

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn  
Badis-Mostaganem  
Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس  
مستغانم  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

## MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

*M<sup>lle</sup> BELMEHEL Fouzia*

*M<sup>lle</sup> BOUAFIA Zohra*

Pour l'obtention du diplôme de

### MASTER EN BIOLOGIE

**Spécialité: BIOTECHNOLOGIE DES MICROORGANISMES**

THÈME

**Effet des extraits des feuilles de *Prunus persica*  
sur les biofilm de *P. aeruginosa***

Soutenu publiquement le : 28/06/2016

DEVANT LE JURY :

Président	CHIBANI ABDEL WAHEB	M.C.A U. Mostaganem
Examineur	BOUZNEB AHSEN	M.C.B U. Mostaganem
Encadreur	DJIBAOUI RACHID	M.A.A U. Mostaganem
Co-encadreur	LATTAB AICHA	M.A.A U. Mostaganem

Année Universitaire 2015-2016

# Remerciements

*Nos remerciements s'adressent particulièrement à notre encadreur M<sup>r</sup> DJIBAOUI Rachid et co-encadreur LATTAB Aicha, pour nous avoir accueillies au sein de leur équipe afin de réaliser ce travail. Par leur conseil, leurs critiques constructifs et leurs soutiens moraux et pour leurs sages conseils scientifiques qui nous ont aidées dans la suite des travaux.*

*A tous les enseignants de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Mostaganem, qui ont fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui ; nous vous remercions du fond du cœur pour vos conseils lors de la conception de ce travail et le fait de nous avoir mis en contact avec notre superviseur.*

*Nous remercions également toutes les enseignants du parcours et surtout à le responsable du parcours M<sup>r</sup> DJIBAWI.R.*

*Nos remerciements s'adressent également aux techniciens de laboratoire et aux personnes qui ont participé à réaliser se travail.*

*Enfin nous remercions tous les étudiants de la promotion DE BIOT2CHNOLOGIE DES MICROORGANISMES 2015-2016*

# *Dédicaces*

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

*A mon père (LAID) pour son soutien et son amour, à ma mère (FATIMA) je dédier ma vie toute entière car sans toi je n'aurais été ce que je suis aujourd'hui.*

*A mes frères et sœur MAKI, HANANE, ANOUAR, AKRAM et FOUAD.*

*A mes oncle : AËK et son marie FATIMA*

*A mes cousins KHADIDJA, BILAL, ANIS, FAYSSAL et HADIL*

*A la famille HENNI spécialement HENNI DJILALI.*

*A tout la famille BELMEHEL et son oublier ma grande mère BAKHTA.*

*A mes amis : Nazîha, Fatîma Zohra, Hasnia, Karîma, Naïma, Souad, Asmaa, Khawla, Djouda, Rabha, Wahiba, Khadidja, Djamal.*

*Fouzia*

# *Dédicace*

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

*A mon père pour (HADJ) son soutien et son amour, à ma mère (FATMA) je dédier ma vie toute entière car sans toi je n'aurais été ce que je suis aujourd'hui.*

*A mes frères et sœur ABDELRAHMANE, BANDHIBA, ABED, ZAHIA, HADJAR, HANANE, SARA.*

*A mes Oncles: MOHAMMED, LAID, SOFAINE*

*A mes Cousins : MOHAMMED, BOUABDELAH, CHAIMA, DJAMEL et WALIDE*

*A les familles BOUTIBA, BOUOUDA et DAOULI surtout BOUTIBA MAHDJOUBA*

*A tout la famille BOUAFIA et son oublier ma grande père DJAMEL*

*A mes amis : Fouzia, Samia, Naïma, Souad, Nabila, Nadia, Fatima Zahra, Yamina, Noura, Souhila, Fatima, Ibrahim.*

*ZOHRRA*

## Rusémé

L'utilisation des extraits de plantes et considéré comme une solution alternative pour lutter contre les infections microbiennes. La bactérie *P. aeruginosa* est pathogène opportuniste multirésistante dans sa forme planctonique et en biofilm.

Dans la présente étude l'extrait méthanolique et deux fractions, de l'extrait d'éthyle d'acétate et de butanol préparés à partir les feuilles de *Prunus persica* ont été testés contre trois isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* et une souche de référence (*P. aeruginosa* ATCC 27853). Les Résultats montrent une activité antibactérienne contre les souches testées par l'extrait flavonoïque extraite par le butanol comparativement avec les deux autres extraits. Une activité inhibitrice remarquable a été enregistrée. Une CMI autour de 12,5mg/ml et une CMB à une concentration de 25mg/ml.

Le test de l'effet antibiofilm de cet extrait réalisé par la méthode de cristal violet est négatif sur les quatre souches de *P. aeruginosa*.

**Mots clés :** *Pseudomonas* -extrait flavonoïque- multirésistance- *Prunus persica*-biofilm - CMI- CMB

## Abstact

Plant extracts are considered as an alternative therapy against microbial infections. The bacterium *P. aeruginosa* is a multiresistant opportunistic pathogen in its planktonic and biofilm forms.

In the present study methanol extract and two fractions of ethyl acetate and butanol extracts prepared from leaves of *Prunus persica* were tested against three *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates and reference strain (*P. aeruginosa* ATCC 27853). The results show an antibacterial activity against the strains tested by the flavonoid extract extracted by butanol compared with the other two extracts. A remarkable inhibitory activity was recorded. A MIC was a around 12.5mg / ml and an MBC at a concentration of 25mg / ml.

The antibiofilm effect of butanol extract tested by the crystal violet method was negative on the all four strains of *P. aeruginosa*.

**Key words:** *Pseudomonas* – flavonoic extract - multirésistance- *Prunus persica* – biofilm- MIC- MBC.

## المخلص

تعتبر المستخلصات النباتية بديلا للعلاج ضد الالتهابات الميكروبية. وتعتبر *P. aeruginosa* بكتريا ممرضة بشكل انتهازى و متعددة المقاومة سواء في حالتها الحرة أو في حالة البيوفيلم .

تظهر هذه الدراسة اختبار كل من مستخلص الميثانول واثنين من أجزاء مستخلص إيثيل أسيتات و مستخلص البيتانول لأوراق *Prunus persica* ضد ثلاث عزلات تابعة لـ *P. aeruginosa* وسلالة مرجعية *P. aeruginosa* ATCC27853

وتشير النتائج إلى فعالية ضد السلالات المدروسة بواسطة مستخلص الفلافونويد المستخلص بالبيوتانول مقارنة مع اثنين من مستخلصات أخرى. وقد تم تسجيل نشاط مثبطا ملحوظا. حيث كان التركيز المثبط الأدنى نحو 12.5mg / ml و كان التركيز القاتل الأدنى بتركيز 25mg / ml.

وأظهرت النتائج أيضا من خلال اختبار مستخلص الفلافونويد المستخلص بالبيوتانول على البيوفيلم البكتري بطريقة الكريستال البنفسجي تأثيرا سلبيا على السلالات الأربعة المدروسة.

## **SOMMAIRE**

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	

### **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

#### **Chapitre I : Généralités sur *P. aeruginosa***

<b>I.1. Définition</b>	01
<b>I.2. Caractères biochimiques</b>	01
<b>I.3. Les facteurs de virulences</b>	02
<b>I.3.1. Les facteurs de virulence secrétés</b>	02
<b>I.3.1.1. Les protéases</b>	03
<b>I.3.1.1.1. Les métallo-protéases</b>	03
<b>I.3.1.1.1.1. L'élastase LasB (<i>Pseudolysine</i>)</b>	03
<b>I.3.1.1.1.2. L'élastase LasA (<i>staphylolysine</i>)</b>	03
<b>I.3.1.1.1.3. La protéase alcaline (<i>Aeruginolysine</i>)</b>	03
<b>I.3.1.1.2. Les serine-protéases</b>	04
<b>I.3.1.2.1. La protéase IV (<i>Arginyl peptidase</i>)</b>	04
<b>I.3.1.2.2. LasD</b>	04
<b>I.3.1.2. Les phospholipases C</b>	04
<b>I.3.1.3. Les rhamnolipides</b>	04
<b>I.3.1.4. L'exotoxine A</b>	05
<b>I.3.1.5. Les lectines</b>	05
<b>I.3.1.6. Les pyocyanines</b>	06
<b>I.3.1.7. Les pyoverdines</b>	06
<b>I.3.2. Les facteurs de virulence cellulaire</b>	06
<b>I.3.2.1. Les flagelles et pili</b>	06
<b>I.3.2.2. Lipopolysaccharides (LPS)</b>	08
<b>I.3.2.3. L'alginate</b>	08
<b>I.4. Les infections à <i>P. aeruginosa</i></b>	08
<b>I.4.1. Infection aiguë</b>	09
<b>I.4.2. Infection chronique</b>	09
<b>I.5. Résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i></b>	10

<b>I.5.1.Mécanismes de résistance aux B-lactamines chez <i>P. aeruginosa</i></b>	10
<b>I.5.1.1. Résistance naturelle</b>	10
<b>I.5.2. Résistance acquises</b>	10
<b>I.5.2.1. Résistance enzymatique</b>	10
<b>I.5.2.1.1. Résistance par hyperproduction de la céphalosporine Amp C</b>	10
<b>I.5.2.1.2. Résistance par production de B-lactamases de classe B</b>	11
<b>I.5.2.2. Résistance non enzymatique</b>	11
<b>A. perte de la porine OprD2</b>	11
<b>B. surexpression de système d'efflux</b>	11
<b>I.5.2.2.1. Résistance aux fluoroquinolones</b>	12
<b>I.5.2.2.2. Résistance aux Aminosides</b>	12

## **Chapitre II : Généralités sur les biofilms**

<b>II.1.Définition</b>	14
<b>II.2.Formation des biofilms</b>	15
<b>II.2.1.Adhésion réversible</b>	15
<b>II.2.2.Adhésion irréversible</b>	16
<b>II.2.3.Maturation</b>	17
<b>II.2.4.Détachement</b>	17
<b>II.3.Facteurs favorisant la formation d'un biofilm</b>	18
<b>II.3.1.Caractéristiques de la surface</b>	18
<b>II.3.2.Caractéristiques du milieu</b>	20
<b>II.3.3. Propriétés des cellules</b>	21
<b>II.4.Régulation de la formation de biofilm</b>	22
<b>II.4.1. Quorum sensing</b>	22
<b>II.4.1.1. Les molécules de quorum sensing</b>	22
<b>II.4.1.2.Roles de quorum sensing</b>	22
<b>II.4.2. Le lien entre quorum sensing, biofilm et infection à <i>P. aeruginosa</i></b>	23

## **Chapitre III : *Prunus persica***

<b>III.1. Historique</b>	26
--------------------------	----

III.2. Répartition	26
III.3. Description	26
III.4. Propriété chimique	27
III.5. Culture	28
III.6. Caractérisation moléculaire	29
III.7. Variétés	29
III.8. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques	30
III.9. Propriété antibactérienne	30

## **PARTIE EXPÉRIMENTALE**

### **Chapitre IV : Matériels et Méthodes**

IV.1. Obtention des souches	32
a- Enrichissement	32
b- L'ensemencement sur la gélose nutritive	32
IV.2. Identification de <i>P. aeruginosa</i>	32
IV.2.1. Etude macroscopique des colonies	32
IV.2.2. Etude microscopique	32
IV.2.3. Croissance à 4°C et 42°C	32
IV.2.4. Production des pigments	33
IV.2.5. caractères biochimiques	33
IV.2.5.1. Production de catalase	33
IV.2.5.2. Production d'oxydase	33
IV.2.5.3. Utilisation des sucres, production de gaz et d'H <sub>2</sub> S	33
IV.2.5.4. Utilisation du mannitol et recherche de la mobilité	34
IV.2.5.5. Test de rouge de méthyle (RM) et vogues-proskauer (VP)	34
IV.2.5.6. Utilisation de citrate	34
IV.2.5.7. Test de nitrate réductase	34
IV.2.6. La galerie API 20 NE	36
IV.2.7. Conservation des isolats	36
IV.3. Matériel végétal	36
IV.3.1. Récolte de la plantes	36
IV.3.2. Préparation des extraits	36
IV.3.2.1. Préparation des extraits bruts (extraction par le méthanol)	36
IV.3.2.1.1. Le principe de l'extraction Soxhelt	37

IV.3.2.2.L'extraction des flavonoïdes	38
IV.a. L'extraction flavonoïde par l'éthyle d'acétate	38
IV.b. L'extraction flavonoïde par butanol	38
IV.3.3. Le rendement d'extraction	39
IV.4. L'activité antibactérienne des extraits préparation	39
IV.5. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait	40
IV.5.1. Préparation des dilutions	41
IV.6. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'extrait	41
IV.7. Effet des extraits sur la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	41
<b>CHAPIRE II : Résultats et Discussion :</b>	
V.1. Identification des isolats obtenus	44
V.1.1. L'étude macroscopique	44
V.1.2. L'étude microscopique	44
V.1.3. Croissance à 4° C et 42° C	45
V.4. Caractères biochimiques	45
V.1.4.1. Teste de l'oxydase	45
V.1.4.2. Teste de la catalase	45
V.1.4.3. Milieu TSI (Triple sugar iron)	45
V.1.4.4. Utilisation du mannitol et recherche de la mobilité	46
V.1.4.5. Utilisation du citrate	46
V.1.4.6. Teste de rouge de méthyle (RM) et vogues-proskauer (VP)	47
V.1.4.7. Réduction des nitrates	48
V.1.5. Galerie biochimique API 20 NE	48
V.2. L'obtention des extraits des plantes	51
V.2.1. L'extrait méthanoïque de <i>Prunus persica</i>	51
V.2.2. Rendement d'extraction	51
V.3. Activité antibactérienne des extraits préparés de <i>Prunus persica</i>	51
V.4. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'extrait flavonoïque de <i>Prunus persica</i>	52
V.5. Concentration Minimale Bactéricide (CMB) d'extrait flavonoïque de <i>P. persica</i>	53
V.6. Effet d'extrait flavonoïque sur la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	54



## Liste des figures

- Figure n°1** Principaux facteurs de et leurs interactions avec l'hôte
- Figure n°2** Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm de *P. aeruginosa*
- Figure n°3** *Prunus persica*
- Figure n°4** La galerie biochimique API 20 NE
- Figure n°5** le montage de l'extraction soxhlet.
- Figure n°6** l'évaporateur rotatif (Type : BUCHE R-210).
- Figure n°7** Extraction flavonoïde par l'éthyle acétate.
- Figure n°8** Extraction des flavonoïdes par butanol
- Figure n°9** Protocole de quantification de la formation de biofilm
- Figure n°10** Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* ensemencée : Sur King A et sur King B
- Figure n°11** Observation microscopique de *P. aeruginosa* après une coloration de Gram (x1000)
- Figure n°12** Résultat de test de la catalase pour le *P. aeruginosa*
- Figure n°13** Résultat de test de TSI pour les quatre isolats de *P. aeruginosa*
- Figure n°14** Résultat de test mannitol mobilité pour les isolats testés de *P. aeruginosa*.
- Figure n°15** Résultat de l'utilisation de citrate pour les isolats testés de *P. aeruginosa*.
- Figure n°16** Résultat de test de rouge de méthyle et vogues – proskauer Pour les quatre isolats de *P. aeruginosa*.
- Figure n°17** résultat de teste nitrate réductase positive pour les quatre isolats de *P. aeruginosa*.
- Figure n°18** résultats de l'API 20 NE de l'isolat n°1 *P. aeruginosa*
- Figure n°19** Résultats de l'API 20 NE de l'isolat n° 2 de *P. aeruginosa*
- Figure n°20** Résultats de l'API 20 NE de l'isolat n° 3 de *P. aeruginosa*.
- Figure n°21** L'extrait méthanoïque de *Prunus persica*.
- Figure n°22** Activité antibactérienne d'extrait de butanol contre *P. aeruginosa*
- Figure n°23** Les résultats de l'effet de l'extrait de butanol sur la croissance de *P. aeruginosa*
- Figure n°24** CMB d'extrait flavonoïque par butanol de *P. persica*
- Figure n°25** : Effet d'extrait flavonoïque sur la formation du biofilm par *P. aeruginosa*

## Liste des tableaux

**Tableau n°1:** Les résultats des différents tests de la galerie biochimique API 20 NE pour les trois isolats testés de *Pseudomonas aeruginosa*

**Tableau n°2 :** Le rendement de l'extrait de *Prunus persica*

## Liste des abréviations

°C	: Degré Celcius
ADN:	Acide désoxy ribonucléique
AHL :	Acyldhomosérine lactone
BN :	Bouillon nutritif
cm :	centimètre
CMB :	Concentration Minimale Bactéricide
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CV :	Cristal violet
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DO :	Densité optique
EPS :	Extra Polymeric Substances
GN :	Gélose nutritive
Ig :	Immunoglobulines
IL :	Interleukine
H :	Heure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Eau oxygénée
KDa :	Kilo Daltons
LB :	Luria Bertani
LPS :	Lipopolysaccharides
MH :	Mueller Hinton
Mg :	Milligramme
ml :	Millilitre
NR :	Nitrate réductase
O <sub>2</sub> :	Oxygène
OMP :	Outer Membrane Protein
OprD :	Outer membrane protein D
OprF :	Outer membrane protein F
ORF :	Open Reading Frame
<i>P.aeruginosa</i> :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IIL :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin II
PA-IL :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin I
<i>P. persica</i> :	<i>Prunus persica</i>

QRDR :	Quinolone Résistance Determining Regions
QS :	Quorum sensing
RM :	Rouge de méthyle
SEP :	Substrats Extracellulaires Polymériques
TSB :	Tryptic-soy-broth
TSI :	Triple Sugar Iron
UFC :	Unité Formant Colonie
VP :	Vogues-proskauer



# ***Introduction***

## **Introduction :**

*P. aeruginosa* est une espèce bactérienne ubiquitaire, comme toutes les espèces du genre *Pseudomonas* ou apparenté. Ces bactéries ont des exigences nutritives peu importantes et sont capables de survivre dans l'environnement (eaux, surface, air, aliments) et particulièrement en milieu humide. Elle est un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôte : humains, souris, plantes, insectes, nématodes ou amibes (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; D'Argenio *et al.*, 2001; Pukatzki *et al.*, 2002). Présente fréquemment dans le milieu hospitalier, elle atteint essentiellement les sujets débilisés (cancéreux, brûlés, insuffisant respiratoires, .....). Sa présence dans certains prélèvements par exemple : les urines-témoigne de manœuvre instrumentale et du caractère iatrogène de l'infection. Il est également possible de l'isoler coproculture sans qu'un rôle pathogène précis puisse lui être attribué (Ben *et al.*, 2004). En revanche, les sujets atteints de mucoviscidose sont très souvent infectés au niveau pulmonaire par un type particulier de souche ; les pyocyanique muqueux (Ben *et al.*, 2004).

*P. aeruginosa* a toujours été considéré comme une cible difficile en chimiothérapie anti-infectieuse. La séquence complète de son génome (Stover *et al.*, 2000) a permis de rationaliser cette observation car 0.3 % des gènes sont directement impliqués dans les mécanismes de résistance, comme il est capable d'acquérir des novo de mécanismes de résistance suite à l'exposition à des traitements antibiotiques (Woods, 2004 ; Kipnis *et al.*, 2006). De plus, formant des biofilms (communauté de micro-organismes, adhérant entre eux et à une surface et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice). Depuis plusieurs années le biofilm est reconnu comme la forme de développement majoritaire des bactéries dans la nature. En effet, ce mode de développement confère aux bactéries de nombreuses protections vis-à-vis des différents stress environnementaux. Il se trouve que ce mode de croissance est souvent associé à des problèmes de santé publique tels que la formation de biofilms contenant des bactéries opportunistes dans les réseaux d'eau, sur les dispositifs médicaux (cathéters, endoscopes...) ou encore les muqueuses du corps humain. Les substances naturelles et les plantes en particulier représentent une immense source de chimiodiversité, Ces dernières années, nous assistons à un regain d'intérêt des consommateurs pour les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des, procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale.

Nous avons sélectionné pour notre étude la plante médicinale : *Prunus persica*.

Notre travail comporte deux parties, la première englobe une recherche bibliographique divisée en trois chapitres :

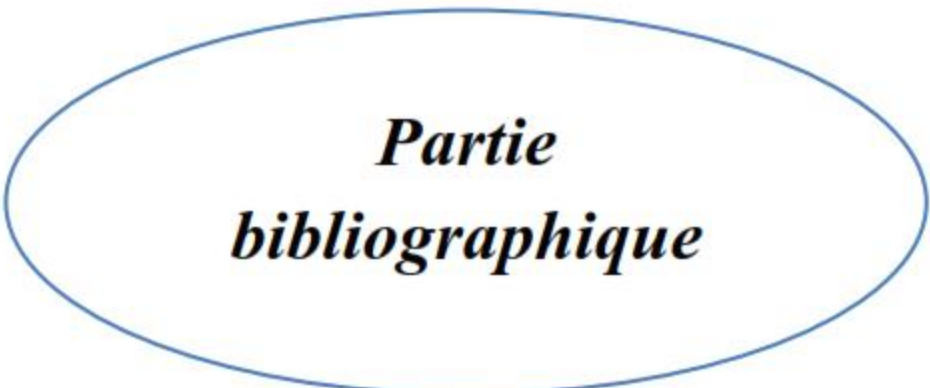
Dans le premier chapitre, nous aborderons la présentation de *P. aeruginosa*, les caractéristiques, les facteurs de virulence, les infections et les résistances aux antibiotiques.

Dans le deuxième chapitre on a la présentation sur les biofilms, les étapes de formation, et les fondements physico-chimiques de la formation des biofilms, les mécanismes de résistance du biofilm et le lien entre Quorum Sensing, biofilm et infection à *P. aeruginosa*.

