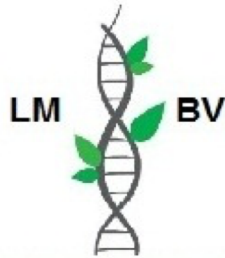


Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem

Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Laboratoire de Microbiologie
et Biologie Végétale



UNIVERSITE
Abdelhamid Ibn Badis
MOSTAGANEM

Filière : Sciences Biologique

Option : Microbiologie

THÈSE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DOCTORAT
EN SCIENCES

Par
M^{elle} LATTAB Aicha

Thème

**Effet des composés naturels sur l'adhérence et
la formation de biofilm à *Pseudomonas*
*aeruginosa***

Soutenue publiquement le **Dimanche 11/03/2018** devant le jury de soutenance suivant :

Président	MEKHALDI Abdelkader	Pr	Université de Mostaganem
Directeur de thèse	DJIBAOUI Rachid	Pr	Université de Mostaganem
Examineur	AIT SAADA Djamel	MCA	Université de Mostaganem
Examineur	KACEM Brahim	Pr	ENS de Mostaganem
Examineur	BEKADA Ahmed Med Ali	Pr	Centre Universitaire de Tissemsilet
Examineur	BELAHCENE Miloud	Pr	Centre Universitaire de Ain-Timouchent

Dédicaces

À mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont encouragé et soutenu pendant mes études.

À mes chers frères et mes chères sœurs.

À ma chère belle-sœur Fouzia

À mes chers neveux et mes nièces

À toutes ma famille.

À tous mes collègues et mes amies.

À tous ceux que j'aime.

Picha

REMERCIEMENTS

En premier, je tiens à remercier mon «DIEU», le très puissant, qui m'a donné la santé et le courage pour aller au bout de cette thèse.

Je tiens particulièrement à remercier le **Pr. DJIBAOUI Rachid** qui, par sa grande compétence scientifique, ses précieux conseils et son implication assidue m'a aidé et soutenu tout au long de ce travail de recherche. Je le remercie très sincèrement pour son immense disponibilité, son dynamisme et son écoute constante, attentive et constructive.

J'exprime toute ma gratitude au professeur **Pr. MEKHALDI Abdelkader**, Directeur du laboratoire de Microbiologie et biologie végétale de l'université de Mostaganem où on a réalisé ce travail pour ses conseils et ses recommandations et je le remercie pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Je remercie vivement **Mr. AIT SAADA Djamel** (Maître de conférence A, à l'Université de Mostaganem), **Mr. KACEM Brahim** ; Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Mostaganem, **Mr. BEKADA Ahmed Med Ali** ; Professeur au Centre Universitaire de Tissemsilet) et **Mr. BELAHCENE Miloud** (Professeur au Centre Universitaire de Ain-Timouchent) d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je remercie étroitement mon cher père et ma chère mère de m'avoir toujours soutenue et encouragée durant toutes ces années.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire de DIAG-GENE (Angers, France).

Je remercie vivement Monsieur Le **Pr. BOUDEROUA Kaddour** pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Sans oublier de remercier **Dr BOUZOUINA Mohammed, Dr DEBBA Mohamed Bachir et Dr Mokhtar Meriem.**

Je remercie **Mr. DAHLOUM Houari** (Maitre de conférences B à l'Université de Mostaganem) qui m'a aidé pour faire l'étude statistique.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres du Laboratoire de Microbiologie et Biologie végétale.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des employés de l'EPSP de Sidi Lakhdar et du service de Bactériologie à l'Hôpital de Ain Tedeles «Mostaganem» et les techniciens du laboratoire à l'Université de Mostaganem : **Mr. BENBOUZIANE Dj., Mr. Nabil, M^{me} AMIR F., M^{me} Djahira, M^{me} Latifa, M^{me} Fatima**, pour l'aide qu'ils m'ont apportée.

J'exprime mes profonds remerciements à **Mr. ARABI Abed, IDAR Abou Baker, Dahah Hicham, Hamoum Hakim, BENCHOUK Amina et ABDELLI Wafae** mes collègues au laboratoire de Microbiologie et biologie végétale.

Je tiens à remercier aussi tous qui m'ont aidé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

الملخص

توفر طريقة الحياة في البيوفيلم للبكتريا *P. aeruginosa* بيئة كثيفة و واقية من المضادات الحيوية والجهاز المناعي للمضيف، مما يجعل علاج عدوى هذه البكتريا أكثر تعقيدا ويتطلب البحث عن علاجات جديدة. في هذا الإطار قمنا بدراسة النشاط المضاد للبكتيريا والتأثير على تشكيل البيوفيلم بمستخلصات، تم الحصول عليها من ثلاثة نباتات وهي: الثوم (*Allium sativum*) وأوراق نوعين من الحناء (*Lawsonia inermis*) وأوراق نبات الخوخ (*Prunus persica*). مستخدمين في ذلك ستة عزلات سريرية لـ *P. aeruginosa* وسلالة مرجعية *P. aeruginosa* ATCC 27853. تم اختبار تشكيل البيوفيلم على نمطين من الدعامات وفي وسطين هما تريبتكاز الصويا ومرق البيوفيلم المعدل.

أثبتت هذه الدراسة أن كمية البيوفيلم التي تشكلها *P. aeruginosa* تعتمد على السلالة البكتيرية نفسها وعلى الوسط المغذي ونمط الدعامة التي تنبت عليها البكتريا. كما لوحظ أن مردود مركبات متعددة الفينول و الفلافونويدات تتعلق بالنبات المستعمل و بنوع المذيب المستخدم في الاستخلاص، حيث وجد أن مستخلص أسيتات الإثيل للحناء *L. inermis* أظهر كميات أعلى من متعددة الفينول تقدر بـ $224,83 \pm 20,07$ mg EAG/g و $244,58 \pm 25,54$ mg EAG/g لأوراق الحناء من منطقة أدرار ومنطقة بسكرة على التوالي.

إن قيم التركيز المثبط الأدنى (CMI) التي سجلت بالمستخلصات المدروسة تتراوح من 3,15 إلى 6,25 % (v/v) لمستخلص الثوم و 3,15mg/ml إلى 12,5 mg/ml لمستخلصات أسيتات الإثيل و البيتانول لنوعي *L. inermis* و 20 mg/ml إلى 25 mg/ml لمستخلصات *P. persica*. وقد انخفض تشكيل البيوفيلم أيضا مع CMI 1/2 لمستخلصات البيتانول لنوعي الحناء، بينما لم تأثر CMI 1/2 لمستخلص أسيتات الإثيل على تشكيل البيوفيلم عند جميع عزلات *P. aeruginosa* ولم تظهر مستخلصات *P. persica* أي انخفاض في كمية البيوفيلم وعلى العكس من ذلك تسببت في زيادة كمية تشكيلها.

بينت نتائج تحليل لمستخلصات أسيتات الإثيل والبيتانول لنوعي الحناء *L. inermis* و *P. persica* بواسطة كروماتوغرافيا السائل ذو الأداء العالي (HPLC) تنوعا في التركيب. وهذا ما قد يفسر الاختلاف الملحوظ في النشاط المضاد للميكروبات وتكوين البيوفيلم بواسطة سلالات *P. aeruginosa*.

أدت إضافة حمض السليسيك (AS) إلى تثبيط *P. aeruginosa*. حيث قدر CMI و CMB بحوالي 10mM و 20mM على التوالي. وانخفض تشكيل البيوفيلم وإنتاج البيوسيانين أيضا بزيادة تراكيز حمض السليسيك. سلالة واحدة فقط (P2) كانت منتجة للرمولبيدات في وسط PPGAS وتوقف هذا الإنتاج تماما عند تركيز 2 mM من حمض السليسيك. أظهر تأثير AS على الحركة الاندفاعية للبكتريا *P. aeruginosa* انخفاضا تدريجيا لأقطار المستعمرات بزيادة تركيز حمض السليسيك.

كلمات المفتاحية: *Prunus persica*, *Lawsonia inermis*, *Allium sativum*, *Pseudomonas aeruginosa*، النشاط المضاد للبكتيريا، البيوفيلم، حمض السليسيك.

Résumé

Le mode de vie en biofilm fournit à *P. aeruginosa* un environnement dense qui le protège contre les antibiotiques et le système immunitaire de l'hôte, ce qui rend le traitement de ses infections plus compliqué et nécessite de nouvelles thérapies.

Dans ce cadre nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude de l'activité antibactérienne et à l'effet sur la formation de biofilm des extraits obtenus de trois plantes : *Allium sativum*, *Prunus persica* et *Lawsonia inermis*, en utilisant six isolats cliniques de *P. aeruginosa* et une souche de référence de *P. aeruginosa* ATCC 27853. La formation de biofilm a été testée sur deux types de support et dans deux types de milieu de culture à savoir le Bouillon de Trypticase de Soja (TSB) et le Bouillon Biofilm Modifié (BBM).

Nous avons constaté que la quantité de biofilm formée par *P. aeruginosa* dépendait de l'isolat testé, du milieu de culture utilisé et aussi de la matière du support sur lequel l'isolat s'adhère. Les résultats de cette étude indiquent que le rendement d'extraction dépend à la fois de la plante choisie et du solvant utilisé pour l'extraction où il a été constaté que l'extrait d'acétate d'éthyle de *L. inermis* a donné les teneurs les plus élevées, avec des valeurs ; en polyphénols de $224,83 \pm 20,07$ mg EAG/g d'extrait et $244,58 \pm 25,54$ mg EAG/g d'extrait pour les feuilles de la région d'Adrar et la région de Biskra respectivement.

Les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) enregistrées par les extraits étudiés varient de 3,15 à 6,25% (v/v) pour l'extrait brut d'Ail, de 3,15mg/ml à 12,5mg/ml pour les fractions d'acétate d'éthyle et de butanol pour les deux variétés de *L. inermis* et de 20mg/ml à 25mg/ml pour les fractions de *P. persica*.

En outre, la formation de biofilm a été aussi diminuée avec la $\frac{1}{2}$ CMI des fractions butanoliques de deux échantillons de *L. inermis* testés. Alors que la $\frac{1}{2}$ CMI d'acétate d'éthyle n'a pas affecté la formation des biofilms chez tous les isolats testés de *P. aeruginosa*. L'extrait de *P. persica* a montré une activité très faible et bien au contraire la concentration $\frac{1}{2}$ CMI pour les deux fractions (acétate d'éthyle et butanolique) de *P. persica* provoque une augmentation de la quantité du biofilm formé.

Les résultats d'analyse des fractions des deux variétés de *L. inermis* et de *P. persica* par HPLC montrent une variabilité de la composition. Ceci peut expliquer la différence remarquée dans l'activité antibactérienne et l'effet sur la formation du biofilm par les souches de *P. aeruginosa* étudiées.

La présence de l'acide salicylique (AS) a conduit à une inhibition de croissance de *P. aeruginosa* dont les CMI et les CMB ont été autour de 10 mM et 20 mM respectivement. La formation des biofilms et la production de pyocyanine ont été diminuées par l'augmentation des concentrations de l'AS. Une seule souche (P2) a produit des rhamnolipides dans le milieu PPGAS, cette production a été inhibée complètement avec une concentration de 2mM de l'AS. L'effet de l'AS sur la motilité de type swarming a montré une diminution progressive des diamètres des colonies par l'augmentation de concentration de cet acide.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, *Allium sativum*, *Lawsonia inermis*, *Prunus persica*, Activité antibactérienne, Biofilm, Acide salicylique.

Abstract

The biofilm lifestyle provides to *P. aeruginosa* a dense environment that protects it against antibiotics and host's immune system, making treatment of its infections complicated and requiring new therapies.

In this present work, we investigated the antibacterial activity and the anti-biofilm effect of extracts obtained from three plants: *Allium sativum*, *Prunus persica* and *Lawsonia inermis* using six clinical isolates of *P. aeruginosa* and a reference strain *P. aeruginosa* ATCC 27853. The formation of biofilm was tested on two types of support and in two types of culture medium namely Soybean Trypticase Broth (STB) and Modified Biofilm Broth (MBB).

We found that the amount of biofilm formed by *P. aeruginosa* depended on the isolate tested, on the culture medium used and also on the material of the support to which the isolate adheres. The results of this study indicate that the yield extraction depends on both the selected plant and the solvent used for extraction, where it was found that the ethyl acetate extract of *L. inermis* gave the highest contents, with polyphenol content values of 224.83 ± 20.07 mg EAG/g extract and 244.58 ± 25.54 mg EAG/g extract for the leaves of the Adrar region and the Biskra region respectively.

The minimum inhibitory concentration (MIC) values recorded by the extracts studied range from 3.15 to 6.25% (v/v) for the crude extract of garlic, from 3.15 mg/ml to 12.5 mg/ml for the ethyl acetate and butanol fractions for the two varieties of *L. inermis* and from 20 mg/ml to 25 mg/ml for *P. persica* fractions.

In addition, biofilm formation was also decreased with the $\frac{1}{2}$ MIC of the butanolic fractions of the two *L. inermis* samples tested. While $\frac{1}{2}$ MIC of ethyl acetate did not affect the formation of biofilms in all of the isolates tested of *P. aeruginosa*. The extract of *P. persica* showed no or very low activity and, on the contrary, the $\frac{1}{2}$ MIC concentration for the two fractions (ethyl acetate and butanolic) of *P. persica* caused an increase in the amount of the biofilm formed.

Fractions analysis of the two varieties of *L. inermis* and *P. persica* by HPLC show a variability in their composition. This may explain the observed difference in antibacterial activities and effects on biofilm formation of *P. aeruginosa*.

The presence of salicylic acid (SA) resulted in inhibition of *P. aeruginosa* whose MICs and MBCs were around 10 mM and 20 mM respectively. The formation of biofilms and the production of pyocyanin have been reduced by increasing concentrations of SA. A single strain (P2) produced rhamnolipids in PPGAS medium, this production was inhibited completely with a concentration of 2 mM of SA. The effect of SA on swarming motility showed a gradual decrease in colony diameters by increasing the concentration of this acid.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, *Allium sativum*, *Lawsonia inermis*, *Prunus persica*, Antibacterial activity, Biofilm, Salicylic acid.

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités sur *Pseudomonas aeruginosa*

I.1. Description	4
I.2. Le génome de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
I.3. Infections à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
I.3.1. Infections chroniques	6
I.3.2. Infections aiguës.....	7
I.4. Facteurs de virulence.....	8
I.4.1. Facteurs de virulence cellulaire.....	8
I.4.1.1. Le flagelle.....	8
I.4.1.2. Pili.....	9
I.4.1.2.1. Pili de type IV.....	9
I.4.1.2.2. Fimbriae.....	10
I.4.1.3. Lipopolysaccharides.....	10
I.4.1.4. Exopolysaccharides (EPS)	11
I.4.2. Facteurs de virulence extracellulaire.....	11
I.4.2.1. Exotoxines.....	11
I.4.2.1.1. Exotoxine A.....	11
I.4.2.1.2. Exotoxine du SST3.....	12
I.4.2.2. Élastases.....	12
I.4.2.3. Phospholipases C (PLC).....	13
I.4.2.4. Rhamnolipides	13
I.4.2.5. Lectines solubles.....	14
I.4.2.6. Pyoverdine.....	14
I.4.2.7. Pyocyanine.....	14
I.5. Régulation de l'expression des facteurs de virulence.....	16
I.5.1. Le Quorum Sensing chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16

Chapitre II : Le biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

II.1. Le Biofilm.....	18
II.2. Biofilm chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
II.2.1. La matrice du biofilm chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
II.2.1.1. L'alginat.....	19

II.2.1.2. Le Psl.....	20
II.2.1.3. Le Pel.....	20
II.2.1.4. L'ADN extracellulaire.....	20
II.2.2. Les étapes de formation de biofilm chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
II.2.2.1. Adhésion réversible.....	22
II.2.2.2. Adhésion irréversible.....	22
II.2.2.3. Maturation primaire.....	23
II.2.2.4. Maturation secondaire.....	23
II.2.2.5. Essaimage et dispersion du biofilm.....	24
II.2.3. Les mécanismes de résistance du biofilm chez <i>P. aeruginosa</i>	25
II.2.3.1. Résistance du biofilm aux antibiotiques	25
II.2.3.2. Résistance du biofilm envers le système immunitaire	26
II.2.4. Systèmes de régulations impliquées dans la formation de biofilm à <i>P. aeruginosa</i> ..	28
II.2.4.1. Régulation par le système de détection du Quorum Sensing.....	29
II.2.4.2. Les systèmes à deux composants <i>GacS/GacA</i> et <i>RetS/LadS</i>	29
II.2.4.3. Di-guanosine monophosphate cyclique (di-GMPc).....	30

Chapitre III : Effet des substances naturelles sur la formation de biofilm

III.1. Inhibition de la formation du biofilm par des substances naturelles.....	32
III.1.1. Composés anti-biofilm avec activité anti-Quorum sensing	32
III.1.1.1. Inhibition de l'activation et de la synthèse des AHL.....	33
III.1.1.2. Inhibition de la formation des complexes LasR ou RhlR avec les AHL.....	34
III.1.1.2.1. Inhibiteurs naturels du récepteur.....	35
III.1.1.2.2. Inhibiteurs synthétiques du récepteur.....	35
III.1.1.3. Inhibition de la transcription de <i>lasR/lasI</i> et <i>rhlR/rhII</i>	35
III.1.1.4. Inhibition du quorum sensing par macrolides.....	36
III.1.2. Composés anti-biofilm sans activité anti-Quorum sensing.....	37
III.2. Description et caractéristique des plantes testées contre la formation du biofilm à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
III. 2.1. L'ail (<i>Allium sativum</i>)	38
III.2.1.1. Taxonomi	38
III.2.1.2. Aspect botanique	38
III.2.1.3. Principaux constituants phytochimique et propriété pharmacologiques	39
III.2.2. Le henné (<i>Lawsonia inermis</i>)	40
III.2.2.1. Taxonomie	40
III.2.2.2. Aspect botanique.....	40

III.2.2.3. Principaux constituants phytochimique et propriété pharmacologiques	40
III.2.3. Le pêcher (<i>Prunus persica</i>)	42
III.2.3.1. Taxonomie.....	42
III.2.3.2. Aspect botanique.....	42
III.2.3.3. Principaux constituants phytochimique et propriété pharmacologiques	43
III.3. Acide salicylique	44
III.3.1. Origine et rôle de l'Acide salicylique chez les plantes	44
III.3.2. Propriétés pharmacologiques.....	44

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre I : Matériel et méthodes

I. Matériel et Methodes.....	45
I.1. Isolats bactériens	45
I.1.1. Identification des isolats	45
I.1.1.1. Identification par la Galerie API 20NE.....	45
I.1.1.2. Identification génotypique	46
I.2.1. Conservation des souches.....	47
I.1.3. Etude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques.....	47
I.2. Formation du biofilm	49
I.2.1. Evaluation de la biomasse adhéree en fonction de la charge d'inoculum et du temps d'incubation.....	49
I.2.2. Evaluation de la biomasse adhéree en fonction du milieu de culture	49
I.2.3. Evaluation de la biomasse adhéree en fonction de la matière de support utilisé	50
I.2.4. Evaluation de la biomasse adhéree en fonction de l'isolat testé.....	50
I.3. Activité antibactérienne et effet sur la formation de biofilm des extraits de plantes contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
I.3.1. Matériel végétal.....	50
A. L'ail (<i>Allium sativum</i>)	51
B. Le henné (<i>Lawsonia inermis</i>)	51
C. Le pêcher (<i>Prunus persica</i>)	52
I.3.1.1. Préparations des extraits.....	52
I.3.1.1.1. Extrait brut d' <i>Allium sativum</i> (jus frais de l'ail)	52
I.3.1.1.2. Extraction hydrp-méthanolique.....	53
I.3.1.1.3. Extraction par l'acétate d'éthyle et le butanol.....	53

