* vendu dans des poissonneries de la capitale à l'état frais, a rapporté une charge bactérienne initiale de la chair, comprise entre $8,10E+02$ UFC/g et $6,27E+05$ UFC/g (**YARBOUB, 2020**). L'étude qui porte sur l'analyse de la chair, préparée en filets, de quatre différentes espèces prélevées dans une exploitation piscicole située dans la zone vénitienne en Italie, à savoir le saumon atlantique, le cabillaud et la plie commune, a enregistré des charges élevées en *Pseudomonas* estimées entre $10E+04$ UFC/g et $10E+05$ UFC/g, dans 76% des échantillons de chair de saumon et 52% des échantillons de plie commune (**BEN MHENNI et al., 2023**). Ces résultats s'expliquent par le fait que plusieurs facteurs peuvent influencer la contamination par *Pseudomonas* spp., ainsi que sa prolifération, tels que la qualité de l'eau des fermes aquacoles, la manipulation, la transformation et le stockage du poisson après la pêche ou la capture, sachant que le caractère psychrotrophe du micro-organisme est favorable à sa croissance dans les conditions de conservation des produits de la pêche et de l'aquaculture. La charge de contamination que nous avons rapportée en analysant des échantillons de 5 espèces, pourraient aussi s'expliquer par les nombreuses manipulations qu'elles auraient subi le long du circuit de production et de distribution, à partir de la pêche jusqu'au point de vente.

Par ailleurs, la qualité des poissons analysés ne peut être évaluée en raison de l'absence du critère « *Pseudomonas* » dans cette denrée alimentaire, et donc d'un plan

d'échantillonnage et de limites microbiologiques. En effet, la réglementation Algérienne, de par l'arrêté interministériel du 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires, n'exige ni la recherche ni le comptage de *Pseudomonas* dans la catégorie « Produits de la pêche et de l'aquaculture » (**JORA n°39, 2017**), bien que ce micro-organisme fasse autant partie de la microflore d'altération que de la microflore pathogène.

L'identification biochimique des souches de *Pseudomonas* a permis de révéler la présence de 4 espèces distinctes, à savoir, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. mendocina* (**Tableau n°09**) avec prédominance de *P. fluorescens*. Cette espèce a été isolée de tous les sites anatomiques choisis pour prélèvement, sauf dans la chair de *Mullus surmuletus* (**Tableau n°10**). Ces résultats sont intéressants à comparer avec ceux d'autres études récentes, notamment ceux de **BEN MHENNI et al. (2023)** où *P. fluorescens* était aussi l'espèce la plus fréquemment identifiée dans des filets de poissons analysés avec un taux estimé à 45,95 %, ainsi que ceux de **ABRIL et al. (2024)** où *P. fluorescens* et *P. putida* ont été isolées parmi 18 autres espèces à partir de spécimens de turbot et de dorade achetés dans un marché local aux poissons de Vigo, au nord-est de l'Espagne. Cependant, aucune souche de *P. aeruginosa* n'a été identifiée lors de ces deux études. Cela suggère que la composition de la microflore associée aux poissons peut varier en fonction de leurs zones de pêche et que différentes espèces de poissons peuvent héberger des communautés microbiennes distinctes, et il serait probable que les poissons analysés au cours de la présente étude soient plus susceptibles d'héberger *P. aeruginosa*.

Parmi les 20 souches de *Pseudomonas* identifiées, 18 ont été caractérisées à l'échelle de l'espèce et testées pour leur sensibilité aux antibiotiques. Ces souches, isolées à partir de 4 sites anatomiques différents chez 5 espèces de poissons, ont été soumises à l'étude de sensibilité à 11 antibiotiques de 4 familles distinctes. Les résultats ont révélé une résistance à 4 antibiotiques et une sensibilité réduite à 2 d'entre eux, tous appartenant tous à la famille des bêtalactamines. Cela se traduit par un taux de résistance de 36,36% et un taux de sensibilité réduite de 18,18% (**Tableau n°11**). Nos résultats sont inférieurs à ceux de **BEN MHENNI et al. (2023)** qui, en utilisant un panel différent constitué de 15 antibiotiques, ont observé une résistance avec une prévalence estimée à 53% (8 antibiotiques). Cette différence pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs, tels que

l'origine des souches, le mode d'élevage des poissons et l'utilisation d'antibiotiques dans l'exploitation piscicole étudiée.