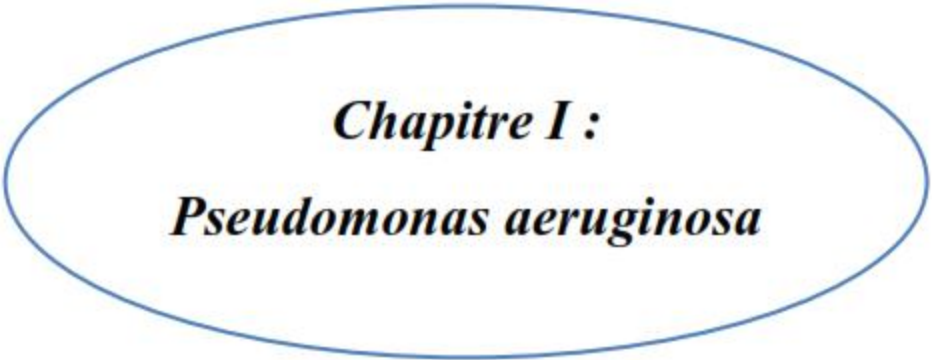
Alors que le troisième chapitre présente une généralité sur *Prunus persica*, répartition description, propriété chimique, culture, caractérisation moléculaire, variétés, propriétés pharmacologiques et thérapeutiques, propriété antibactérienne.

La deuxième partie c'est la partie expérimentale qui présente l'essentiel des travaux et des résultats obtenus dans le cadre de ce modeste travail :

- Obtention et confirmation de l'identification des isolats testées.
- Préparation des extraits végétaux de la plante étudiée (*Prunus persica*).
- L'activité antibactérienne des extraits préparés sur *P. aeruginosa*.
- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'extrait présentant un effet inhibiteur sur *P. aeruginosa*.
- L'étude de l'effet d'extrait sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa*.



***Partie  
bibliographique***



***Chapitre I :***  
***Pseudomonas aeruginosa***

**I.1. Définition :**

*Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique est une bactérie saprophyte de l'air, l'eau et du sol, commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, elle possède un pouvoir pathogène étendu. Elle est essentiellement une bactérie pyogène qui provoque chez l'homme et chez l'animal des suppurations superficielles et profondes à partir de ces suppurations on peut l'isoler (Bedoui *et al.*, 2005).

*P. aeruginosa* présente fréquemment dans le milieu hospitalier elle atteint essentiellement les sujets débilisés : cancéreux brûlés, insuffisant respiratoires. Sa présence dans certains prélèvements par exemple : les urines-témoigne de manœuvres instrumentales et du caractère iatrogène de l'infection. Il est également possible de l'isoler de coprocultures sans qu'un rôle pathogène précis puisse lui être attribué (Ben Messaoud, 2004-2005).

*P. aeruginosa* se caractérise en particulier par la production d'un pigment (mélange de pyocyanine et pyoverdine) qui teinte fortement les milieux de culture. Elle possède uniquement en aérobiose ou elle utilise les nitrates en anaérobiose (Leyral, 1994). Elle est capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température avec une température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C, ce qui en fait une bactérie mésophile. Elle est catalase positive, oxydase positive et capable de métaboliser plus de 50 composés organiques ainsi que des composants inorganiques (Vasil, 1986).

**➤ Classification :**

**Domaine :** Bactéria

**Phylum:** *Proteobacteria*

**Classe :** *Gammaproteobacteria*

**Ordre:** *Pseudomonadales*

**Famille:** *Pseudomonadaceae*

**Genre:** *Pseudomonas*

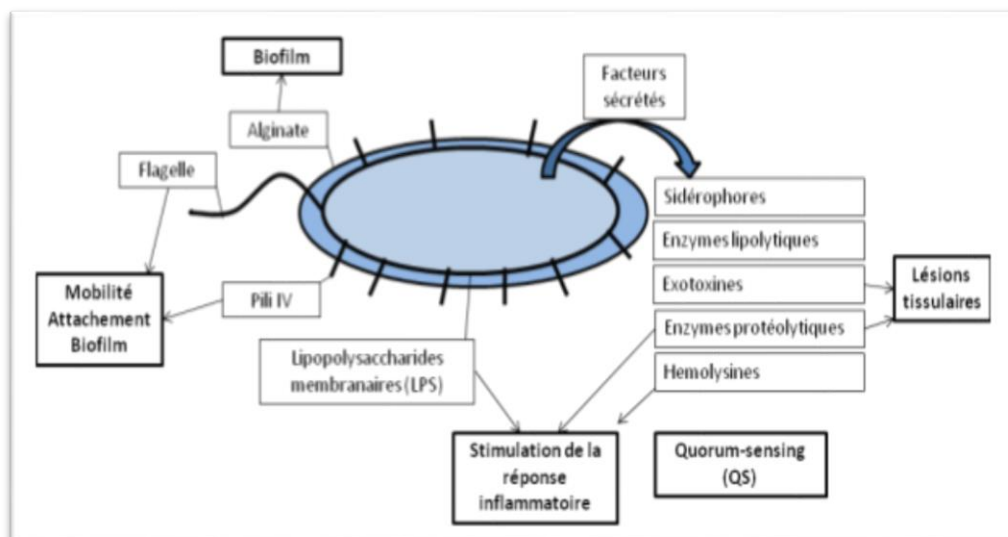
**Especie:** *Pseudomonas aeruginosa* (Prescott, 2003).

### I.2. Caractères biochimiques :

*P. aeruginosa* n'est pas capable de fermenter les sucres mais peut les attaquer (le glucose en particulier) par voie oxydative, entraînant une acidification du milieu. Les milieux MEVAG (Milieu pour l'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides) ou de Hugh et Leifson sont spécialement destinés à mettre cette propriété en évidence. Comme d'autres *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* sécrète un certain nombre de pigments, dont les principaux la pyocyanine (bleu-vert), la pyoverdine (jaune vert fluorescent) et la pyorubine (brun-rouge) (Khalilzadeh, 2009). Comme la plupart des *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* possède une oxydase, d'autres caractères sont utiles pour le diagnostic d'espèce : Indole (-), urée (-), TDA (tryptophane-désaminase) (-), gélatine (+), ONPG(-) (orthonitrophényl-galactose), Nitrate-réductase (+), LDC (-) (Lysine-décarboxydase), ODC (-) (ornithine-décarboxylase), ADH (+) (Arginine-déshydrogénase) (Lie, 2002).

### I.3. Les facteurs de virulences :

*P. aeruginosa* synthétise de nombreux facteurs de virulence, qui lui permettent de survivre aussi bien dans les différents hôtes que dans l'environnement (Lazdunski, 1998). Ces facteurs de virulence sont impliqués dans les différentes étapes du processus d'infection et permettent ainsi à *P. aeruginosa* de coloniser son hôte. Ils comprennent notamment des facteurs impliqués dans l'adhérence et la motilité de *P. aeruginosa* qui permettent la colonisation de l'hôte.



**Figure n° 1 :** Principaux facteurs de et leurs interactions avec l'hôte.

**I.3.1. Les facteurs de virulence secrétés :**

*P. aeruginosa* est capable de sécréter certains produits qui sont toxiques pour les cellules et les tissus de l'hôte. Ces facteurs de virulence peuvent agir à distance comme les hormones. Ils sont associés à l'infection aiguë et interviennent principalement dans la dissémination de la bactérie en perturbant les défenses de l'hôte.

**I.3.1.1. Les protéases :**

*P. aeruginosa* produit deux types de protéases : les métallo-protéases et la sérine protéases. La production des protéases est régulée par le quorum-sensing (Chaker, 2012).

**I.3.1.1.1. Les métallo-protéases :****a. L'élastase *Las B* (*Pseudolysine*):**

Il s'agit d'une métallo-protéase à zinc de 33 kDa, codée par le gène *lasB* et sécrétée par le système de sécrétion de type II (Moriyama, 1965 ; Bever et Iglewski, 1988 ; Kessler et Safrin, 1988). Cette protéase joue un rôle important dans la pathogénie de *P. aeruginosa*. En clivant l'élastine et le collagène, cette enzyme est à l'origine d'une destruction de la jonction entre les cellules épithéliales. Ceci augmente la perméabilité épithéliale et le recrutement des neutrophiles. Cette protéase fait augmenter la production de l'IL-8 et diminuer la réponse immunitaire innée en rendant inactifs, par clivage des protéines du surfactant, SP-A et des récepteurs à protéase (Azghani *et al.*, 1993 ; Konet *et al.*, 1999 ; Azghani *et al.*, 2000 ; Dulon *et al.*, 2002 ; Alcorn *et al.*, 2004).

L'élastase B est également capable d'inactiver d'autres protéines comme les IgA, IgG et des composés du complément modulant ainsi la réponse immunitaire (Heck *et al.*, 1990 ; Hong et Ghebrehiwet, 1992). Elle a la capacité de cliver la protéine uPAR2 (urokinase-type plasminogen activator receptor) qui est nécessaire à la migration et l'adhérence des cellules épithéliales et des leucocytes (Beaufort *et al.*, 2004). Elle inhibe aussi la réparation des cellules épithéliales lésées en altérant la mobilité cellulaire (De Bentzmann *et al.*, 2000).

**b. L'élastase *LasA* (*staphylolysine*):**

C'est une protéase de 20 kDa, codée par le gène *lasA* et sécrétée par le système de sécrétion de type II (Olson et Ohman, 1992). Elle agit en synergie avec l'élastase B pour la dégradation

de l'élastine (Kessler *et al.*, 1997). Elle représente un facteur de virulence important qui a la capacité de moduler les défenses de l'hôte (Estrellas *et al.*, 2000 ; Park *et al.*, 2001).

### **c. La protéase alcaline (Aeruginolysine) :**

C'est une métalloprotéase à zinc de 56 kDa codée par le gène *aprA* (Okuda *et al.*, 1990). Elle représente la seule protéase sécrétée par le système de sécrétion de type I (ou transporteur ABC) (Guzzo *et al.*, 1991). Elle lyse la fibrine et inhibe sa formation (Kipnis *et al.*, 2004). Elle joue le rôle d'immunomodulateur pendant l'infection. Elle dégrade des anticorps, les composants du complément C1q et C3, les cytokines et les chémokines (Hong et Ghebrehiwet, 1992 ; Avidon *et al.*, 1998 ; Leidal *et al.*, 2003)

### **I.3.1.1.2. Les Sérine-Protéases**

#### **a. La protéase IV (Arginyl peptidase) :**

Il s'agit d'une protéase de 26 kDa codée par le gène *prpL* (Wilderman *et al.*, 2001 ; Traidej *et al.*, 2003). Elle dégrade les protéines A, D et B du surfactant (Malloy *et al.*, 2005), le fibrinogène, la plasmine, le plasminogène, l'épithélium cornéen, des IgG, le complément et des produits inflammatoires et contribue aussi au pouvoir pathogène de la bactérie (Engel *et al.*, 1997 ; Engel *et al.*, 1998a ; Engel *et al.*, 1998 ).

Il est vraisemblable que les protéases *lasB*, *LasA*, la protéase alcaline et la protéase IV agissent en synergie pendant l'invasion (Suter *et al.*, 1994 ; Matsumoto *et al.*, 2004 ).

#### **b. Las D :**

Après clivage d'une protéine de 43 kDa, la CbpD (chitin-bindingproteinD). Le fragment N-terminal de 23 kDa représente la protéase Las D (Park et Galloway, 1995 ; Braun *et al.*, 1998 ; Folders *et al.*, 2000). Cette protéase possède la capacité de lyser les bactéries *Staphylococcus aureus* permettant à *P. aeruginosa* de prédominer au niveau poumon (Park et Galloway, 1998).

### **I.3.1.2. Les phospholipases C :**

Les phospholipases C sont des hémolysines thermolabiles dont la synthèse est induite par une carence en phosphate. Elle libère des phosphorylcholine à partir de la phosphatidylcholine

ou de la sphingomyéline. Son substrat principal est le constituant majeur du surfactant pulmonaire (Meriem, 2013).

Egalement sécrétées par le système de sécrétion de type II, elles présentent différentes spécificités de substrats (Stonehouse *et al.*, 2002) et ont particulièrement pour cible la partie lipidique de la membrane des cellules eucaryotes. L'action des phospholipases est facilitée par les rhamnolipides bactériens.

Par ailleurs, certaines présentent une activité hémolytique (PlcN et PlcH) et jouent un rôle dans la mobilité de type « twitching » (PlcB : Barker *et al.*, 2004). Elles sont capables de supprimer la réponse oxydative des neutrophiles (Terada *et al.*, 1999).

### 3.1.3. Les rhamnolipides :

Les rhamnolipides sont des biosurfactants glycolipidiques résistants à la chaleur. Ils sont composés de rhamnose lié à des acides gras  $\beta$ -hydroxylés. *P. aeruginosa* produit 25 rhamnolipides qui sont différents soit par la longueur de la chaîne ou le degré de saturation de l'acide gras (Deziel *et al.*, 1999). La biosynthèse des rhamnolipides implique 3 enzymes codées par les gènes *RhlA*, *RhlB* et *RhlC* (Deziel *et al.*, 2003). Plusieurs stimuli environnementaux tels que la densité cellulaire, le stress et carence nutritionnelle stimulent la biosynthèse des rhamnolipides (McKnight *et al.*, 2000 ; Diggle *et al.*, 2003 ; Déziel *et al.*, 2005 ; Dekimpe et Déziel, 2009). Cette biosynthèse coïncide avec la phase stationnaire de croissance. Elle est régulée soit au niveau de la transcription soit à un niveau post-transcriptionnel. Parmi les régulateurs impliqués, il y a le quorum-sensing et les systèmes à deux composants tels que GacS /GacA (Diggle *et al.*, 2003 ; Deziel *et al.*, 2005 ; Dekimpe et Deziel, 2009). Le rôle des rhamnolipides dans la physiologie de la bactérie est encore mal connu. Néanmoins, ils sont des facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. En effet, ils ont été détectés dans le crachat des patients atteints de mucoviscidose. Ils ont la capacité d'inhiber le phénomène de clairance ciliaire (Hastie *et al.*, 1986 ; Kownatzki *et al.*, 1987). En outre, les rhamnolipides jouent un rôle dans le changement de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (Al-Tahhan *et al.*, 2000), dans la solubilisation du PQS (Pseudomonas quinolone signal), la mobilité de type « swarming » (Deziel *et al.*, 2003) et dans l'architecture du biofilm (Kownatski *et al.*, 1987; Filloux et Vallet, 2003 ). Il sont une activité antimicrobienne (Wang *et al.*, 2005) et une activité hémolytique (Fujita *et al.*, 1988). En plus, ils inhibent la phagocytose et induisent la nécrose des PMN (leucocytes PolyMorphoNucléaire) (Jensen *et al.*, 2007).

**I.3.1.4.L'exotoxine A :**

L'exotoxine A (ETA) est considérée comme la protéine la plus toxique par *P. aeruginosa*. Il s'agit d'une enzyme de 66kDa codée par le gène *toxA* et sécrétée dans l'espace extracellulaire sous forme d'une pro-toxine inactive via le système de sécrétion de type II (Iglewski et Kabat, 1975 ; Gray *et al.*, 1984 ). Elle est reconnue par les récepteurs CD91 et LRP (LDL related protein) (Herz *et al.*, 1990). Cette interaction provoque le clivage de la protoxine et une interaction de la partie active. Cette dernière, à activité ADP-ribosyltransférase, inhibe le facteur d'élongation-2 (EF-2) et, donc l'inhibition de la synthèse protéique induisant la mort cellulaire (Pavlovskis *et al.*, 1978 ; Wick *et al.*, 1990 ; Perentesis *et al.*, 1992 ). L'exotoxine A inhibe la libération de certaines cytokines pro-inflammatoires tel que TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6 et l'IL-8. Ceci affaiblit la réponse immunitaire de l'hôte et aggrave l'état de l'infection (Schultz *et al.*, 2000 ; Schultz *et al.*, 2001). L'exotoxine A est cruciale pour la virulence de *P. aeruginosa*. Des mutants déficients de l'exotoxine A ont été 20 fois moins virulents par rapport à la souche sauvage (Lory, 1986 ; Miyazaki *et al.*, 1995).

**I.3.1.5.Les lectines :**

*P. aeruginosa* produit un grand nombre de glycoprotéines incluant deux lectines solubles : I (PA-IL) et II (PA-IIL). Elles sont principalement présentes dans le cytoplasme de la bactérie et la présence du calcium est essentielle pour qu'elles soient actives. Cependant, la lectine PA-IIL est également présente en grande quantité sur la membrane externe (Glick et Garber, 1983 ; Tielker *et al.*, 2005). Ces deux lectines représentent deux facteurs de virulences important pour l'infection. Leur expression est sous le contrôle du système du quorum sensing (Winzer *et al.*, 2000 ; Schuster *et al.*, 2003 ; Wagner *et al.*, 2003).

**I.3.1.6. Les pyocyanine :**

La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie et implique dans de nombreux mécanismes de pathogénicité (Lau *et al.*, 2004). Elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte, induit l'apoptose des neutrophiles (Allen *et al.*, 2005) et induit la production d'IL-8 (Denning *et al.*, 1998). Son importance dans la virulence de *P. aeruginosa* a été démontrée lors d'infections sur modèle animal (Lau *et al.*, 2004). Ses propriétés oxydo-réductrices lui permettent d'oxyder la glutathionne, d'inactiver la catalase des cellules épithéliales bronchiques et ainsi de participer aux lésions liées au stress oxydatif (O'Malley *et al.*, 2004).

**I.3.1.7. Les pyoverdines :**

La pyoverdine et la pyocheline sont les deux principaux sidérophores et secrétés par *P. aeruginosa*. Les sidérophores sont des petites molécules chélatant le fer de l'environnement afin de l'utiliser dans le métabolisme. Comme le fer est un élément important pour la croissance de *P. aeruginosa*, la pyoverdine est donc nécessaire pour la virulence de la bactérie (Meyer *et al.*, 1996 ; Takase *et al.*, 2000). La pyoverdine régule sa propre sécrétion ainsi que celle d'autres facteurs de virulence comme l'exotoxine A et une endoprotéase (Lamont *et al.*, 2002).

**I.3.2. Les facteurs de virulence cellulaire :****I.3.2.1. Les flagelles et pili :**

La mobilité en liaison avec la variation de l'environnement est un phénomène primordial dans le processus de colonisation et d'infection. Les bactéries sont ainsi dotées d'appendices cellulaires, flagelles et pili (ou fimbriae), leur permettant de « sonder » les surfaces et de se déplacer dans le milieu.

Le flagelle polaire confère à la bactérie la capacité de se déplacer non seulement en milieu aqueux, mais également sur des surfaces semi-solides (swarming) (Kohler *et al.*, 2000). Il présente une forte homologie structurale avec les systèmes de sécrétion de type III et se compose d'une partie enchâssé dans la membrane assurant la rotation par transport de protons et une partie libre. Celle-ci est constituée en partie de monomères de flagelline (FlicC) (Bardy et Jarrell, 2003). Le flagelle est impliqué dans la reconnaissance et l'adhérence aux surfaces épithéliales (Simpson *et al.*, 1992) et abiotiques, qu'à la formation de micro-colonies et au développement « normal » d'un biofilm (O'Toole et Kolter, 1998). La flagelline est ainsi capable d'interagir avec les glycolipides GM1, les asialo-GM1 (Feldman *et al.*, 1998) et les mucines (Lillehoj *et al.*, 2002) présentes à la surface de l'épithélium bronchique. Le flagelle participe également à la virulence en induisant une réponse inflammatoire dépendante de NF $\kappa$ B via les récepteurs Toll, TLR5, TLR2 et une production d'IL-8 (Di Mango *et al.*, 1995 ; Adamo *et al.*, 2004). Des mutants dépourvus de flagelle ont ainsi une virulence atténuée (Tang *et al.*, 1996 ; Feldman *et al.*, 1998) et l'utilisation d'anticorps anti flagellaires permet de réduire la Symptomatologie lors de pneumonies à *P. aeruginosa* chez le rat (Landsperger *et al.*, 1994). La nature antigénique du flagelle est impliquée dans les réponses de l'hôte. Cependant, lors d'infections chronique, et notamment au cours de la

formation du biofilm, *P. aeruginosa* est capable de sélectionner des mutant non-flagellés pour échapper aux défenses de l'hôte (Mahenthiralingan *et al.*, 1994). Constitués essentiellement de monomères de piline (PilA), leur capacité de rétraction permet une mobilité de type « Twitching » et « Swarming », permettant une dispersion sur les surfaces humides (Mattick, 2002).

Ils sont également connus pour jouer un rôle crucial dans l'adhérence aux surfaces muqueuses et leur colonisation (Hahn *et al.*, 1997). Une altération de ces pili conduit à une diminution de l'adhérence aux cellules épithéliales *in vitro* (Hahn *et al.*, 1997 ; Comolli *et al.*, 1999). Leurs sites de liaison correspondent aux asialo-GM2 des membranes cellulaires épithéliales (Gupta *et al.*, 1994).

Ces constituées bactériennes cellulaires sont nécessaires pour l'expression de la virulence de *P. aeruginosa* dans un certain nombre de modèles infectieux (Cryz *et al.*, 1983 ; Pier *et al.*, 1992 ; Tang *et al.*, 1995 ; Tang *et al.*, 1996 ; Feldman *et al.*, 1998). De nouveaux appendices de surface de la famille des pili de type IVb ont été récemment mis évidence (Bentzman *et al.*, 2006). D'autres types de pili récemment mis en évidence chez *P. aeruginosa* sont impliqués dans l'adhérence aux surfaces inertes et dans la formation du biofilm. Il s'agit notamment des pili de type I dépendant d'une protéine chaperone CUP (Vallet *et al.*, 2001 ; Ruer *et al.*, 2007).