I.3.1.2. Rendement d'extraction	54
I.3.1.3. Dosage des polyphénols totaux.....	55
I.3.1.4. Dosage des flavonoïdes.....	55
I.3.2. Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits d' <i>A. sativum</i> , <i>L. inermis</i> et <i>P. persica</i>	56
I.3.2.1. L'effet antibactérien par la méthode de diffusion par disque.....	56
I.3.2.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	56
I.3.2.3. Détermination de la Concentration Minimale bactéricide (CMB)	58
I.3.3. Effet des extraits préparés sur la formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i>	58
I.3.3.1. Effet des extraits sur la formation de biofilm en tubes.....	58
I.3.3.2. Effet des extraits sur la formation de biofilm en microplaque	60
I.4. Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)	61
I.5. Effet de l'acide salicylique.....	62
I.5.1. Détermination la CMI et la CMB.....	62
I.5.2. Effet de l'acide salicylique sur la formation du biofilm.....	62
I.5.3. Effet de l'acide salicylique sur la mobilité.....	62
I.5.4. Effet de l'acide salicylique sur la production de pyocyanine.....	63
I.5.5. Effet de l'acide salicylique sur la production des Rhamnolipides.....	63
I.5.5.1 Production des Rhamnolipides par les souches testées	63
I.5.5.2 Effet de l'acide salicylique sur la production des rhamnolipides.....	64
I.6. Calculs et traitement statistique des données.....	64

Chapitre II : Résultats et discussion

II. Résultats et Discussion.....	65
II.1. Isolement et identification des <i>Pseudomonas</i>	65
II.2. Etude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques	66
II.3. Formation du biofilm	69
II.3.1. Evaluation de la biomasse adhéree en fonction des isolats testés	69
II.3.2. Evaluation de la biomasse adhéree en fonction de la charge d'inoculum et du temps d'incubation	71
II.3.3. Evaluation de la biomasse adhéree en fonction du milieu de culture utilisé (TSB et BBM)	72
II.3.4. Evaluation de la biomasse adhéree en fonction de la matière du support (verre et polystyrène).....	73
II.4. Activité antibactérienne et effet sur la formation de biofilm des extraits de plantes contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
II.4.1. Extraction.....	74

II.4.1.1. Rendements d'extractions	74
II.4.1.2. Détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes	75
II.4.2 Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits de <i>L. inermis</i> , <i>P. persica</i> de <i>A. sativum</i>	78
II.4.2.1. L'effet antibactérien par la méthode de diffusion sur disques	78
II.4.2.2 Détermination de La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)	80
II.4.3. L'effet des extraits préparés sur la formation de biofilm par des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	86
II.4.3.1. L'effet d'extrait aqueux d' <i>Allium sativum</i>	86
II.4.3.2. L'effet des extraits des deux variétés de <i>Lawsonia inermis</i>	89
II.4.3.3. L'effet des extraits de <i>Prunus persica</i>	95
II.5. Résultats des analyses par HPLC des fractions testées de <i>P. persica</i> et de deux variétés de <i>L. inermis</i>	97
II.6. Acide salicylique.....	102
II.6.1. Concentration minimale inhibitrice.....	102
II.6.2. Effet de l'acide salicylique sur la formation du biofilm.....	102
II.6.3. Effet de l'acide salicylique sur la mobilité.....	104
II.6.4. Effet de l'acide salicylique sur la production de pyocyanine.....	106
II.6.4. Effet de l'acide salicylique sur la production des Rhamnolipides	107
II. 6.4.1. Production des Rhamnolipides	107
II.6.4.2. Effet de l'acide salicylique sur la production des Rhamnolipides.....	108
Conclusion.....	110
Références bibliographiques.....	112
Annexe.	
Travaux scientifiques.	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme.....	48
Tableau 2 :	Résultats de l'identification biochimique des isolats.....	65
Tableau 3 :	Susceptibilité des isolats de <i>P. aeruginosa</i> vers des antibiotiques testés.....	68
Tableau 4 :	Teneurs en phénols totaux et flavonoïdes des extrait d'acétate d'éthyle et de butanol obtenus par deux variétés de <i>L. inermis</i> et de <i>P. persica</i>	78
Tableau 5 :	Effet antibactérien de différents extraits préparés à partir d' <i>Allium sativum</i> , <i>Prunus persica</i> et deux variété de <i>Lawsonia inermis</i> sur milieu MH.....	79
Tableau 6 :	Valeurs des paramètres antibactériens de différents extraits sur les souches testées de <i>P. aeruginosa</i>	85
Tableau 7 :	Effet de l'extrait d' <i>Allium sativum</i> sur la formation des biofilms des isolats testés de <i>P. aeruginosa</i>	87
Tableau 8 :	Effet de l'extrait butanolique de <i>L. inermis</i> de la région d'Adrar sur la formation des biofilms chez les isolats testés de <i>P. aeruginosa</i>	90
Tableau 9 :	Effet de l'extrait butanolique de <i>L. inermis</i> de la région de Biskra sur la formation de biofilm chez les isolats testés de <i>P. aeruginosa</i>	92
Tableau 10 :	Résultat d'analyse par HPLC des fractions testées des deux variétés de <i>L. inermis</i>	99
Tableau 11 :	Résultat d'analyse par HPLC des fractions testées de <i>P. persica</i>	101
Tableau 12 :	Effet de l'acide salicylique sur la formation des biofilms par les isolats testés de <i>P. aeruginosa</i>	104

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Facteurs de virulence chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
Figure 2 :	Modèle de formation d'un biofilm par <i>P. aeruginosa</i>	21
Figure 3 :	Systèmes bactériens pertinents et facteurs impliqués dans la régulation de la formation de biofilm à <i>P. aeruginosa</i>	28
Figure 4 :	Schéma des mécanismes potentiels d'action des extraits végétaux et phytochimiques comme QSI.	33
Figure 5 :	Photo d' <i>Allium sativum</i>	38
Figure 6 :	Photo de <i>Lawsonia inermis</i>	40
Figure 7 :	Photo de <i>Prunus persica</i>	42
Figure 8 :	La galerie biochimique API 20 NE.....	46
Figure 9 :	Echantillon d' <i>Allium sativum</i> utilisé	51
Figure 10 :	les échantillons de <i>L. inermis</i> utilisés dans cette étude, feuilles de la région d'Adrar (V1) et feuilles de la région de Biskra (V2).	51
Figure 11 :	Feuilles de <i>Prunus persica</i> utilisées.....	52
Figure 12 :	Protocole d'extraction utilisé pour les feuilles de <i>L. inermis</i> et <i>P. persica</i>	54
Figure 13 :	Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.....	57
Figure 14 :	Etapas du protocole de suivi de la formation du biofilm en tubes.....	59
Figure 15 :	Etapas du protocole de suivi de la formation du biofilm sur microplaque.....	60
Figure 16 :	Appareil Shimadzu équipé d'une pompe de chromatographie liquide de haute pression muni d'un détecteur UV à deutérium.....	61
Figure 17 :	Électrophorèse en gel d'agarose du gène 16S-ARNr amplifié par PCR pour les isolats cliniques (1-6).....	66
Figure 18 :	Sensibilité de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques testés.....	67
Figure 19 :	La déférence remarquée entre les souches testées de <i>P. aeruginosa</i>	70
Figure 20 :	La variation de la densité optique en fonction de la variation de la souche testée de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
Figure 21 :	Les valeurs de DO enregistrées pour la souche <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 aux différents temps d'incubation avec deux charges d'inoculum initial différentes.	72
Figure 22 :	Evaluation de formation de biofilm en fonction de milieu de culture utilisé (TSB, BBM)	73
Figure 23 :	La formation de biofilm dans des tubes en verre	74

Figure 24 :	Rendement d'extraction des fractions d'acétate d'éthyle et butanolique de <i>P. persica</i> et des deux variétés de <i>L. inermis</i>	75
Figure 25 :	Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux réalisée à l'aide de l'acide gallique.	76
Figure 26 :	Courbe d'étalonnage des Flavonoïdes réalisée à l'aide du quercétine.....	76
Figure 27 :	Activité antibactérienne d'extrait d'acétate d'éthyle	79
Figure 28 :	La CMI de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>L. inermis</i> des feuilles de <i>L. inermis</i> de la région d'Adrar.....	83
Figure 29 :	La CMB de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>L. inermis</i> des feuilles de <i>L. inermis</i> de la région d'Adrar.....	83
Figure 30 :	la CMI de l'extrait butanolique de <i>L. inermis</i> des feuilles de <i>L. inermis</i> de la région d'Adrar.	83
Figure 31 :	La CMB de l'extrait butanolique de <i>L. inermis</i> des feuilles de <i>L. inermis</i> de la région d'Adrar.....	84
Figure 32 :	La CMI de l'extrait butanolique des feuilles de <i>Prunus persica</i>	84
Figure 33 :	La CMB de l'extrait butanolique des feuilles de <i>Prunus persica</i>	84
Figure 34 :	Effet d'extrait d' <i>A. sativum</i> sur la formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (méthode en tubes).....	87
Figure 35 :	Effet d'extrait d' <i>A. sativum</i> sur la formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (méthode en microplaques).....	88
Figure 36 :	Effet d'extrait d' <i>A. sativum</i> sur la formation des biofilms par les isolats de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89
Figure 37 :	Effet de l'extrait butanolique de <i>L. inermis</i> (V1) sur la formation de biofilm à <i>P. aeruginosa</i>	91
Figure 38 :	Effet de l'extrait butanolique de <i>L. inermis</i> (V1) sur la formation de biofilm par les souches testées de <i>P. aeruginosa</i>	91
Figure 39 :	Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>L. inermis</i> (V1) sur la formation de biofilm à <i>P. aeruginosa</i>	91
Figure 40 :	Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>L. inermis</i> (V1) sur la formation de biofilm à par les souches testées de <i>P. aeruginosa</i>	92
Figure 41 :	Effet de l'extrait butanolique de <i>L. inermis</i> (V2) sur la formation de biofilm à <i>P. aeruginosa</i>	93
Figure 42 :	Effet de l'extrait butanolique de <i>L. inermis</i> (V2) sur la formation de biofilm par les souches testées de <i>P. aeruginosa</i>	93

Figure 43 :	Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>L. inermis</i> (V2) sur la formation de biofilm à <i>P. aeruginosa</i>	94
Figure 44 :	Effet de l'extrait acétatique de <i>L. inermis</i> (V2) sur la formation de biofilm par les souches testées de <i>P. aeruginosa</i>	94
Figure 45 :	Effet de l'extrait butanolique de <i>P. persica</i> sur la formation de biofilm à <i>P. aeruginosa</i>	96
Figure 46 :	Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle de <i>P. persica</i> sur la formation de biofilm à <i>P. aeruginosa</i>	96
Figure 47 :	Profil chromatographique d'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de <i>Lawsonia inermis</i> de la région d' Adrar.....	98
Figure 48 :	Profil chromatographique d'extrait butanolique des feuilles de <i>Lawsonia inermis</i> de la région d'Adrar.....	98
Figure 49 :	Profil chromatographique d'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de <i>Lawsonia inermis</i> de la région de Biskra.	98
Figure 50 :	Profil chromatographique d'extrait butanolique des feuilles de <i>Lawsonia inermis</i> de la région de Biskra.....	
Figure 51 :	Profil chromatographique d'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de <i>P. persica</i>	100
Figure 52 :	Profil chromatographique d'extrait butanolique des feuilles de <i>P. persica</i>	100
Figure 53 :	Effet de l'acide salicylique sur la formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	103
Figure 54 :	Réduction de formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 et les six isolats clinique en présence de 0.5, 1, 2 et 4mM d'AS.....	97
Figure 55 :	Effet de l'acide salicylique sur la motilité de type swarming chez <i>P. aeruginosa</i>	105
Figure 56 :	Effet de l'acide salicylique sur la production de pyocyanine par <i>P. aeruginosa</i>	106
Figure 57 :	Inhibition de la production de pyocyanine chez <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 par l'acide salicylique.....	107
Figure 58 :	Production des Rhamnolipides par <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (PR) et les souches cliniques de <i>P. aeruginosa</i> dans le milieu PPGAS.....	108
Figure 59 :	Effet de l'acide salicylique sur la production de rhamnolipides par <i>P. aeruginosa</i> (P2).	109

LISTE DES ABREVIATIONS

3-oxo-C12-HSL :	N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone
ADP :	Adenosine diphosphophate
<i>A. tumefaciens</i> :	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AHL :	Acyllhomosérine lactone
AS :	Acide salicylique
ATCC	American Type Culture Collection
BPCO :	Bronchopneumopathie chronique obstructive
C4-HSL :	<i>N</i> -butyryl-L-homosérine lactone
CF :	Fibrose kystique (Mucoviscidose)
CFTR :	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
Cup :	Chaperone-usher pathway
DDB :	Dilatation des bronches
di-GMPc :	Di-guanosine monophosphate cyclique
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EPS :	Exopolysaccharides
ExoA, S, T, U, Y :	Exotoxine A, S, T, U, Y
<i>K. pneumoniae</i> :	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
kDa :	Kilo Dalton
<i>L. plantarum</i> :	<i>Lactobacillus plantarum</i>
LPS :	Lipopolysaccharides
MEC :	Matrice Extracellulaire
MSQS :	Molécules de Signale de Quorum sensing
PAMP :	Pattern Associated Molecular Pattern
<i>P. aeruginosa</i> :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. putida</i> :	<i>Pseudomonas putida</i>
Pb :	Paires de base
PCR :	Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase chain reaction)
Pel :	PELLicle locus
PLC :	Phospholipases C
PMN :	Polymorphonucléaire
PQS :	<i>Pseudomonas quinolone signal</i>
PqsR :	<i>Pseudomonas Quinolone Signal Receptor</i>
Psl :	Polysaccharide synthesis locus
QQ :	<i>Quorum quenching</i>
QS :	<i>Quorum sensing</i>
QSI :	Inhibition du <i>quorum sensing</i>
RSA :	Résistance systémique acquise
ROS :	Reactive Oxygen Species
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i> :	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. saprophyticus</i> :	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>S. typhimurium</i> :	<i>Salmonella typhimurium</i>
SST2 :	Système de Sécrétion de Type Deux
SST3 :	Système de Sécrétion de Type Trois
TLR :	Toll-Like Receptor
tpm :	Tours par minute
UFC :	Unité Formant Colonie
<i>V. harveyi</i> :	<i>Vibrio harveyi</i>

Productions scientifiques

Publications

Lattab Aicha*, Djibaoui Rachid and Arabi Abed. 2017. Antibacterial Activity and Anti-Biofilm Formation of Henna (*Lawsonia inermis*) Extracts against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, **7**(5), 92-104.

Lattab Aicha*, Djibaoui Rachid, Arabi Abed and Dahah Hicham. 2017. Effect of salicylic acid on biofilm formation and on some virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biosciences*, **10**(1), 60-71.

Arabi Abed*, Djibaoui Rachid, Malihac Catherine, Sisbane Ismahene, **Lattab Aicha**, Bechelaghem Nadia, Dahah Hicham, Rezigia Charef, Ettalhi Mehdi, TALEB Farida, Ouar Korichi Mounira, Dahloun Lahouari. 2017. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves and twigs of *Pistacia lentiscus* growing in Mostaganem Province (Algeria). *International Journal of Biosciences*, **10**(5), 146-158.

Lattab Aicha*, Belkacem Imane, Djibaoui Rachid, Rebai Oifa, Chibani Abdelwaheb, Arabi Abed. 2015. Eradication of *Pseudomonas* biofilm by disinfectants and some plants extracts. *South Asian Journal of Experimental Biology*, **5**(1), 6-16.

Communications internationales

Aicha LATTAB*, Rachid DJIBAOUI et Abed ARABI. 2017. Effet de *Allium sativum* (Ail) sur la croissance et la formation du biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*. 3ème congrès international de la société algérienne de nutrition Constantine (Algérie), 28-30 Novembre .

Aicha LATTAB*, Rachid DJIBAOUI et Abed ARABI. 2017. Effet des extraits à base des plantes sur l'adhérence et la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*. Congrès International sur la Valorisation et la Préservation de la Biomasse VAPB'17. Boumerdès (Algérie), 05-06 Novembre.

Aicha LATTAB*, Rachid DJIBAOUI et Abed ARABI. 2017. Activité antibactérienne des extraits de deux variétés algérienne de *Lawsonia inermis* (Henné) contre *Pseudomonas aeruginosa*. Le 1^{er} Congrès international sur les biotechnologies au service de développement durable. Boumerdès (Algérie), 24-25 Octobre.

Aicha LATTAB*, Rachid DJIBAOUI et Abed ARABI. 2017. In vitro, effet antibactérien et anti-biofilm formation des extraits acétatique et butanolique de *Lawsonia inermis* vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*. 8^{es} Journées Scientifiques Internationales sur la valorisation des Bioressources, Monastir (Tunisie), 05-07 Mai.

Abed ARABI*, **Aicha LATTAB**, Farida TALEB, Mounira Ouar Korichi, Rachid DJIBAOUI and Lahouari Dahloun. 2017. Antimicrobial Effect of Essential Oils of *Pistacia lentiscus* L on *Helicobacter pylori*. 8^{es} Journées Scientifiques Internationales sur la valorisation des Bioressources, Monastir (Tunisie), 05-07 Mai.

Aicha LATTAB*, Rachid DJIBAOUI, Abed ARABI et Hicham Dahah. 2016. Action antibactérienne des extraits de henné (*Lawsonia inermis*) sur *Pseudomonas aeruginosa*. International Conference on Integrated Environmental Management For Sustainable Development, Sousse (Tunisie), 27-30 Octobre.

Communications nationales

Aicha LATTAB*, Rachid DJIBAOUI et Abed ARABI. (2017). Salicylic acid affects biofilm formation and some virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. VII^{èmes} Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Mostaganem, 26-27 Avril.

Aicha LATTAB* et Rachid DJIBAOUI. (2016). Effects of *Allium sativum* and *Lawsonia inermis* on the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. VI^{èmes} Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Mostaganem, 27-28 Avril.

Aicha LATTAB*, Rachid DJIBAOUI et Mehdi ETALHI. (2013). Utilisation des extraits de quelques plantes locales pour lutter contre la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques. IV^{èmes} Journées Scientifiques de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Mostaganem, 27-28 Avril.

Introduction

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à coloration de Gram négative omniprésente trouvée dans de nombreux environnements. C'est l'un des principaux agents pathogènes opportunistes impliqué dans de graves infections nosocomiales. C'est aussi un micro-organisme polyvalent capable de tolérer des conditions défavorables. Toutes ces propriétés lui permettent de s'attacher et de survivre sur de nombreuses surfaces biotiques et abiotiques, ce qui favorise le début des infections, en particulier chez les patients immunodéprimés (Engel et Balachandran, 2009). Le traitement des infections causées par *P. aeruginosa* est difficile en raison de sa résistance intrinsèque élevée contre la plupart des antibiotiques et de sa capacité à acquérir de nouveaux mécanismes de résistance suite à l'exposition aux antibiotiques pendant les traitements (Breidenstein *et al.*, 2011). En plus de sa résistance aux antibiotiques, *P. aeruginosa* se caractérise par sa capacité à former des biofilms.

Un biofilm est une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules attachées de manière irréversible à une surface biotique et abiotique, incorporés dans une matrice extracellulaire de substances polymériques (EPS) autoproduite, faite d'un mélange d'exopolysaccharides, d'ADN et de protéines (Joo et Otto, 2012). En suggérant que le biofilm serait le mode de vie majoritaire adopté par les cellules microbiennes dans la nature. Il a été estimé que 99 % de l'ensemble des bactéries dans un environnement naturel existe sous forme d'un biofilm (Costerton *et al.*, 1978). Les bactéries cultivées dans ce biofilm ont une résistance accrue aux antibiotiques et au système immunitaire de l'hôte par rapport aux bactéries non planifiées (planctoniques). Le comportement bactérien dans les biofilms est régulé par le système de détection du quorum (QS) (Heurlier *et al.*, 2006). C'est un régulateur clé de leur développement (De Kievit, 2008), de leur résistance aux antibiotiques (Høiby *et al.*, 2010b) et de l'expression de leurs facteurs de virulence (Schuster et Greenberg, 2006).

Pendant de nombreuses années, il est bien connu que les plantes ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour prévenir ou guérir les maladies infectieuses. Cependant, au cours des dernières années, de nombreuses études de recherche ont signalé les propriétés d'utilisation des extraits de plantes pour lutter contre les agents pathogènes en les éradiquant ou en inhibant les mécanismes de virulence sous l'effet des différents mécanismes du système d'adaptation et de régulation du quorum sensing (Kalia, 2013).