Notre étude a révélé une résistance importante aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas* isolées. Toutes les souches testées étaient résistantes à au moins 2 antibiotiques (n= 18 ; 100%), et 66,67% d'entre elles étaient résistantes à au moins 3 antibiotiques (**Tableau n°12**). Néanmoins, il ne s'agissait pas d'une multirésistance car ne concernait qu'une seule famille, celle des bêta-lactamines. Les souches testées ont exprimé une résistance de 100% à la ticarcilline et à la ticarcilline associée à l'acide clavulanique, de 66,67% à la céfotaxime, une C3G, et de 11,11% à l'imipenème, de la sous-famille des carbapénèmes (**Tableau n°13**). Parmi les facteurs qui peuvent contribuer à l'apparition de la résistance aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas* d'origine pisciaire chez nous, nous citons la pollution par les eaux usées et les eaux de ruissellement agricoles. Quant au mécanisme de cette résistance, il serait lié à la production de bêta-lactamases à spectre étendu qui peuvent interférer avec l'action inhibitrice de l'acide clavulanique, notamment. Cependant, aucune résistance n'a été observée pour les antibiotiques des familles des fluoroquinolones, des aminosides et des polymyxines contrairement à l'étude menée par **DUMAN et al. (2021)** portant sur la prévalence des espèces de *Pseudomonas* chez des poissons d'eau douce et dans l'eau des piscicultures en Turquie ainsi que sur l'étude de la sensibilité aux antibiotiques ; ces auteurs ont rapporté une résistance à la ciprofloxacine, un antibiotique de la famille des fluoroquinolones, de *P. lurida* et *Pseudomonas* spp.

Les résultats par espèce, montrent que 60% des souches de *P. fluorescens*, l'espèce la plus prévalente dans notre étude, ont exprimé une résistance à 3 antibiotiques, tandis que 10% étaient résistants à 4 antibiotiques. Les souches de *P. putida* ont montré une résistance de 66,67 % à 3 antibiotiques et de 33,33 % à 4 antibiotiques. Toutes les souches de *P. aeruginosa* testées (n= 3) étaient résistantes à 2 antibiotiques, et l'ensemble des souches de *P. mendocina*, (n= 2) étaient résistantes à 3 antibiotiques (**Tableau n°14**).

En Égypte, **SHABANA et al. (2021)** ont révélé que parmi 364 souches de *P. fluorescens* testées, 29,7% étaient multirésistantes, montrant une résistance commune à la pipéracilline, de la sous-famille des pénicillines, et à la ceftazidime, appartenant à la sous-famille des céphalosporines. **ALGAMMAL et al. (2020)**, ont également signalé une multirésistance mais associée à des souches de *P. aeruginosa* isolées à partir de poissons provenant de

fermes piscicoles, ces souches étant résistantes à l'amoxicilline, au céfotaxime, à la tétracycline et à la gentamicine.

L'apparition de la résistance à ces différentes molécules d'antimicrobiens dans le genre *Pseudomonas*, est influencée par divers facteurs environnementaux, tels que la pollution de l'eau, sa température et sa salinité. Ces facteurs peuvent modifier la dynamique des populations bactériennes et favoriser la sélection de souches résistantes. De plus, il est important de noter que différentes souches d'une même espèce bactérienne peuvent présenter des capacités de résistance aux antibiotiques variables.

L'analyse des phénotypes de résistance des souches de *Pseudomonas* isolées de cinq espèces de poissons a révélé une distribution intéressante. *P. fluorescens* se démarque par la plus grande diversité d'antibiogrammes avec Ttc Tc Ctx Imp, Ttc Tc Ctx et Ttc Tc qui ont été trouvés associés aux cinq espèces de poissons étudiées et à différents sites anatomiques. L'antibiogramme Ttc Tc Ctx Imp a aussi caractérisé l'espèce *P. putida*. La résistance de ces deux espèces à l'imipénème est préoccupante, s'agissant d'un antibiotique de la famille des carbapénèmes, une famille largement utilisée pour traiter les infections nosocomiales causées par *Pseudomonas* (WOLFF et al., 2009). L'antibiogramme prédominant Ttc Tc Ctx est aussi commun à *P. putida* et à *P. mendocina*, alors que le l'antibiogramme Ttc Tc a été aussi trouvé associé à *P. aeruginosa* (Tableau n°15).