### **I.3.2.2. Lipopolysaccharides (LPS) :**

La membrane externe des bactéries à Gram négatif, est d'une part connue pour son rôle protecteur contre la lyse provoquée par le sérum et d'autre part pour son activité endotoxique. *P. aeruginosa* peut posséder deux types de LPS. Le LPS de type B, de haut poids moléculaire et le LPS de type A, qui ne possède que le *core-lipid A* contenant les chaînes d'acides gras. La composition en LPS, et la variation du niveau des bandes A ou B, peuvent être importantes pour l'attachement sur différents types de surface selon qu'elle est hydrophile ou hydrophobe (Makin et Beveridge, 1996). Il est également impliqué dans la stimulation de la réponse inflammatoire et dans les interactions avec les tissus hôtes. L'endotoxine est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort.

**I.3.2.3.L'alginate :**

Les alginates sont des exopolysaccharides visqueux et extracellulaires produites par *P. aeruginosa* durant les deux phases aigüe et chronique de l'infection. Ils sont composés de polymères répétés d'acide mannuronique et d'acide glucuronique et donnent à la bactérie un aspect mucoïde (Evans et Linker, 1973 ; Shanker *et al.*, 1995). La plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse des alginates sont regroupés sur un opéron contenant 12 gènes : *algD*, *alg8*, *alg44*, *algK*, *algE*, *algG*, *algX*, *algL*, *algI*, *algJ*, *algF* et *algA* (Chitnis et Ohman, 1993 ; Schurr *et al.*, 1993 ; Shankar *et al.*, 1995). Les gènes *algR*, *algP*, *algQ* et *algB* régulent la biosynthèse des alginates (Shankar *et al.*, 1995 ; Gacera, 1998).

**I.4.Les infections à *P. aeruginosa* :**

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste capable d'infecter une grande variété d'hôtes : humain, souris, insectes, nématodes, plantes et amibes (Rahme *et al.*, 1995 ; D'Argenio *et al.*, 2001 ; Pukatzki *et al.*, 2002). Chez l'homme, elle n'adhère pas à l'épithélium normal intact et ne provoque de maladie que lorsqu'il existe une défaillance du système immunitaire ou une lésion préexistante. *P. aeruginosa* colonise particulièrement les personnes immunodéprimées (patients atteints de leucémie, SIDA, cancer), les grands brûlés en soins intensifs ou atteints de la mucoviscidose (Lyczak, 2000 ; Bielecki *et al.*, 2008 ; Branski *et al.*, 2009).

Elle est capable de coloniser une grande diversité de tissus. Elle provoque des bactériémies, des infections intestinales, urinaires, des dermatites, des otites externes, des kératites ulcéreuses chez les porteurs de verres de contact, des infections de la peau chez les grands brûlés, des endocardites chez les patients abusant de drogues intraveineuses (Bielecki *et al.*, 2008 ; branski *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* est également capable de causer des méningites et des ostéomyélites en infectant le système nerveux central et les structures osseuses (Carek *et al.*, 2001).

**I.4.1. Infection aigüe :**

*P. aeruginosa* est capable de provoquer des infections aiguës des poumons, du système digestif, des voies urinaires et de la cornée (Lyczak *et al.*, 2000 ; Berthelot *et al.*, 2005). L'infection est caractérisée par sa rapidité et, elle est associée au mode de vie dit « planctonique » en opposition au mode de vie en biofilm. La bactérie est invasive et cytotoxique. Cette étape d'infection est caractérisée par un système de sécrétion de type trois fortement actif (Tang *et al.*, 1996 ; Comolli *et al.*, 1999 ; Ventre *et al.*, 2006 ; Hogardt

Heesemann, 2010). La sécrétion des exotoxines est abondante (Allewelt *et al.*, 2000 ; Shaver et Hauser, 2004 ; Lee *et al.*, 2005).

La bactérie induit une forte réponse inflammatoire. Les protéases et les toxines sont à l'origine de dommages tissulaires conduisant à l'invasion de la circulation sanguine et par conséquent à des septicémies. En effet la bactérie est capable de faire des ouvertures au niveau des jonctions situées entre les cellules épithéliales (Coraux *et al.*, 2004 ; Lau *et al.*, 2005 ; Zulianello *et al.*, 2006).

#### **I.4.2. Infection chronique :**

Plusieurs définitions ont été proposées pour définir l'infection chronique (Hoiby, 1977 ; Ballmann *et al.*, 1998 ; Lee *et al.*, 2003 ; Proesmans *et al.*, 2006). En effet, elle peut être définie comme une infection qui persiste malgré les thérapies de lutte d'un côté, les défenses immunitaires et la réponse inflammatoire de l'hôte de l'autre côté. Comme dans le cas de la mucoviscidose, une infection chronique est caractérisée par la persistance de la pathologie et des réponses immunitaires (Pressler *et al.*, 2011).

La bactérie est non invasive et non cytotoxique. Elle produit moins de facteurs de virulence extracellulaires. En outre, la bactérie perd certains facteurs de virulence les plus immunogènes comme les pili et le flagelle. Par conséquent, elle devient non mobile mais elle échappe à la clairance et aux réponses immunitaires de l'hôte. Elle surproduit des exopolysaccharides pour former un biofilm qui la protège contre les mécanismes de défense de l'hôte (Singh *et al.*, 2000 ; Ventre *et al.*, 2006 ; Hogardt et Heeseman, 2010). Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'installation de la bactérie sous forme de biofilm est à l'origine d'épisodes d'exacerbations aiguës qui entretiennent un cercle vicieux pro-inflammatoire. L'élimination totale du pathogène des voies bronchiques devient impossible et l'infection évolue vers une détérioration progressive définitive des fonctions respiratoires (Aebi *et al.*, 1995 ; Pier, 2000 ; Pier, 2002).

#### **I.5. Résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* :**

##### **I.5.1. Mécanismes de résistance aux $\beta$ -lactamines chez *P. aeruginosa* :**

###### **I.5.1.1. Résistance naturelle :**

*P. aeruginosa* possède une résistance à un grand nombre d'antibiotiques en raison de la production d'une  $\beta$ -lactamase chromosomique inductible de classe C. Cette enzyme n'est pas

inhibée par le clavulante. Cette résistance naturelle est due aussi à une mauvaise perméabilité membranaire. Il est donc naturellement résistant aux pénicillines des groupes V, G, M et A, à la plupart des céphalosporines de troisième génération et aux quinolones de première génération. *P. aeruginosa* est aussi généralement résistant à la kanamycine (Poole, 2004). A ces différents mécanismes, s'ajoute le système d'efflux actif Mex AB-OprM, produit constitutivement chez les bactéries sauvages. Ce système joue un rôle fondamental dans la résistance naturelle à de nombreux agents toxiques ou antibiotiques dont les  $\beta$ -lactamines (Livermore, 1995) et les aminosides (Masuda et Sakagawa, 2000). *P. aeruginosa* a toujours été considéré comme un micro-organisme difficile à traiter en raison de sa résistance aux antibiotiques. Il n'est sensible naturellement qu'à un nombre restreint d'antibiotiques.

## **I.5.2. Résistances acquises :**

### **I.5.2.1. Résistance enzymatique :**

Les  $\beta$ -lactamases sont des enzymes d'inactivation de type serine (classes A, C et D) ou métallo-enzymes (class B) dont les substrats sont des  $\beta$ -lactamines. L'inactivation enzymatique (perte de l'activité antibiotique) survient lors de l'ouverture du cycle  $\beta$ -lactame (Philippon et Arlet, 2006).

#### **I.5.2.1.1. Résistance par hyperproduction de la céphalosporinase AmpC :**

Les cephalosporinases appartiennent à la classe C de classification d'Ambler, ce sont des sérine-enzymes. Le mécanisme le plus fréquent est une hyperproduction constitutive de l'AmpC. La surproduction constitutive de l'enzyme AmpC affecte principalement l'activité de la ticarcilline, de l'association piperacilline/tazobactam, de la Cef tazidime, de l'Aztreonam et dans une moindre mesure du Cefepime.

Habituellement, l'enzyme est produite en petites quantités. Toutefois, la production d'AmpC chez *P. aeruginosa* peut augmenter de 10 à 1000 fois (Bagge et Ciofu, 2002). L'hyperproduction de céphalosporine de type AmpC permet *P. aeruginosa* de résister à toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception des carbapénèmes. Son action échappe l'action des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases comme l'action clavulanique ou tazobactam. La nouveauté de la résistance c'est la relation avec la quantité d'enzyme AmpC produite (Livermore, 1995). La cinétique d'hydrolyse n'est pas le reflet direct de l'activité enzymatique. En effet, l'efficacité d'AmpC dépend, à la fois, de la perméabilité de la membrane externe et de l'efflux des molécules d'antibiotiques (Bush et Jacoby, 1995).

**I.5.2.1.2. Résistance par production de  $\beta$ -lactamases de classe B :**

Les enzymes de ce groupe sont également connues sous le nom de carbapénémase ou métallo- $\beta$ -lactamase (MBL) en raison de la présence d'un ou deux atomes de  $Zn^{2+}$  dans leur actif pour hydrolyser des  $\beta$ -lactamines (Nordmann et Guibert, 1998). Seul le monobactam est épargné par les caractéristiques hydrolytiques des MBL. L'activité enzymatique des carbapénémases n'est inhibée ni par l'acide clavulanique ni par le tazobactam, mais par l'EDTA, qui chelate les ions zinc présents au niveau du site actif (Nordmann et Poirel, 2002). L'isolement des MBL transférables est en plusieurs familles : VIM, IMP, GIM, SIM, SPM ou NDM (Walsh, 2008 ; Yong *et al.*, 2009). IMP-1 a été isolé pour la première fois au Japon en 1990 sur un plasmide conjugatif dans une souche de *P. aeruginosa* (Queenan et Bush, 2007 ; Walsh, 2008). VIM-1 a été isolé pour la première fois en 1997 en Italie à Vérone dans une souche de *P. aeruginosa* (Lauretti *et al.*, 1999).

**I.5.2.2. Résistance non enzymatique :****1) Perte de la porine OprD2 :**

Le principal mécanisme par lequel *P. aeruginosa* acquiert une résistance aux carbapénèmes est la réduction de la perméabilité par perte de la porine OprD, voie préférentielle de pénétration des carbapénèmes. Ce mécanisme de résistance est stable depuis plusieurs années et est présent en France chez 15 à 20 % des souches. Cette perte de porine est en effet responsable d'une augmentation de la CMI, rendant la souche intermédiaire ou résistante aux carbapénèmes. Lorsqu'elle s'accompagne de l'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC, ou de l'hyper-expression du mécanisme d'efflux mexAB-oprM, les CMI peuvent être encore plus élevées (Livermore, 2002; Quale *et al.*, 2006).


**2) Surexpression de système d'efflux :**

Le système Mex-OprM, cause une résistance naturelle à la plupart des  $\beta$ -lactamines par dépression génétique. Il occasionne une résistance acquise à ces molécules. Les systèmes MexCD-OprJ et MexEF-OprN ne se manifestent pas normalement, mais suite à des mutations peuvent être responsables de résistances acquises multiples, dont le spectre est légèrement différent (Pechere, Kohler, 1999).

**I.5.2.2.1. Résistance aux Aminocyclitolides :**

La résistance aux fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* est due à la présence de mutation dans les Quinolone Résistance Determining Regions (QRDR), des gènes codant les cibles et à la surexpression du système d'efflux (Yoshida *et al.*, 1990).

Les mutations dans les QRDR des gènes *gyrA* et *gyrB*, *parC* et *parE* affectent la liaison des fluoroquinolones sur leurs cibles (Yoshida *et al.*, 1990 ; Hooper, 1999). Chez les souches cliniques de *P. aeruginosa*, l'altération des QRDR des sous unités *gyrB* et *parC* est peu fréquente. Elle conduit à une résistance modérée aux fluoroquinolones (Hooper, 1999). Par contre, les mutations dans le gène *gyrA* sont plus fréquentes et sont responsables d'une augmentation plus forte des CMI de la ciprofloxacines (CMI de 1 à 64 mg/L) (Akasaka *et al.*, 2001).



***Chapitre II :***

***Biofilm***

### II.1. Définition :

Le biofilm est une communauté de microorganismes fixés à une surface et généralement inclus dans une matrice extracellulaire (Carpentier et Cerf, 1993). Généralement est considérée comme biofilm toute association de microorganismes adhérant entre eux ou à une surface (Costerton, 1995). Cette définition regroupe des situations très différentes, depuis quelques bactéries adhérentes à une surface, à des biofilms épais présentant une diversité écologique importante, en passant par la flore commensale de la peau. On admet généralement que dans un écosystème donné le nombre de bactéries attachées aux surfaces est 1000 à 10 000 fois plus important que le nombre de bactéries planctoniques (Watkins et Costerton, 1984). Les biofilms sont ubiquitaires, ils concernent le monde animal, végétal, minéral, aquatique, technologique. Ces biofilms, de par leurs caractéristiques physiologiques et génomiques, ainsi que de par leur importance quantitative dans les écosystèmes, constituent une interface primordiale physiologiquement active (Campana *et al.*, 2002).

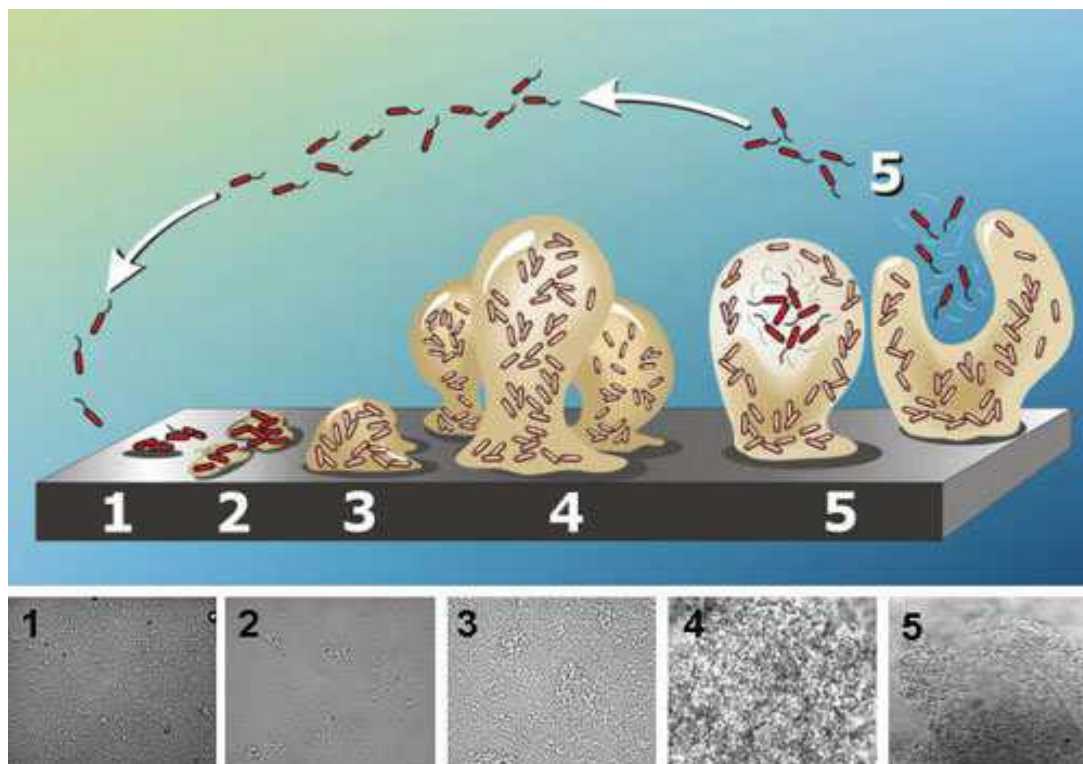
Les bactéries contenues dans un biofilm présentent des caractéristiques très différentes de leurs homologues planctoniques (bactéries libres en suspension) parmi lesquelles des modifications structurales (par exemple la disparition des flagelles (Flemming, 1990 ; Costerton *et al.*, 1995). La production d'exo-polymères, la mise en place d'un système de communication chimique (quorum sensing) (Parsek et Greenberg, 2000). Les augmentations significative de leur résistance aux agents antimicrobiens (désinfectants ou antibiotiques) et aux stress environnementaux (déshydratation, privation nutritionnelle, rayonnements ultraviolets...) (Morton *et al.*, 1998 ; Mah et O'Toole, 2001 ; Campanac *et al.*, 2002). Entre 3 et 50% du protéome total est modifié chez les bactéries des biofilms par rapport à celui des cellules planctoniques (Sauer, 2003 ; Jouenne *et al.*, 2004).

La structure du biofilm est renforcée par la matrice extracellulaire d'exo-polymères, constituée essentiellement d'exopolysaccharides (EPS) : Chez *P. aeruginosa*, cette matrice englobe d'autres molécules de nature organique et inorganique, jouant également un rôle dans la résistance aux stress environnementaux, par exemple l'ADN extracellulaire, les protéines et les rhamnolipides (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Pamp et Tolker-Nielsen, 2007). Cette matrice représente 85% du volume total et permet au biofilm de conserver une grande plasticité. Au sein du biofilm, les bactéries sont regroupées en micro colonies séparées par des canaux aqueux. Ce réseau de canaux assure le transport du dioxygène et des nutriments ainsi que l'évacuation des déchets. Ainsi, les constituants solubles capables de diffuser à travers la matrice peuvent être utilisés par les bactéries. Un gradient de nutriments et de dioxygène est

observable depuis le sommet du biofilm jusqu'à sa base ou un microenvironnement anaérobie (Beer *et al.*, 1994). Cette observation conforte l'idée selon laquelle l'état métabolique d'une bactérie à l'intérieur d'un biofilm dépend de sa localisation au sein de la structure (Filloux et Vallet, 2003).

### II.2. Formation des biofilms :

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (Characklis et Marshall, 1990 ; Lappin-Scott et Costerton, 1995). La constitution d'un biofilm mature nécessite plusieurs étapes.



**Figure n°2 :** Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm de *P. aeruginosa* et visualisation par microscopie à transmission : 1 adhésion réversible, 2 adhésion irréversible/formation de micro-colonies, 3 et 4 maturation, 5 détachement (Stoodley *et al.*, 2002).

#### II.2.1. Adhésion réversible :

La bactérie doit dans un premier temps approcher le support. Des mécanismes dans lesquels la cellule n'est pas active interviennent : mouvement brownien, sédimentation et transfert de

masse par convection (Yang *et al.*, 1999), mais aussi des mécanismes où la cellule est active comme le chimiotactisme et la mise en place d'appendices générateurs de mouvement tels que les flagelles (O'Toole et Kolter, 1998). Cette approche conduit à un attachement transitoire pendant lequel la bactérie va chercher à « évaluer » la surface sur laquelle elle se trouve. A ce stade (entre 20 et 50 nm du support), l'adhésion dite réversible, est due aux forces de Van der Waals, aux forces acide-base de Lewis et aux forces électrostatiques.

Les bactéries peuvent alors être remises en suspension sous l'effet des mouvements browniens, des forces de cisaillement du flux de liquide ou encore de la mobilité intrinsèque des cellules (Campanac, 2002).

Dans un deuxième temps, une association stable avec la surface s'établit grâce à des structures adhésives telles que des adhésions filamenteuses (fimbriae, pili) ou non (EPS, capsule) et à la mise en place de nombreuses liaisons de faible énergie comme les liaisons hydrogène, hydrophobes et les liaisons ioniques (Palmer *et al.*, 2007).

### **II.2.2. Adhésion irréversible :**

L'adhésion correspond à une fixation active et spécifique des micro-organismes sur une surface. Les structures d'adhésion varient selon les types de micro-organismes concernés.

Pour les bactéries Gram-négative, il s'agit des pili, des curli, des capsules et du glycocalix.

Pour les bactéries Gram-positives, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix.

Après une adhésion transitoire des bactéries, l'intervention des pili de type IV permet une adhésion permanente avec la surface ou avec d'autres microorganismes. Les pili de type IV sont des structures fibrillaires présentes chez certaines bactéries à Gram négatif dont le *P. aeruginosa* sont impliqués dans un type particulier de mobilité associée à la surface, la mobilité de type twitching, caractérisée par l'extension et la rétraction du pilus. Cette fonction permet aux pili de type IV l'approche et la colonisation de la surface (O'Toole et Kolter, 1998). Ainsi différents organites extracellulaires, le flagelle, les pili de type IV et les fimbriae, sont essentiels à la formation du biofilm et plus particulièrement dans sa phase initiale. L'attachement des bactéries déclenche la régulation génétique à induire la formation du biofilm et caractérisé par l'expression des substrats extracellulaires polymériques (SEP) (Renner et Weibel, 2011).

### II.2.3. Maturation :

La phase de stabilisation apparente, correspond à un équilibre dynamique avec perte de biomasse (mortalité et décrochement) et multiplication concomitante d'une partie de la biomasse fixée. Le point important est la diminution de l'activité métabolique globale. Celle-ci met en jeu des mécanismes qui peuvent expliquer, au moins en partie, la résistance des biofilm à certains antimicrobiens et son évolution en fonction de l'âge du biofilm. Ainsi, la biomasse adhérente est caractérisée par un taux de croissance faible qui selon certains auteurs (Nguyen *et al.*, 1989 ; Jacquelin *et al.*, 1994) serait corrélé à l'existence d'une masse active en « surface » du biofilm et d'une masse peu active à l'intérieur du biofilm. Les micro-colonies formées, véritables entités structurales et biologiques, pourraient également exprimer une immunogénicité spécifique. Au sein du biofilm, l'activité métabolique globale ralentit et l'architecture se modifie. Des canaux aqueux se créent entre les colonies permettant une circulation des nutriments, enzymes et déchets. Un gradient de nutriments et d'oxygène se crée, les cellules les plus proches du support étant les moins alimentées, en « dormance » et donc les mieux protégées vis-à-vis des agressions extérieures.