Le but de cette étude était d'examiner l'effet des extraits de trois plantes (*Allium sativum*, *Lawsonia inermis* et *Prunus persica*) sur la croissance sous forme planctonique et en biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et six isolats cliniques de cette espèce. Le choix des plantes ayant fait l'objet de cette étude est basé sur une recherche bibliographique puis une enquête ethnopharmacologique auprès de la population ayant connaissance de leur usage en médecine traditionnelle. Nous avons étudié aussi l'effet de l'acide salicylique sur la mobilité de type swarming, la production de rhamnolipides et de pyocyanine et sur la formation de biofilm.

L'ail est l'une des espèces importantes d'*Allium* consommée dans le monde entier. Il est utilisé depuis des décennies comme remède médicinal (Mnayer *et al.*, 2014 ; Gupta *et al.*, 2015) . Il peut être préparé sous diverses formes, à savoir l'huile, la poudre, le jus cru et les différents extraits (Jabar et Al-Mossawi, 2007 ; Ried *et al.*, 2010). L'effet thérapeutique de l'ail a été attribué à ses constituants organosulfurés, qui sont également responsables de sa saveur et de son odeur typique (Rahman, 2007 ; Zeng *et al.*, 2012).

Lawsonia inermis est généralement appelé henné. C'est la seule espèce du genre *Lawsonia*, appartenant à la famille des *Lythraceae* (Singh *et al.*, 2005). Elle est cultivée dans diverses régions tropicales en Afrique du Nord, en Asie et en Australie. *L. inermis* a longtemps été utilisé pour de nombreux effets médicinaux, y compris comme un antifongique, un antihémorragique et antibactérien (Shivananda *et al.*, 2007).

Prunus persica qui appartient à la famille des *Rosaceae* est connue pour ses valeurs nutritionnelles et ses propriétés thérapeutiques par la présence d'une source potentielle de composés bioactifs. En outre la valeur nutritionnelle et pharmacologique des fruits, les feuilles de pêche sont traditionnellement utilisées comme laxatives et sédatives.

L'acide salicylique ou acide 2-hydroxybenzoïque est le principal acide phénolique synthétisé comme métabolite secondaire par certains végétaux. Il est produit par la plante en réponse à l'attaque de divers pathogènes et constitue un élément clef pour l'établissement de la résistance locale et la RSA (Loake et Grant, 2007).

La stratégie suivie durant cette étude comprend les étapes suivantes :

- L'isolement et l'identification des isolats de *Pseudomonas aeruginosa*
- L'étude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques.

- L'évaluation de la formation de biofilm en fonction des souches bactériennes, du milieu de culture et de la matière de support.
- Préparations des extraits à partir des plantes médicinales choisis à savoir *Allium sativum*, deux variétés de *Lawsonia inermis* et *Prunus persica*.
- Détermination du rendement d'extraction et de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes.
- Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits de plantes avec la détermination de la CMI et la CMB.
- Détermination de l'effet de ces extraits préparés sur la formation de biofilm à *P. aeruginosa* par la méthode de cristal violet.
- Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)
- Etude de l'effet de l'acide salicylique sur la mobilité de type swarming, sur la production de rhamnolipides et de pyocyanine et sur la formation de biofilm.

Les résultats présentés sont discutés et comparés avec d'autres.

Enfin, le manuscrit est achevé par une conclusion qui permettra de résumer les résultats trouvés intéressants et de tirer quelques perspectives.

Partie bibliographique

CHAPITRE I

Généralités sur *Pseudomonas aeruginosa*

I.1. Description

Pseudomonas aeruginosa a été découverte pour la première fois en 1872 par le chercheur allemand Schroeter sous l'appellation *Bacterium aeruginosum*, après une observation d'un aspect bleuté du pus en présence de la bactérie. Cette coloration est à l'origine de son nom, *aerugo* signifiant vert-de-gris en latin. En 1882, le pharmacien militaire Charles Gessard isola le bacille et en fit la première description dans sa thèse de doctorat et lui donna le nom de bacille pyocyanique (Pitt, 1998).

P. aeruginosa est une bactérie à coloration de Gram négative appartenant au genre *Pseudomonas* et à la famille des *Pseudomonadaceae*. Elle se présente sous forme de bacilles fins, droits ou légèrement courbés et très mobiles grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire. *P. aeruginosa* est caractérisée par une versatilité métabolique lui permettant d'utiliser une large variété de substrats comme source de carbone (sucres simples et complexes, alcools et acides aminés). Le pathogène est classé comme aérobie strict avec un métabolisme oxydatif utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Cependant la survie de la bactérie est observée dans des conditions anaérobies, expliquée par sa capacité à métaboliser l'arginine (Vander *et al.*, 1984) et le pyruvate (Eschbach *et al.*, 2004) ou par utilisation des nitrates comme accepteur final d'électrons (Filiatrault *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* est capable de se développer dans un spectre de températures compris entre 4 et 42°C ; sa température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C. Ces différentes caractéristiques font de cette bactérie un microorganisme ubiquitaire retrouvé dans l'eau, les sols, les plantes et les mammifères. Sa versatilité et son adaptabilité extraordinaire se marque aussi par son nombre important de gènes. *P. aeruginosa* possède le plus large génome bactérien séquencé. Ce génome englobe 6,3 millions de pb (souche de référence PAO1) (Stover *et al.*, 2000) est plus grand que celui d'autres bactéries, comme *Escherichia coli* (4,6 Mpb) ou encore *Staphylococcus aureus* (2,6 Mpb). De nombreux gènes impliqués dans des fonctions métaboliques permettent à la bactérie de se développer dans différents environnements, notamment en présence de l'hôte ou en présence d'agents antimicrobiens et parfois très pauvres en nutriments.

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste, c'est à dire qu'il n'est pas pathogène pour l'organisme en temps normal, mais qui le devient lorsque les défenses de l'hôte sont affaiblies. Il peut coloniser de nombreux tissus, notamment le tissu cutané, osseux et des dispositifs médicaux, tels les valves cardiaques. Il est aussi responsable d'infections ophtalmiques, du

tractus urinaire et des poumons. C'est également le pathogène le plus fréquemment responsable de mortalité chez les individus atteints de la mucoviscidose (Zemanick *et al.*, 2011).

I.2. Le génome de *Pseudomonas aeruginosa*

Le génome de la souche de référence PAO1 de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé par Stover *et al.*, (2000). Le séquençage a révélé le plus grand génome bactérien de 6.3 millions de paires de bases connu à ce jour, contenant 5 570 cadres de lecture ouverts dont la plupart sont riches en Guanine et Cytosine (G+C) (66,6%) (Stover *et al.*, 2000). Après le séquençage complet des autres souches appartenant à l'espèce *P. aeruginosa*, la comparaison montre que le génome de cette bactérie composé d'un squelette commun d'environ 5000 gènes, interrompus dans chaque souche par une combinaison des gènes accessoires qui confèrent un répertoire génétique spécial pour chaque souche (Mathee *et al.*, 2008 ; Qiu *et al.*, 2009).

P. aeruginosa possède un taux élevé de gènes (9,4% de la totalité du génome) impliqué dans des systèmes de régulation et des fonctions métaboliques par rapport aux autres bactéries. Cette propriété lui confère la capacité d'utiliser un grand nombre de composés organiques comme source de carbone et une large adaptabilité aux différents environnements hostiles ainsi que sa grande pathogénicité (Stover *et al.*, 2000 ; Wolfgang *et al.*, 2003).

I.3. Infections à *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste et multirésistant aux antibiotiques. Cette bactérie ne provoque une maladie chez l'homme que lorsqu'il existe une défaillance locale ou systémique du système immunitaire. Cette défaillance peut être une diminution des défenses immunitaires (patients atteints de mucoviscidose, de cancers ou du SIDA) ou une faiblesse des barrières tissulaires de l'hôte (lésion de la peau ou des muqueuses) (Lyczak *et al.*, 2000).

P. aeruginosa est à l'origine de différents types d'infections qu'elles soient aiguës ou chroniques selon le type de déficit immunitaire de l'hôte et les facteurs de virulence exprimés par la bactérie (Williams *et al.*, 2010 ; Hauser, 2012). Elle peut notamment causer des bactériémies, des surinfections cutanées de plaies et de brûlures (Mulcahy *et al.*, 2013), d'infections ostéoarticulaires, oculaires ou neuro-méningées (Huang, 2003).

De plus, *P. aeruginosa* est responsable d'infections urinaires (Mulcahy *et al.*, 2014) et de nombreuses affections du système respiratoire (L'atteinte la plus fréquente). Ces dernières

sont souvent contractées en milieu hospitalier suite à une intervention chirurgicale, une intubation ou l'utilisation de matériel médical (cathéters, sondes,...).

I.3.1. Infections chroniques

Les infections chroniques à *P. aeruginosa* sont associées aux formes de biofilms des bactéries. Ce type d'infection peut toucher diverses catégories de patients, les plus touchés sont les sujets présentant un déficit chronique de l'immunité pulmonaire telles que la mucoviscidose (CF), bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), dilatation des bronches (DDB) (Bajmoczy *et al.*, 2009 ; Williams *et al.*, 2010), ce qui constitue un facteur d'augmentation des dommages au tissu pulmonaire et à une diminution de la fonction respiratoire (Wagner et Iglewski, 2008). Dans ce contexte, la principale cause de mortalité des patients est l'inflammation pulmonaire chronique déclenchée par ce pathogène (Doring, 2012).

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive létale caractérisée par une mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) qui code pour une protéine transmembranaire impliquée dans le flux d'ions chlorures (Cl⁻) à travers la membrane des cellules épithéliales (Bertrand *et al.*, 2003). Il s'agit d'une maladie chronique qui atteint principalement les voies respiratoires et digestives. Elle consiste en une viscosité anormale du mucus qui s'accumule dans ces organes. Le poumon mucoviscidosique est particulièrement susceptible aux infections occasionnées par *P. aeruginosa*. L'établissement de *P. aeruginosa* débute par des phases de colonisation intermittentes récurrentes, puis évolue vers un état d'infection chronique. Au cours de cette colonisation, *P. aeruginosa* subit une forte adaptation génétique et phénotypique à ce nouvel environnement en accumulant un certain nombre de mutations génétiques et en sous-exprimant certains de ses gènes. Les adaptations phénotypiques qui en résultent comprennent notamment une augmentation de la résistance aux antibiotiques et une diminution de l'expression de certains facteurs de virulence (Cullen et McClean, 2015). Ces modifications permettent à *P. aeruginosa* de perdurer sous forme de biofilm dans le mucus pulmonaire très épais et visqueux des patients atteints de mucoviscidose (Hoiby *et al.*, 2010a). La croissance sous forme de biofilm permet aux bactéries d'adhérer au mucus et de résister au système immunitaire de l'hôte, ainsi qu'aux agents antimicrobiens utilisés pour le traitement de l'hôte (Breidenstein, 2011). *P. aeruginosa* va alors prendre une apparence visqueuse liée à la surproduction d'un exopolysaccharide, l'alginate, et est alors qualifiée de mucoïde qui génèrent une forte réponse inflammatoire, très destructrice pour les tissus mais pas pour le pathogène (Gellatly et Hancock, 2013).

La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) fait référence à un état décrit comme une bronchite chronique se traduisant par une inflammation chronique et un rétrécissement des voies aériennes. Elle est la plus fréquemment associée à une comorbidité (Holm *et al.*, 2013). Chez les patients atteints de BPCO, la fréquence d'isolement de *P. aeruginosa* va de 3 à 18% en période d'exacerbation (Sethi, 2000). La BPCO est caractérisée par une obstruction lente et progressive des poumons, liée à une distension permanente des alvéoles pulmonaires.

La dilatation des bronches (DDB) ou la bronchiectasie est une affection chronique des bronches parfois congénitale mais le plus souvent faisant suite à des broncho-pneumopathies virales ou bactériennes à répétition, à la mucoviscidose, à l'inhalation d'un corps étranger, à la coqueluche ou à la tuberculose et se manifeste par une augmentation anormale et permanente du calibre des bronches. Chez les patients atteints de DDB, *P. aeruginosa* est isolé dans 9 à 45% des cas selon les différentes populations. D'autres pathologies respiratoires peuvent être également associées à des infections chroniques par *P. aeruginosa* telles que le cancer du poumon ou l'asthme (Holm *et al.*, 2013).

P. aeruginosa est la deuxième bactérie la plus fréquemment isolée dans le cas d'infections urinaires. Les infections urinaires à *P. aeruginosa* peuvent être des infections aiguës ou chroniques. Dans les deux cas, elles sont systématiquement associées à une pose de cathéter (Mittal *et al.*, 2009). Plusieurs études ont démontré que *P. aeruginosa* est capable de croître sous forme de biofilm à la surface des cathéters ou des tubes de ventilation (Mulcahy *et al.*, 2014).

Enfin, *P. aeruginosa* peut infecter des lésions locales de l'épiderme, et empêcher leur guérison. Ce genre de blessure chronique est observé surtout chez les diabétiques, qui peuvent présenter des problèmes de circulation sanguine au niveau de leurs extrémités (Mulcahy *et al.*, 2014).

I.3.2. Infections aiguës

Les infections aiguës à *P. aeruginosa* sont généralement brèves et caractérisées par une forte multiplication bactérienne. Les bactéries, très mobiles grâce à leur flagelle et leurs pili, expriment fortement certains facteurs de virulence, notamment leurs Systèmes de Sécrétion de Type 2 et de Type 3 (Gellatly et Hancock, 2013). *P. aeruginosa* présente un phénotype beaucoup plus agressif, induisant une réponse inflammatoire intense et une destruction

tissulaire marquée. Les infections aiguës à *P. aeruginosa* sont presque exclusivement des infections nosocomiales et les patients touchés présentent généralement des dysfonctionnements tissulaires ou immunitaires. Les pneumonies aiguës associées à ce pathogène se compliquent fréquemment d'œdème pulmonaire majeur, de choc septique et de défaillance multiviscérale, causant un taux de mortalité élevé, estimé de 50 à 70% selon les études, malgré une antibiothérapie adaptée (Faure *et al.*, 2006).

Dans certains cas, les bactéries pourront franchir l'épithélium au cours de l'infection. Dans ce contexte, *P. aeruginosa* pourra échapper aux mécanismes de défense de l'organisme et accéder au système sanguin. On parle de bactériémie, qui correspond à une complication grave de l'infection et qui est généralement associée à un mauvais pronostic vital pour le patient (Micek *et al.*, 2005). Les bactéries pourront ensuite provoquer des atteintes dans d'autres organes. Si l'infection n'est pas endiguée rapidement par un traitement d'antibiotique approprié, les bactéries pourront également induire un choc septique, c'est-à-dire une défaillance circulatoire aiguë pouvant entraîner la mort du patient (Micek *et al.*, 2005).

I.4. Facteurs de virulence

P. aeruginosa possède de nombreux facteurs de virulence impliqués dans sa pathogénicité. Ces derniers peuvent être classés en facteurs de virulence associés à la bactérie et à de nombreux facteurs de virulence sécrétés ou extracellulaires, dont les rôles sont complémentaires (Figure 1) (De Bentzmann et Plésiat, 2011).

I.4.1. Facteurs de virulence cellulaires

I.4.1.1. Le flagelle

P. aeruginosa produit un flagelle monotriche polaire constitué de trois éléments principaux indispensables à son fonctionnement : le corps basal, le crochet et le filament. Ce dernier correspond à un assemblage de protéines, les flagellines, dont il peut comprendre 20000 copies, et peut atteindre plusieurs microns de long (Haiko et Westerlund-Wikström, 2013). Le flagelle permet à *P. aeruginosa* d'opérer deux types de mobilité, la nage « swimming » et le grouillement « swarming », nécessaires au déplacement de la bactérie dans un environnement aqueux ou semi-solide (Kearns, 2010).

Le flagelle est initialement lié à la mobilité de la bactérie mais peut également jouer un rôle important dans l'adhésion de *P. aeruginosa* (Bucior *et al.*, 2012 ; Bruzaud *et al.*, 2015). Il

adhère aux cellules épithéliales par fixation sur un composant membranaire commun, l'asialo-GM1, et peut induire une réponse inflammatoire (Kipnis *et al.*, 2006). Les flagellines composant le filament sont porteuses d'un motif PAMP (Pattern Associated Molecular Pattern) reconnu par les récepteurs de type TLR5 (Toll-Like Receptor) notamment exprimés sur la surface baso-latérale des cellules épithéliales intestinales, sur les monocytes et les fibroblastes. Cette reconnaissance TLR/FliC permet d'induire la sécrétion de cytokines contribuant à l'induction d'une réponse inflammatoire (Haiko et Westerlund-Wikström, 2013). Cette réponse inflammatoire permet de combattre *P. aeruginosa* mais aussi de créer un foyer inflammatoire et des dommages aux tissus de l'hôte qui sont favorables à la colonisation de *P. aeruginosa* (Hayashi *et al.*, 2001).

I.4.1.2. Pili

Chez *P. aeruginosa*, deux types de pili sont présents en surface des cellules, les pili de type IV et les pili assemblés par la voie « Chaperonne-Usher » (CU).

I.4.1.2.1. Pili de type IV

P. aeruginosa produit deux types des pili de type IV: les IVa et les IVb. Les pili de type IVa sont des filaments très flexibles de diamètre compris entre 5 et 8 nm (Beaussart *et al.*, 2014). Ils peuvent former des structures très longues, allant jusqu'à plusieurs microns (Burrows, 2012). Ils sont impliqués dans la motilité de type «twitching» et la mobilité de type «swarming» (Asikyan *et al.*, 2008). Les pili de type IVa sont indispensables à la virulence de *P. aeruginosa* et également très importants pour l'adhésion à des surfaces abiotiques ou aux cellules et pour la formation de biofilms (Barken *et al.*, 2008 ; Conrad *et al.*, 2011). Ils permettent également l'adhérence aux cellules épithéliales de l'hôte en se fixant sur le récepteur asialo-GM1, ce qui conduit également à l'activation de la réponse immunitaire (Schroeder *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2003).

Les pili de type IVb sont des pili de type conjugatifs, qui servent au transfert d'éléments génétiques d'une bactérie à l'autre.

I.4.1.2.2. Fimbriae

Les fimbriae ou pili de la voie « chaperone-usher » (CU) sont des appendices filamenteux non flagellaires composés d'un assemblage de pilines pouvant aller d'une centaine à plusieurs milliers de sous-unités polymérisées (Allen *et al.*, 2012). L'assemblage de ces sous-unités protéiques est assuré par la voie dite « chaperone-usher ».

L'existence de pili de la voie CU chez *P. aeruginosa* a été mise en évidence par Vallet *et al.* en 2001. Ces derniers ont montré l'existence de trois systèmes CupA, CupB et CupC (Chaperone-usher pathway). Les pili du système CupA comprennent une sous-unités CupA4 agissant comme une adhésine et interviennent dans l'attachement de la bactérie aux surfaces abiotiques (Vallet *et al.*, 2001 ; Giraud et De Bentzmann, 2012). Les systèmes CupB et CupC jouent un rôle dans les interactions entre les cellules et sont impliqués dans les étapes de maturation du biofilm (Giraud *et al.*, 2011). D'autres systèmes Cup ont pu être mis en évidence chez *P. aeruginosa* : les pili des systèmes CupE interviennent dans la formation et la structuration du biofilm (Giraud *et al.*, 2010 ; Giraud *et al.*, 2011).

I.4.1.3. Lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) sont une composante majeure de la membrane externe des bactéries à coloration de Gram négative. Ils sont constitués d'un lipide A, le corps oligosaccharidique et le polysaccharide O.

Le lipide A correspond à la partie du LPS ancrée dans la membrane externe, il s'agit d'un disaccharide (diglucosamine biphosphate) auquel sont rattachées plusieurs chaînes d'acides gras (King *et al.*, 2009). La structure du lipide A se modifie en réponse à des peptides antimicrobiens cationiques, éléments clés de la réponse immunitaire (Lam *et al.*, 2011). Ces modifications sont susceptibles de modifier la perméabilité de la cellule bactérienne augmentant ainsi sa résistance à certains antimicrobiens. La reconnaissance du lipide A par le complexe immunologique spécifique TLR4 (Toll-Like Receptor) induit une réponse inflammatoire (Lam *et al.*, 2011).