Ce que nous présumons, c'est que les différentes espèces de poissons peuvent offrir des niches écologiques distinctes aux bactéries, sélectionnant ainsi des souches présentant des profils de résistance spécifiques. De ce fait, les mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent varier selon les espèces de *Pseudomonas*, entraînant des profils de résistance phénotypiques divers. Cette diversité reflète l'adaptation des bactéries aux environnements spécifiques de l'hôte, influençant la capacité des souches à survivre et à proliférer face aux traitements antibiotiques utilisés.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Notre étude s'est intéressée à l'évaluation du niveau de contamination, de l'identification des espèces et de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas* isolées de 4 sites anatomiques chez cinq espèces de poissons pêchées à Alger et à Tipaza.

Nos résultats sur le dénombrement des *Pseudomonas* ont révélé une contamination de toutes les espèces échantillonnées et de tous les sites prélevés. La charge bactérienne étant particulièrement élevée dans le mucus de *Sardinella aurita*, *Merlangius merlangus* et *Dentex gibbosus* (2,43E+13 UFC/écouvillon, 6,50E+04 UFC/écouvillon et 3,90E+04 UFC/écouvillon, respectivement.). Les deux espèces *Scorpaena scrofa* et *Mullus surmuletus* ont présenté la contamination la plus élevée de la chair, avec respectivement 9,00E+02 UFC/g et 1,30E+05 UFC/g. Nous précisons que la qualité de ces poissons exposés à la vente directe au consommateur, n'a pu être évaluée en raison de l'absence de limites microbiologiques et du critère « *Pseudomonas* » dans la réglementation Algérienne.

Quatre espèces de *Pseudomonas* ont été identifiées. *P. fluorescens* était prédominant dans tous les sites anatomiques prélevés, sauf chez *Mullus surmuletus*. *P. aeruginosa* était présent à hauteur de 15%, principalement dans les intestins de *Sardinella aurita* et dans le mucus de *Dentex gibbosus*. *P. putida* a été identifiée dans le mucus et les intestins de *Merlangius merlangus* ainsi que dans la chair de *Mullus surmuletus*, tandis que *P. mendocina* était retrouvée uniquement dans les intestins de *Sardinella aurita* et *Scorpaena scrofa*.

Les résultats de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques révèlent que toutes les souches (n= 18) étaient résistantes à au moins 2 antibiotiques, et que 66,67% d'entre elles étaient résistantes à au moins 3 antibiotiques. Les taux de résistance aux 4 antibiotiques évalués de la famille des bêtalactamines étaient de 100% pour la ticarcilline et la ticarcilline associée à l'acide clavulanique, de 66,67% pour le céfotaxime, et de 11,11% pour l'imipénème, un antibiotique de 1^{ère} intention pour le traitement des infections nosocomiales à *P. aeruginosa*. L'antibiorésistance varie dans l'espèce et d'une souche à l'autre dans la même espèce.

Trois phénotypes de résistance ont été identifiés : Ttc Tc Ctx Imp associé aux deux espèces *P. fluorescens* et *P. putida*, l'antibiotype prévalent (n= 10) Ttc Tc Ctx associé à *P. fluorescens*, *P. putida* et *P. mendocina*, et Ttc Tc associé à *P. fluorescens* et *P. aeruginosa* mais aussi à toutes les espèces de poissons et à tous les sites anatomiques prélevés.

La contamination des espèces de poissons les plus communément pêchées et consommées chez nous, par un micro-organisme qui est à la fois pathogène et altérant, ainsi que la détection de souches résistantes aux antibiotiques utilisés en santé animale et en santé humaine, représente un risque de transmission réel à l'homme. Pour réduire la charge bactérienne en *Pseudomonas* et garantir la sécurité et la salubrité des produits de la pêche et de l'aquaculture que nous consommons, il est recommandé essentiellement :

- **Le renforcement de la chaîne de froid et des pratiques d'hygiène**

1. Maintenir la chaîne de froid : Assurer une température constante et adéquate du bateau de pêche jusqu'au détaillant, en utilisant des équipements de réfrigération fiables.
2. Renouveler l'utilisation de la glace pilée : Garantir l'utilisation d'une glace de haute qualité pour conserver ces produits, ce qui aide à maintenir une température basse et limiter la prolifération de ces bactéries psychrotrophes par ralentissement de leur métabolisme.
3. Adopter des pratiques d'hygiène strictes : Mettre en place des protocoles d'hygiène rigoureux tout au long de la chaîne d'approvisionnement, de la production, à la pêcherie au détaillant, pour éviter toute contamination croisée.