Le biofilm va donc acquérir une structure tridimensionnelle caractéristique et très bien décrite dans le cas de *P. aeruginosa*. Les unités de base ont été décrites comme des structures en forme de « champignons » (Dunne, 2002), au sein desquels les bactéries ne représentent que 10 à 15% associées à 75% à 90% de matrice extracellulaire (Costerton *et al.*, 1999).

Tout au long du processus de formation du biofilm, l'expression génomique est modifiée (Costerton *et al.*, 2003). Ceci conduit à des modifications phénotypiques drastiques que ce soit en termes de taille, de profil des protéines membranaire, d'hydrophobicité de surface,... Les échanges avec le milieu environnant persistent, conduisant à un remaniement constant de l'expression des gènes et donc du comportement et de la structure du biofilm. A ce stade, et bien qu'en perpétuelle évolution, le biofilm est caractérisé par une perte de sensibilité aux défenses immunitaires de l'hôte et aux traitements antimicrobiens qu'ils soient de nature physique ou chimique (Gray *et al.*, 1984 ; Costerton, 1984 ; Duguid *et al.*, 1992 ; Campanac *et al.*, 2002).

### II.2.4. Détachement :

Le détachement des cellules du biofilm est un phénomène complexe, peu exploré, faisant intervenir de nombreux mécanismes simultanément. Ceux du quorum sensing, déjà cités, sont

sans doute impliqués via la régulation de l'expression de gènes, notamment ceux impliqués dans la synthèse des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* (Davey *et al.*, 2003). La diminution de la quantité de nutriments pourrait aussi entraîner un détachement des cellules (Allison *et al.*, 1998) ont montré que dans un biofilm constitué de l'espèce *P. fluorescens* la diminution de la quantité de nutriments entraîne la sécrétion d'un polysaccharide lyase qui dégrade la matrice du biofilm, facilitant ainsi la libération des bactéries.

La mort des cellules du biofilm fait aussi partie du processus de renouvellement et de dispersion de la biomasse. Un mécanisme original régissant l'autorégulation de la population des biofilms est proposé par Webb *et al.* (2003). Les autres ont observé que dans un biofilm constitué de l'espèce *P. aeruginosa* la mort d'un grand nombre de cellules intervient régulièrement. Dans les effluents provenant du biofilm ils ont détecté un phage filamenteux capable d'infecter et de lyser une partie de la population du biofilm, tandis que l'autre partie des cellules semble résistante. Ce phage étant présent sous forme de prophage dans le génome de *P. aeruginosa*, les auteurs formulent l'hypothèse qu'il constituerait un mécanisme de différenciation des cellules à l'intérieur des micro-colonies, facilitant la dispersion d'une sous population résistant à la lyse (Webb *et al.*, 2003).

### **II.3. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm :**

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques de la surface sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (Donlan, 2002).

#### **II.3.1. Caractéristiques de la surface :**

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques sur une surface jouent une influence sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm.

##### **a. Rugosité de la surface.**

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante (Characklis, 1990). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la

présence d'aspérités (Donlon, 2002). Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses (Donlon et Costerton, 2002). Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques.

### **b. Propriétés physico-chimiques de la surface.**

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les microorganismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le verre ou les métaux. Les cellules sont capables d'outre passer les forces répulsives que peuvent exercer sur elles le substrat, via l'action de liaison hydrophobes (Bendinger, 1993).

### **c. Présence de films protéiques sur la surface.**

La présence de polymère sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface et a une influence directe sur l'attachement de bactérie à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel, les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactérie à sa surface et favorise la formation de biofilm (Mittelman, 1996).

La nature de ces films protéiques est différente selon les milieux. Prenons l'exemple des bactéries formant le biofilm de la plaque dentaire. Elles se fixent sur un film protéique, présent à la surface de l'émail dentaire et composé d'albumine, de lysozymes, de glycoprotéines, de phosphoprotéines et de lipides (Donlon, 2002). La présence de films protéiques sur des implants médicaux en contact direct avec un fluide favorisent la formation de biofilm. Par exemple, les cathéters veineux centraux, en contact directe avec le sang, sont recouverts de plaquettes, de plasma et de protéines : albumine, fibrinogène, fibronectine, laminine... (Goller, 2008).

### **d. L'attachement à une matrice protéique :**

C'est la première étape de formation d'un biofilm dans le corps humain (Otto, 2008). Par exemple, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* expriment à leur surface des molécules, les MSCRAMM11, capables de se lier aux molécules adhésives des matrices protéiques, comme le fibrinogène ou la fibronectine (Patti, 1994). Ces interactions spécifiques

entre matrice protéique de 900 très importantes pour l'établissement de la colonisation bactérienne.

### II.3.2. Caractéristiques du milieu :

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs. On peut citer les facteurs suivants (O'Toole, 2000 ; Donlon, 2002 ; Martiner, 2007 ; Goller, 2008) :

- Température
- pH : conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité (Martinez, 2007),
- Concentration en oxygène.
- Concentration en fer.
- Osmolarité.
- Présence d'ions spécifiques.
- Sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (Martinez, 2007).
- Concentrations en nutriments : dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (Spormann, 2008).
- Concentration en certains cations : l'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium  $\text{Na}^+$ , Calcium  $\text{Ca}^+$ , ion ferrique  $\text{Fe}^{3+}$ , ion lanthanum) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (Fletcher, 1988).
- Hydrodynamique du fluide : selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les microorganismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (Donlan, 2002).
- Saison : il existerait un effet saisonnier sur la formation de biofilms (Donlan, 1994).

La formation d'un biofilm dépend, selon les bactéries, de conditions environnementales différentes. Par exemple, *P. aeruginosa* peut former des biofilms dans n'importe quelles conditions alors que d'autres bactéries nécessitent des conditions particulières de température, de pH ou encore de nutrition. Certaines bactéries peuvent s'adapter à des milieux par des modifications génétiques (Clutterbuck, 2007). Des conditions environnementales stressantes (fortes concentration de sels, de sucres, d'alcools, hautes températures, variations extrêmes du pH) inhibent la biosynthèse du flagelle (Goller, 2008).

### II.3.3. Propriétés des cellules :

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae, de flagelles et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette dernière, moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dès leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides...Il peut y voir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (Donlan, 2002).

La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules (stimulation de la synthèse si déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*Escherichia coli*) et par les conditions environnementales (pas de synthèse si pH bas, température basse ou forte osmolarité) (Goller, 2008). L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de phosphorylation.

Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codant pour des caractères de mobilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes : faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate et fer ; microaérophilie et croissance ralentie (Goller, 2008).

### II.4. Régulation de la formation de biofilm :

#### II.4.1. Quorum sensing :

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de Quorum-Sensing (QS). Il s'agit de mécanismes de contrôle au sein des cellules, matérialisés par des signaux de cellule à cellule et dépendant de la quantité de cellule présentes : on parle de mécanisme de perception de densité cellulaire. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (Tomlin *et al.*, 2005). Une fois que les concentrations en molécules signal atteignent une valeur seuil, des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (Clutterbuck *et al.*, 2007 ; Irie et Parsek, 2008). Des mutations de gène impliqué dans les mécanismes de QS entraînent des répercussions sur les stades tardifs de formation des biofilms. Cependant ces phénomènes sont très variables d'une espèce bactérienne à l'autre. Ces gènes exercent un contrôle sur une grande partie de l'expression du transcriptome et du protéome, permettant de réguler positivement ou négativement la croissance en biofilm.

##### II.4.1.1. Les molécules de quorum sensing :

Les molécules du QS sont nombreuses (Lazdunski *et al.*, 2004). La majorité des bactéries utilisent des peptides auto-inducteurs (Type AI-2), dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés). On trouve aussi des N-acylhomosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries. Ces molécules du QS peuvent être dégradées par des enzymes : AHL-lactonases et AHL-acylases. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du QS au sein d'un biofilm (Irie et Parsek, 2008).

##### II.4.1.2. Rôles de quorum sensing :

Le QS régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm et en prenant en compte les conditions environnementales. Il initie les phénomènes de dispersion et d'essaimage de bactéries planctoniques à partir du biofilm (Irie et Parsek, 2008). Le QS aurait aussi un rôle dans l'épaisseur du biofilm (Clutterbuk *et al.*, 2007). Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme des protéases (Clutterbuk *et al.*, 2007 ; Irie et Parsek, 2008). Les molécules du QS jouent aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme des protozoaires tels que *Serratia marcescens* (Queck *et al.*, 2006). Les synergies observées au sein des biofilms constitués de différentes espèces de

micro-organismes sont permises grâce aux molécules intervenant dans le QS (Bjarnsholt *et al.*, 2005). Les biofilms composés de plusieurs communautés de bactérie d'espèces différentes ont de fortes concentrations en molécules du QS, compte-tenu de la densité élevée de cellule présentes.

Parmi les autres mécanismes régulateurs de la formation et de la maturation de biofilms, les polysaccharides présents à la surface des cellules jouent un rôle important dans les interactions entre bactéries et leur environnement immédiat. Par exemple, on trouve à la surface d'*Echerichia coli* une endotoxine faisant partie du lipopolysaccharide (LPS) et l'antigène polysaccharide de capsule K. les lipopolysaccharide font partie de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif. Ils peuvent inhiber ou stimuler la formation de biofilm selon les cas (Decho, 2010). Les polysaccharides des capsules sont des facteurs de virulences ; ils protègent les bactéries des défenses immunitaires de l'hôte (par exemple de la phagocytose) (Beloin *et al.*, 2008).

Par ailleurs, un biofilm mature peut être considéré comme l'ensemble de plusieurs sous-populations bactériennes. Ces sous-populations sont le résultat de différents microenvironnements localisés dans le biofilm. Ainsi certains sous-populations seront plutôt actives et produiront des EPS, alors que d'autres seront métaboliquement inactives ou en train de mourir (Stewart et Franklin, 2008). La lyse et la mort cellulaire contrôle pendant la maturation du biofilm ou par des phénomènes de fratricide apportent des nutriments et de l'ADN extracellulaire au reste de la population bactérienne. L'ADN ainsi libéré est un constituant essentiel de la matrice (Whitchurch *et al.*, 2002 ; Steinberger et Holden, 2005).

### **II.4.2. Le lien entre Quorum Sensing, biofilm et infection à *P. aeruginosa***

La capacité de *P. aeruginosa* à former des biofilms *in vitro* et *in vivo* a conduit à considérer ce mode de vie comme une étape clé dans certains processus infectieux à *P. aeruginosa* (Ruimy et Andremont, 2004). Ainsi, au niveau pulmonaire, de nombreux patients peuvent présenter une étape de colonisation. Le développement d'une forme biofilm, avec multiplication des bactéries adhérees, correspond au passage au stade d'infection.

Différents travaux ont mis en évidence le lien entre QS et pathologie liée à *P. aeruginosa*. Ainsi, dans le modèle de pneumopathie à *P. aeruginosa* chez la souris nouveau-née, la souche PAO1 produit des lésions pulmonaires inflammatoires avec un infiltrat de polynucléaires. Le mutant correspondant *lasR* est responsable d'une pneumonie moins sévère, avec une mortalité réduite (Tang *et al.*, 1996 ; Pearson *et al.*, 2000).

De manière globale, une réduction de la virulence est observée chez les mutants affectant les gènes du QS. La même implication du QS est notée pour des modèles d'infection cutanée à *P. aeruginosa* (Rumbaugh *et al.*, 2000).

Lors d'une étude récente sur souris C57BL/6 instillées par un inoculum de *P. aeruginosa* inclut dans des billes d'agarose, Pierre *et al.* (2008) ont étudié la cinétique d'expression de trois gènes de virulence de *P. aeruginosa* appartenant à des systèmes de régulation différents (*exoS*, *lasI* et *algD*) durant les 7 premiers jours de l'infection. Les auteurs ont observé une diminution progressive de l'expression du gène *exo S* et une augmentation de l'expression des gènes *algD* et *lasI*. Ces observations sont en accord avec une perte progressive de la fonctionnalité du système de sécrétion de type III et un développement du phénotype mucoïde avec production d'alginate au cours de l'infection.

La capacité à former des biofilms de *P. aeruginosa* représente la principale cause de persistance des pneumopathies chez les patients mucoviscidosiques (Costerton *et al.*, 1999). Lors de la formation du biofilm, la quantité d'A1-1 ne peut être suffisante pour déclencher l'activation de l'expression de gènes que lorsque les bactéries sont déjà nombreuses. Davies *et al.* (1998) ont observé la formation de biofilms chez des mutants *lasI* et *rhl* de *P. aeruginosa*, montrant que lors des étapes précoces de la formation du biofilm les deux mutants étaient capables d'adhérer au support et de former des micro-colonies semblables à celles observées avec la souche sauvage. En revanche, pendant la phase de maturation seul le mutant *rhl* formait des biofilms semblables à ceux observés avec la souche sauvage, tandis que le mutant *las* formait des biofilms moins épais, sensibles à l'action du SDS 0.2%. L'addition d'A1-1 dans le milieu restaure le phénotype sauvage.

L'étude de Sauer *et al.*, (2002) a permis de distinguer cinq étapes différentes lors du développement de *P. aeruginosa* sous forme de biofilms en milieu minimum : l'attachement réversible, l'attachement irréversible, deux étapes de maturation et la dispersion (Sauer *et al.*, 2002). A chacune de ces étapes correspond l'expression de phénotypes particuliers, différent entre eux par l'expression d'au moins 500 protéines. Par ailleurs les auteurs ont aussi observé que l'expression de *lasI* est plus importante dans les étapes de maturation du biofilm. Le mutant *lasI* présente une matrice exopolysaccharidique nettement différente de celle observée chez la souche sauvage: EPS essentiellement en surface des cellules, ne remplissant pas les espaces interstitiels du biofilm.

L'étude récente de Davey *et al.*, (2003) confirme et apporte des explications à ces observations. Elle semble démontrer que la différenciation du biofilm en une forme mature "vascularisée" grâce à la formation de canaux aqueux serait due à la sécrétion de rhamnolipide

(biosurfactant) par *P. aeruginosa*. Le rhamnolipide ne serait pas nécessaire à la formation de canaux, en revanche il empêcherait la colonisation de ces canaux par les cellules en phase planctonique et pourrait avoir un rôle dans le détachement de micro-colonies du biofilm. L'expression du gène codant pour le rhamnolipide étant régulée par les systèmes *RhlI-RhlR* et *LasI-LasR*, ces observations permettent d'expliquer les études précédentes (Espinosa-Urgel, 2003).

L'importance des AI-1 dans la formation des biofilms a été mise en évidence chez d'autres espèces : *Chromobacterium violaceum* (Martinelli *et al.*, 2004), *Aeromonas hydrophila* (Lynch *et al.*, 2002), *Burkholderia cepacia* (Conway *et al.*, 2002),... Chez ces espèces, les AI-1 interviennent aussi dans les étapes de maturation des biofilms.

Parallèlement, Riedel *et al.* (2001) ont mis en évidence la possibilité d'une communication entre espèces bactériennes d'un biofilm via un AI-1. Ils ont étudié des biofilms intra pulmonaires chez la souris. Ces biofilms étaient constitués de deux espèces: *P. aeruginosa* et *B. cepacia* (Riedel *et al.*, 2001), qui sont fréquemment isolées lors d'infections pulmonaires chez des patients atteints de cystite fibreuse. Lors de ces infections, *P. aeruginosa* se développe dans les sécrétions bronchiques et forme des structures apparentées aux biofilms, sécrétant notamment des homosérines lactones de type 1 (Singh *et al.*, 2000). Les auteurs ont montré que les homosérines sécrétées par *P. aeruginosa* peuvent réguler l'expression de protéases de *B. cepacia* impliquées dans la virulence, tandis que les homosérines sécrétées par *B. cepacia* n'interagissent pas avec *P. aeruginosa* (Riedel *et al.*, 2001).

L'action du QS peut également s'exprimer au niveau de l'hôte. Ainsi, Williams *et al.* ont démontré que les AI de *P. aeruginosa* sont capables d'altérer la réponse immunitaire sur cellules eucaryotes (Williams *et al.*, 2004). Ainsi, la 3-oxo-C12-HSL stimule la production d'IL8 par les cellules épithéliales pulmonaires (Smith *et al.*, 2002) et influence également le processus d'apoptose des macrophages et polynucléaires neutrophiles (Tateda *et al.*, 2003).

Différentes études cliniques ont été réalisées afin de démontrer l'importance du QS dans les infections broncho-pulmonaires à *P. aeruginosa* chez des patients mucoviscidosiques.

L'ensemble de ces données démontre le lien entre QS, formation de biofilm et pneumopathies à *P. aeruginosa* et constitue l'introduction à une nouvelle approche thérapeutique ciblée sur le QS et/ou la formation de biofilm.

***Chapitre III :***

***Généralité sur Prunus  
persica***

### III.1. Historique :

En France, des noyaux de pêches ont été retrouvés parmi les vestiges archéologiques de l'époque gallo-romaine à saintes (visibles au Musée archéologique). Le pêcher est cultivé depuis le Moyen Age. L'apparition de l'espalier au XVII<sup>e</sup> siècle a contribué à l'extension de sa culture. A Versailles, dans le jardin fruitier du Roi Soleil, il existait déjà une quarantaine de variétés différentes dont les noms évoquaient parfois les charmes féminins : « Téton de vénus », « Belle de Chevreuse », « Grosse Mignone ».

Le pêcher est un petit arbre cultivé depuis l'Antiquité dans le bassin méditerranéen. En se fondant sur la littérature classique (Hedrick, 1919) avait conclu que le pêcher était arrivé en Grèce au IV<sup>e</sup> siècle avant notre ère, en provenance de Perse. Toutefois, une découverte récente de restes de pêcher datant du VII<sup>e</sup> siècle avant notre ère, dans l'île de Samos, indique que le pêcher pourrait être arrivé plusieurs siècles plus tôt (Daniel et Maria, 2012).

Les Romains ne l'ont pas cultivé avant le 1<sup>er</sup> siècle avant notre ère. A l'époque de pline l'ancien, les romains cultivaient cinq variétés de pêcher qu'ils dénommaient *malumpersicm* « pomme de perse ». Le latin *persicum* a donné l'italien *pesca*, le français pêche et l'anglais peach. L'origine supposée persane explique aussi le nom spécifique donné par Linné, *Prunus persica*, « prunus de Perse ». Mais en fait, le pêcher est arrivé en Perse par la route de la soie en provenance de chine.

### III.2. Répartition :

Bien qu'originnaire de chine, le pêcher n'existe plus véritablement à l'état sauvage (référence Flora of chine (archive) : *Amygdalus persica* (archive)). Le pêcher est cultivé pour ses fruits ou pour l'ornement dans les régions tempérées ou subtropicales du globe.

### III.3. Description :

*Prunus persica* L. de lot (Peach) nommé comme *Amygdalus persica* est un arbre à feuilles caduques de la sous-famille des Prunoideae de la famille des Rosaceae, avec une hauteur de 5 à 10 m et est couramment cultivé en Asie du Sud-Ouest, Europe, Himalaya et l'Inde jusqu'à une altitude de 1000 pieds. Il y a environ 100 genres et 3000 espèces dans la famille des rosacées (Judd et coll, 1999). *Prunus* a près de 200 espèces cultivées pour leurs fruits comestibles et les graines (Rheder, 1940). Les feuilles sont vermifuges, insecticide, sédative, diurétique adoucissantes, expectorant, vermifuge et sont utilisés en leucoderme et en tas. Pate de feuilles est utilisée pour tuer les vers dans les plaies et les infections fongiques. Le

traitement de la bronchite chronique est réalisé en interne avec des feuilles (Fatma et Basu, 1984). Elles ont anti-oxydante majeurs, tels que prunétine, quercétine et kaempférol (Jung *et al.*, 2002). Les fleurs sont considérées comme laxatives et diurétique et utilisé pour traiter la constipation et l'œdème. Le fruit de la pêche est favorisé autour de la monde, y compris au japon. Graines de pêche mélangé avec diverses plantes on a prescrit comme les remèdes traditionnels chinois d'athérosclérose (Zhang *et al.*, 2009).

➤ **Classification :** (Cronquist, 1981).

**Règne :** Plantae  
**Sous-règne :** Tracheabionta  
**Division :** Magnoliophyta  
**Classe :** Magnoliopsida  
**Sous-classe :** Rosidae  
**Ordre :** Rosales  
**Famille :** Rosaceae  
**Genre :** *Prunus*  
**Espèce :** *Prunus persica*



Figure n°3 : *Prunus persica*

#### III.4. Propriété chimique :

Pêche a une teneur de 86-89% d'eau, une teneur en sucre de 7.5-8.5% (principalement saccharose, glucose et fructose), une teneur en protéine de 0.6 à 1.2%, une teneur en matières grasses de 0.3%, une teneur en fibre de 1.2 à 1.4% de principalement la cellulose, pectines et hémicellulose), une teneur en acide de 0.63%, une teneur en sels minéraux 0.8% de potassium étant le constituant principal. Plusieurs vitamines (principalement du groupe B et C) et une teneur en caroténoïdes de 0.20 à 0.80% carotène principalement  $\beta$ .

Le totale des acides présents dans les pêches sont l'acide malique et dans une moindre proportion, l'acide citrique et l'acide quinique. Il contient également des composés phénoliques, catequines et leu Co anthocyanines.