Le corps oligosaccharidique rattaché au lipide A existe sous deux formes selon qu'il soit relié ou non au troisième élément constitutif des LPS (le polysaccharide O). Il est spécifiquement reconnu par les récepteurs CFTR des cellules épithéliales des poumons ou de la cornée (Lam *et al.*, 2011).

La chaîne O polysaccharidique, également appelée antigène O, chez *P. aeruginosa* : la nature des unités saccharidiques répétées a permis de distinguer 17 sérotypes (Lam *et al.*, 2011). L'absence de l'antigène O limite les capacités de mobilité de la bactérie liées au fonctionnement du flagelle. Cette altération de la mobilité est notamment due à l'augmentation des forces d'adhésion de la cellule à une surface biotique ou abiotique (Lindhout *et al.*, 2009).

I.4.1.4. Exopolysaccharides (EPS)

Les exopolysaccharides (EPS) sont des polymères de poids moléculaire élevé qui constituent un composant important (50 à 90%) des substances polymériques extracellulaires (Wingender *et al.*, 1999). *P. aeruginosa* a la capacité de sécréter trois exopolysaccharides : l'alginat, le Psl (Polysaccharide synthesis locus) et le Pel (PELLicle locus) (Ma *et al.*, 2009; Schurr, 2013). Dans la nature, les EPS bactériennes tiennent différentes fonctions biologiques, dont, comme matériau de réserve de composés biodégradables, une structure de protection contre les attaques chimiques, mécaniques et thermiques et contre les systèmes de défense des hôtes infectés (Fux *et al.*, 2005; Franklin *et al.*, 2011). Ils sont responsables aussi de la résistance aux antibiotiques et de l'adhésion des cellules sur des surfaces dans la formation et le développement de biofilms (Ghafoor *et al.*, 2011 ; Colvin *et al.*, 2012).

I.4.2. Facteurs de virulence extracellulaires

I.4.2.1. Exotoxines

I.4.2.1.1. Exotoxine A

L'exotoxine A (ExoA) est une enzyme appartenant à la famille des ADP-ribosyltransférase sécrétée dans le milieu extracellulaire par le SST2 (Jorgensen *et al.*, 2008). Elle est la protéine la plus cytotoxique qui est importante pour la virulence de *P. aeruginosa* chez les patients atteints de fibrose kystique. Elle est capable de s'internaliser dans les cellules cibles pour aller ensuite catalyser la ribosylation de l'ADP du facteur d'élongation EF-2 des cellules eucaryotes conduisant à l'inhibition de la synthèse de protéines et à la mort cellulaire (Ramachandran, 2014).

I.4.2.1.2. Exotoxine du SST3

Le SST3 (Système de Sécrétion de Type Trois) est activé par le contact du pathogène avec la cellule eucaryote cible, et dédié à l'injection des effecteurs directement du cytoplasme de la bactérie dans le cytosol de la cellule cible sans passage par le milieu extérieur. (Shaver et Hauser, 2004 ; Vance *et al.*, 2005).

Lors d'infections aiguës, *P. aeruginosa* est considérée comme invasive et cytotoxique grâce aux exotoxines secrétés via le SST3, qui participent à la dissémination de la bactérie dans l'organisme en perpétuant l'état lésé des cellules épithéliales, ce qui entraîne une forte réaction inflammatoire et provoque la destruction de la barrière épithéliale et/ou endothéliale (Sato *et al.*, 2003 ; Shaver et Hauser, 2004 ; Sundin *et al.*, 2004 ; Kipnis *et al.*, 2006). De plus, ces exotoxines permettent à la bactérie d'échapper aux systèmes immunitaires en induisant la mort des neutrophiles et des macrophages (Engel et Balachandran, 2009).

P. aeruginosa secrète quatre exoenzymes via ce système : ExoY, ExoU, ExoT et ExoS. Ces quatre effecteurs requièrent un cofacteur eucaryote pour être actifs (Engel et Balachandran, 2009). Ces quatre toxines sont exprimées de façon variable dans les différentes souches ou isolats cliniques. Alors que le gène *exoT* est présent dans toutes les souches, les gènes codant pour ExoY et ExoS sont présents respectivement dans 89% et 72% des souches. Le gène *exoU* est présent dans seulement 28% des souches et ceci majoritairement dans les souches les plus agressives, isolées de septicémie ou d'infections urinaires (Shaver et Hauser, 2004 ; Berthelot *et al.*, 2005).

I.4.2.2. Élastases

L'élastase (**LasB**) est une métalloprotéinase (dépendante à zinc) de 33kDa codée par le gène *lasB*. C'est la protéase la plus sécrétée par *P. aeruginosa* via le SST2. Elle endommage la matrice extracellulaire des voies respiratoires et des tissus conjonctifs en dégradant des composants de la matrice comme l'élastine pulmonaire, la fibronectine, la vitronectine et certains collagènes (Beaufort *et al.*, 2011). L'élastase LasB cible également des composants du système immunitaire notamment des composants du complément, des immunoglobulines G et A (Strateva et Mitov, 2011). Elle dégrade la protéine SP-A (protéines du surfactant pulmonaire), un composant important du système immunitaire pulmonaire, permettant à la bactérie d'échapper à la phagocytose (Kuang *et al.*, 2011). Enfin, le clivage de la VE-cadhérine via LasB a été démontré par Beaufort *et al.* (2013) et Golovkine *et al.* (2014) ce qui détruit les jonctions

serrées entre les cellules endothéliales et permettant ainsi l'invasion des tissus par *P. aeruginosa*.

LasA (staphylosine) est une protéase de 20 kDa codée par le gène *lasA* dont la transcription est régulée par le quorum sensing (QS) et est sécrétée par le SST2. Cette protéase agit en synergie avec l'élastase (LasB) pour la dégradation de l'élastine (Kessler *et al.*, 1997). Elle est considérée comme un facteur de virulence important lors des infections oculaires à *P. aeruginosa* (Estrellas *et al.*, 2000). LasA est également connue en tant qu'enzyme à forte activité staphylolytique, à la fois *in vitro* et dans un modèle d'infection oculaire *in vivo* à cause de sa capacité à dégrader le peptidoglycane de *S. aureus* (Kessler *et al.*, 1993 ; Barequet *et al.*, 2004).

I.4.2.3. Phospholipases C (PLC)

Les PLC sont des enzymes extracellulaires thermolabiles également sécrétées par le SST2 dont la cible majeure est la phosphatidylcholine présente dans les membranes eucaryotes (Barker *et al.*, 2004). Parmi les phospholipases C extracellulaires sécrétés par *P. aeruginosa*, une phospholipase C possédant une activité hémolytique (PlcH) et une non hémolytique (PlcN) (Ostroff *et al.*, 1990). PlcH participe à la dégradation du surfactant pulmonaire, riche en phosphatidylcholine ce qui favorise la colonisation bactérienne au niveau des poumons (Kipnis *et al.*, 2006). L'implication directe de PlcH dans l'altération de la fonction du poumon de l'hôte a été démontrée (Wargo *et al.*, 2011).

I.4.2.4. Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des molécules amphiphiles composées d'un lipide couplé à un sucre mono ou dirhamnose produits par *P. aeruginosa* (Caiazza *et al.*, 2005). Ils sont codés par les gènes *rhlAB* dont la production est contrôlée par le système de QS (Kearns, 2010). Ils jouent un rôle dans la formation et le maintien de la structure du biofilm de *P. aeruginosa* et jouent le rôle de surfactant aux interfaces matrice/cellule permettant la formation des canaux d'eau dans le biofilm et le détachement des bactéries du biofilm pour coloniser de nouvelles surfaces (Davey *et al.*, 2003). De plus, les rhamnolipides participent à la formation des structures dites « champignons » caractéristiques d'un biofilm mature. Ils favorisent significativement la formation de microcolonies en facilitant la migration par « twitching » des cellules mobiles constitutives de la tête des structures « champignons » (Lequette et Greenberg, 2005 ; Pamp et Tolker-Nielsen, 2007).

En plus, les rhamnolipides possèdent un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire les rendant ainsi plus accessibles aux phospholipases bactériennes. Ils altèrent la jonction entre les cellules épithéliales des voies respiratoires et favorisent l'infiltration des épithéliums humains des voies aériennes par *P. aeruginosa* (Zulianello *et al.*, 2006). Ils participent à la protection de *P. aeruginosa* contre le système immunitaire en inhibant la phagocytose et en provoquant la lyse des macrophages (Alhede *et al.*, 2014). Une activité antibactérienne a été mise en évidence par des rhamnolipides produits par *P. aeruginosa* OBP1 envers *S. aureus* et *K. pneumoniae* (Bharali *et al.*, 2013).

I.4.2.5. Lectines solubles

P. aeruginosa produit deux lectines solubles PA-II et PA-III appelées aussi respectivement, LecA (gène *lecA*) et LecB (gène *lecB*), sont des glycoprotéines qui reconnaissent spécifiquement et respectivement le D-galactose et le L-fucose, elles sont dépendantes pour être actives du Ca^{2+} (Imberty *et al.*, 2006). Ces deux lectines sont principalement présentes dans le cytoplasme des bactéries, mais la protéine LecB a été également identifiée sur la membrane externe des bactéries (Tielker *et al.*, 2005). Des études réalisées par Chemani et ses collaborateurs indiquent le rôle des lectines chez *P. aeruginosa* dans l'adhésion et la cytotoxicité envers les cellules épithéliales (Chemani *et al.*, 2009).

I.4.2.6. Pyoverdine

La pyoverdine est un sidérophore important impliqué dans l'acquisition du fer dans le poumon notamment grâce à une forte affinité pour cet élément (Schalk *et al.*, 2011). L'apport en fer favorise la production de radicaux toxiques à action bactéricide envers d'autres espèces, ce qui favorise son émergence parmi les autres souches. Elle joue aussi un rôle dans la virulence et la communication intercellulaire chez *P. aeruginosa* (Beare *et al.*, 2003).

I.4.2.7. Pyocyanine

La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par *P. aeruginosa* via le SST2 et impliqué dans de nombreux mécanismes de pathogénicité (Lau *et al.*, 2004). Ses propriétés oxydoréductrices lui permettent d'agir sur les cellules épithéliales par plusieurs manières, le pigment oxyde le glutathion réduit qui perd son rôle d'antioxydant cellulaire entraînant des lésions au niveau des cellules épithéliales liées au stress oxydatif (O'Malley *et al.*, 2004). Elle inhibe la production de cytokines, empêche le mouvement des cils et bloque les voies de

signalisation cellulaire (Rada et Leto, 2013) et enfin accélère et induit également l'apoptose des neutrophiles (Allen *et al.*, 2005).

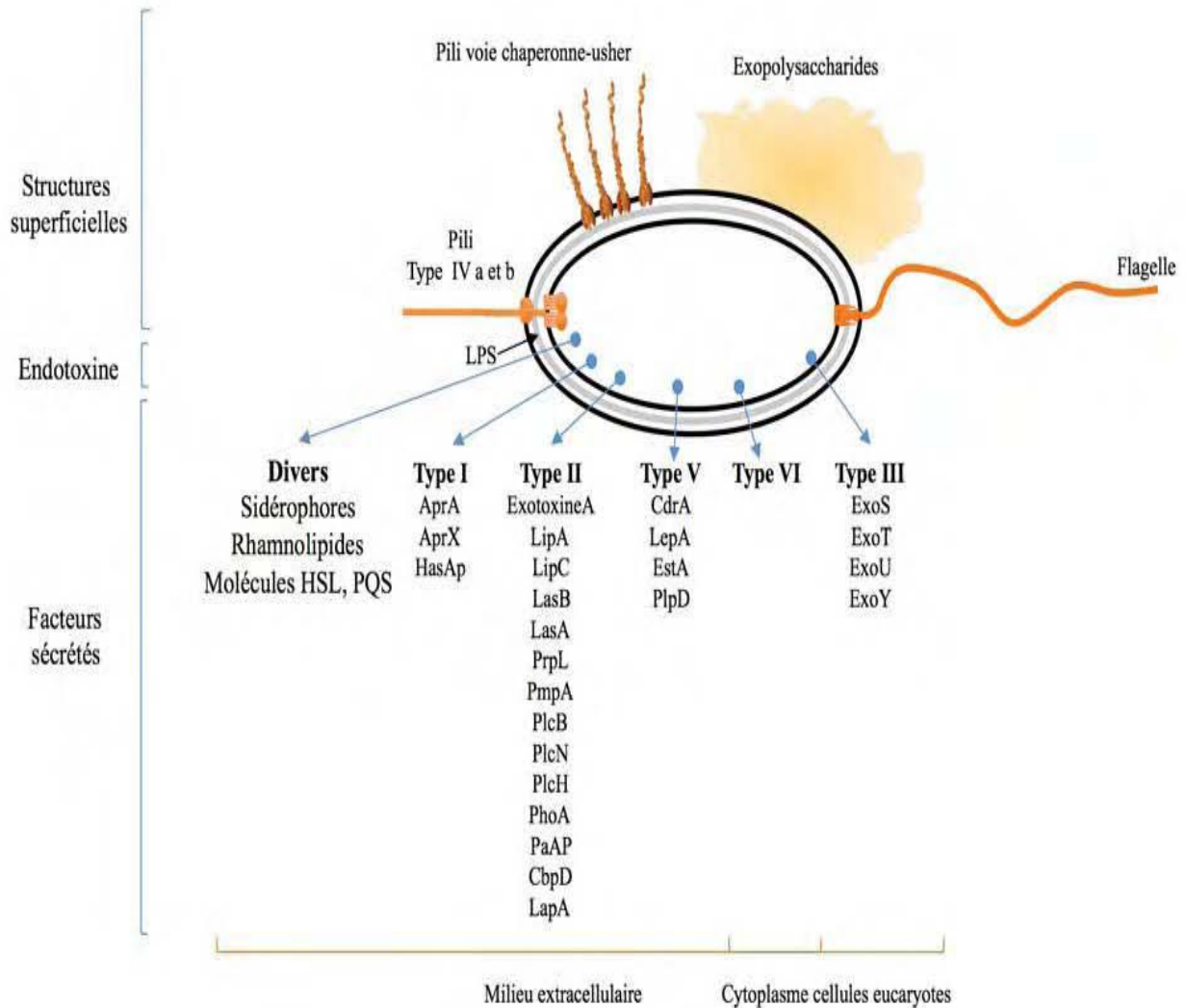


Figure 1 : Facteurs de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa* (Patrick et De Bentzmann, 2011).

AprA (Aeruginolysine) (Métallo-protéase), AprX (Protéine de fonction inconnue), HasAp (Hémophore), LipA et LipC (Lipases), LasB (Pseudolysine), LasA (Staphylolysine), PrpL (PIV) et PmpA (Métallo-enzymes), PlcB, PlcN et PlcH (Phospholipases B, N, H), PhoA (Phosphatase alcaline), PaAP (Amino-peptidase), CbpD (Protéine de liaison à la chitine), LapA (Phosphatase alcaline), CdrA, LepA, EstA et PlpD (Exo-protéines).

I.5. Régulation de l'expression des facteurs de virulence

P. aeruginosa adapte son expression de la plupart des facteurs de virulence décrits aux changements d'état, de mode de développement et des conditions environnementales par de nombreux systèmes de régulation. Parmi ceux-ci le Quorum Sensing (QS).

I.5.1. Le Quorum Sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*

Le quorum sensing (QS) est un mécanisme d'adaptation et de régulation qui permet aux bactéries de prendre des décisions collectives pour la transcription, la production et/ou la sécrétion d'un ensemble spécifique de gènes (Kalia, 2013). Ce système repose sur la production de petites molécules diffusibles appelées « autoinducteurs », dont la concentration sert d'indication de la densité bactérienne. Lorsque leur concentration atteint un certain seuil, ces molécules vont permettre d'induire des changements d'expression des gènes dans la population bactérienne et notamment la production de facteurs de virulence (Winstanley et Fothergill, 2009 ; Stevens *et al.*, 2012).

Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes de QS sont présents: deux circuits de QS de type LuxI/LuxR, le système *las* (LasI/LasR) et le système *rhl* (RhlI/RhlR), dont les deux principales molécules d'AHLs connues, le N-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL) et le N-butyryl-L-homosérine lactone (C4-HSL) ont la propriété de diffuser librement dans le milieu et peuvent transiter à travers la paroi et la membrane bactérienne. Un troisième circuit de type non- LuxI/LuxR appelé le *Pseudomonas quinolone signal* (PQS) (Rutherford et Bassler, 2012).

Dans le système LasRI, le gène *lasR* code pour une protéine régulatrice LasR, homologue de LuxR et contient deux sites fonctionnels. Dont le premier, situé au niveau de la région N-terminale de la protéine, constitue la région de liaison à la molécule auto-inductrice (AHL) et la portion C-terminale est responsable de la liaison de la protéine aux promoteurs des gènes cibles (Choi et Greenberg, 1991). Le deuxième gène dans le système LasRI est *lasI* code pour une enzyme auto-inducteur synthase LasI, homologue de LuxI, nécessaire à la synthèse d'une AHL: la 3-oxo-C12-HSL. Au cours de la croissance bactérienne et lorsque la concentration en 3-oxo-C12-HSL atteint un seuil critique, témoin d'une forte densité cellulaire. Cette molécule se lie à la protéine régulatrice LasR et forme un complexe activateur permettant d'adapter l'expression d'un panel de gènes cibles (Lee et Zhang, 2015). Cette adaptation permet l'action coordonnée à l'ensemble de la population bactérienne. Le complexe 3-oxo-C12-

HSL/LasR active notamment la transcription des gènes *lasB* (Gambello et Iglewski, 1991), *lasA* (Toder *et al.*, 1991), *aprA* (Gambello *et al.*, 1993), codant respectivement pour la synthèse de deux élastases et d'une protéase alcaline, *eoxA* (Gambello *et al.*, 1993) codant pour une exotoxine ADP-ribosylante et le gène *lasI*, ce qui induit une amplification du signal (3-oxo-C12-HSL) par auto-induction (Seed *et al.*, 1995).

Le système LasI/R contrôle également le système RhlI/R (Pesci *et al.*, 1997), qui fonctionne selon le même schéma. Il porte le gène *rhlR*, codant pour la protéine régulatrice RhlR et le gène *rhlI*, codant pour une enzyme auto-inducteur synthase, RhlI nécessaire à la synthèse d'un deuxième signal de type d'AHL : la *N*-butyryl-L-homosérine lactone (C4-HSL). Dans ce système, le complexe formé entre la protéine régulatrice RhlR et le signal C4-HSL contrôle la transcription des gènes *lasB*, *lasA*, *aprA*, *pyc*, *rhlI* et *rhlAB*. Ces deux derniers sont impliqués dans la production des rhamnolipides. Le gène *pyc* code pour la production de pyocyanine (Ruimy et Andremont, 2004). Le complexe C4-HSL/RhlR mène aussi à une auto-induction du circuit par l'activation de la transcription du gène *rhlI* (Rutherford et Bassler, 2012).

Une troisième protéine de type LuxR, QscR (quorum sensing control repressor), qui a été nommé pour son rôle de répresseur de contrôle de quorum-sensing a été détecté chez *P. aeruginosa* (Chugani et Greenberg, 2010 ; Oinuma et Greenberg, 2011). Cette protéine est un régulateur clé d'un sous-ensemble de gènes contrôlés par le QS et qu'elle ne soit pas associée à un auto-inducteur synthase, elle pouvait répondre à des signaux AHL notamment l'AHL générée par LasI (3-oxo-C12-HSL) (Lequette *et al.*, 2006 ; Antunes *et al.*, 2010).

Un troisième auto-inducteur dont la structure est très différente des deux autres homosérines lactones a été découvert pour la première fois par Pesci *et al.* (1999). Il s'agit de 2-heptyl-3-hydroxy-quinolone et désigné le *Pseudomonas quinolone signal* (PQS). La synthèse et la bioactivité du PQS sont en réalité sous la dépendance des systèmes LasI/R (effet positif) et RhlI/R (effet négatif) qui contrôlent l'expression du gène *pqsR* (Wade *et al.*, 2005). PQS est détecté par le régulateur PqsR (Rutherford et Bassler, 2012). La synthèse de PQS requiert de nombreux gènes (*PqsABCDH* et *phnAB*). Le signal PQS contrôle l'expression de multiples gènes impliqués dans la virulence (élastase, rhamnolipides et pyocyanine) et fonctionne comme régulateur entre les deux premiers systèmes de QS. Le complexe PqsR-PQS auto-induit la synthèse de PQS et active l'expression de *rhlI* et *rhlR* (Diggle *et al.*, 2007).