- **La surveillance et gestion de la résistance aux antibiotiques**

1. Contrôler l'utilisation des antibiotiques : Mettre en place des contrôles stricts sur l'utilisation des antibiotiques, éviter les doses subthérapeutiques (doses répétées à long terme) qui peuvent favoriser la résistance bactérienne.
2. Intégrer le critère « *Pseudomonas* » dans la réglementation Algérienne parmi les autres critères microbiologiques des denrées alimentaires de la catégorie « produits de la pêche et de l'aquaculture » : Selon l'arrêté interministériel du 4 octobre 2016 (**JORA n°39, 2017**), ce critère étant exigé uniquement pour quatre denrées de la catégorie « viande d'animaux de boucherie et dérivés », ainsi que pour les eaux minérales naturelles et eaux de source.
3. Limiter l'usage des antibiotiques pour la croissance et la prévention dans les fermes aquacoles : Interdire l'utilisation des antibiotiques à des fins de croissance ou de prévention non spécifiques afin de réduire le risque de résistance et de préserver l'efficacité des traitements.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ABRIL A, GARCÍA B, MARTÍNEZ C, SÁNCHEZ D, JIMÉNEZ E (2024).** Shotgun proteomic analyses of *Pseudomonas* species isolated from fish products [en ligne]. Food Chemistry Disponible sur : <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139342> [consulté le 5 juillet 2024].
2. **ALGAMMAL A, ASHOUR HM, EL-SAYED M, GHAZAL A, ELHOSARY H (2020).** Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor *oprL* and *toxA* virulence genes and *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, and *tetA* antibiotic-resistance genes. [en ligne]. Scientific Reports. Disponible sur : <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72264-4> [consulté le 5 juillet 2024].
3. **ALQUATI C, DE GIOIA L, SANTAROSSA G, ALBERGHINA L, FANTUCCI P et LOTTI M (2002).** The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. Eur. J. Biochem [en ligne].URL : <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03012.x> [consulté le 15/04/2024].
4. **ANONYME, 2024.** List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Genus *Pseudomonas* [en ligne]. URL : <https://lpsn.dsmz.de/genus/pseudomonas> [consulté le 17/04/2024].
5. **ARNABOLDI S, RAGNI L, TILOLA M, PAVONI E, FINAZZI G, ANDREOLI G ET FILIPELLO V (2022).** Blue mozzarella is back! *Pseudomonas fluorescens* detection and typing in dairy products [en ligne]. URL: <https://www.researchgate.net/publication/363284630> [consulté le 10/06/2024].
6. **BEN MHENNI N, ZRELLI C, BRAHIM A, DJEBALI L, JAZIRI M (2023).** Prevalence and Antibiotic Resistance Phenotypes of *Pseudomonas* spp. in Fresh Fish Fillets [en ligne]. Foods, 12(5), article 950. Disponible sur : <https://doi.org/10.3390/foods12050950> [consulté le 5 juillet 2024].
7. **CADY A (2006).** Etude génétique de la résistance aux carbapénèmes chez *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse pour le diplôme d'État de Docteur en Pharmacie. Étude Université de Nantes faculté de pharmacie.2006 [en ligne]. URL : <https://archive.bu.univ-nantes.fr/pollux/show/show?id=9f9349ec-f605-427b-970f-0ef83f46f6ad> [consulté le 05/06/2024].
8. **CDC, 2012.** Etymologia : *Pseudomonas*. Emerging Infectious Diseases, 18(8): 1241. <https://doi.org/10.3201/eid1808.et1808>.