L'intérêt pour la composition phénolique des fruits tient à la corrélation entre les polyphénols totaux et l'activité antioxydant. Les principaux composés phénoliques de la pêche sont des tanins condensés, des acides chlorogéniques et quelques flavanols et pigments d'anthocyanosides.

- Les pêches fraîches contiennent des acides chlorogéniques, toutefois en quantité bien moindre que les prunes. Ces acides ont une activité antioxydant et anxiolytique (à forte dose).
- Les pêches fraîches contiennent des flavanols (catéchol, épicatechol) ainsi que des oligomères de flavanols, appelés tanins condensés ou proanthocyanidols. Ces composés que l'on trouve aussi dans le raisin et la prune ont une activité vasodilatatrice.
- Les anthocyanosides sont des pigments responsables de la coloration rouge des pêches. Le composé anthocyanosidique principale est le cyanidol 3-O-glycoside avec des contributions du cyanidol 3-O-rutoside.

Des mesures comparatives effectuées sur des pêches et des poires cultivées dans des vergers expérimentaux, soit en agriculture biologique soit par les méthodes conventionnelles ; ont montré que les fruits biologique étaient plus riches en composés phénoliques (Marina et Maria, 2001).

### **III.5. Culture :**

Le pêcher a une tendance non apicale, c'est-à-dire que lors d'une taille, il repart plutôt de la base au détriment de la cime. Il est difficile de les cultiver en pot à moins de les remettre en pleine terre régulièrement pour leur redonner de la vigueur.

Le pêcher est cultivé soit en plein-vent, notamment dans les vignes d'Europe, soit en espalier.

La récolte manuelle des pêches a lieu en été ; les fruits, fragiles, sont rapidement placés en chambre froide.

La multiplication se fait par semis ou par multiplication végétative. On peut utiliser comme porte-greffe, selon le type de sol :

- Un pêcher franc (Chanturgue, GF 305) ;
- Un prunier 'Ferdor' ;
- Un hybride pêcher amandier 'GF 677'.

Certaines variétés telles que la « pêche de vigne » ou la « reine des vergers » se multiplient fidèlement par semis. Le pêcher fructifie généralement vers l'âge de 7 ans et peut produire des fruits pendant 12,5 à 20 ans. Le pêcher est une espèce à autogamie préférentielle.

En France, la culture est concentrée dans les régions méridionales. La variété des pêches est très grande, on distingue (Claire Doré, 2006) :

- Les variétés adaptées au climat tempéré, à long repos hivernal ;
- Les variétés adaptées au climat subtropical, à faible repos hivernal.

### III.6. Caractérisation moléculaire :

Pour chaque adhésion, les jeunes feuilles ont été recueillies sur un arbre. L'extraction d'ADN a été effectuée (Shagai Maroof *et al.*, 1984). Seize paires d'amorces ont été choisies parmi la bibliothèque génomique CT enrichi de la pêche (INRA Bordeaux, France) sur la base de leur reproductibilité et haute puissance de discrimination fondée sur la pêche (Testolin *et al.*, 2000 ; Aranzana *et al.*, 2002 ; Dirlewanger *et al.*, 2002)

### III.7. Variétés :

Il existe des centaines de variétés de *Prunus persica*. Outre *Prunus persica* var. *persica*, qui donne des pêches au sens où on l'entend habituellement (fruits à peau duveteuse), citons :

- *Prunus persica* forme compressée, le pêcher à pêche plate chinoise
- *Prunus persica* var. *nuci persica*, qui donne le brugnon ou la nectarine
- *Prunus persica* 'Atropurpurea', le pêcher pourpre (arbre ornemental à feuillage pourpre).

Pour *Prunus persica* var. *persica*, voici quelques-unes de ses variétés intéressantes :

- 'Amsden' : pêche blanche, floraison précoce, bonne résistance à la cloque
- 'Sanguine vineuse' ou 'Pêche de vigne' : fruit à chair rouge et fondante, saveur délicate, floraison tardive.
- 'Reine des vergers' : variété ancienne, fruits à chair blanche, sucrée et juteuse
- 'Grosse mignonne' : variété ancienne à chair blanche, très sucrée et parfumée, résistante aux maladies
- 'Belle impériale' : variété ancienne, fruits à chair blanche, très gros et parfumés

### III.8. Propriétés pharmacologiques et thérapeutiques

*Prunus persica* est une plante croître dans la région tempérée utilisée comme laxatif, sédatif, anticancéreux et se composer également des glycosides, des flavonoïdes, des anthocyanines, des vitamines etc (Deb *et al.*, 2010). Le fruit est favorisé autour du monde, incluant au Japon. Où les raines de pêche ont été mélangées à des diverses plantes prescrits en tant que médecines traditionnelles chinoises pour l'athérosclérose (Zhang *et al.*, 2009). Pulpe de pêche montre également une certaine bioactivité, y compris l'atténuation induite par la chimiothérapie de hépatotoxicité (Lee *et al.*, 2008) et l'inhibition de l'activité inflammatoire allergique (Shin *et al.*, 2010).

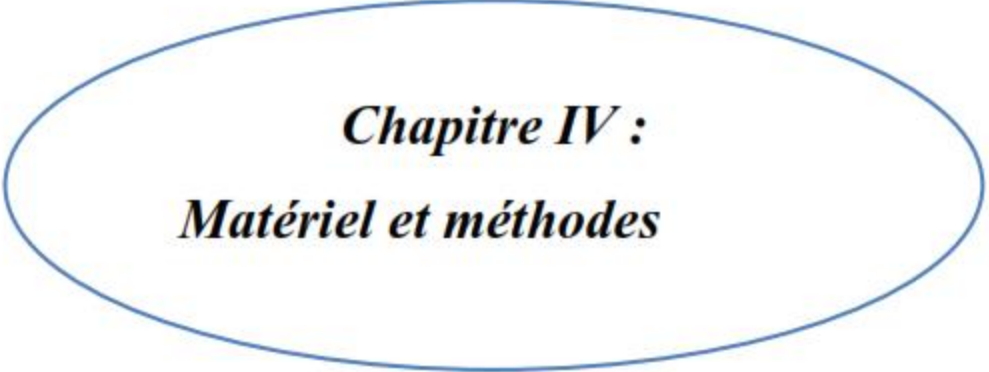
Les feuilles de la pêche ont antioxydants principaux, tels que le prunetin, la quercétine et le kaempferol (Jung *et al.*, 2002). Elles sont insecticide, sédatif, diurétique, adoucissant, l'expectorant, vermicide et sont employés dans le leucoderme, dans les piles, le traitement de la gastrite, la coqueluche et la bronchite chronique. La pâte de feuille est employée pour tuer des vers dans les blessures et infections fongiques (Kritikar et Basu, 1984). Extrait des feuilles montre effet hépatoprotecteur contre des lésions hépatiques induites par tétrachlorure de carbone chez le rat (Preeti *et al.*, 2010).

### III.9. Propriété antibactérienne :

Une étude de l'activité biologique d'écorce de *P. persica* montre que l'extrait méthanolique exerce une activité antibactérienne significative contre la *Klebsiella pneumonia* et *Enterococcus faecalis*. La fraction d'éther de pétrole a également démontré une activité antibactérienne significative contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. La fraction de dichlorométhane a inhibé la croissance d'*E. coli* et *K. pneumoniae*. La fraction d'éthyle acétate a indiqué une activité significative contre *E. faecalis*. La fraction méthanoïque de *P. persica* inhibe significativement la croissance de *K. pneumoniae* et *E. faecalis*, alors qu'aucune activité a été indiquée par *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhi* et *S. flexenari* (Sumaira et Habib, 2012).

En Inde, l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de graine de *Prunus persica* seul et en association avec l'extrait méthanolique de *Annona squamosa* a été mis en évidence par la méthode de diffusion en milieu gélose milieu gélosé vis-à-vis des isolats cliniques a coloration de gram négatifs (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*,

*Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella paratyphi*) et coloration de gram positifs (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*) (Anup *et al.*, 2013).



***Chapitre IV :***  
***Matériel et méthodes***

### **IV. Isolement de *Pseudomonas aeruginosa*:**

#### **IV.1. Obtention des bactéries :**

Les isolats de *P. aeruginosa* incluses dans cette étude ont été isolés à partir des prélèvements cliniques au niveau du laboratoire du service de Bactériologie de l'hôpital de «Mostaganem»

##### **a- Enrichissement :**

L'enrichissement des échantillons a été réalisé par incubation en milieu BN (Bouillon nutritif) pendant 24h

##### **b- L'ensemencement sur la gélose nutritive (GN)**

Après l'enrichissement des prélèvements, nous avons fait l'ensemencement sur milieu GN. Les boîtes ensemencées sont incubées en aérobiose pendant 24h à 37°C.

#### **IV.2. Identification de *P. aeruginosa* :**

L'identification des isolats a été fait en comparaison avec la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853

##### **IV.2.1. Etude macroscopique des colonies :**

Dans cette étude il a été pris en considération les caractères suivants: la forme, l'aspect et la couleur des colonies.

##### **IV.2.2. Etude microscopique :**

Cette étude est réalisée par une coloration de Gram qui permet de connaître le type de Gram des bactéries ainsi que leur morphologie (bâtonnet ou cocci).

##### **IV.2.3. Croissance à 4°C et 42°C :**

Les isolats sont ensemencées dans des boîtes de pétri contenant le milieu GN, ensuite elles sont incubées à 4°C et 42°C pendant 48 heures. La lecture se base sur la présence ou l'absence de croissance.

### **IV.2.4. Production des pigments :**

*P. aeruginosa* secrètent les deux pigments, pyocyanine et pyoverdine. L'observation de la pyocyanine identifie même l'espèce car c'est la seule à produire ce pigment. Cependant *P. aeruginosa* peut perdre par mutation la capacité de synthèse de l'un ou l'autre de ces pigments.

La présence des pigments fluorescents jaune verdâtre (pyoverdine) est testée sur le milieu King B, la production d'un pigment bleu (pyocyanine) est vérifiée sur milieu King A respectivement par la méthode de stries simple.

L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 heures.

### **IV.2.5. Identification biochimique:**

#### **IV.2.5.1. Production de catalase :**

Ce test est basé sur la détection de l'enzyme catalase produite par la bactérie. Il s'agit de mettre en contact une colonie bactérienne avec une goutte d'eau oxygénée. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un dégagement gazeux sous forme de mousse ou de bulles.

#### **IV.2.5.2. Production d'oxydase :**

Ce test est basé sur la détection de la production de l'enzyme cytochrome oxydase. Il s'agit de mettre en contact une colonie bactérienne avec un disque d'oxydase. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette, soit immédiatement, soit après quelques secondes. La lecture est limitée à 30s.

#### **IV.2.5.3. Utilisation des sucres, production de gaz et d'H<sub>2</sub>S :**

Ce test est réalisé sur un milieu gélosé incliné T.S.I (Triple Sugar Iron), qui permet d'étudier l'utilisation du lactose, du saccharose, la fermentation du glucose et la production des gaz et d'H<sub>2</sub>S. L'ensemencement des tubes est réalisé par des stries sur la pente et par piqure central à partir d'une culture sur milieu gélosé. L'incubation se fait à 30°C pendant 24h.

### IV.2.5.4. test de mobilité et utilisation du mannitol

Le milieu mannitol mobilité est ensemencé par pique centrale jusqu'au fond du tube et incubé pendant 24h à 37°C. Si le milieu devient jaune la bactérie est mannitol (+) et s'il y a présence d'un trouble cela indique que la bactérie est mobile.

### IV.2.5.5. Test de rouge de méthyle (RM) et vogues –proskauer (VP) :

Ces tests sont réalisés en utilisant le milieu Clark et Lubs (bouillon réparti dans des tubes standards), l'ensemencement des deux tubes de Clark et Lubs se fait par inoculation, l'incubation est réalisée à 30°C pendant 24h. Au moment de la lecture des résultats on ajoute au premier tube, 3 gouttes de RM et dans le deuxième tube, on additionne 3 gouttes de VP<sub>1</sub> (α naphthol) et 3 gouttes de KOH.

La coloration rouge dans le test de rouge de méthyle montre un milieu relativement acide (glucose convertis en produits acides tels que le lactate, l'acétate et le formate), la bactérie est dite rouge de méthyle positif (RM+). La coloration jaune indique un résultat négatif.

L'apparition d'un anneau rouge (en surface) dans le test de VP signifie la présence d'acétoïne et la fermentation du glucose par la voie butylène glycolique, la souche est dite VP positif.

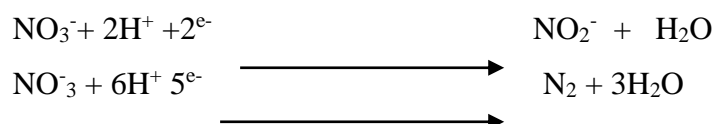
L'absence de l'anneau rouge, signifie l'absence d'acétoïne, la souche est dite VP négative.

### IV.2.5.6. Utilisation de citrate

Le caractère recherché est l'utilisation du citrate comme seule source de carbone. Le milieu utilisé est le citrate de simmons, ensemencé par stries longitudinales, ensuite met en incubation pendant 24h heures à 37°C. Le virage de l'indicateur de pH au bleu est due à l'alcalisation du milieu et la souche est dite citrate (+).

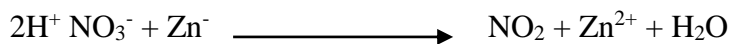
### IV.2.5.7. Recherche de la nitrate-réductase

Le nitrate réductase est une enzyme qui catalyse la réaction de réduction des nitrates en nitrites dont leur mise en évidence est réalisée en utilisant le réactif de Griess. Parfois, certaines bactéries peuvent pour suivre cette réduction, jusqu'à une dénitrification.



Le réactif de Griess, prend une teinte rouge-orangé en présence d'ion nitrites.

L'absence de coloration rouge ne signifie pas obligatoirement que la bactérie testée ne possède pas de nitrate-réductase, car elle peut posséder une nitrate-réductase très active qui est capable de réduire les nitrates jusqu'au stade diazote  $N_2$  et une bactérie possédant une telle enzyme consomme tous les nitrates du milieu. Dans ce cas le test est complété par l'épreuve de Zo-Bell en ajoutant la poudre de zinc qui est un composé capable de réduire les ions nitrates en ions nitrites :



L'apparition d'une teinte rouge indique la formation d'ions nitrites par l'action du zinc, donc ça signifie la présence des ions nitrates dans le milieu, donc la bactérie ne possède pas de nitrate-réductase. A l'inverse, l'absence de coloration rouge indique qu'il n'y a plus d'ions nitrates dans le milieu pour réagir avec le zinc, donc la bactérie possède une nitrate-réductase très active qui a consommé tous les ions nitrates.

#### IV.2.6. La galerie API 20 NE :

Les trois isolats ont fait l'objet d'une identification biochimique avec le système API 20 NE. La galerie biochimique API 20 NE est un système miniaturisé, prêt à l'emploi et standardisé. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique stérile. Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (Kerr, 1996).

La galerie API 20NE permet d'effectuer les tests suivants :  $NO_3$  (réduction des Nitrates), TRP (formation d'indole (Tryptophane), GLU (fermentation (GLUcose), ADH (Arginine DiHydrolase), URE (UREase), ESC (hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase) (ESCuline), GEL (synthèse d'une gélatinase), PNPG ( $\beta$ -galactosidase (Para-NitroPhényl- $\beta$ d-Galactopyranosidase), GLU (assimilation (GLUcose), ARA (assimilation (ARAbinose), MNE (assimilation (ManNosE), MAN (assimilation MANnitole), NAG (assimilation (N-Acétyle-Glucosamine), MAL (assimilation (MALtose), GNT (assimilation (potassium GlucoNaTe), CAP (assimilation (acide CAPrique), ADI (assimilation (acide ADIrique), MLT (assimilation (MaLaTe), CIT (assimilation (trisodium CITrate), PAC (assimilation (acide PhénylACétique) (Kerr A, 1996).



**Figure n° 4 :** La galerie biochimique API 20 NE

### **IV.2.7. Conservation des isolats :**

Les isolats purifiées et identifiées sont conservées à 4°C dans des tubes de gélose nutritive (GN) incliné, inoculer et incuber préalablement pendant 20h à 30°C.

### **IV.3. Matériel végétal :**

#### **IV.3. 1. Récolte de la plante :**

Pour la présente étude, il est utilisé comme matériel végétal la plante *Prunus persica*. Les feuilles ont été récolté durant les mois de juin et juillet 2015, séchées à l'ombré pendant quinze jours, Après le séchage, la matière végétale a été réduite en poudre à l'aide d'un broyeur électrique, puis conservée soigneusement dans des sachets en papier dans un endroit sec.

#### **IV.3.2. Préparations des extraits :**

##### **IV.3.2.1. Préparation des extraits bruts (Extraction par le méthanol) :**

L'extraction par percolation type Soxhlet a été la méthode choisie, L'extracteur de Soxhlet est une pièce permettant d'effectuer une extraction solide-liquide avec une grande efficacité. L'appareil porte le nom de son inventeur : Franz Von Soxhlet ; c'est une méthode simple et convenable qui nous permettra de répéter infiniment le cycle d'extraction avec un solvant frais jusqu'à épuisement complet du soluté dans la matière première, d'où vient son efficacité élevée (Penchev, 2010).



**Figure n° 5** : le montage de l'extraction soxhlet.

➤ **Le principe de l'extraction Soxhlet :**

La matière à extraire est mise dans la cartouche du Soxhlet. Le solvant est introduit dans le ballon puis chauffé pour démarrer l'extraction. Cette dernière est arrêtée lorsque le liquide entourant la cartouche devient clair, cette couleur indique que le solvant n'extrait plus rien du solide. Le contenu du ballon (solvant plus matières solubilisées) est ensuite traité à l'aide du Rotavapor pour éliminer le solvant. Le résidu est pesé pour quantifier la masse d'extrait total sec (Mext) (Penchev, 2010).

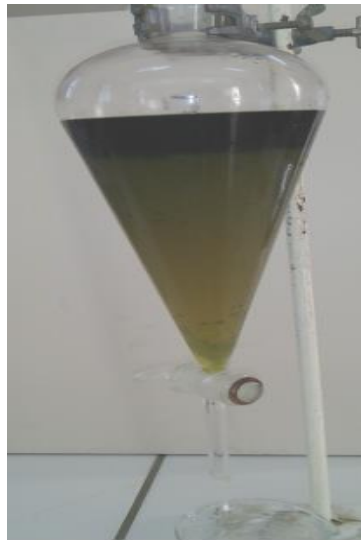


**Figure n° 6** : l'évaporateur rotatif (Type : BUCHE R-210).

### IV.3.2.2. Extraction des flavonoïdes :

#### a) Extraction des flavonoïdes par l'acétate d'éthyle:

A partir de l'extrait méthanoïque, nous avons préparé l'extrait acétatique (EAC). L'extrait méthanoïque est ajoutés dans un solvant composé d'acétate d'éthyle/eau distillée volume par volume. Le tout a été vigoureusement agité pendant 20 minutes. Au bout de 30 à 50 minutes dans une ampoule à décanter, nous avons assisté à la formation de deux (2) phases. Après élimination de la phase inférieure aqueuse, la phase supérieure acétatique a été recueillie et évaporée à pression réduite (Bekkara *et al.*, 1998).



**Figure n° 7 :** Extraction des flavonoïdes par l'éthyle acétate.

#### b) Extraction des flavonoïdes par butanol :

On ajoute le butanol à l'extrait aqueux obtenu de l'extraction de flavonoïde par l'Éthyle Acétate Le tout a été vigoureusement agité pendant 20 minutes, met dans une ampoule à décantation qui a donné deux extraits : extrait flavonoïde par butanol et extrait aqueux (Bekkara *et al.*, 1998).



**Figure n° 8 :** Extraction des flavonoïdes par butanol.

### **IV.3.3. Le rendement d'extraction :**

Selon Clémence et Dongmo (2009), le rendement exprimé en pourcentage par rapport au poids du matériel de départ et déterminé par la relation suivante :

$$R (\%) = (M_{\text{ext}}) \times 100 / M_{\text{éch}}$$

- R: Rendement (en %);
- M<sub>ext</sub> : est la masse de l'extrait après l'évaporation du solvant en g ;
- M<sub>éch</sub> : est la masse de l'échantillon végétal en g.

### **IV.4. Activité antibactérienne des extraits préparés :**

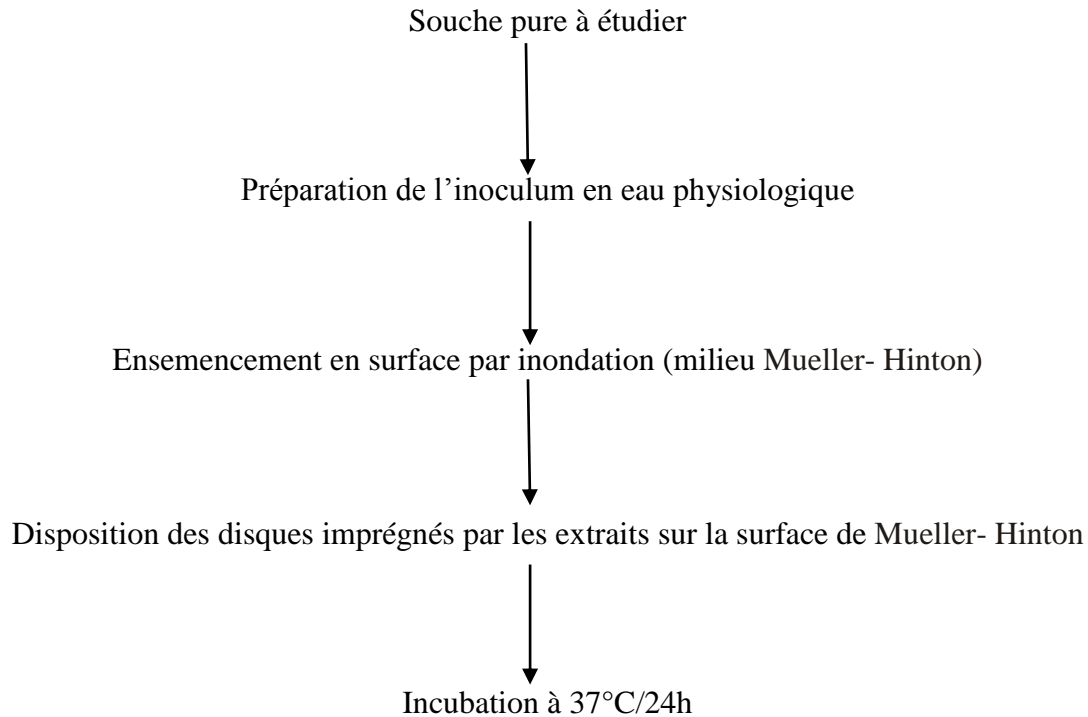
L'activité antibactérienne des extraits préparés a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélose Mueller-Hinton telle que décrite par Bauer *et al.*, (1966) et reprise par Barry *et al.*, (1985).