CHAPITRE II

Le biofilm chez
Pseudomonas aeruginosa

II.1. Le Biofilm

La découverte des biofilms a été avancée pour la première fois par Antoni Van Leeuwenhoek au 17^{ème} siècle. En effet, il aurait observé vers 1683 avec son microscope certes primitif, des micro-organismes adhérents à la surface des dents (Donlan, 2002). Mais à cause de l'insuffisance des méthodes d'observation performantes, la mise en évidence des biofilms est restée anecdotique pendant longtemps.

Des expériences ont été faites par Henrici en 1933, il émit l'hypothèse que la majorité des microorganismes vivant en milieux aqueux sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à un support et non pas sous forme planctonique (Henrici, 1933). L'étude des biofilms a pris véritablement son essor dans les années 1970, sous l'impulsion de Characklis puis de Costerton. Parmi les techniques utilisées à cette époque : la microscopie électronique à balayage et les cultures microbiologiques. Ces techniques ont permis de définir un certain nombre de caractéristiques inhérentes aux biofilms.

La notion de biofilm a été avancée pour la première fois par Hoiby qui observe des agglomérats de bactéries dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Hoiby, 1977) et par Costerton *et al.* (1978) qui proposèrent les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des micro-organismes. En suggérant que le biofilm serait le mode de vie majoritaire adopté par les cellules microbiennes dans la nature. Il a été estimé que 99 % de l'ensemble des bactéries dans un environnement naturel existent sous forme d'un biofilm (Costerton *et al.*, 1978).

Un biofilm est une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules attachées de manière irréversible à une surface biotique, abiotique ou tout simplement entre elles, enrobées d'une matrice extracellulaire de substances polymériques (EPS) autoproduite. Cette substance prend la forme d'un réseau de structure tridimensionnelle complexe, représente 50 à 90% du carbone organique total du biofilm et composée majoritairement d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire, de protéines et de biosurfactants (Costerton *et al.*, 1995). Au sein du biofilm, les bactéries sont regroupées en microcolonies séparées par des canaux aqueux. L'évolution de cette structure au cours de la formation du biofilm conduit à la création de gradients d'éléments indispensables au métabolisme bactérien, tels que l'oxygène, les nutriments ou des déchets qui en sont issus, telles que les toxines. La génération de ces gradients conduit à la formation de niches écologiques appropriées à l'installation et/ou au

développement d'espèces ou de sous-populations adaptées à ces microenvironnements spécifiques (Wingender *et al.*, 2011). Cette structure complexe caractérisée par une hétérogénéité métabolique, l'expression de gènes spécifiques relevant d'une réponse générale au stress et une augmentation de la présence de variants phénotypiques, d'échange de matériel génétique et du taux de mutation (Bridier *et al.*, 2011). L'ensemble de ces facteurs participe à l'augmentation de la résistance des microorganismes présents au sein des biofilms vis-à-vis des différents stress environnementaux par rapport à leur état libre (Bridier *et al.*, 2011).

II.2. Le biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

II.2.1. La matrice du biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, le biofilm est constitué de deux grands éléments : les microorganismes, organisés en microcolonies et la matrice extracellulaire d'exopolymères (Costerton *et al.*, 1995) qui représente 85% du volume total du biofilm et constituée essentiellement d'exopolysaccharides (EPS). 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). *P. aeruginosa* a la capacité de synthétiser au moins trois exopolysaccharides : l'alginate, le Psl (Polysaccharide synthesis locus) et le Pel (PELlicle locus) (Ma *et al.*, 2009 ; Schurr, 2013).

II.2.1.1. L'alginate

L'alginate est le premier exopolysaccharide qui a été identifié chez *P. aeruginosa* par Evans et Linker (1973). Il s'agit d'un polymère acétylé de l'association non répétitive de monomères d'acides guluroniques et mannuroniques (Ryder *et al.*, 2007). Le polysaccharide visqueux représente un facteur de virulence chez *P. aeruginosa* par son caractère mucoïde qu'il lui confère et un composant principal de la matrice du biofilm formé (Parsek et Tolker-Nielsen, 2008). L'alginate joue un rôle dans la viabilité cellulaire au sein du biofilm (Ghafoor *et al.*, 2011). Il procure aux bactéries un avantage sélectif dans l'environnement hostile comme les voies pulmonaires en leur offrant une protection adaptée contre les agents de défense du système immunitaire (lymphocytes, phagocytes, action des cellules ciliées du tractus respiratoire) et les traitements antibiotiques (Stapper *et al.*, 2004 ; Ghafoor *et al.*, 2011).

II.2.1.2. Le Psl

Psl (Polysaccharide synthesis locus) est constitué de mannose, de glucose et de galactose et contient également des traces de rhamnose, de xylose et de N-acetylglucosamine (Ma *et al.*, 2007). Il est produit durant le mode planctonique où il intervient dans l'étape d'attachement initial des souches et la formation des micro-colonies (Ma *et al.*, 2009).

La présence de Psl au sein de la matrice extracellulaire augmente son élasticité et sa réticulation (Chew *et al.*, 2014). Cette augmentation de la réticulation contribue à renforcer la structure de la matrice extracellulaire et à maintenir l'architecture du biofilm. Elle contribue également à la ségrégation de *P. aeruginosa* au sein d'un biofilm multi-espèces par formation d'une barrière physique (Chew *et al.*, 2014). En plus de ses fonctions dans la structure du biofilm, le Psl agit comme un signal pour stimuler davantage de production de polysaccharides (Irie *et al.*, 2012).

II.2.1.3. Le Pel

Pel (PEllicle locus) est essentiellement composé d'un assemblage de polysaccharides riches en glucose et joue un rôle dans la densité cellulaire du biofilm et/ou de la compacité du biofilm (Ghafoor *et al.*, 2011). La synthèse de Pel intervient plus spécifiquement lors des phases de maturation du biofilm. Sa capacité à interagir avec l'ADN extracellulaire composant la matrice favorise les interactions entre cellules bactériennes, aboutissant à une augmentation de la densité du biofilm (Ghafoor *et al.*, 2011). Pel aurait également la capacité d'interagir avec Psl : ces interactions conduiraient à une augmentation des forces d'adhésion en certains points (Cooley *et al.*, 2013). Il contribuerait également aux propriétés de résistance du biofilm contre les antibiotiques de type aminoglycosides (Colvin *et al.*, 2011).

II.2.1.4. L'ADN extracellulaire

L'ADN extracellulaire (ADNe) est un composant majeur de la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* dans lequel il joue un rôle de connecteur intercellulaire et est requis pour maintenir l'intégrité du biofilm (Flemming et Wingender, 2010). Il est libéré suivant deux types de mécanismes : Les mécanismes indépendants du QS par l'induction de la lyse des cellules par des prophages et les mécanismes dépendants du QS permettraient l'induction de la lyse des cellules via la synthèse de facteurs de virulence tels que les phénazines (Das *et al.*, 2013). L'ADNe intervient lors des premières étapes de formation du biofilm de *P. aeruginosa* et participe au maintien de la structure de la matrice extracellulaire. Son action stabilisatrice

provient notamment de sa capacité à induire des forces d'interactions de type van der Waals ou acide/base avec les autres éléments constitutifs de la matrice ou des cellules (Das *et al.*, 2010) tels que le Pel (Colvin *et al.*, 2011) ou la pyocyanine (Das *et al.*, 2015).

II.2.2. Les étapes de formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

Le cycle de développement du biofilm comprend 5 stades successifs (Figure 2). Tout d'abord, le développement du biofilm est initié par l'attachement réversible de cellules planctoniques à une surface par des interactions non spécifiques de type liaison hydrogène ou liaison de Van der Waals : on parle d'adhérence (Golovlev, 2002 ; Van Houdt et Michiels, 2005). La deuxième étape est une adhésion irréversible et spécifique des souches au substrat grâce à des molécules d'adhésion comme les pili et production d'une matrice d'exopolysaccharides : il s'agit de la phase d'adhésion. Ensuite, le biofilm se développe, les bactéries ont alors un fort taux de croissance et augmentent leur activité métabolique, jusqu'à former un biofilm mature, épais et structuré, c'est la phase de maturation. Puis, sous l'effet de facteurs environnementaux, des bactéries vont se détacher du biofilm, et se disperser sous forme planctonique dans le milieu environnant : on parle de dispersion (essaimage) du biofilm. Ces individus mobiles sont capables de coloniser de nouvelles surfaces et donner naissance à de nouveaux biofilms (Clutterbuck *et al.*, 2007).

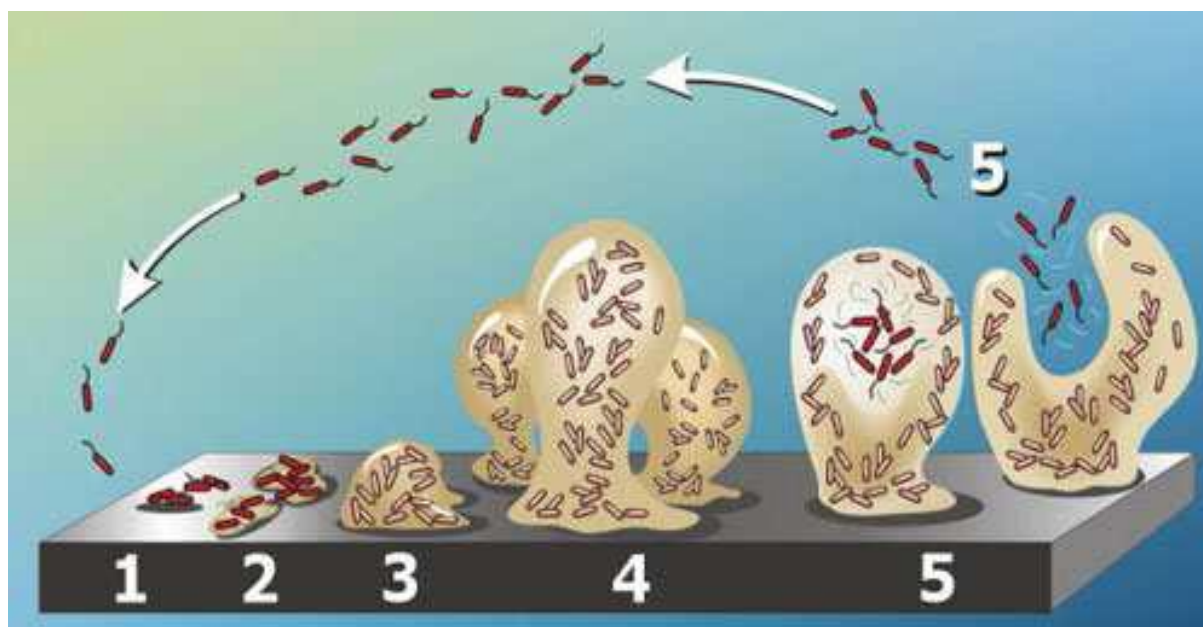


Figure 2 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Stoodley *et al.*, 2002).

(1) Attachement initial des cellules à la surface (2) Attachement irréversible des cellules et production d'EPS (3) Développement précoce de l'architecture du biofilm. (4) Maturation du biofilm (5) Dispersion des cellules du biofilm.

II.2.2.1. Adhésion réversible

L'étape initiale de la formation du biofilm est une adhésion réversible des bactéries planctoniques à une surface naturelle ou artificielle en réponse à des signaux environnementaux ou nutritionnels (Filloux et Vallet, 2003) et sous l'influence de nombreux facteurs : pH, osmolarité du milieu, température.... (Beloin *et al.*, 2008). A ce stade, *P. aeruginosa* est transitoirement fixé au substrat et est capable de se détacher librement (Sauer *et al.*, 2002). L'adhésion dépend des forces d'attraction ou de répulsion s'exerçant entre la bactérie et la surface où dans un environnement liquide, les bactéries planctoniques s'approchent des surfaces par l'intervention des mécanismes de motilité active ou sous l'influence des forces physiques comme les forces d'attraction de van der Waals, les charges électrostatiques des surfaces et des interactions hydrophobes (Donlan, 2002 ; Kim *et al.*, 2012). Le flagelle de *P. aeruginosa* s'avère très important dans l'étape de l'approche au support (O'Toole et Kolter, 1998). Il permet à la bactérie d'opérer deux types de mobilité, la nage «swimming» et le grouillement «swarming», nécessaires au déplacement de la bactérie dans un environnement aqueux ou semi-solide (Kearns, 2010). En plus, cette étape fait également intervenir des lectines et/ou des adhésines, qui peuvent être portés par des éléments de la surface externe de la membrane des microorganismes tels que certains appendices liés à la mobilité (flagelle, pili de type IV) (Dunne, 2002).

II.2.2.2. Adhésion irréversible

Après une adhésion réversible des bactéries, l'intervention des pili de type IV permet un attachement permanent avec la surface ou avec d'autres microorganismes. Cette adhésion conduit à une augmentation locale de la densité cellulaire qui active le mécanisme de communication cellulaire et d'adaptation « le quorum-sensing » qui permet aux bactéries de prendre des décisions collectives. Le fonctionnement de ce système est lié à la production de molécules diffusibles induites à forte densité cellulaire et est essentiel à la formation de biofilm mature chez *P. aeruginosa*. (Petrova et Sauer, 2012). L'accumulation de ces molécules constitue un signal ayant la propriété, après détection par les protéines réceptrices appropriées, d'activer ou d'inhiber l'expression d'un panel de gènes cibles (Lee et Zhang, 2015). L'expression des gènes codant pour des éléments impliqués dans la mobilité est inhibée tandis que celle des gènes nécessaires à la production de protéines de surface et à l'excrétion de substrats extracellulaires polymériques (EPS) est favorisée (Garret *et al.*, 2008, Renner et Weibel, 2011).

II.2.2.3. Maturation primaire

Dès que l'attachement au substrat devient irréversible, le biofilm entame la phase de croissance. Cette phase de développement est caractérisée par la prolifération des bactéries qui donne lieu à la formation des micro-colonies. La formation de ces micro-colonies est un mécanisme d'agrégation cellulaire qui nécessite une mobilité bactérienne obtenue par les pili de type IV. Les cellules bactériennes sécrètent des substances exopolymériques (EPS) qui vont permettre de les immobiliser et les maintenir à proximité les unes des autres, favorisant les interactions étroites bactérie-bactérie telles que la communication intercellulaire et l'échange d'ADN (Flemming et Wingender, 2010 ; Renner et Weibel, 2011 ; Tashiro *et al.*, 2013).

II.2.2.4. Maturation secondaire

Cette phase de maturation du biofilm est marquée par des synthèses protéiques importantes, très différentes de celles ayant lieu lors de la première phase de maturation du biofilm. L'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation (Clutterbuck *et al.*, 2007). Ce stade implique l'intervention du QS (production de rhamnolipides), la production d'exopolysaccharides ainsi que la répression de l'expression des différents appendices de mobilité (flagelle et pili de type IV) (Ruimy et Andremont, 2004 ; Kukavica-Ibrulj, 2007).

Les microorganismes au sein d'un biofilm ne présentent pas le même état métabolique et/ou physiologique selon leur emplacement au sein de la matrice. Ils se divisent en deux sous-populations : l'une non mobile et l'autre mobile, via son flagelle et ses pili de type IV. Les premières micro-colonies sont formées par des cellules non mobiles qui prolifèrent à des positions fixes et forment la base du biofilm. La sous-population mobile migre alors, à l'aide de flagelles et pili de type IV, et colonise la base du biofilm pour former la périphérie de la structure (Parsek et Tolker-Nielsen, 2008). Au cours de l'accumulation des exopolymères synthétisés par les bactéries, la matrice extracellulaire (MEC) gagne en épaisseur. Elle se creuse des canaux qui permettent l'acheminement des nutriments et de l'oxygène dans les différentes couches du biofilm et l'export des différents déchets produits dans l'environnement (Filloux et Vallet, 2003). L'oxygène étant consommé par les microorganismes aérobies plus vite qu'il ne diffuse à travers la matrice, les couches profondes du biofilm, à partir d'une cinquantaine de micromètres de profondeur, relèvent de conditions microanaérobies

(Flemming, 2011). De la même façon, les microorganismes des couches superficielles ont un accès facilité aux nutriments nécessaires à leur activité. Cette hétérogénéité métabolique et physiologique participe aux propriétés de résistance du biofilm (Borriello *et al.*, 2004). Ces gradients conduisent également à la création de niches écologiques au sein du biofilm (Mann et Wozniak, 2012).

La structure tridimensionnelle du biofilm est influencée par des conditions physiques, comme la vitesse du flux du milieu dans lequel le biofilm se développe et des facteurs biologiques (sources nutritives, mobilité bactérienne et surfactants) (Karatan et Watnick, 2009).

II.2.2.5. Essaimage et dispersion du biofilm

Lorsque l'épaisseur du biofilm atteint le maximale, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu en réponse à des perturbations externes. Il s'agit du stade de détachement. Cette étape implique la dispersion de cellules individuelles de la matrice du biofilm et le détachement du film par érosion (Kim *et al.*, 2012) pour aller coloniser de nouvelles niches écologiques et par conséquent la formation d'autres biofilms.

On peut distinguer deux grands types de dispersion : la dispersion active et la dispersion passive. La dispersion active correspond à l'ultime phase de développement du biofilm conduisant à la libération d'éléments planctoniques mobiles. Elle est caractérisée par la formation d'un creux dans la tête de la structure « champignon ». L'ouverture de la tête de la structure permet leur libération dans l'environnement (Van Schaik *et al.*, 2005) et est le résultat de sa dégradation par différentes enzymes. Ces enzymes peuvent être produites par les microorganismes constitutifs du biofilm ou être issues de la lyse des bactéries due à l'action de bactériophages (Garnett et Matthews, 2012).

La dispersion passive correspond à l'arrachage de morceaux de biofilm. Cet arrachage résulte de l'érosion du biofilm par les forces de frottements exercées par les flux hydrodynamiques, de l'abrasion par les particules contenues dans l'eau circulante ou de la prédation par d'autres microorganismes, tels que les amibes ou les bactériophages. Ces détachements sont indépendants de l'activité des bactéries et peuvent survenir à n'importe quelle phase du cycle de développement du biofilm (Hall-Stoodley et Stoodley, 2005 ; Kaplan, 2010).

II.2.3. Les mécanismes de résistance du biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

Les études menées sur les biofilms ont permis d'établir l'existence de changements radicaux dans l'expression génétique et les phénotypes entre les formes planctoniques et sessiles. Les biofilms renforcent considérablement la tolérance des micro-organismes englobés dans la matrice contre les agents antimicrobiens, le système immunitaire et les stress environnementaux.

II.2.3.1. Résistance du biofilm aux antibiotiques

Les bactéries résidentes dans un biofilm sont 100 à 1000 fois plus résistantes envers les agents antimicrobiens et par différents mécanismes que la même souche planctonique (Hoiby *et al.*, 2010b).

La production d'une matrice d'exopolysaccharides, lors du développement des micro-colonies, a souvent été considérée comme une barrière physique difficile à franchir induisant une limitation du transport des antibiotiques au sein du biofilm et donc le contact des bactéries avec les agents antimicrobiens (Costerton, 2001). Cependant l'échec de certains antibiotiques à pénétrer dans le biofilm ait souvent été avancé comme une explication pour la résistance des biofilms à la thérapie antimicrobienne (Donlan et Costerton, 2002 ; Drenkard, 2003) où la diffusion retardée à travers le biofilm laissant le temps aux bactéries d'exprimer leurs mécanismes inductibles de résistance comme l'expression d'une enzyme appelée β -lactamase. Cette enzyme est capable de détruire les antibiotiques de la famille des β -lactames qui ont pour fonction d'inhiber la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries (Bagge *et al.*, 2004).

La présence d'alginate dans le biofilm de *P. aeruginosa* permet aussi d'inactiver les antibiotiques de la famille des aminosides. La charge négative d'alginate permet de piéger les aminosides chargés positivement et d'empêcher leur action (Walters *et al.*, 2003). De même, l'ADNe est un composant majeur de la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* aussi capable d'interagir avec les aminosides (Chiang *et al.*, 2013).