9. **CHARAN AR, REDDY VP, REDDY PN, REDDY SS et SIVARAMAKRISHNAN S (2011).** Assessment of genetic diversity in *Pseudomonas fluorescens* using PCR-based methods. *Bioremediat Biodivers Bioavailab* [en ligne]. URL:
10. **CHEN SP (2020).** *Pseudomonas* Infection [en ligne]. URL: <https://emedicine.medscape.com/article/970904-overview?form=fpf> [consulté le 14/04/2024].
11. **CLAVE D (2011).** Fiche technique bactériologie *Pseudomonas aeruginosa* centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique [en ligne]. URL: [https://www.ctcb.com/documentation/Fiches%20techniques%20BAC/Pseudomonas%20aeruginosa%20\(Edition%202011\).pdf](https://www.ctcb.com/documentation/Fiches%20techniques%20BAC/Pseudomonas%20aeruginosa%20(Edition%202011).pdf) [consulté le 30/05/2024].
12. **DELARRAS C (2014).** Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures. Paris : Tec & doc. 772 p.
13. **DUMAN S, YILMAZ ES, CEBECI HH, YAMAN G, KANDEMIR I (2021).** The diversity of *Pseudomonas* species isolated from fish farms in Turkey [en ligne]. *Aquaculture*, 736369. Disponible sur :
14. **FAO, 2024a.** Fisheries and aquaculture. [en ligne]. URL : https://www.fao.org/fishery/en/countrysector/naso_algeria [consulté le 27/06/2024].
15. **FAO, 2024b.** La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2022 [en ligne]. URL : <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/00f1704f-b092-492c-84da-63c2a88923e2/content/sofia/2022/consumption-of-aquatic-foods.html#:~:text=Les%20produits%20alimentaires%20d'origine%20aquatique%20apportent%20des%20prot%C3%A9ines%20de,l'une%20des%20principales%20sources> [consulté le 02/07/2024].
16. **GOMES NC, KOSHELEVA IA, ABRAHAM WR et SMALLA K (2005).** Effects of the inoculant strain *Pseudomonas putida* KT2442 (pNF142) and of naphthalene contamination on the soil bacterial community". *FEMS Microbiology Ecology*. [en ligne]. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8465415/> [consulté le 14/06/2024].

- 17. GOMILA M, PEÑA A, MULET M, LALUCAT J et GARCA-VALDAS E (2015).** Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology* [en ligne]. URL : <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.00214/full> [Consulté le 17/04/2024].
- 18. GUIRAUD J P (2012).** Microbiologie Alimentaire. Éditeur DUNOD. Collection : Technique et ingénierie – Agroalimentaire, 696 p.
- 19. IDIR M, MONZER H, DABBOUSSI F, BAIDA N et IZARD D (2003).** Taxonomie du genre *Pseudomonas* : rétrospective et actualité. [en ligne]. URL : <https://lsj.cnrs.edu.lb/wp-content/uploads/2016/01/izard.pdf> [consulté le 14/04/2024].
- 20. JEANNOT K et GUILLARD T (2019).** *Pseudomonas aeruginosa* [en ligne]. URL : https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/07/BACTERIE_Pseudomonas.pdf [consulté le 25/04/2024].
- 21. LATIFOU I, AMOUSSA S, ABDOU K, SOUMANOU MM, DAH-NINON JP (2019).** Changements post mortem et évaluation de la qualité du poisson destiné à la consommation humaine : Revue de la Littérature [en ligne]. Disponible sur : https://www.researchgate.net/publication/337012978_Changements_Post_Mortem_et_Evaluation_de_la_Qualite_du_Poisson_Destine_a_la_Consommation_Humaine_Revue_de_la_Litterature [consulté le 02/07/2024].
- 22. LEZZAR A (2023).** Mécanisme de résistance des bactéries. Centre hospitalo-universitaire de Constantine, service de microbiologie [en ligne]. URL : <https://facmed.univ-constantine3.dz/wp-content/uploads/2023/11/Mecanisme-de-resistance-des-bacteries.pdf> [consulté le 18/06/2024].
- 23. MARQUES S et RAMOS JL (1993).** Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways. *Molecular Microbiology* [en ligne]. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01222.x> [consulté le 15/06/2024].
- 24. OPATOWSKI M (2020).** Résistance bactérienne aux antibiotiques, apport du système national des données de santé. Médecine humaine et pathologie [en ligne]. URL : <https://theses.hal.science/tel-03149679/> [consulté le 16/06/2024].