A partir de colonies jeunes de 24h, une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau physiologie stérile pour chaque isolat testé. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0.5 Mac Farland puis diluée au 1/100. On obtient alors un inoculum estimé à 10<sup>6</sup> unités formant colonie par millilitre (UFC/ml). Cet inoculum estensemencé par inondation sur des boîtes de pétri contenant la gélose Mueller-Hinton (SFM, 2008).

Des disques en papier Whatman de 6 mm de diamètre, ont été d'abord stérilisés par l'autoclavage, puis ont été imprégnés durant 15-20 minutes dans les différents extraits. Ils sont

ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose. Les boîtes de pétri sont d'abord laissées pendant 30 minutes à la température ambiante pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubée à 37°C à l'étuve pendant 24h (Adesokan *et al.*, 2007).

- **L'organigramme suivant résume la démarche adoptée :**



### **Protocole de l'activité antibactérienne en milieu solide**

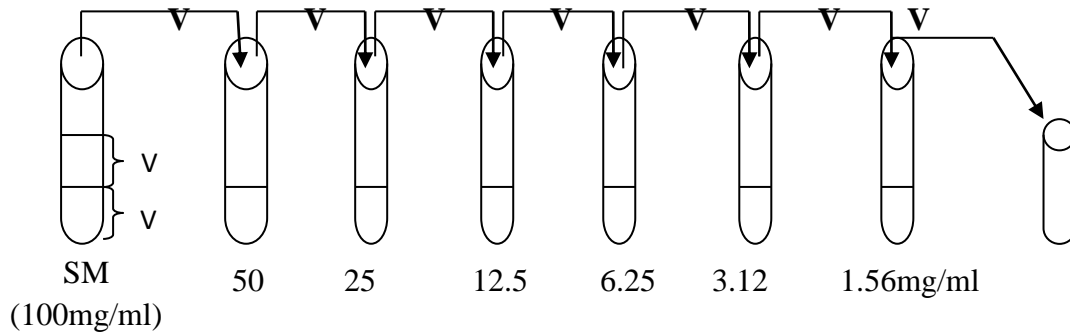
#### **IV.5. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'extrait :**

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration d'antibactérienne capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures.

Chacune des trois isolats de *P. aeruginosa* et la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 étudiés est inoculés dans des tubes à raison de  $10^6$  UFC/ml soit 200  $\mu$ l de suspension bactérienne de DO  $\approx$  0,08-0.1 /tube contenant 2ml de milieu Luria Bertani (LB) ajusté avec les déférentes concentrations de l'extrait (50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,12 - 1,5mg/ml) testées. Ces tubes son incubés à 37°C pendant 24h.

**IV.5.1. Préparation des dilutions :**

A partir d'un extrait préparé et des tubes en verre contenant 2ml de milieu LB stérile, en passant par la préparation des concentrations 50; 25; 12.5 ; 6.25 ; 3.12 jusqu'à 1.56mg/ml suivant le protocole mentionné ci de sous :

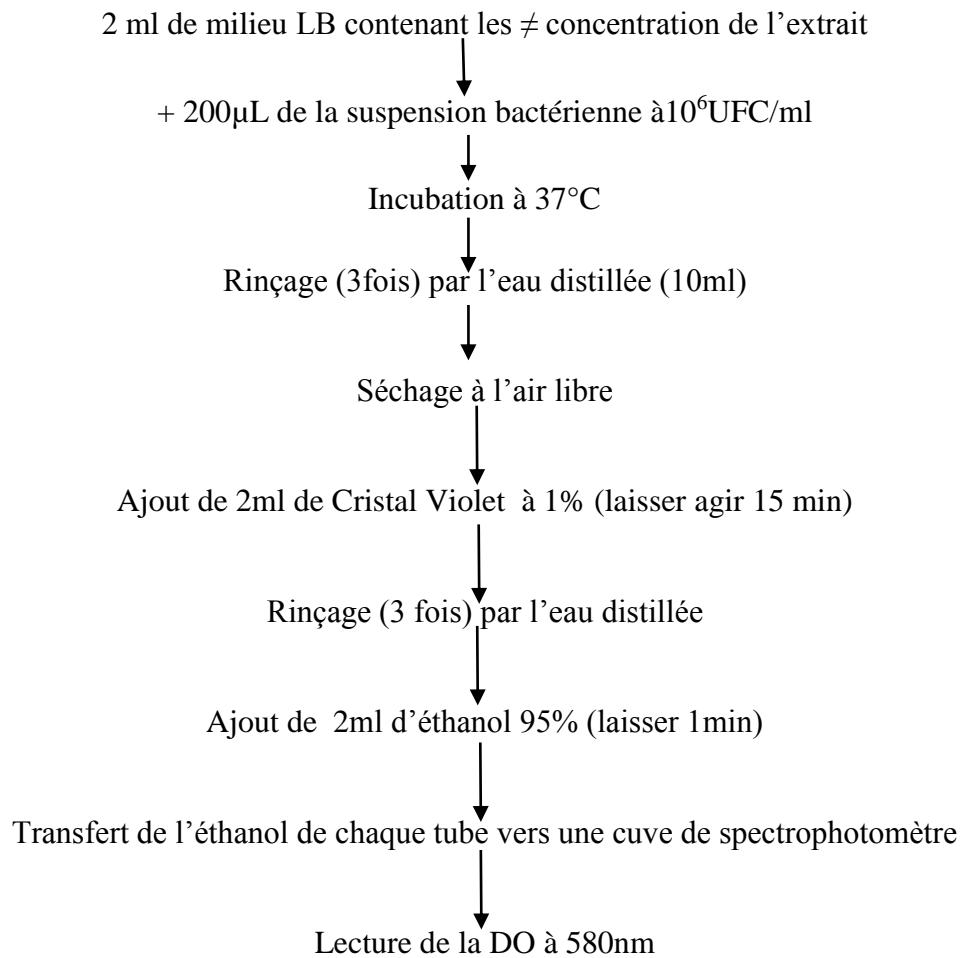


**IV.6. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'extrait**

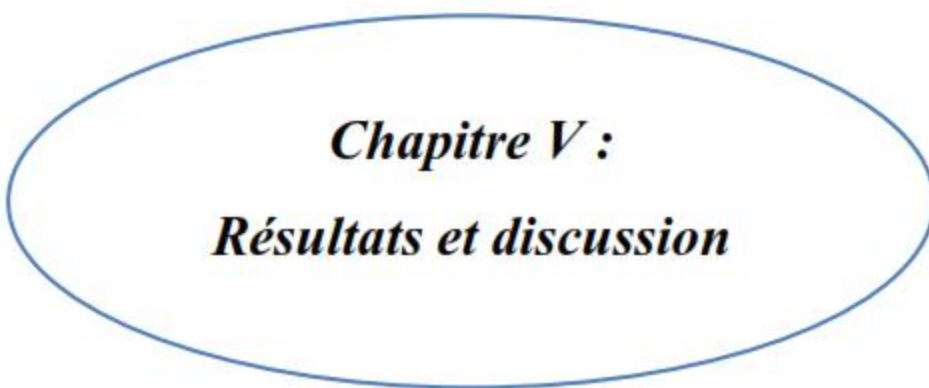
La concentration minimale bactéricide (CMB) est la concentration antimicrobienne qui laisse au plus 0,01% de germe survivants. Pour sa détermination, la gélose nutritive coulée dans des boîtes de pétri est ensemencée en stries par les contenus des tubes ayant une concentration  $\geq$  CMI dans la série de dilution précédentes. La CMB est déterminée après une incubation de 24h à 37°C (Biyiti *et al.*, 2004).

**IV.7. Effet de l'extrait flavonoïde sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa* :**

Dans le but d'étudier l'effet d'extraits préparés sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa*, nous avons inoculé chacun des trois isolats et la souche de référence *P. aeruginosa* étudiés dans des tubes à raison de  $10^6$  UFC/ml soit 200  $\mu$ l de suspension bactérienne / tube, ces tubes contenant préalablement 2ml de milieu LB additionné par deux différentes concentrations de l'extrait flavonoïque extraite par le butanol (1/2 et 1/4CMI). Ces tubes sont incubés à 37°C pendant 24h. La quantification des biofilms attachés aux tubes est évaluée semi-quantitativement par l'analyse cristal violet.



**Figure n° 9 :** Protocole de quantification de la formation de biofilm



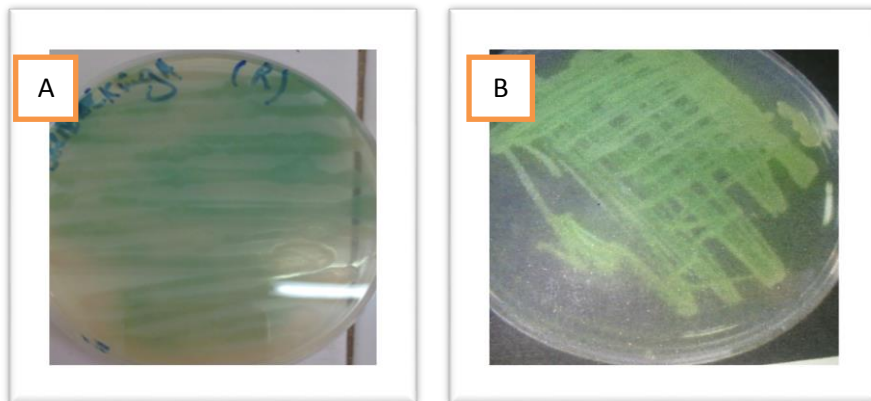
***Chapitre V :***  
***Résultats et discussion***

## V. Résultats et discussion

### V.1. Identification des isolats obtenus

#### V.1.1.L'étude macroscopique

L'observation macroscopique a montré que les colonies de *Pseudomonas aeruginosa* ayant une forme plate opaque, bombée, de contour régulier et parfois irrégulier, avec un aspect métallique, une pigmentation jaune verdâtre présente dans le milieu King B et bleu vert dans le milieu King A.



**Figure n°10:** Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* ensemencée :  
Sur King A (A) et sur King B (B).

#### V.1.2. L'étude microscopique

L'observation microscopique des bactéries après la coloration de Gram des frottis réalisés à partir des cultures purifiées a montré que les quatre isolats de *P. aeruginosa* apparaissent sous forme de bacille à couleur rose à coloration de Gram négatif.



**Figure n°11:** Observation microscopique de *P. aeruginosa* après une coloration de Gram  
(x1000)

### **V.1.3. Croissance à 4°C et à 42°C**

Après 48 heures d'incubation, toutes les bactéries ont poussés à 42°C mais aucune culture n'a été obtenue à 4°C.

### **V.1.4 Caractères biochimiques**

#### **V.1.4.1. Test de l'oxydase**

La coloration violette qui a apparue en quelques secondes, révèle une réaction positive, tous les isolats sont dites oxydases positives (Mac Faddin, 2000).

#### **V.1.4.2. Test de la catalase**

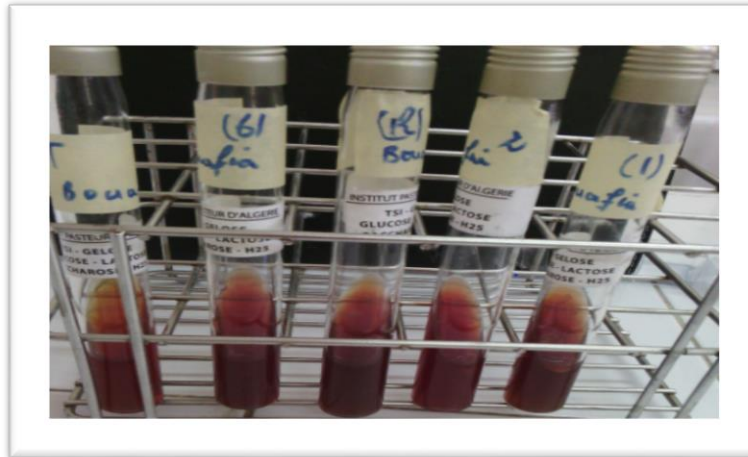
L'apparition des bulles de gaz après l'addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, révèle une réaction positive et tous les isolats sont dites catalase positive.



**Figure n°12:** Résultat de test de la catalase pour le *P. aeruginosa*

#### **V.1.4.3. Milieu TSI (Triple sugar iron)**

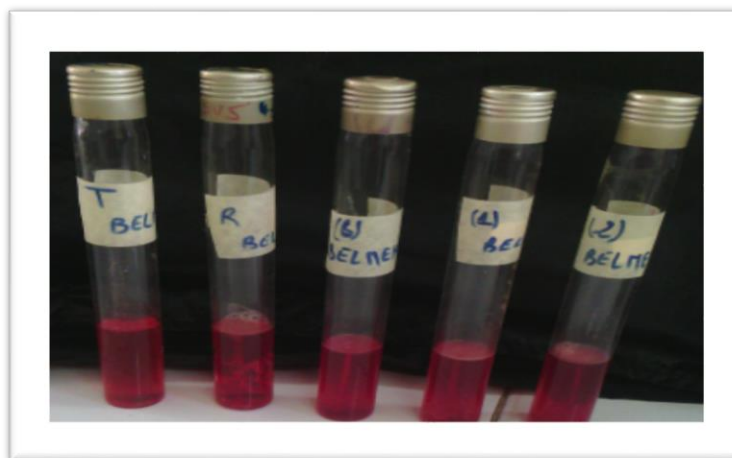
Les tubes de TSI ensemencés par les isolats présentent un culot et une pente rouge, ce qui signifie que les bactéries sont des non fermentatifs de sucres (lactose, glucose et saccharose), l'absence de bulles d'air et des précipités noirs révèle l'absence de gaz et de H<sub>2</sub>S.



**Figure n°13:** Résultat de test de TSI pour les quatre isolats de *P. aeruginosa*.

#### V.1.4.4. Utilisation du mannitol et recherche de la mobilité

La dispersion des bactéries dans le milieu mannitol mobilité, révèle que les quatre isolats sont mobiles et peuvent se déplacer dans la gélose molle du milieu utilisé. L'absence de dégradation du mannitol révèle que tous les isolats sont Mannitol négatif.



**Figure n°14:** Résultats de test mannitol mobilité pour les isolats testés de *P. aeruginosa*.

#### V.1.4.5. Utilisation de citrate

Les quatre souches sont citrate (+). Dans ce milieu le citrate ( $C_6H_5O_7^{-3}$ ) est la source unique de carbone. L'utilisation de ce substrat en aérobie en présence d'enzyme citrate perméase, a été traduite par le virage de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol) au bleu dû à l'alcalinisation du milieu. L'équation de l'oxydation par respiration aérobie du citrate est :



Figure n°15: Résultat de l'utilisation de citrate pour les isolats testés de *P. aeruginosa*.

#### V.1.4.6. Test de rouge de méthyle (RM) et Vogues –Proskauer (VP)

L'absence de la coloration rouge après l'addition de rouge de méthyle au moment de la lecture des résultats, révèle que tous les isolats sont RM négatif, le milieu est dit légèrement acide ou alcalin, Pour le test VP l'absence d'une coloration rouge, signifie l'absence d'acétoïne et absence de fermentation du glucose par la voie butylène glycolique ( pas de production d'acétoïne ), la souche est dite VP négative.



Figure n°16: Résultat de test de rouge de méthyle et Vogues – Proskauer  
Pour les quatre isolats de *P. aeruginosa*.

#### V.1.4.7. Réduction des nitrates

En anaérobiose, les souches poussent en utilisant le nitrate comme accepteur final d'électron de sa chaîne de phosphorylation oxydative. Cette respiration anaérobie est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne (Marchal *et al.*, 1987). Ce test est pour but de rechercher la nitrate réductase. Après incubation on verse quelques gouttes de réactif de GRISS (Nit I: acide sulfanilique, et Nit II:  $\alpha$ -naphtylamine) la présence d'un précipité rouge signifie que les réactives de GRIESS ont réagi avec les nitrites.



**Figure n°17:** Résultat du test positif de nitrate réductase pour les quatre isolats de *P. aeruginosa*.

#### V.1.5. Galerie biochimique API 20 NE :

Les résultats obtenus de tous les isolats testés sont mentionnés dans le tableau N°1.

**Tableau n°01 :** les résultats des différents tests de la galerie biochimique API 20 NE pour les trois isolats testés de *P. aeruginosa*.

Teste	Isolat 1	Isolat 2	Isolat 6
NO3 (réduction des Nitrates)	+	+	+
TRP (formation d'indole TRyptophane)	-	-	-
GLU(fermentation (GLUcose))	-	-	-
ADH (Arginine DiHydrolase)	+	+	+
URE (UREase)	-	-	-
ESC (hydrolyse ( $\beta$ -glucosidase) (ESCuline))	+	+	+
GEL (synthèse d'une gélatinase)	+	+	+
PNPG ( $\beta$ -galactosidase (Para-NitroPhényl- $\beta$ D-Galactopyranosidase),	-	-	-
GLU (assimilation (GLUcose))	+	+	+
ARA (assimilation (ARAbinose))	-	-	-
MNE (assimilation (ManNosE))	-	-	-
MAN (assimilation (MANnitol))	+	+	+
NAG (assimilation (N-Acétyl-Glucosamine))	+	+	+
MAL (assimilation (MALtose))	-	-	-
GNT (assimilation (potassium GlucoNaTe))	+	+	+
CAP (assimilation (acide CAPrique))	+	+	+
ADI (assimilation (acide ADIrique))	+	+	+
MLT (assimilation (MaLaTe))	+	+	+
CIT (assimilation (trisodium CITrate))	+	+	+
PAC (assimilation (acide Phénylacétique))	-	-	-

+ : Réaction positive

- : Réaction négative

Oxydase positive



Figure n° 18: Résultats de l'API 20 NE de l'isolat n°1 *P. aeruginosa*



Figure n° 19 : Résultats de l'API 20 NE de l'isolat n° 2 de *P. aeruginosa*



Figure n°20 : Résultats de l'API 20 NE de l'isolat n° 3 de *P. aeruginosa*.

## V.2. L'obtention des extraits des plantes :

### V.2.1. L'extrait méthanoïque de *Prunus persica*

L'extrait méthanoïque recueilli après extraction.



**Figure n°21:** L'extrait méthanoïque de *Prunus persica*.

**V.2.2. Rendement d'extraction :** Le tableau N°2 montre le rendement des trois extraits effectués sur les feuilles de *Prunus persica*

**Tableau N°02 :** Le rendement des trois extraits préparés de *Prunus persica*.

L'extrait	Rendement %
Extrait méthanoïque	34.4
Extrait d'éthyle Acétate	5.5
Extrait de butanol	5.9

## V.3. Activité antibactérienne des extraits préparés de *P. persica* :

Suivant les résultats de l'activité antibactérienne des trois extraits préparés à partir des feuilles de *Prunus persica* (extrait brut par méthanol et les deux fractions de l'extrait d'éthyle d'acétate et de butanol) par la méthode de diffusion sur gélose MH.

Des zones d'inhibition des trois isolats de *P. aeruginosa* (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub>) et une souche de référence (*P. aeruginosa* ATCC 27853) ont été enregistré par uniquement l'extrait flavonoïque par le Butanol. Ceci signifié que l'extraits butanolique possède une activé antibactérienne sur les isolats de *P. aeruginosa* testés et il est plus actif par rapport les deux extraits (méthanoïque et éthyle d'acétate).

La variation observée dans l'activité antibactérienne entre les trois extraits préparés suivant le protocole décrit par Bekkara *et al.*, (1998) peut être expliqué par la variation de concentration des composées responsable de l'activité antibactérienne observées entre des extraits réalisés par les déférents solvants chez la même plante.

L'efficacité optimal d'un extrait peut ne pas être due à un constituant actif principal, mais à l'action combinée (synergie) de différents composée de l'origine de cet extrait (Rojas *et al.*, 1992 ; Marjori, 1999 ; Essawi et Srour, 2000). Comme peuvent être affecté par l'antagonisme entre les constituants dans le même extrait.