Au sein du biofilm, les micro-colonies sont séparées par un réseau de canaux permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments à l'intérieur du biofilm et, d'autre part, d'évacuer les déchets. Ainsi un gradient en nutriments et en oxygène se développe du sommet à la base du biofilm et affecte la vitesse de croissance et l'activité

métabolique des bactéries. Comme la plupart des antibiotiques ciblent principalement des cellules métaboliquement actives, il a été suggéré que l'hétérogénéité métabolique des bactéries dans le biofilm mène à des différences de susceptibilité aux agents antimicrobiens (Aaron *et al.*, 2002 ; Parsek et Tolker-Nielsen, 2008).

Les cellules persistantes représentent une petite sous-population de cellules qui entrent spontanément dans un état-dormant. Ces bactéries persistantes sont très tolérantes aux antibiotiques même lorsque les biofilms sont traités pendant des temps prolongés ou avec des concentrations élevées en agent antimicrobien (Lewis, 2012).

La proximité des bactéries dans la structure leur permet le transfert d'informations génétiques (transfert horizontal de gènes) au sein du biofilm à des fréquences très élevées avec pour conséquence un taux de mutation plus important que chez les bactéries isogéniques en mode planctonique (Molin et Tolker-Nielsen, 2003 ; Driffield *et al.*, 2008). On parle de phénotype hypermutable. L'augmentation de stress oxydatif dans les biofilms, provoquée par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de facteurs de défense antioxydants est une cause d'augmentation de la mutabilité dans les biofilms. Le stress oxydatif endogène dans les biofilms favorise la résistance aux agents antimicrobiens (Boles et Singh, 2008 ; Hoiby *et al.*, 2010b ; Paraje, 2011).

Il a été démontré que le système de communication QS joue un rôle important dans la tolérance des biofilms de *P. aeruginosa* à la thérapie antibiotique (Hoiby *et al.*, 2010b). Les bactéries du biofilm dans lequel le QS est bloqué, sont sensibles au traitement par la tobramycine et l' H_2O_2 contrairement aux bactéries avec un système de QS fonctionnel (Bjarnsholt *et al.*, 2005).

II.2.3.2. Résistance du biofilm envers le système immunitaire

Les biofilms de *P. aeruginosa* possèdent de nombreux moyens pour résister à la réponse immunitaire de l'hôte favorisant l'installation des infections chroniques et persistantes (Hall-Stoodley et Stoodley, 2009). En effet, *P. aeruginosa* est capable de se protéger de la phagocytose effectuée par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, on parle du phénomène de «phagocytose frustrée». C'est un phénomène rencontré lorsque la bactérie se développe sous forme d'un biofilm où le processus de phagocytose induit par l'hôte est perturbé par les composants de la matrice du biofilm. L'alginate par exemple constitue l'un de ces composés était impliqué dans ce phénomène (Leid *et al.*, 2005).

En plus de la non élimination du pathogène, la phagocytose frustrée provoque la libération du contenu toxique des macrophages (comme les radicaux libres d'oxygène) dans le milieu. Ceci va donc détruire les tissus sains de l'hôte et maintenir l'inflammation, ce qui sera propice à l'installation chronique de l'infection.

La résistance des biofilms à la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles et au H₂O₂ est un phénomène dépendant du QS (Bjarnsholt *et al.*, 2005). La nécrose des neutrophiles qui peut entraîner la libération d'enzymes protéolytiques dégradant les tissus hôtes est causé par les rhamnolipides de *P. aeruginosa* dont la production dépend du système du QS (Jensen *et al.*, 2007) et augmente en présence de polynucléaires neutrophiles (Alhede *et al.*, 2009). Les rhamnolipides entourent les bactéries du biofilm et éliminent les polynucléaires neutrophiles menant à la persistance de la bactérie et l'invasion du tissu pulmonaire (Van Gennip *et al.*, 2009 ; Van Gennip *et al.*, 2012).

L'alginate en plus de son effet dans la résistance du biofilm aux antibiotiques, il participe également à la résistance des bactéries dans le biofilm au système immunitaire. Il diminue le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles (Hänsch *et al.*, 2008), inhibe l'activation du complément et diminue la phagocytose par les macrophages et les neutrophiles (Leid *et al.*, 2005).

II.2.4. Systèmes de régulations impliqués dans la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*

La régulation de la formation de biofilm implique de multiples mécanismes bactériens, y compris les systèmes QS et les systèmes de réglementation à deux composants qui interagissent principalement avec la production d'EPS (De Kievit, 2009). La figure 3 résume les principaux systèmes impliqués dans la régulation de la formation de biofilm à *P. aeruginosa*.

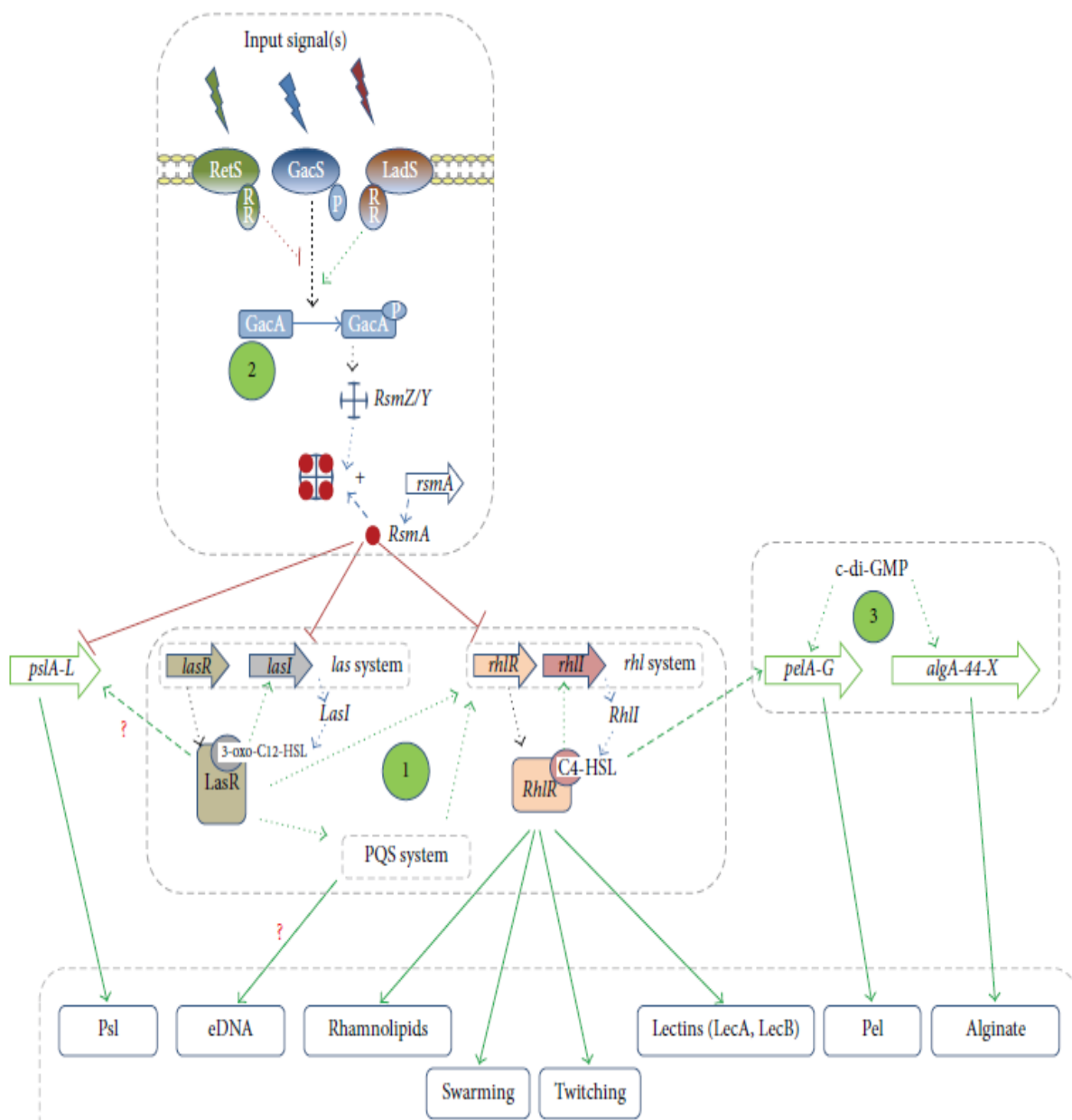


Figure 3 : Systèmes bactériens pertinents et facteurs impliqués dans la régulation de la formation de biofilm à *P. aeruginosa* (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

II.2.4.1. Régulation par le système de détection du Quorum Sensing

En 1998, Davies et collaborateurs ont décrit le rôle du QS dans la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*. Ils ont vérifié lequel des deux systèmes QS basés sur les AHLs (*lasI*-3-oxo-C12-HSL-*lasR* et *rhlI*-C4-HSL-*rhlR*). Il était impliqué dans la maturation du biofilm chez *P. aeruginosa*. Ils ont conclu que la maturation du biofilm chez *P. aeruginosa* est liée uniquement au système *lasI*-3-oxo-C12-HSL-*lasR*. Cependant, Gilbert *et al.* (2009) ont rapporté que le régulateur QS LasR peut se lier à la région promoteur de l'opéron *psl*, suggérant que QS peut réguler l'expression de *psl*. Le système *rhl* a été signalé pour intervenir dans la formation du biofilm de *P. aeruginosa* (Sakuragi et Kolter, 2007) en améliorant la biosynthèse de Pel. La transcription de l'opéron du *pel* est réellement réduite chez le mutant *rhlI*. Le système PQS, pour sa part, est lié à la libération d'ADNe lors du développement du biofilm (Allesen-Holm *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2007).

Le quorum sensing régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm. Il aurait un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm (Clutterbuck *et al.*, 2007). Le quorum sensing initie les phénomènes de dispersion et d'essaimage des bactéries planctoniques à partir du biofilm (Irie et Parsek, 2008). Le déclenchement du QS à forte densité cellulaire peut permettre aux bactéries d'activer ou de désactiver la sécrétion de substances polymériques extracellulaires (EPS) (Xavier et Foster, 2007 ; Nadell *et al.*, 2008). Par exemple la diminution de la production d'EPS, conférerait aux bactéries l'avantage de rediriger l'énergie utilisée pour la production d'EPS vers la division cellulaire et la croissance du biofilm, avant leur dissémination vers une nouvelle niche (Nadell *et al.*, 2008).

Il est important de noter qu'un lien indirect entre la formation de biofilm et QS a été rapporté, par le contrôle des motilités de types swarming et twitching, ainsi que de la production de certains facteurs de virulence extracellulaires comme les rhamnolipides, les lectines et les protéases (Clutterbuck, 2007 ; Irie et Parsek, 2008).

II.2.4.2. Les systèmes à deux composants *GacS/GacA* et *RetS/LadS*

Parmi les 60 systèmes à deux composants trouvés dans le génome de *P. aeruginosa* (Rodrigue *et al.*, 2000), le système *GacS/GacA* agit comme un super régulateur du système QS et participe à la production de multiples facteurs de virulence ainsi que dans la formation de biofilm (Parkins *et al.*, 2001). Le système Gac se compose d'un capteur kinase

transmembranaire (GacS) qui, lors de l'autophosphorylation, transfère un groupe phosphate à son régulateur apparenté (GacA) qui, à son tour, augmente l'expression des petits ARN régulateurs (*RsmZ* et *RsmY*). *RsmZ* et *RsmY* captent la petite protéine régulatrice de liaison à l'ARN *RsmA* (codée par le gène *rsmA*), un répresseur qui régule post-transcriptionnellement le *psl* locus (*pslA-L*) (Brencic *et al.*, 2009 ; Irie *et al.*, 2010). Le système *GacS/GacA* a également un contrôle sur le système AHL car il inactive *RsmA* libre qui contrôle négativement la synthèse de C4-HSL et 3-oxo-C12-HSL et donc les facteurs de virulence extracellulaires contrôlés par les systèmes *las* et *rhl* (Reimmann *et al.*, 1997 ; Kay *et al.*, 2006).

Le capteur hybride histidine kinase *RetS* est connu pour réprimer la formation de biofilm (Goodman *et al.*, 2004 ; Kong *et al.*, 2013) où l'histidine kinase *LadS* antagonise l'effet de *RetS* (Ventre *et al.*, 2006). En effet, les mutants $\Delta retS$ forment des biofilms plus structurés par rapport à la souche PAO1 de type sauvage (Goodman *et al.*, 2004). La souche PA14 (naturellement déficiente dans le gène *ladS*) affiche une formation de biofilm atténuée par rapport à la souche PA14 *LadS*⁺ (Mikkelsen *et al.*, 2011). Il est rapporté que *RetS* et *LadS* interagissent avec le système *GacS/GacA* en modulant l'état de phosphorylation de *GacS*, ce qui inhibe et favorise, respectivement, la phosphorylation de *GacA* (Goodman *et al.*, 2009 ; Records et Gross, 2010).

Il est intéressant de noter que les systèmes *GacS/GacA* et *RetS/LadS* sont proposés pour impliquer la médiation de la transition du phénotype de *P. aeruginosa* d'une infection à phase aiguë à une phase chronique (Goodman *et al.*, 2004).

II.2.4.3. Di-guanosine monophosphate cyclique (di-GMPc)

La production de polysaccharides dépend du bis-(3'-5')-dimérique-guanosine-monophosphate cyclique, plus communément appelé di-GMPc (Hickman *et al.*, 2005 ; Merighi *et al.*, 2007). Le di-GMPc est un second messager intracellulaire omniprésent largement distribué dans les bactéries (Hengge, 2009), intervenant dans des cascades de phosphorylation et modulant l'expression de certains gènes impliqués dans la formation du biofilm et dans les mécanismes de virulence. Dans les cellules bactériennes, di-GMPc est généré à partir de deux molécules de guanosine triphosphate par le diguanylate cyclases et dégradé en 2-GMP par des phosphodiesterases spécifiques (Hengge, 2009).

Lorsque la quantité de GMP-c est élevée au sein de la cellule, ceci favorise la biosynthèse des polysaccharides (alginate et Pel). En effet, un processus de liaison de c-di-GMP aux protéines PelD et Alg44 est nécessaire pour la formation de polymère Pel et alginate, respectivement (Lee *et al.*, 2007 ; Merighi *et al.*, 2007). À l'inverse, les faibles niveaux de di-GMPc favorisent les motilités bactériennes en améliorant la formation flagellaire et la dispersion bactérienne (Merighi *et al.*, 2007).

CHAPITRE III

Effet des substances naturelles sur la formation de biofilms

III.1. Inhibition de formation de biofilm par des substances naturelles

Sous la forme de biofilm, les bactéries posent de graves problèmes en matière de santé publique. Les bactéries dans un biofilm sont plus résistantes à divers traitements antimicrobiens. Elles peuvent également survivre à des conditions difficiles et résister au système immunitaire de l'hôte. Par conséquent, il y a un besoin de nouvelles stratégies de traitement pour traiter les infections associées aux biofilms.

Pendant de nombreuses années, il est bien connu que les plantes ont été utilisées dans la médecine traditionnelle pour prévenir ou guérir les maladies infectieuses. Cependant, au cours des dernières années, de nombreuses études de recherche ont signalé la possibilité d'utilisation des extraits de plantes pour lutter contre les agents pathogènes en les tuant ou en inhibant les mécanismes de leur virulence tels que le système QS par leur similitude dans la structure chimique avec les signaux de détection du quorum et leur capacité à dégrader les récepteurs de signal et/ou la formation de biofilm (Kalia, 2013).

III.1.1. Composés anti-biofilm avec activité anti-Quorum sensing

L'inhibition du *quorum sensing* (QSI), aussi appelé *quorum quenching* (QQ) (Uroz *et al.*, 2009), serait une bonne approche de lutte contre les infections et la formation de biofilms indésirables dont les biofilms chez *P. aeruginosa* (Rasmussen et Givskov, 2006 ; Dobretsov *et al.*, 2009). Les molécules QSIs peuvent être soit naturelles, sécrétées par des organismes vivants tels que les microbes ainsi que les plantes et les animaux, soit chimiquement synthétisées (Kalia, 2013).

L'inhibition de la détection du QS peut être réalisée par plusieurs façons, y compris :

- La dégradation enzymatique des molécules de signalisation où blocage de leur synthèse ;
- Blocage de la formation des complexes LasR et RhlR avec les AHL correspondants ;
- L'inhibition de la transcription de *lasR/lasI* et *rhlR/rhlI* par les activateurs GacA et Vfr (Ruimy et Andremont, 2004) (Figure 4).

De plus, l'activité des macrolides chez les patients mucoviscidosiques ou atteints de panbronchiolite diffuse pourrait être expliquée par une inhibition du QS (Tateda *et al.*, 2001).

Il faut signaler que cette voie thérapeutique ne sera efficace qu'à la seule condition que les biofilms de *P. aeruginosa* responsables de l'infection sont principalement contrôlés par le QS.

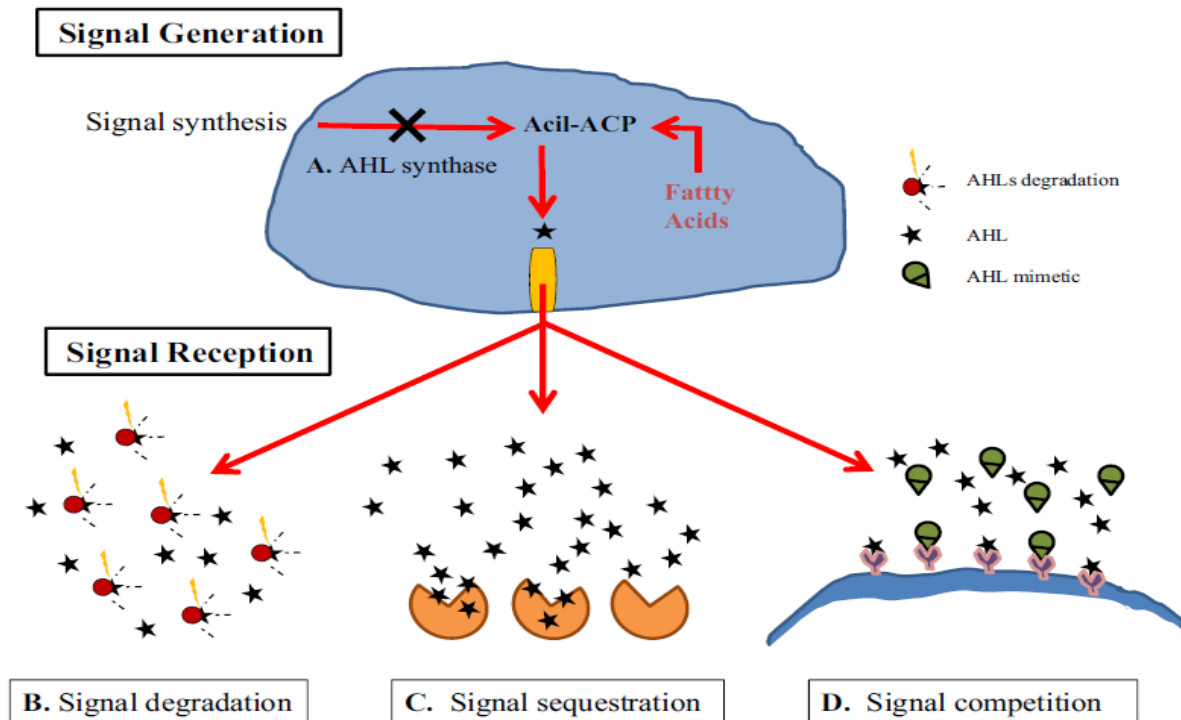


Figure 4 : Schéma des potentiels mécanismes d'action des extraits végétaux et phytochimiques comme QSI. (A): Blocage de la production des signaux par l'inhibition de l'activité de la synthase AHL, (B): la dégradation de l'AHL, (C) : la séquestration de l'AHL, (D) : compétition avec les signaux par de petites molécules mimant les AHLs (Truchado *et al.*, 2015).