25. **PALLERONI NJ (2005).** Genus I. *Pseudomonas*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Part B, The *Proteobacteria*, the *Gammaproteobacteria* [en ligne]. URL: <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01210> [consulté le 19/04/2024].
26. **PAPADOPOULOU OS, ILIOPOULOS V, MALLOUCHOS A, PANAGOU EZ, CHORIANOPOULOS N, TASSOU CC et NYCHAS GJ (2020).** Spoilage potential of *Pseudomonas* (*P. fragi*, *P. putida*) and LAB (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*) strains and their volatilome profile during storage of sterile pork meat using GC/MS and data analytics [en ligne]. URL: <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/5/633> [consulté le 16/06/2024].
27. **PELADAN F et MONTEIL H (1984).** Intérêt taxonomique de la caractérisation des *Pseudomonas* par l'analyse des acides gras volatils produits en culture. Annales de l'Institut Pasteur Microbiologie [en ligne]. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0769260984800824> [consulté le 17/04/2024].
28. **SHABANA R, AHMED M, HASSAN M, KHALIL M (2021).** Sequencing and multiple antimicrobial resistance of *Pseudomonas fluorescens* isolated from Nile tilapia fish in Egypt [en ligne]. Disponible sur : <https://doi.org/10.1590/1519-6984.257144> [consulté le 04/07/2024].
29. **VAILLANCOURT M et JORTH PA (2021).** Résistance aux antibiotiques et virulence du *Pseudomonas* : les deux faces d'une même pièce (en ligne).url: <https://vivreaveclafibrosekystique.com/resistance-aux-antibiotiques-et-virulence-du-pseudomonas-les-deux-faces-dune-meme-piece/> [consulte le 20/06/2024].
30. **WEIMER A, KOHLSTEDT M, VOLKE D, NIKEL P, WITTMANN C (2020).** Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* : advances and prospects [en ligne]. URL : <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10811-9> [consulté le 15/06/2024].
31. **YARBOUB N (2020)** Contribution à l'étude de l'évolution de la contamination par *Pseudomonas* spp. de l'Allache lors de sa conservation à l'état réfrigéré. Mémoire de master pour l'obtention du diplôme de master en médecine vétérinaire. Ecole nationale supérieure vétérinaire, Alger, 50p.

ANNEXES

Annexe n°01 : Composition milieux gélosés utilisés.

• GELOSE A LA CETRIMIDE

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

| | |
|--|-------------|
| Peptone | 20,00g |
| Chlorure de magnésium..... | 1,40g |
| Sulfate dipotassique..... | 10,00g |
| Cetrimide (cetyltrimethylammonium bromide) | 0,30g |
| Glycérol..... | 10 ml |
| Agar | 13,60g |
| pH final à 25°C | 7,2 +/- 0,2 |

• GELOSE NUTRITIVE

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

| | |
|---------------------------------|-------------|
| Peptone | 5,00 |
| Extrait de viande de bœuf | 3,00 |
| Chlorure de sodium | 5,00 |
| Agar | 15,00 |
| pH final à 25°C | 7,3 +/- 0,2 |

• GELOSE DE MUELLER HINTON

Composition

| | |
|----------------------------------|--------|
| Infusion de viande de bœuf | 300ml. |
| Peptone de caséine | 17.5 g |
| Amidon de maïs | 1,5g |
| Agar | 10,0 g |

Ph= 7.4

Préparation :

37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 116°C, 15min

Annexe 1 : Tableau d'interprétation des tests biochimiques pour l'identification de l'espèce *Pseudomonas* par la galerie API® 20NE.

| Tests | Réactions/enzymes | Résultats | |
|-------|--|-----------------------------|---------------------------|
| | | Négatif | Positif |
| NO3 | Réduction des Nitrates en nitrites | NIT 1 + NIT 2 /5 min | |
| | | Incolore | Rose-rouge |
| | Réduction des Nitrates en azote | Zn / 5min | |
| | | Rose | Incolore |
| TRP | Formation d'indole (TRyptOphane) | JAMES / immédiat | |
| | | Incolore, vert pale / jaune | Rose |
| GLU | Fermentation (GLUcose) | Bleu à vert | Jaune |
| ADH | Arginine Dhydrolase | Jaune | Orange / rose / rouge |
| URE | UREase | Jaune | Orange / rose / rouge |
| ESC | Hydrolyse (β -glucosidase) (ESCuline) | Jaune | Gris / marron / noir |
| GEL | Hydrolyse (protéase) (GELaline) | Pas de diffusion de pigment | Diffusion du pigment noir |
| PNPG | β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β D-Galactopyranosidase) | Incolore | Jaune |
| GLU | Assimilation (GLUcose) | Transparence | Trouble |
| ARA | Assimilation (ARAbinose) | Transparence | Trouble |
| MNE | Assimilation (ManNosE) | Transparence | Trouble |
| MAN | Assimilation (MANnitol) | Transparence | Trouble |
| NAG | Assimilation (N-Acétyle-Glucosamine) | Transparence | Trouble |
| MAL | Assimilation (MALtose) | Transparence | Trouble |
| GNT | Assimilation (potassium GlucoNaTe) | Transparence | Trouble |
| CAP | Assimilation (acide CAPrique) | Transparence | Trouble |
| ADI | Assimilation (acide ADIrique) | Transparence | Trouble |
| MLT | Assimilation (MaLaTe) | Transparence | Trouble |
| CIT | Assimilation (trisodium CITrate) | Transparence | Trouble |
| PAC | Assimilation (acide PhénylACétique) | Transparence | Trouble |