**Figure n°22 :** Activité antibactérienne d'extrait de butanol *contre P. aeruginosa*.

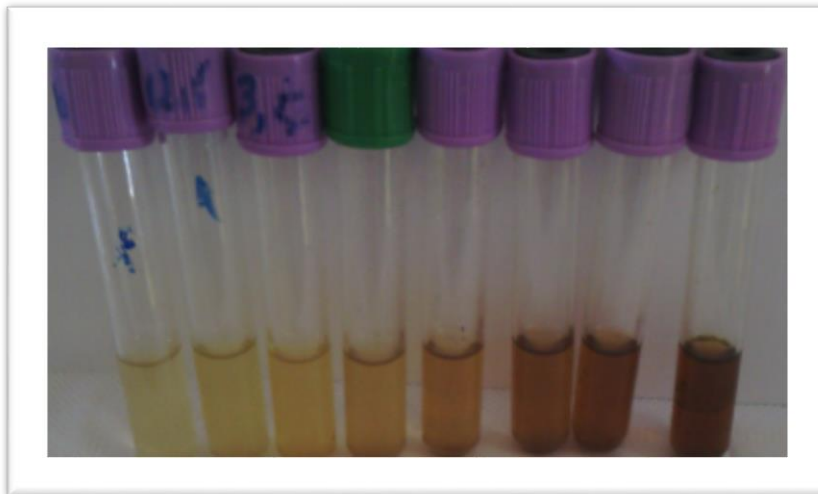
#### **V.4. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'extrait flavonoïque de *P. persica*:**

La CMI et la CMB ont été déterminées pour l'extrait possédant la plus forte activité antibactérienne, il s'agit de l'extrait flavonoïque par le butanol sur la bactérie *P. aeruginosa*.

Les résultats que nous avons obtenue comparativement aux témoins montre qu'avec une concentration de 12.5 mg/ml on a remarqué une absence de trouble, ce qui explique l'inhibition de leur croissance par l'extrait. Cette concentration correspond à la concentration

minimale inhibitrice de l'extrait flavonoïque par butanol sur les isolats de *P. aeruginosa* testés (Figure n°23). L'apparition de trouble à partir de la concentration de 6.5 mg/ml est dû au fait que les extraits à ces concentration sont diluée et sont alors incapables d'inhiber la croissance des isolats (concentration inefficace pour l'inhibition de la croissance).

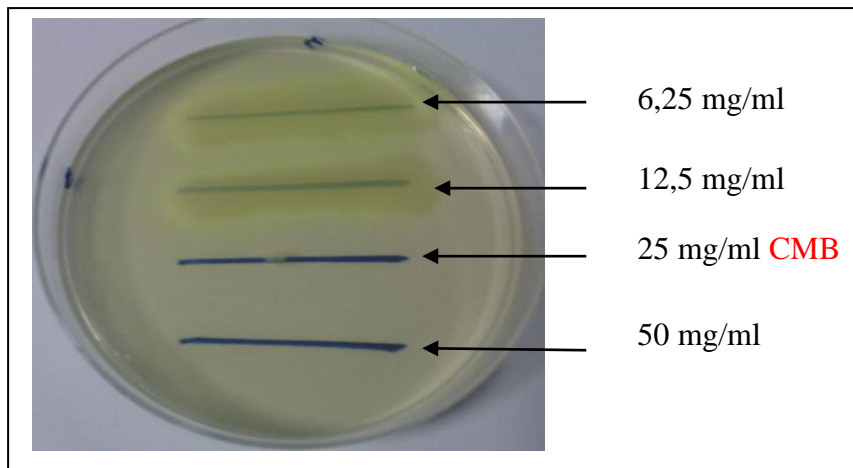
Une étude de l'activité biologique réalisée en 2012 par Sumaira et Habib montre que l'extrait méthanolique exerce une activité antibactérienne significative contre la *Klebsiella pneumonia* et *Enterococcus faecalis*. La fraction d'éther de pétrole a également démontré une activité antibactérienne significative contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. La fraction de dichlorométhane a inhibé la croissance d'*E. coli* et *K. pneumoniae* et Celle d'éthyle acétate a indiqué une activité significative contre *E. faecalis*. La fraction de chloroforme n'a montré aucune activité significative contre *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Bacillus subtilis*. L'extrait méthanoïque de *P. persica* inhibe significativement la croissance de *K. pneumoniae* et *E. faecalis*, alors qu'aucune activité a été indiquée par *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhi* et *S. flexneri*.



**Figure n°23 :** Les résultats de l'effet de l'extrait de butanol sur la croissance de *P. aeruginosa*

#### **V.5. Concentrations Minimale Bactéricide (CMB) d'extrait flavonoïque de *P. persica*:**

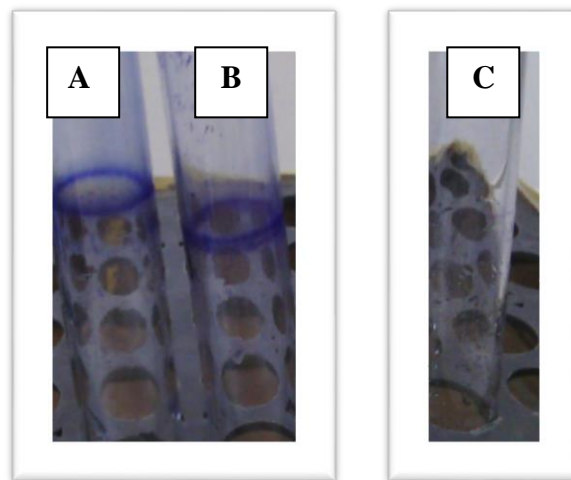
L'ensemencement sur la gélose nutritif à partir des concentrations  $\geq$  à la concentration minimale inhibitrice, a révélé un pouvoir bactéricide contre *P. aeruginosa* à la concentration de 25 mg/ml de l'extrait flavonoïque par butanol (fig 24).



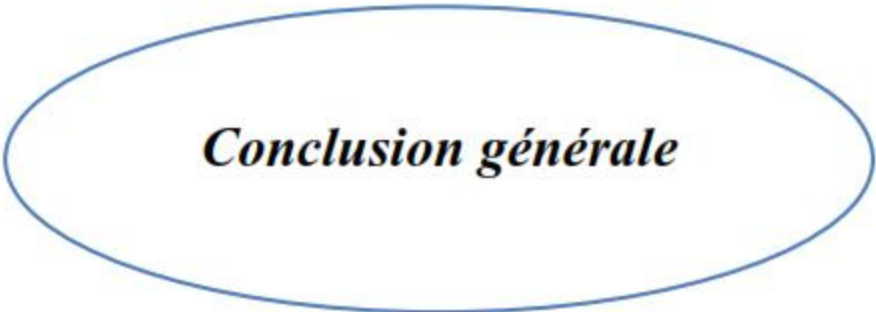
**Figure n°24 :** CMB d'extrait flavonoïque par butanol de *P. persica*

**V.6. Effet d'extrait flavonoïque sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa* :**

Les résultats que nous avons obtenus pour l'effet d'extrait flavonoïque extraite par le butanol sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa* indiquent que l'extrait testé ne montre aucune inhibition de formation de biofilm comparativement aux témoins.



**Figure n°25 :** Effet d'extrait flavonoïque sur la formation du biofilm par *P. aeruginosa* (A : Biofilm non traité par l'extrait, B : Biofilm traité par ½ CMI d'extrait, C : Témoin négatif)



***Conclusion générale***

## Conclusion

*P. aeruginosa* est aujourd'hui clairement reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez les patients immunodéprimés ou affaiblis, ainsi que dans le cadre de la mucoviscidose. *P. aeruginosa* a toujours été considéré comme une cible difficile en chimiothérapie anti infectieuse.

A travers l'étude réalisée sur la plante *Prunus persica*, on a vérifié l'activité antibactérienne des trois extraits préparés à partir des feuilles (extrait brut par méthanol et deux fractions à partir de l'extrait par éthyle d'acétate et par butanol) contre trois isolats de *P. aeruginosa* (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub>) et une souche de référence (*P. aeruginosa* ATCC 27853) par la méthode de diffusion sur milieu gélosé.

Les résultats obtenus montrent une activité antibactérienne contre les trois isolats de *P. aeruginosa* (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> et P<sub>3</sub>) et une souche de référence (*P. aeruginosa* ATCC 27853) testé par seulement l'extrait flavonoïque par Butanol.

Cette étude suggère probablement que les flavonoïdes de *P. persica* soluble dans le butanol sont plus actifs contre les isolats testés de *P. aeruginosa* en comparant aux flavonoïdes solubles dans l'éthyle d'acétate et le méthanol.

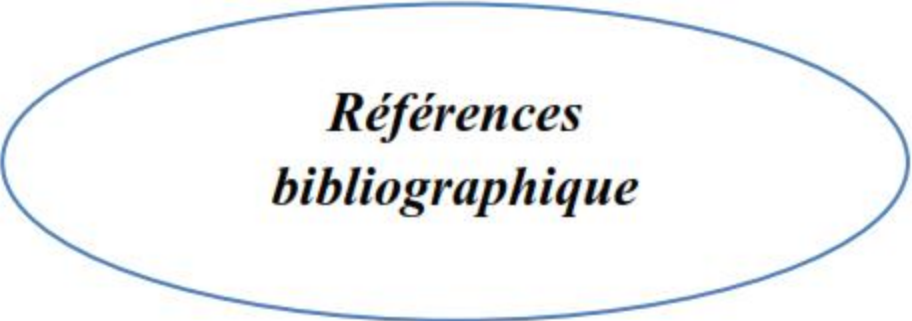
La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de cet extrait (l'extrait flavonoïque par Butanol) en milieu liquide suivie par ensemencement en milieu gélosé dans le but de détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), ont montré une activité inhibitrice autour de 12,5mg/ml et 25mg/ml respectivement.

Le test d'effet de l'extrait flavonoïque par Butanol sur la formation de biofilm par l'analyse de cristal violet, n'a montré aucun effet inhibiteur sur la quantité de biofilm formé par les isolats testés de *P. aeruginosa*.

En perspectives, les recommandations suivantes sont suggérées:

Etablir des études chimiques des extraits de la plante pour pouvoir connaître leurs compositions et comprendre la différence entre eux.

Les résultats restent préliminaires et donc nécessitent des tests plus avancés in vitro mais aussi in vivo pour plus de confirmation.



***Références  
bibliographique***

## Références bibliographiques :

Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez M.I (2004). *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialomannan and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *J Respir Cell Mol Biol* 30 : p 627-634.

Aebi C, Bracher R, Liechti-Gallati S, Tschappeler H, Rudeberg A et Kraemer R (1995). The age at onset of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis-prognostic significance. *Eur J Pediatr* 154 : p 69-73.

Alcorn J. F, Wright J. R (2002). Degradation of pulmonary surfactant protein d by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem* 279 : p 30871-30879.

Allen L, Dockrell D.H, Pattery T, Lee D.G, Cornlis P, Hellewell P.G et Whyte M.K (2005). Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol* 174 : p 3643-3649.

Allesen-Holm M, Barken K.B, Yang L, Klausen M, Webb J.S, Kjelleberg S, Molin S, Givskin M et Tolken-Nielsen T (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 59 : p 1114-1128.

Allewelt M, Coleman F.T, Grout M, Priebe G.P et Pier G.B (2000). Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 68 : p 3998-4004.

Allison D.G, Ruiz B, San Jose C, Jaspe A, Gilbert P (1998). Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 167(2) : p 179-184.

Al-Tahhan R.A, Sandrin T.R, Bodour A.A and Maier R.M (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* : effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic. *Appl Environ Microbiol* 66 : p 3262-3228.

Avidano M.A, Cotter C.S, Stringer S.S et Schultz G.S (1998). Analysis of protease activity in human otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119 : p 346-351.

Azghani A. O, Gray L. D et Johnson A. R (1993). A bacterial protease perturbs the paracellular barrier function of transporting epithelial monolayers in culture. *Infect Immun* 61 : p 2681-2686.

Azghani A. O, Idell S, Bains M et Hancock R. E (2002). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein f is an adhesion in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb Pathog* 33 : p 109-114.

- Bagge N, Ciofu O, Hentzer et al (2002). Constitutive high expression of chromosomal betalactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob Agents Chemother* 46 : p 3406-11.
- Ballman M, Rabsch P et von der Hardt H (1998). Long-term follow up of changes in FEV1 and treatment intensity during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Thorax* 53 : p 732-737.
- Bardy S.L, Ng S.Y et Jarrell K.F (2003). Prokaryoti motility structures. *Microbiol* 149(2) : p 295-304.
- Barker A.P, Vasil A.I, Filloux A, Ball G, Wilderman P.J et Vasil M.L (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol Microbiol* 53 : p 1089-1098.
- Barry A.L, Garcia F, Thrup P.L.D (1970). An improved single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. *Am J Clin Pathol* 53 : p 149-158.
- Bauer A.W, Kirby W.M.M, Sherris J.C and Turck M (1966). Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. *Am J Clin Pathol* 45 : 493-496.
- Beaufort N, Leduc D, Rousselle J.C, Namane A, Chignard M et Pidard D (2004). Plasmin Cleaves the juxtamembrane domain and releases truncated species of the urokinase receptor (CD87) from human bronchial epithelial cells. *FEBS Lett* 574 : p 89-94.
- Bedoui H, Benhammadi Z, Nacer N (2005-2006). Projet de résistances de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques ou secteur sanitaire de Ghardaïa. Diplôme supérieur en Microbiologie université de Kasdi Merbah Ouargla : p 03.
- Beer A.M, Lukanov J, Sagroche V (2007). Effet of Thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine* 14 : p 65-69.
- Bekkara F., Jay M., Viricel M.R et al (1998). Distribution of phenolic compound within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant Soil* 203 : p 2736.
- Beloin C, Roux A, Ghigo J.M (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322 : p 249-289.
- Bendinger B, Rijnaarts HHM, Altendorff K (1993). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Appl Environ Microbiol* 59 : p 3973-3977.
- Ben messaoud Kawthar Oumel kheir (2004-2005). L'otite moyenne chronique ; Diplôme supérieur en Microbiologie de Kasdi Merbah Ouargla : p 18-32.
- Bever R.A et Iglewski B.H (1988). Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase Structural gene. *J Bacteriol* 170 : p 4309-4314.

- Berthelot P, Grattard F, Mallaval F.O, Ros A, Lucht F et Pozzetto B (2005). [Epidemiology of nosocomial infection due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*]. *Pathol Biol (Paris)* 53 : p 341-348.
- Bielecki P, Glik J Kawecki M et Martins dos Santos V.A (2008). Towarde understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression. *Biotechnol Lett* 30 : p 777-790.
- Biyiti L.F, Meko'o DJ.L, Tamzc V.; AMvam Zollo P.H (2004). Recherche de L'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* Vol 13 : p 11-20.
- Bodey G.P, Bolivar R, Fainstein V et Jadeja L (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 5 : p 279-313.
- Branski L.K, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke M.G Sanford A.P et Herndon D.N (2009). Emerging Infections in Burns. *Surg Infect (Larchmt)* 10 : p 389-397.
- Braun P, de Groot A, Bitter W et Tommassen J (1998). Section of elastolytic enzymes and their propeptides by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180 : p 3467-3469.
- Bruneton J (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plants médicinaux. 3<sup>eme</sup> édition. Lavoisier. Paris.
- Campanac C (2002). Biofilms bactériens : intérêt dans l'utilisation de l'activité détergente : approche des facteurs impliqués dans la formation et la résistance finale. *Thèse, Université Paul Sabatier, Toulouse*.
- Campanac C, Pineau L, Payard A, Baziad-Mouysset G et Roques C (2002). Interaction between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemo* 46(5) : p 1469-1474.
- Carek P.J, Dickerson L.M et Sack J.L (2001). Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician* 63 : p 2413-2420.
- Carpentier B et Cerf O (1993). Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 75 : p 499-511.
- Characklis W.G et Marshall K .C (1990). Biofilms. John Wiley et Sons, Inc, New York, N.Y.
- Chitnis C.E et Ohman D.E (1993). Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operonic structure. *Mol Microbiol* 8 : p 583-593.
- Clémence R, Dongmo M (2009). Clinique et pharmacologie Evaluation de l'activité antidermatophytique des extraits au méthanol et fractions d'Acalyphaman mana (Euphorbiacées) et *Tristem mahirtum* (Mélastomatacées). Université de Dshange Mester en Biochimie : p34.

Clutterbuck A.L, Woods E.J, Knottenbelt D, Clegg P.D, Cochran C.A Percival S.L (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 121 : p 1-17.

Comolli J.C, Hauser A.R, Waite L, Whitchurch C.B, Mattick J.S et Engel J.N (1999). *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia infect. *Immun* 67 : p 3625-3630.

Conway B.A, Venu V, Speert D.P (2002). Biofilm formation and homoserine lactone production in the *Burkholderia cepacia* complex. *J Bacteriol* 184(20) : p 5678-5685.

Coraux C, Killezky C, Polette M, Hinrasky J, Zahm J.M, Devillier P, De Bentzmann S et Puchell E (2004). Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30 : p 605-612.

Costerton J.W (1984). The formation of biocide-resistant biofilms in industrial, natural and medical system. *Dev Ind Microbiol* 25 : p 363-372.

Costerton J.W (1995). Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol* 15 : p 137-140.

Costerton J.W, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D et James G (1994). Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176 : p 2137-2142.

Costerton J.W, Stewart PS, Greenberg EP (1999). Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. *Science* 284 : p 1318-1322.

Costerton W, Veeh R, Shirliff M, Pasore M, Post C et Ehrlich G (2003). The application of biofilm science to the study of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 112 : p 1466-1477.

Cryz S.J, Pitt T.L, Furer E et Germanier R (1984). Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 44 : p 508-513.

Daniel Zohary, Maria Hopf (2011). *Domestication of Plants in the Old World : The Origin and Spread of Cultivated Plants in West Asia, Europe and the Nile Valley*. Oxford University Press. USA : p 328.

Davey M.E, Caiazza N.C, O'Toole G.A (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185 (3) : p 1027-1036.

D'Argenio D.A, Gallagher L.A, Berg C.A et Manioli C (2001). *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol* 183 : p 1466-1471.

De Bentzmann S, Polette M, Zahm J.M, Hinrasky C, Bajolet O, Klossek J.M, Filloux A, Lazdunski A et Puchelle E (2000). *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors delay airway epithelial wound repair by altering the actin cytoskeleton and inducing overactivation of epithelial matrix metalloproteinase-2. *Lab Invest* 80 : p 209-219.

De Bentzmann S, Aurouze M, Ball G et Filloux A (2006). FppA, a novel *Pseudomonas aeruginosa* prepilin peptidase involved in assembly of type IVb pili. *J Bacteriol* 188(13) : p 4851-4860.

Decho A.W (2010). Overview of biopolymer-induced mineralization : what goes on in biofilms *Ecological Engineering* 36(2) : p 662-664.

De Beer D, Stoodley P, Rose F et Lewandowski Z (1994). Effects of biofilm structures on oxygen distribution and transport. *Biotechnol Bioeng* 43 : p 1131-1138.

Dekimpe V et Déziel E (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa* : the transcriptional regulator RhlR regulates lasR specific factors. *Microbiology* 155 : p 712-723.

Denning G.M, Wollenweber L.A, Railsback M.A, Cox C.D, Stoll L.L et Britigan B.E (1998). *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun* 66 : p 5777-5784.

Déziel E, Gopalan S, Tampakaki A.P, Lepine F, Padfield K.E, Saucier M, Xiao G et Rahme L.G (2005). The contribution of MvFRto *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation : multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting las RI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactoes. *Microbiol* 55 : p 998-1014.

Déziel E, Lepine F, Dennie D, Boismenu D, Mamer O.A et Villemur R (1999). Liquid chromatography /mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57Rp grown on mannitol or raphthalene. *Biochim Biophys Acta* 1440 : p 244-252.

Déziel E, Lepine F, Milot S et Villemur R (2003). RhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* (3-hydroxyalkanyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipid. *Microbiology* 149 : p 2005-2013.

Diggel S. P, Winser K, Chhabra S. R, Worrall K. E, Camara M et Williams P (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of *lasR*. *Mol Microbiol* 50 : p 29-43.

Di Mango E, Zar H.J, Bryan R et Prince A (1995). Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* 96 : p 2204-2210.

Donlan R.M, Costerton J.W (2002). Biofilms : survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15 : p 167-193.

Donlan R.M (2002). Biofilms : microbial life on surface. *Emerging Infections Diseases* 8(9) : p 881-890.

Duguid I.G, Evans E, Brown M.R et Gilbert P (1992). Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J Antimicrob Chemother* 30 : p 803-810.

Dulon S, Cande C, Bunnett N. W, Hollenberg M. D, Chignard M et Pidard D (2003). Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells : disarming by neutrophil serine proteinases. *Am J Respir cell Mol Biol* 28 : p 339-346.

Dunne W.M (2002). Bacterial adhesion : seen any god biofilms lately ? .*Clin Microbiol Rev* 2 : p 155-166.

Engel L.S, Hobden J.A, Moreau J.M, Callegan M.C, Hill J.M et O'Callaghan R.J (1997). Pseudomonas deficient in protease IV has significantly reduced corneal virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38 : p 1535-1542.

Engel L.S, Hill J.M, Caballero A.R, Green L.C et O'Callaghan R.J (1998a). Protease IV a unique extracellular protease and virulence factor from pseudomonas aeruginosa. *J Biol Chem* 273 : p 16792-16797.

Engel L.S, Hill J.M, Moreau J.M, Green L.C, Hobden J.A, et O'Callaghan R.J (1998b). Pseudomonas aeruginosa protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39 : p 662-665.

Espinosa-Urgel M (2003). Resident parking only : rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J Bacteriol* 185(3) : p 699-700.

Estrellas P.S.Jr, Alionete L.G et Hodden J.A (2000). A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a contact lens-induced acute eye (CLARE) is protease-deficient. *Curr Eye Res* 20 : p 157-165.

Essawi T, Srour M (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharm* 70 : p 343-349.

Evans L.R et Linker A (1973). Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 116 : p 915-924.

Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H et Prince A (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* 66 : p 43-51.

Filloux A et Vallet I (2003). [Biofilm : set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci* 19 : p 77-83.

Fleming H.C (1990). Introductio : biofilm as a particular form of microbial life, in Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. Stuttgart.

Fletcher M (1988). Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *J Bacteriol* 170 : p 2027-2030.

Folders J, Tommassen J, Van Loon L.C et Bitter W (2000). Identification of a chitin-binding protein secreted by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182 : p 1257-1263.

Fujita K, Akino T et Yoshioka H (1988). Characteristics of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 56 : p 1385-1387.

Gacera P (1998). Bacterial alginate biosynthesis-recent progress and future prospects. *Microbiology* 144 : p 1133-1143.

Goller C, Romeo T (2008). Environmental influences on biofilm development. *Bacterial Biofilms, Current Topics in Microbiology and Immunology* 322 : p 37-66.

Gupta S.K, Berk R.S, Masinik S et Hazlett L.D (1994). Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun* 62 : p 4572-4579.

Gray G.L, Smith D.H, Baldrigo J.S, Harkins R.N, Vasil M.L, Chen E.Y et Heyneker H.L (1984). Cloning nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : p 2645-2649.

Guzzo J, Pages J.M, Duong F, Lazdunski A et Murgier M (1991). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease : Evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol* 173 : p 5290-5297.

Glik j et Garber N (1983). The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *J Gen Microbiol* 129 : p 3085-3090.

Hahn H.P (1997). The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Review Gene* 192 : p 99-108.

Hastie A. T, Hingley S. T, Higgins M. L, Kueppers F et Shryock T (1986). Rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* inactivates mammalian tracheal ciliary axonemes. *Cell Motil Cytoskeleton* 6 : p 502-509.

Heck L.W, Alarcon P.G, Kulhavy R.M, Morihara K Russel M.W et Mestecky J.F (1990). Degradation of Ig A proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Immunol* 144 : p 2253-2257.

Hedrick U.P (1919). Sturtevant's edible plants of the World, Dover Publication : p 687.

Herz J, Kowal R.C, Goldstein J.L et Brown M.S (1990). Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-golgi compartment. *EMBO J* 9 : p 1769-1776.

Hogardt M et Heesemann J (2010). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int Med Microbiol* 300 : 557-562.

Hoiby N (1977). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 262 : p 1-96.

Hong Y.Q et Ghebrehwiet B (1992). Effet of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1 q and C3. Clin Immunol Immunopathol 62 : p 133- 138.

Iglewski B.H et Kabat D (1975). NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. Proc Natl Acad Sci USA 72 : p 2284-2288.

Irie Y, Parsek M.R (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. Curr Top Microbiol Immunol 322 : p 67-84.

Jacquelin L.F, Le Magrex E, Brisset L, Carquin J, Berthet A, Choisy C (1994). Synergism of the combination of enzymes or surfactants and a phenolic disinfectant on a bacterial biofilm. Pathol Biol (Paris) 42 (5) : p 425-431.

Joffin J.N et Leyrol G (2006). Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux : CRDP d'aquitaine : p 363.

Jensen P.O, Bjarnosholt T, Phipps R, Ramussen T.B, Calum H, Christoffersen L, Moser C, Williams P, pressles T, Givskov M et Hoiby N (2007). Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorumsensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 153 : p 1329-1338.

Judd W.S, Christopher S, Elizabeth A.C, Kellogg F, Stevens P, Donoghue J.M (1999). Plants systematics. Aphylogenetic approach. Sinouer associates Ic. Massachusetts US 2 : p 365-372.

Jung H.A, Kim A.R, Chung H.Y et Choi J.S (2002). In vitro anti-oxidant activity of some selected *Prunus* species in Korea. Archives of Pharmacal Research 25 : p 865-872.

Kessler E Safrin M (1988). Synthesis, processing and transport of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. J Bacteriol 170 : p 5241-5247.

Kessler E, Safrin M, Abrams W.R, Rosenboom J et Ohman D.E (1997). Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Las A. J Biol Chem 272 : p 9884-9889.

Khalilzadah P, « Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing », Thèse de doctorat en Microbiologie, sous la direction de Mme Christine ROQUES, Mme Geneviève BAZIARD ; Toulouse, L'université Paul Sabatier, 2009 : p 329.

Kipnis E, Guery B.P, Tournoy A, Leroyt X, Robrique L, Fialdes P, Nevriere R et Fourrier F (2004). Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*. induced acute lung injury. Shock 21 : p 444- 451.

Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med Mal Infect 36(2) : p 78-91.

Kohler T, Curty L.K, Barja F, Van Delden C et Pecher J.C (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J Bacteriol 182 : p 5990-5996.

Kownatzki R, Tummler B, Doring G (1987). Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* 1 : p 1026-1027.

Kritikar K.R, Basu B.D (1940). Indian Medicinal plants. Bishen Singh Mahendra Pal Singh dehradun 1 : p 954.

Lamont I.L, Beare P.A, Ochsner U, Vasil A.I, et Vasil M.L (2002). Siderophore mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : p 7072-7077.

Lappin-Scott H.M et Costerton J.W (1995). Microbiol biofilms. Cambridge University Press, Cambridge, England.

Landsperger W.J, Kelly-Wintenberg K.D, Montie T.C, Knight L.S, Hansen M.B et Huntentbug C.C (1994). Inhibition of bacterial motility with human anti-flagellar monoclonal antibodies attenuates *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in the immunocompetent rat. *Infect Immun* 62 : p 4825-4830.

Lau G.W, Hassett D.J et Britigan B.E (2005). Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Microbiol* 13 : p 389-397.

Lau G.W, Hassett D.J, Ran H et Kong F (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 10 : p 599-606.

Lazdunski A.M, Ventre I, Sturgis J.N (2004). Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 2 : p 518-592.

Lee T.W, Brownlee K.G, Conway S.P, Denton M et Littlewood J.M (2003). Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2 : p 29-34.

Lee V.T, Smith R.S, Tummler B et Lory S (2005). Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* 73 : p 1695-1705.

Lee C.K, Park K.K, Hwang J.K, Lee S.K et Chung W.Y (2008). The Extract of *Prunus persica* flesh (PPFE) attenuates chemotherapy-induced hepatotoxicity in mice. *Phytotherapy Research* 22 : p 223-227.

Leidal K.G, Munson K.L, Johnson M.C et Denning G.M (2003). Metalloproteases from *Pseudomonas aeruginosa* degrade human RANTES, MCP-1 and ENA-78. *J Interferon Cytokine Res* 23 : p 307-318.

Lie Souley Abdou Fousam Kourah (2002). Sensibilité et révolution de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques à l'hôpital du Point G. Thèse doctorat : p 15.

Lillehoj E.P, Kim B.T et Kim K.C (2002). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellar as an adhesin for Mucl mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282 : p 751-756.

Lory S (1986). Effect of iron on accumulation of exotoxin A-specific mRNA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 168 : p 1451-1456.

- Lynch M.J, Swift S, Kirke D.F, Keevil C.W, Dodd C.E, Williams P (2002). The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Environ Microbiol* 4(1) : 18-28.
- Lyczak J.B, Cannon C.L et Pier G.B (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection : lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2 : p 1051-1060.
- Mah T.F et O'Toole G.A (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 9 : p 34-39.
- Mahajan-Miklos S, Tan M.W, Rahme L.G, and Ausubel F.M (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96 : p 47-56.
- Mahenthalingan E, Campbell M.E et Speert D.P (1994). Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 62 : p 596-605.
- Makin S.A et Beveridge T.J (1996). The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surface. *Microbiology* 142 (Pt 2) : p 299-307.
- Malloy J.L, Veldhuizen R.A, Thibodeaux B.A, O'Callaghan R.J et Wright J.R (2005). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288 : p 409-418.
- Martinez L.R, Casadevall A (2007). *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology* 73 : p 4592-4601.
- Martinelli D, Grossmann G, Séquin U, Brandl H and Bachofen R (2004). Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* BMC. *Microbiol* 4(25) : 1471-2180.
- Matsumoto K (2004). Role of bacterial proteases in *Pseudomonas* and *Serratia* keratitis. *Biol Chem* 385 : p 1007-1016.
- Mattick J.S (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 56 : p 289-314.
- McKnight S.L, Iglewski B.H et Pesci E.C (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182 : p 2702-2708.
- McLean R.J, Pierson L.S and Fuqua C (2004). A simple screening protocol for identification of quorum signal antagonists. *J Microbiol Methods* 58(3) : 351-360.
- Meyer J.M, Neely A, Stintzi A, Georges C et Holder I.A (1996). Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 64 : p 518-523.

Mittelman M.W (1996). Adhesion to biomaterials. Bacterial Adhesion molecular and ecological diversity : 89-127 p.

Miyazaki S, Matsumoto T, Yateda K, Ohno A et Yamaguchi K (1995). Role of exotoxin a in inducing severe *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice. *J Med Microbiol* 43 : p 169-175.

Morihara K, Tsuzuki H, Oka T, Inoue H et Ebata M (1965). *Pseudomonas aeruginosa* elase. Isolation, crystallization and preliminary characterization. *J Biol Chem* 240 : p 3295-3305.

Nguyen V.T, Morange M, Bensaude O (1989). Protein denaturation during heat shock and related stress. Escherichia coli beta-galactosidase and Phtinus pyralis luciferase inactivation in mouse cells. *J Biol Chem* 246 (18) : p 1048-1092.

Okuda K, Morihara K Atsumi Y, Takeuchi H, Kawamots S, Kawasaki H, Suzuki K et Fukushima J (1990). Complete nucleotide sequence of the structural gene for alkaline proteinase from *Pseudomonas aeruginosa* IFO 3455. *Infect Immun* 58 : p 4083-4088.

O'Malley Y.Q, Reszka k.J, Spitz D.R, Denning G.M et Britigan B.E (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287 : p L94-L103.

O'Toole G.A et Kolter R (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30(2) : p 295-304.

Otto M (2008). Staphylococcal biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322 : p 207-228.

Ould Amar B (2013). Investigation des taux de HAP dans les sols avoisinant les centres de stockage et (ou de distribution des hydrocarburées. Mémoire de fin d'étude Master II chimie. Université ABB Tlemcen.

Palmer J.S, Flint S.H et Brooks J (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* 34 : p 577-588.

Pamp S.J, et Tolker-Nielsen T (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189 : p 2531-2539.

Park S et Galloway D.R (1995). Purification and characterization of *lasD* : a second staphylolytic proteinase produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 16 : p 263-270.

Park P.W, Pier G.B, Hinkes M.T et Bernfield M (2001). Exploitation of syndecan-1 shedding by *Pseudomonas aeruginosa* enhances virulence. *Nature* 411 : p 98-102.

Parsek M.R, Greenberg (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gramnegative bacteria : a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : p 8789-8793.

Pavlovskis O.R, Iglewski B.H et Pollack M (1978). Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin a in experimental mouse infections : Adenosine diphosphate ribosylation of elongation factor 2. *Infect Immun* 19 : p 29-33.

Pearson J.P, Pesci E.C et Iglewski B.H (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 179 : p 5756-5767.

Penchev P.I (2010). Etudes des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à bases et hautes pressions : p 129.

Perentesis J.P, Miller S.P et Bodley J.W (1992). Protein toxin inhibitors of protein synthesis. *Biofactors* 3 : p 173-184.

Pier G.B (2000). Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : p 8822-8828.

Pier G.B (2002). CFTR mutation and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection *Curr. Opin Microbiol* 5 : p 81-86.

Pier G.B, Meluleni G et Neuger E (1992). A murine model of chronic mucosal colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 60 : p 4768-4776.

Pierre M, Le Berre R, Tiesset H, Faure K, Guery B, Desseyn J.L, Galabert C, Béghin L, Beermann C, Gottrand F, Husson M.O (2008). Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* virulence gene expression during chronic lung infection in the murine model. *Med Mal Infect* 38(6) : p 318-323.

Prescott Harley. Klein (2003). Microbiologie, Edition française Paris : p 1053-1056.

Pressler T, Bohmora C, Conway S, Dumcius S, Hjelte L, Hoiby N, Kollberg H, Tummler H et Vavrova V (2011). Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition : EuroCareCF Working Group report. *J Cyst Fibros* 10 : p 75-78.

Proesmans M, Balinska-Miskiewicz W, Dupont L, Bossuyt X, Verhaegen J, Hoiby N et de Boeck K (2006). Evaluating the «Leeds criteria » for *Pseudomonas aeruginosa* infect in a cystic fibrosis centre. *Eur Respir J* 27 : p 937-943.

Pukatzki S, kessin R.H and Mekalanos J.J (2002). The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : p 3159-3164.

Queck S-Y, Weitere M, Moreno AM Rice SA, Kjelleberg S (2006). The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environmental Microbiology* 8 : p 1017-1025.

Rahme L.G, Stevens E.J, Wolfort S.F, Shao J, Tompkins R.G et Ausubel F.M (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity on plants and animals. *Science* 268 : p 899-1902.

Rheder A (1940). Manual of cultivated trees and shrubs hardy in north America. Macmillan company New York : 425-481.

Riedel K, Hentzer M, Geisenberger O, Huber B, Steidle A, Wu H, Hoiby N, Givskov M, Molin S, Eberl L (2001). N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Buekholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiol* 147(12) : p 3249-3262.

Rojas A, Hernandez L, Pereda-Miranda R, and Mata R (1992). Screening for antimicrobial activity of drug extracts and puze natural products form Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 35 : p 275-283.

Ruer S, Stender S, Filoux A et de Bentzmann S (2007). Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa* : functionality and specificity of chaperoneusher machineries. *J Bacteriol* 189(9) : p 3547-3555.

Ruimy R et Andremont A (2004). Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique et inhibition. *Réanimation* 13 : p 176-184.

Rumbaugh K.P, Griswold J.A, Hamood A.N (2000). The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect Rev* 2(14) : p 1721-1731.

Schultz M.J, Rijneveld A.W, Florquin S, Speelman P, Van Deventer S.J et Van der Poll T (2001). Impairment of host defence by exotoxin a in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice. *J Med Microbiol* 50 : p 822-827.

Schultz M.J, Speelman P, Zaat S.A, Hack C.E, van Deventer S.J et van der Poll T (2000). The effect of *Pseudomonas* exotoxin a on cytokine production in whole blood exposed to *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immuno Med Microbiol* 29 : p 227-232.

Schuster M, Lostreh C.P Ogi T et Greenberg E.P (2003). Identificatuin, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes : a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 185 : p 2066-2079.

Schurr M.J, Martin D.W, Mudd M.H, Hiblre N.S, Boucher J.C et Deretic V (1993). The algD promoter : regulation of alginate production by *Pseudomonas aeruginosa* in cyclic fibrosis. *Cell Mol Biol Res* 39 : p 371-376.

Shankar S, Ye R.W, Schlichtman D et Chakrabarty A.M (1995). Exopolysccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* : enzymology and regulation of gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 70 : p 221-255.

Shaver C.M et Hauser A.R (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* 72 : p 6969-6977.

Shin T.Y, Park S.B, Yoo J.S, Kim I.K, Lee H.S, Kwon T.K, Kim M.k, Kim J.C et Kim S.H (2010). Anti-allergic inflammatory activity of the fruit of *Prunus persica* : role of calcuim and NF-Kappa. *J Food Chem Toxicol* 48(10) : p 2797-2807.

Simpson D.A, Ramphal R, Lory S (1992). Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* adherence : distinct genetic loci control attachment to epithelial cells and mucins. *Infect Immun* 60(9) : p 3771-3779.

- Singh P.K, Schaefer A.L, Parsek M.R, Moninger T.O, Welsh M.J et Greenberg E.P (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407 : p 762-764.
- Smith R.S, Harris S.G, Phipps R (2002). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-Oxododecanoyl) homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol* 184 : p 1132-1139.
- Spormann A.M (2008). Physiology of microbes in biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322 : p 17-36.
- Steinberger R.E, Holden P.A (2005). Extracellular DNA in Single- and Multiple-Species Unsaturated Biofilms. *Appl and Environmental Microbiology* 71 : p 5404-5410.
- Stewart PS, Franklin M.J (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 6 -3 : p 199-210.
- Stover C.K, Pham X.Q, Erwin A.L, Mizoguchi S.D, Warrenner P, Hickey M.J et al (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406(6799) : p 959-964.
- .
- Sumaira Aziz et Habib-ur-rahman (2012). Biological activities of *Prunus persica* L.Batch. *Jornal of Medicinal Plants Research* : p 948-951.
- Suter S (1994). The role of bacterial proteases in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 150 : p 118-122.
- Stoodley P, Sauer K, Davies D.G et Costerton J.W (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56 : p 187-209.
- Stonehouse M.J, Cota-Gomez A, Parker S.K, Martin W.E, Hankin J.A, Murphy R.C, Chen W, Lim K.B, Hackett M, Vasil A.I et Vasil M.I (2002). A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol* 46 : p 661-676.
- Tahhan R.A, Sandir T.R, Bodour A.A et Maier R.M (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* : effect on cell surface properties and interation with hydrophobic substrates. *Appl Enviro Microbiol* 66 : p 3262-3268.
- Takase H, Nitani H, Hoshino K et Otani T (2000). Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun* 68 : p 1834-1839.
- Tang H, Kays M et Prince A (1995). Role of *Pseudomonas aeruginosa* pili in acute pulmonary infection. *Infect Immun* 63 : p 1278-1285.
- Tang H.B, Di Mango E, Bryan R, Gambello M, Igelewski B. H, Goldberg J.B et Prince A (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 64 : p 37-43.

Terada L.S, Johansen K.A, Nowbar S, Vasil A.I et Vasil M.L (1999). *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun* 67 : p 2371-2376.

Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, Rosenau F et Jaeger K.E (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin lecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 151 : p 1313-1323.

Tomli K.L, Malto R.J, Ramage G, Storey D.G, Sokol P.A, Ceri H (2005). Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of burkholderia cenocepacia biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 71 : p 5208-5218.

Traidej M, Marquart M.E, Caballero A.R, Thibodeaux B.A et O'Callaghan R.J (2003). Identification of the active site residues of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV. Importance of enzyme activity in autoprocessing and activation. *JBiol Chem* 278 : p 2549-2553.

Vallet I, Olson J.W, Lory S, Lazdunski A et Filoux A (2001). The chaperone /usher pathway of *Pseudomonas aeruginosa* : Identificatuin of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : p 6911-6916.

Ventre I, Goodman A.I, Vallet-Gely I, Vasseur P, Soscia C, Molin S, Bleves S, Lazdunski A, Lory S et Filloux A (2006). Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(1) : 171-176.

Wagner V.E, Bushnell D, Passador L, Brooks A.I et Iglewski B.H (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons : effects of growth phase and environment. *J bacteriol* 185 : p 2080-2095.

Wang X, Gong L, liang S, Han X, Zhu C et Li Y (2005). Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseumonas aeruginosa*. *Harmful Algae* 4 : p 433-443.

Wathins L et Costerton J.W (1984). Growth and biocide resistance of bacterial biofilms in industrial systems. *Chemical Times Trends* : 35-40.

Webb J.S, Thompson L.S, James S, Charlton T, Tolker-Nielsen T, Koch B, Givskov M et Kjelleberg S (2003). Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 185(15) : p 4585-4592.

Whitchurch C.B, Tolker-Nielsen T, Ragas P.C, Mattick J.S (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295(5559) : p 1487-1487.

Wick M.J, Hamood A.N et Igiewski B.H (1990). Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin a. *Mol Microbiol* 4 :527-535.

Winzer k, Falconer C, Garber N.C, Giggel S.P, Camara M et Williams P (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-III are controlled by quorum sensing and by Rpos. *J Bacteriol* 182 : p 6401-6411.

Wilderman P.J, Vasil A.I Johnson Z, Wilson M.J, Cunliffe H.E, Lamont I.L et Vasil M.L (2001a). Characterization of an endoprotease (prpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 69 :5385-5394.

Williams D.C, McGarvey D.J, Katahira E.J et Croteau R (1998). Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'Pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair. *Biochemistry* 37 : 12213-12220.

Woods D.E, Cantin A, Cooley J, Kenney D.M, Remold-O'Donnell E (2005). Aerosol treatment with mnei suppresses bacterial proliferation in a model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Pediatr Pulmonol* 39 : p 141-149.

Yang J, Bos R, Belder G.F, Engel J et Busscher H.J (1999). Deposition of oral bacteria and polystyrene particles to quartz and dental enamel in a parallel plate and stagnation point flow chamber. *J Colloid Interface Sci* 220 : p 410-418.

Zhang H, Kong B, Xiong Y.L, and Sun X (2009). Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged slices stored at 4°C. *Meat Science* 81 : p 686-692.

Zulianello L, Canard C, Kohler T, Caille D, Lacroix J.S et Meda P (2006). Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 74 : p 3134-3147.



*Annexes*

## **Annexes : Les milieux de culture**

- **Gélose nutritive (GN)**

Peptone	6g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
NaCl	5g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2

- **king A solide**

Peptone de caséine	20g
Sulfate de magnésium	1.5g
Phosphate bipotassique	1.5g
Glycérol	10ml
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2

- **king B solide**

Peptone de caséine	20g
Sulfate de potassium	10g
Chlorure de magnésium	1.4g
Glycérol	10ml
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2

- **Milieu LB (Luria Bertani) (Sigma) (pour réactivation des souches)**

Tryptone	10g/L
Extrait de levure	5g/L
NaCl	10g/L

- **Milieu Mueller Hinton (MH) (activité antibactérienne)**

Extrait de viande	3g
Acide hydrolyse de caséine	17g
Amidon	1.5g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2

- **Bouillon nutritif (pour réactivation des souches)**

Peptone	6g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
NaCl	5g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2