III.1.1.1. Inhibition de l'activation et de la synthèse des AHL

La stratégie d'inhibition du QS par inactivation de la protéine synthase de type LuxI est fondamentale, car elle permettrait de bloquer le QS des bactéries en amont, afin de contrôler les infections et la formation de biofilm chez les bactéries. En effet, si aucun signal n'est synthétisé, il n'y a aucune possibilité de liaison au récepteur et les gènes sous contrôle du QS ne sont donc pas exprimés.

Il a été possible d'inhiber la synthèse d'AHL en modifiant la nature des précurseurs indispensables à cette synthèse. Les mutations des enzymes impliquées dans le métabolisme des acides gras, précurseurs des AHL, entraînent une synthèse importante d'acide gras à courtes chaînes (Hoang et Schweizer, 1999). L'enzyme LasI se trouve alors saturée d'acyl à courte

chaîne et réduit la synthèse de 3-oxo-C12-HSL. Dans ces conditions, la virulence de la souche de *P. aeruginosa* est significativement atténuée.

La production et l'activité des AHLs des bactéries peuvent être aussi inhibées par des molécules naturelles produites de façon générale par des organismes vivants ou synthétiques et commerciales. La curcumine est une molécule commerciale, elle a été décrite par Rudrappa et Bias pour réduire la production d'AHLs et donc la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* PAO1. En effet, 1 µg/mL de curcumine inhiberait la production de la C4-HSL et de la 3-oxo-C12-HSL de 2 à 25% (Rudrappa et Bais, 2008).

Les AHLs peuvent également être inactivées par une dégradation enzymatique. Il existe deux groupes d'enzymes qui dégradent les AHLs. Ce sont les AHL-lactonases et les AHL-acylases, identifiées chez plusieurs espèces de bactéries (Dong *et al.*, 2002 ; Czajkowski et Jafra, 2009). Les lactonases sont des enzymes qui hydrolysent le cycle lactone des AHLs aboutissant à des molécules inactives dépourvues de cycle lactone et qui réduiraient de 1000 fois l'activité des biosenseurs (Dong *et al.*, 2002). Un groupe de gènes nommé *bpi* gènes, isolés de *P. aeruginosa*, coderait pour des lactonases qui inhibent le biofilm de cette dernière et dégradent la 3-oxo-C8-HSL chez *A. tumefaciens* (Schipper *et al.*, 2009). Les acylases coupent la liaison amide de la molécule d'AHL et libère l'acide gras et l'homosérine lactone, incapables d'activer chacun le QS des biosenseurs (Zhang & Dong, 2004). La PvdQ chez *P. aeruginosa* PAO1, qui dégrade la 3-oxo-C12-HSL, conduisent à la régression des facteurs de virulence (Jimenez *et al.*, 2010).

La stabilité et l'activité biologique des AHLs pouvaient largement être influencer par d'autre facteurs tels que le pH, la température et la longueur de la chaîne acyle (Byers *et al.*, 2002 ; Yates *et al.*, 2002).

III.1.1.2. Inhibition de la formation des complexes LasR ou RhIR avec les AHL

La liaison des protéines LasR ou RhIR avec ses AHL correspondantes entraîne une activation de la transcription de plusieurs gènes par interaction avec l'ADN et le domaine C-terminal des protéines. L'approche la plus utilisée dans l'inhibition du QS bactérien est l'utilisation de petites molécules mimant les AHLs, qui bloquent l'activation du récepteur homologue de LuxR (Rasmussen et Givskov, 2006). Ces molécules peuvent être naturelles, produites à la fois par les organismes procaryotes et eucaryotes ou chimiquement synthétisées.

Elles ont pour rôle d'empêcher la fixation des AHLs sur le site du récepteur, en s'y fixant en lieu et place des AHLs (inhibition compétitive).

III.1.1.2.1. Inhibiteurs naturels du récepteur

Les organismes procaryotes peuvent produire des métabolites secondaires qui agissent comme des molécules QSIs. Les QSIs sont des molécules structurellement identiques aux AHLs, d'où la possibilité de les mimer, afin d'entrer en compétition avec eux pour la fixation sur le site du récepteur QS. C'est l'exemple des phényléthylamides produits par la bactérie marine *Halobacillus salinus*, qui miment la C6-HSL pour le récepteur CviR de *C. violaceum* (Teasdale *et al.*, 2009).

Des inhibiteurs du QS ont aussi été découverts chez les macroalgues, les champignons et les plantes (Kalia, 2013). Les furanones halogénées (en particulier les furanones C-30 et C-56), inspirées à partir des composés naturels produits par la macroalgue marine *Delisea pulchra* sont des molécules assez semblables structurellement aux AHLs (Manfield *et al.*, 1999). Les furanones halogénées ont été décrites comme de puissants inhibiteurs du système QS chez les bactéries à coloration de Gram négative, ayant des répercussions sur les phénotypes liés à la virulence, la production d'antibiotiques, la motilité dont le swarming ainsi que la formation de biofilm (Steinberg et De Nys, 2002 ; Defoirdt *et al.*, 2004).

III.1.1.2.2. Inhibiteurs synthétiques du récepteur

Plusieurs antagonistes ont été identifiés et leurs actions évaluées sur la virulence de *P. aeruginosa*. Des analogues de l'AHL synthétique, où l'anneau de l'homosérine lactone est remplacé par un cycle de cyclohexanone, l'expression dérégulée de la *LasI* (AHL synthase), entraînant une réduction de l'expression des facteurs de virulence comme la pyocyanine et l'élastase et dans une altération de la morphologie/phénotype du biofilm (Smith *et al.*, 2003).

III.1.1.3. Inhibition de la transcription de *lasR/lasI* et *rhlR/rhlI*

La délétion des gènes qui contrôlent la transcription de *lasR* et de *rhlR* comme *gacA* et *vfr* *in vitro* réduirait la production des protéines LasR et RhlR et donc la production de facteurs de virulence (Reimmann *et al.*, 1997). Cette approche a été bien démontrée pour *gacA* sur un modèle de brûlures des souris infectées par *P. aeruginosa*. Des études fondées sur l'analyse transcriptionnelle du génome de *P. aeruginosa* ont montré que lorsque la densité bactérienne est faible, l'apport d'AHL exogène ne permet pas d'activer le QS (Hentzer, 2003 ; Schuster *et*

al., 2003). Ces études suggèrent donc que d'autres facteurs doivent être impliqués pour activer le QS. L'inhibition de ces facteurs en amont du QS ouvre une voie potentielle pour inhiber ce dernier.

Les dérivés d'acide ellagique, issus de la plante *Terminalia chebula* Retz., ont montré une régulation négative de l'expression des gènes *LasIR* et *rhlIR* avec une diminution concomitante des AHL, entraînant une atténuation de la production des facteurs de virulence et une sensibilité accrue du biofilm à la tobramycine (Sarabhai *et al.*, 2013).

Enfin, l'utilisation d'oligonucléotides antisens pouvant s'hybrider aux ARNm des gènes *lasR*, *lasI*, *rhlR*, *rhlI* pourrait également inhiber l'expression du QS (Smith et Iglewski, 2003).

III.1.1.4. Inhibition du quorum sensing par macrolides

Les macrolides n'ont pas d'action bactéricide ou bactériostatique sur *P. aeruginosa*. Cependant, plusieurs études montrent des effets bénéfiques du traitement au long cours par macrolides chez des patients mucoviscidosiques ou atteints de panbronchiolite diffuse. L'action des macrolides pourrait être anti-inflammatoire et/ou modulerait la production des protéases de *P. aeruginosa*.

Parmi les macrolides, l'azithromycine, dérivée de l'actinomycète *Saccharopolyspora erythraea*, l'antibiotique anti-QS le plus étudié qui présente un effet inhibiteur sur le QS et le biofilm chez *P. aeruginosa* (Tateda *et al.*, 2001 ; Skindersoe *et al.*, 2008). En effet, une concentration de 2 µg/mL de l'azithromycine provoque une diminution dans la production des molécules de signal AHL et des facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* (Sofer *et al.*, 1999 ; Pechère, 2001), ce qui suggère que l'inhibition du biofilm observé est au moins en partie due à la réduction de la production de C4-HSL et de 3-oxo-C12-HSL (Favre-Bonté *et al.*, 2003). Fait intéressant, on a signalé que l'azithromycine diminue l'expression de *gacA*, mais aussi *RsmA* au niveau transcriptionnel (Pérez-Martínez et Haas, 2011), afin d'inhiber la synthèse de l'alginate (Skindersoe *et al.*, 2008) et de réduire les trois types de motilité (swimming, swarming et twitching) (Bala *et al.*, 2011).

III.1.2. Composés anti-biofilm sans activité anti-Quorum sensing

Divers organismes, y compris les procaryotes et les eucaryotes (organismes marins, animaux et plantes) produisent des métabolites secondaires qui exercent une activité d'antibiofilms. Certains de ces composés naturels ont été utilisés comme modèles pour fabriquer des composés synthétiques d'antibiofilms contre *P. aeruginosa*.

Les extraits de gingembre (*Zingiber officinale* Rosc.) utilisés depuis longtemps par les Indiens, les Asiatiques et les Arabes pour traiter de nombreuses affections (Tetz *et al.*, 2009), inhibent la formation de biofilm de *P. aeruginosa* PA14 grâce à la réduction de la production de c-di-GMP et à la réduction de production des polysaccharides totaux (Kim et Park, 2013). L'extrait de gingembre n'a révélé aucune inhibition de QS basée sur l'AHL dans les systèmes de biocapteurs rapporteurs de *Chloobacterium violaceum* CV026 et *Agrobacterium tumefaciens* NT1. La composante principale de la racine de gingembre sec, la zingerone (vanillyl acetone), a inhibé la formation du biofilm, afin d'augmenter la sensibilité de *P. aeruginosa* PAO1 à la ciprofloxacine (Kumar *et al.*, 2013) et d'inhiber les motilités de natation, l'essaimage et la contraction.

Le diterpène de Casbane, isolé de l'extrait éthanolique de *Croton nepetaefolius*, une plante d'origine du nord-est du Brésil, inhibe la formation de biofilm dans plusieurs espèces cliniques pertinentes, y compris *P. aeruginosa* (à 250 µg/mL) sans affecter la croissance planctonique. Les auteurs suggèrent que cette inhibition de la formation de biofilm peut être liée à une interaction entre le diterpène de casbane et les lipopolysaccharides présents sur la surface de la cellule, ce qui pourrait affecter leurs propriétés d'adhérence (Carneiro *et al.*, 2011).

L'acide ursolique de la plante *Diospyros dendo* a été identifié pour inhiber la formation de biofilm sans interférer avec les systèmes QS chez *E. coli*, *P. aeruginosa* et *V. harveyi*. L'acide ursolique à 10 µg/mL a permis de réduire 72% du biofilm d'*E. coli* JM109. Les analyses transcriptomiques ont conduit à la conclusion que l'acide ursolique inhibe la formation de biofilm en induisant la motilité (Ren *et al.*, 2005).

III.2. Description et caractéristiques des plantes testées contre la formation du Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*

III. 2.1. L'ail (*Allium sativum*)

III.2.1.1. Taxonomie

Le nom commun "Ail" et le nom botanique "*Allium*", viennent du mot celtique "All" qui signifie "qui brûle" (Block, 1992). Il appartient à la famille des *Alliaceae* (anciennement classée sous les *Liliaceae*) :

Classe:	Liliopsida
Sous-classe:	Liliidae
Superorder :	Liliianae
Ordre :	Amaryllidales
Famille :	<i>Alliaceae</i>
Sous-famille :	<i>Allioideae</i>
Tribu :	Allieae
Genre :	<i>Allium</i>
Espèce :	<i>Allium sativum</i> (Takhtajan, 1997).

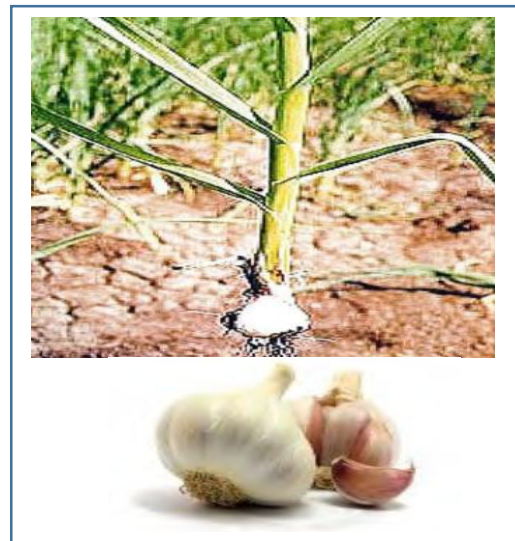


Figure 5 : Photo d'*Allium sativum* (Jung, 2005)

III.2.1.2. Aspect botanique

L'ail est une plante monocotylédone, herbacée bulbeuse. On distingue généralement deux sous-espèces connues sous le nom d'ail à tige dure (*Ophioscorodon*) et ail à tige molle (*sativum*). La première est résistante au froid et s'acclimata bien à une culture dans les régions plus nordiques. La seconde est mieux adaptée aux régions chaudes et ne produit pas de fleurs, sauf en conditions de stress (Bachmann et Hinman 2008).

L'ail est largement cultivé pour sa valeur alimentaire et médicinale. Les parties les plus largement répandues de la plante sont les bulbes et les feuilles (Van Wyk et Wink , 2004 ; Corzo-Martínez *et al.*, 2007).

III.2.1.3. Principaux constituants phytochimiques et propriétés pharmacologiques

L'ail est cultivé depuis des milliers d'années autant pour une utilisation culinaire que médicinale. Il compte parmi les plantes médicinales les plus anciennes.

Le composant principal de l'ail frais non contusé est l'alliine ou S-allyl-L-cystéine sulfoxyde. C'est un composé sulfuré stable sans odeur qui a été isolé en 1948 par Arthur Stoll et Erwald Seebeck (Grun-Thomas, 1998). Le bulbe d'ail en contient en moyenne de 0,35 % à 1,15 % (Wichth et Anton, 2003) et jusqu'à 1,8%. Lorsque les tissus sont blessés, l'alliine est transformée par une enzyme, l'allinase (S-alkyl-L-cystéine sulfoxyde lyase), en acide pyruvique et acide 2-propènesulfènique, qui sera immédiatement transformé en alicine (0,3 % de la masse fraîche) (Grun-Thomas, 1998 ; Girre, 2001). L'allicine (ou allyl-2 propènethiosulfate) a été isolée pour la première fois en 1944 par Chester Cavallito à partir d'un extrait aqueux d'ail frais. Il a suggéré la structure: $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$. C'est un composé organo-sulfuré, instable et odorant (odeur de l'ail fraîchement coupé) aux propriétés antibactériennes et antifongiques (Grun-Thomas, 1998). Il se décompose, selon la température et les conditions du milieu en composés soufrés volatiles et fortement aromatiques (Wichth et Anton, 2003), en: vinylthiines, composés majeurs des préparations à l'huile de l'ail (Ohta *et al.*, 1999), ajoène (formé par condensation de 3 molécules d'allicine) (Ohta *et al.*, 1999 ; Amagase *et al.*, 2001), diallyl disulfure (Dwivedi *et al.*, 1998) et différents autres composés, qui sont liposolubles (Amagase *et al.*, 2001).

L'ajoène est une molécule riche en soufre, elle a été identifiée comme principale composé de QSI dans l'extrait d'ail et a démontré que ce composé inhibait les gènes contrôlés par QS dans *P. aeruginosa*, y compris la production de Rhamnolipides. De plus, l'ajoène synergise avec l'antibiotique tobramycine dans l'inhibition de la formation de biofilm à *P. aeruginosa*. L'ajoène à 80 µg/ml a inhibé la production de N-butyryl-L-homoserine lactone chez *P. aeruginosa*. La tobramycine (jusqu'à 340 µg/ml) était inefficace pour tuer les bactéries dans un biofilm de *P. aeruginosa* mais en présence d'ajoène, jusqu'à 90% de *P. aeruginosa* formant un biofilm ont été tués à 10 µg/ml de tobramycine (Jakobsen *et al.*, 2012).

Le composé organosulfure naturellement inspiré (S-phényl-L-cysteine sulfoxide) et son dérivé (disulfure de diphényle) ont été rapportés pour réduire significativement la quantité de biofilm formaté par *P. aeruginosa* (Cady *et al.*, 2012). Le S-phényl-L-cysteine sulfoxyde antagonise à la fois les systèmes las et rhl de QS alors que le disulfure de diphényle n'interfère qu'avec le système las.

III.2.2. Le henné (*Lawsonia inermis*)

III.2.2.1. Taxonomie

Originaire de Perse et d'Arabie Saoudite, le henné étant le nom vernaculaire le plus répandu, sa position systématique a été configurée dans la hiérarchie suivante :

Embranchement :	Spermatophytes
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotyledones
Sous Classe :	Archichlamydeae
Ordre :	Myrtiflorae
Famille :	<i>Lythraceae</i>
Genre :	<i>Lawsonia</i>
Espèce :	<i>Lawsonia inermis</i> (Wong et Theng, 1995).



Figure 6 : Photo de *Lawsonia inermis* (Amit *et al.*, 2011)

III.2.2.2. Aspect botanique

Le Henné (*Lawsonia inermis*) est un arbuste odoriférant de 2 à 6 mètres. C'est l'espèce unique dans la famille des *Lythraceae* (Singh *et al.*, 2005), présentant des feuilles persistantes, étroites et effilées et de petites fleurs blanches ou roses.

Les feuilles sont de 1,3-3,2 par 0,6-1,6 centimètres, elliptiques ou largement lancéolées, aiguës ou obtus. Les fleurs sont nombreuses de couleurs variables, souvent blanches, petites (moins de 1,3 centimètre), parfumées à odeur de rose. Les capsules sont sphériques 4-8 millimètres de diamètre, avec 32-49 graines par fruit, de 6mm de diamètre avec un vestige de style présentant au sommet quatre loges renfermant de nombreuses graines (Kumar *et al.*, 2005).

III.2.2.3. Principaux constituants phytochimiques et propriétés pharmacologiques

Le henné (*Lawsonia inermis*) a été employé de manière esthétique et médicinal pendant plus de 9.000 années. *L. inermis* est un agent populaire de coloration de peau et de

cheveux dans beaucoup de régions du monde. Sa racine est considérée comme un médicament efficace contre l'infection de gonorrhée et d'herpès. C'est une plante médicinale traditionnellement employée par divers groupes de personnes (Leva et Amarb, 2008 ; Marc *et al.*, 2008 ; Gbolade, 2009). *L. inermis* est employé en tant qu'antirheumatique et agent antineuralgic (Marc *et al.*, 2008) et également comme un potentiel antidiabétique (Gbolade, 2009). En outre, le traitement avec l'extrait hydroalcoolique de *L. inermis* a été prouvé *in vivo* et les niveaux d'enzymes antioxydantes cellulaires ont augmenté telles que la glutathion réductase, la superoxyde dismutase et la catalase (Dasgupta *et al.*, 2003).

Les études phytochimiques ont montré la présence des constituants suivants : les glucides, les protéines, les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les xanthones, les acides gras, les coumarines, les naphthoquinones, les saponines, les triterpénoïdes, les stérols et les dérivés de dioxine (Gupta *et al.*, 1993 ; Siddiqui et Kardar, 2001; Siddiqui *et al.*, 2003; Jain *et al.*, 2010).

Le henné (*L. inermis*) contient de nombreux composés bioactifs tels que : iso-plumbagin lawsoniaside, lalioside, lawsoniaside B, syringinoside, daphneside, daphnorin, agrimonolide 6-O- β -D-glucopyranoside, (+)-syringaresinol O- β -D-glucopyranoside, (+)-pinoresinol di-O- β -D-glucopyranoside, syringaresinol di-O- β -D-glucopyranoside, isoscutellarin 3β , hennadiol, (20S)- 3β , 30-dihydroxylupane, lawnermis acid, 3-methyl-nonacosan-1-ol, trois laxanthes, à savoir les xanthes I, II et III qui ont été caractérisés en tant que 1, 3-dihydroxy-6, 7-dimethoxy xanthone, 1-hydroxy-3, 6-diacetoxy-7-methoxyxanthone et 1-hydroxy-6- acetoxy xanthone et la coumarine (Afzal *et al.*, 1984 ; Gupta *et al.*, 1993 ; Rahmat *et al.*, 2006 ; Shivananda *et al.*, 2007). En plus le lawsone (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone), comme le principal ingrédient bioactif, qui est présent dans les feuilles sèches à des concentrations de 1.0-1.4% (Kelmanson *et al.*, 2002).

Le fractionnement de l'extrait méthanolique des feuilles de henné a entraîné l'isolement de l'acide *p*-coumarique, 2-methoxy-3-methyl-1,4-naphthoquinone et apiine, l'apigénine, la lutézine et la cosmosiine (Mikhaeil *et al.*, 2004). L'apigénine par exemple a été rapporté pour son activité anti-QS (Vikram *et al.*, 2010).

III.2.3. Le pêcher (*Prunus persica*)

III.2.3.1. Taxonomie

Le pêcher ou *Prunus persica* est un arbre fruitier de la famille des *Rosaceae* et du genre *Prunus*. Il fait partie du même genre botanique que l'abricotier, l'amandier, le cerisier et le prunier.

Règne :	Plantae
Sous-règne:	Tracheobionta
Division:	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe :	Rosidae
Ordre :	Rosales
Famille :	<i>Rosaceae</i>
Genre :	<i>Prunus</i>
Espèce :	<i>Prunus persica</i> (Cronquist, 1981).

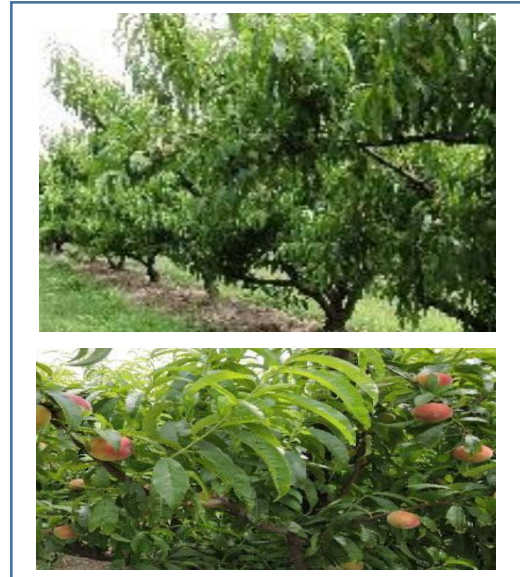


Figure 7 : Photo de *Prunus persica* (Aurélie, 2016)

III.2.3.2. Aspect botanique

Le *Prunus persica* L., ou pêcher commun, est originaire de Chine où il est cultivé depuis 4500 ans (Aranzana *et al.*, 2010). On trouve aujourd'hui le pêcher en Asie, en Europe, en Afrique du nord et en Amérique. Le nom «Persica» a été attribué à l'espèce par les romains qui croyaient que son origine était la Perse.

Le pêcher est un arbre fruitier de hauteur comprise entre 3 et 7 mètres, large au sommet, souvent sans tronc central. C'est un arbre à écorce sombre et lisse, brun rougeâtre pour les vieux arbres. Les branches sont étalées et minces avec des brindilles rondes et glabres. Le pêcher présente des feuilles caduques alternées, de couleur verte, qui dégagent une odeur d'amande. Les fleurs sont sous forme de boutons de formes coniques ou obtuses et apparaissent avant les feuilles. Elles sont hermaphrodites à cinq pétales contenant entre 20 et 25 étamines. La couleur vire du blanc, au rose et au rougeâtre. Le fruit est une drupe charnue de forme globulaire. La forme et la taille sont caractéristiques de la variété.

Le pêcher s'adapte aux diverses conditions climatiques, ce qui justifie sa répartition géographique remarquable à travers le monde (Kazan *et al.*, 2014).

III.2.3.3. Principaux constituants phytochimiques et propriétés pharmacologiques

Prunus persica qui appartient à la famille des *Rosaceae* est connue pour ses valeurs nutritionnelles et ses propriétés thérapeutiques par la présence d'une source potentielle de composés bioactifs. La consommation de ce fruit peut réduire la génération d'espèces réactives d'oxygène (ROS) dans le plasma humain et fournit une protection contre un certain nombre de maladies chroniques (Tsantili *et al.*, 2010). Les acides phénoliques, les flavonoïdes et les anthocyanines sont les principales sources d'antioxydants potentiels dans les fruits de *P. persica* qui sont considérés comme responsables de ses effets thérapeutiques (Gil *et al.*, 2002 ; Bolivar *et al.*, 2006 ; Rupasinghe et Clegg, 2007).

Outre la valeur nutritionnelle et pharmacologique des fruits, les feuilles de pêche sont traditionnellement utilisées comme laxatives et sédatives. Les feuilles de *P. persica* se sont révélées contenir plusieurs composés phénoliques tels que l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'acide p-coumarique, le kaempferol, la quercétine, l'isoquercétine, la quercitrine, l'acide quinique, le tanin, l'acide ursolique et l'acide prusique (Gilani *et al.*, 2000 ; Liakopoulos *et al.*, 2001; Upyr et Komissarenko, 2002).

Des études sur les feuilles de pêche montrées leur propriétés antioxydantes par la présence de composés actifs tels que la prunetine, la quercétine et le kaempferol (Jung *et al.*, 2002 ; Lokesh *et al.*, 2010), ces deux derniers composants ont été évalués pour leurs activités QSI. Ces deux flavonoïdes ont inhibé la bioluminescence médiée par HAI-1 ou AI-2 dans *V. harveyi* BB886 et MM32. Il a été constaté que la quercétine inhibait la formation de biofilm par *V. harveyi* BB120 et *E. coli* O157 : H7 (Vikram *et al.*, 2010). Les feuilles de pêche montraient aussi des propriétés Anti-inflammatoires (Shin *et al.*, 2010), antibactériennes (Ozpinar *et al.*, 2013 ; Salem *et al.*, 2013), antipaludiques, hépatoprotectives, antiasthmatiques et anticoagulantes (Gilani *et al.*, 2000). Une activité antihelminthique (Usharani *et al.*, 2014). Une autre étude a exploré l'effet antihyperglycémiant des feuilles de pêches *in vivo* et a révélé que l'extrait aqueux de feuilles de pêches empêchait l'élévation du glucose sanguin postprandial en inhibant l'absorption de glucose dans l'intestin grêle de la souris (Shirosaki *et al.*, 2012).

III.3. Acide salicylique

III.3.1. Origine et rôle de l'Acide salicylique chez les plantes

L'acide salicylique (AS) ou acide 2-hydroxybenzoïque est le principal acide phénolique synthétisé comme métabolite secondaire par certains végétaux, dont le saule (d'où il tire son nom), l'un des trois isomères de l'acide hydroxybenzoïque, constitué d'un noyau benzénique substitué par un groupe carboxyle (acide benzoïque) et un groupe hydroxyle (phénol) en position ortho.

L'AS produit par la plante en réponse à l'attaque de divers pathogènes constitue un élément clef pour l'établissement de la résistance locale et la SAR (Loake et Grant, 2007). Il est impliqué dans plusieurs réponses aux stress abiotiques et biotiques, en induisant des gènes PR en permettant une meilleure résistance contre les pathogènes (virus, bactéries et champignons) (Shah et Klessig, 1999). L'AS module aussi la mort cellulaire associée à la réponse hypersensible, l'activation de la peroxydation des lipides et la génération de radicaux libres (Dempsey *et al.*, 1999 ; Shah et Klessig, 1999).

III.3.2. Propriétés pharmacologiques

Outre sa fonction bien connue dans la régulation de la défense des plantes, des études ont démontré que ce médicament anti-inflammatoire non stéroïdien (AS) a réduit la formation du biofilm de *Staphylococcus epidermidis* (Polonio *et al.*, 2001), *Bacillus subtilis* (Rudrappa *et al.*, 2007) et *P. aeruginosa*. Cela affecte la motilité (twitching et swimming) et réduit d'autres facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* par une diminution du niveau de production des AHLs (Bandara *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2009, Da *et al.*, 2010). Yang *et al.* (2009) ont rapporté que l'AS est un inhibiteur puissant de la signalisation dépendante du pqs qui peut expliquer son effet comme un QSI. L'AS régule rhlR et lasA chez *P. aeruginosa* PA14 (Prithiviraj *et al.*, 2005) avec une inhibition subséquente des activités des pyocyanines, protéases et d'élastase (Schuster et Greenberg, 2006 ; Yang *et al.*, 2009 ; Guo *et al.*, 2013). L'AS module l'expression des gènes dont certains sont impliqués dans la virulence de *Agrobacterium tumefaciens* par la diminution dans la production des AHLs où l'AS stimule l'expression de l'enzyme AHL-lactonase (Yuan *et al.*, 2007). Chez *Staphylococcus aureus* en plus de son effet sur la formation de biofilm, l'AS réprime l'expression de facteurs de virulence au niveau de la transcription (Palma *et al.*, 2006 ; Riordan *et al.*, 2007).

Partie expérimentale

CHAPITRE I

Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Isolats bactériens

Les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* incluent dans cette étude ont été isolés à partir des prélèvements cliniques prélevés des patients diabétiques présentant des infections cutanées au niveau du centre de santé de Sidi Lakhdar et du service de Bactériologie à l'Hôpital de Ain Tedeles «Mostaganem». En plus une souche de référence de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 fournie par l'Institut Pasteur d'Algérie a été aussi utilisée dans cette étude. .

I.1.1. Identification des isolats

Les isolats de cette étude ont été purifiés et identifiés par une recherche des caractères phénotypiques et génotypiques.

L'étude phénotypique a été basée sur la caractérisation des colonies, la production des pigments sur les milieux king A et king B, la coloration de Gram, la mobilité, la recherche de la catalase, de l'oxydase et la croissance à 42°C et à 4°C.

I.1.1.1. Identification par la Galerie API 20NE

La galerie API 20 NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) (Figure 8) est un système miniaturisé, prêt à l'emploi et standardisé. Elle est constituée de 20 micro-tubes contenant des milieux et des substrats sous forme déshydratés. Les tubes des tests du NO₃ à PNPG ont été inoculés par une suspension bactérienne préparée à partir d'une culture jeune de 20h en Bouillon nutritif (BN) et ajusté à 10⁶ UFC/ml. Puis, un volume de 200 µl de suspension pré-suspendue a été rajouté à une ampoule de médium (API Aux Medium) pour une nouvelle suspension qui servira à remplir les tubes et les cupules des tests du GLU à PAC. Les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) ont été remplies par l'huile de paraffine pour créer des conditions d'anaérobiose.

Après 24h et 48h d'incubation à 30°C, la lecture de la galerie est réalisée en se référant au tableau de la lecture (annexe) où les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (TDA, IND et VP). Sur la fiche des résultats on fait la détermination du profil numérique, où les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur de 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant

les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres, la réaction d'oxydase qui constitue le 21^o test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

L'identification est obtenue à partir du profil numérique à l'aide du logiciel d'identification **apiweb™**.



Figure 8 : La galerie biochimique API 20 NE

I.1.1.2. Identification géotypique

Les essais d'amplification de PCR ont été effectués au laboratoire de DIAG-GENE (Angers, France). Elle est réalisée dans un thermocycleur de iCycler de Biorad (Biorad, USA) avec les amorces universelles 27F: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' et 1492R: 5'GGTTACCTTGTTACGACTT 3'. Un volume de 4 µl d'ADN génomique obtenu par extraction au choc thermique est amplifié dans un volume de 25µl de mixture réactionnelle contenant 1,25 µl de chacun des amorces à 10 µM, 1 U de *Taq* ADN polymérase, 200 µM de chaque dNTP, 1X de tampon d'amplification et la réaction a été soumise à 35 cycles d'amplification de 30 secondes à 95°C, 30 secondes à 55°C, 45 secondes à 72°C et une extension finale de 7 minutes à 72°C.

Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse en gels d'agarose à 1,5%. 10 µl des produits de PCR ont été souillés avec du bromure d'éthidium suivi d'une migration à une tension constante de 100 V. L'ADN a été visualisé et des photos ont été prises sous UV.

Les produits amplifiés de trois isolats (P2, P3 et P6) obtenus ont été séquencés pour valider leurs identités. L'amorce 1492R (5 'GGTTACCTTGTTACGACTT 3') qui a été utilisée pour l'amplification et une amorce additionnelle 27F (5'ACTCCTACGGGAGGCAGCA 3 ') ont été utilisées pour le séquençage. Les séquences obtenues ont été analysées avec les données de GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast) (centre national pour l'information de biotechnologie) pour déterminer l'espèce bactérienne.

I.1.2. Conservation des souches

La conservation des souches a été réalisée par congélation à -20°C en bouillon nutritif additionné de glycérol (30%). Avant toute manipulation, chaque isolat est décongelé à température ambiante et enrichi en bouillon nutritif puis repiqué sur gélose nutritive (GN). Les milieux ensemencés sont incubés à 37°C en aérobiose.

I.1.3. Etude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques

La sensibilité des isolats aux 15 antibiotiques (Tableau 1) a été réalisée par la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé Mueller-Hinton (MH). A partir d'une culture pure de 20 heures sur milieu gélosé non sélectif, une suspension bactérienne est préparée et ajustée à 10^6 UFC/ml en eau physiologique (0,9% NaCl). Un ml de cette suspension a été déposé dans chaque boîte de Pétri contenant 20ml de gélose Mueller-Hinton. Après une imprégnation de 2 min, l'excédent d'inoculum est éliminé par aspiration. Cinq min plus tard, les disques d'antibiotiques ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose des boîtes inoculées. Les boîtes sont incubées dans les 15 min qui suivent le dépôt des disques. La lecture des résultats est faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition après une durée d'incubation de 24h à 37°C. La comparaison des résultats et l'interprétation ont été réalisées suivant les recommandations de 2015 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

Tableau 1 : Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme

Classe	Antibiotique	Abréviation	Charge de disque
β-lactamines	Pénicilline G	P	10 UI
	Pipéracilline	PRL	100 µg
	Ticarcilline,	TI	75 µg
	Ticarcilline-clavulanate	TIM	75/10
Carbapénèmes	Imipénème	IMP	10 mg
Céphalosporines			
de troisième génération (C3G)	Ceftazidime	CAZ	10 µg
de quatrième génération (C4G)	Céfépime	FEP	30 µg
Aminosides	Gentamycine	CN	15 µg
	Amikacine	AK	30 µg
	Nétilmicine	NET	10 µg
	Tobramycine	TOB	10 µg
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5 µg
	Lévofloxacine	LE	5 µg
Divers	Colistine	COL	10 µg
	Fosfomycine	FF	50 µg

I 2. Formation du biofilm

I.2.1. Evaluation de la biomasse adhérente en fonction de la charge d'inoculum du temps d'incubation

Afin d'étudier la cinétique de la formation de biofilm et l'influence de la charge d'inoculum sur cette cinétique, deux séries de tubes à hémolyse en verre stérile sont utilisés. L'une des séries a été inoculée par 2ml de la suspension bactérienne préparée dans un milieu TSB et ajustée à 10^8 UFC/ml (La densité optique variée entre 0,08 et 0,1 à une longueur d'onde de 600 nm) et l'autre série a été inoculée par 2ml de la suspension bactérienne à 10^4 UFC/ml. Les tubes sont incubés à 37°C à différents temps d'incubation (2h, 4h, 6h, 8h, 10h et 24h). La biomasse des biofilms attachés aux tubes est évaluée semi-quantitativement par la mesure colorimétrique de l'incorporation du cristal violet par les cellules sessiles (Djordjevic *et al.*, 2002). Après chaque durée d'incubation, le milieu de culture est aspiré et les tubes sont lavés 3 fois à l'aide de 3 ml d'eau physiologique afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Après séchage à l'air pendant 45 min, les biofilms sont incubés pendant 20 min à température ambiante en présence de 2 ml d'une solution de cristal violet 0,1%, les tubes sont ensuite rincés abondamment à l'eau et séchés de nouveau à l'air. Après que les tubes aient été séchés, le colorant lié aux cellules adhérentes est solubilisé avec 2 ml d'éthanol (95%) pour chaque tube, le liquide solubilisé a été versé dans une cuvette et l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 580 nm par un spectrophotomètre (JENWY-7305 Royaume-Uni).

I.2.2. Evaluation de la biomasse adhérente en fonction du milieu de culture

Dans le but de comparer et quantifier la formation des biofilms en fonction de la richesse et la source de carbone du milieu de culture, nous avons utilisé deux milieux de cultures à savoir Bouillon Biofilm Modifié (BBM) et Bouillon de Trypticase de Soja (TSB) (Annexe) (Campanac *et al.*, 2002 ; Khalilzadeh *et al.*, 2010). Le BBM contient du glucose, alors que le TSB contient du dextrose et des acides aminés. Chacun des six isolats et la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 ont été inoculés dans deux séries de tubes l'une des séries contenant le milieu TSB et l'autre série contenant le milieu BBM à raison de 10^6 UFC/ml soit 200 μ l de suspension bactérienne/tube contenant 1,8 ml de milieu de culture. Ces tubes sont incubés à 37°C pendant 24h.

I.2.3. Evaluation de la biomasse adhérente en fonction de la matière du support utilisé

Dans le but de tester l'influence de la nature de la matière du support sur la quantité des biofilms formés par les bactéries, les isolats cliniques et la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 ont été inoculés selon le protocole d'ensemencement précédent dans deux séries de tubes à hémolyse, l'une des séries est en polystyrène et l'autre en verre.

La stérilisation des tubes en verre a été faite par autoclavage alors que les tubes propres du polystyrène (PS) ont été mis dans l'éthanol 95% pendant 30 minutes et laissé à l'air sec dans des conditions stériles pendant 30 minutes avant l'emploi (Todhanakasem *et al.*, 2010).

I.2.4. Evaluation de la biomasse adhérente en fonction de l'isolat testé

Afin d'étudier la variation de la quantité du biofilm formé en fonction de l'isolat inoculé, les isolats cliniques et la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 ont été inoculés selon le protocole d'ensemencement précédent dans des tubes en verre sous les mêmes conditions.

I. 3. Activité antibactérienne et effet sur la formation de biofilm des extraits de plantes contre *Pseudomonas aeruginosa*

I.3.1 Matériel végétal

Le choix des plantes ayant fait l'objet de l'expérimentation est basé sur une recherche bibliographique puis une enquête ethnopharmacologique auprès de la population ayant connaissance de leur usage en médecine traditionnelle. Trois plantes ont été sélectionnées pour évaluer leur effet contre la croissance sous forme planctonique et la formation des biofilms chez *P. aeruginosa*.

Les plantes choisies sont les suivantes :

A. L'Ail (*Allium sativum*)

L'Ail (*Allium sativum*) utilisé à l'état frais a été récolté en mois d'Avril de la région de Sidi Lakhdar-Mostaganem (Figure 9).



Figure 9 : Echantillon d'*Allium sativum* utilisé.

B. Le henné (*Lawsonia inermis*)

Le henné (*L. inermis*) utilisé est connu pour son usage domestique. Deux échantillons (Figure 10) ont été obtenus à partir de deux régions différentes d'Algérie : Adrar et Biskra.



Figure 10 : Les échantillons de *Lawsonia inermis* utilisés dans cette étude, feuilles de la région d'Adrar (V1) et feuilles de la région de Biskra (V2).

C. Le pêcher (*Prunus persica*)

Prunus persica est une plante de verger de la famille des *Rosaceae* qui a été cultivée pour son fruit comestible. Les feuilles fraîches de *P. persica* (Figure 11) ont été récoltées de la région de Sidi Lakhdar-Mostaganem en mois d'Août.



Figure 11 : Feuilles de *Prunus persica* utilisées

I.3.1.1. Préparations des extraits

La matière végétale (feuilles pour le cas de *Lawsonia inermis* et *Prunus persica*) préalablement séchée à l'abri du soleil. Après leur séchage, les feuilles ont été réduites en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique et la poudre obtenue a été conservée dans des sachets en papier dans un endroit sec jusqu'à utilisation.

I.3.1.1.1. Extrait brut d'*Allium sativum* (jus frais de l'ail)

Les ampoules de 250 g d'ail frais ont été épluchées, nettoyés et écrasés. Ensuite l'extrait a été filtré à l'aide d'un tissu de mousseline, puis la partie liquide extraite a été stérilisée par des filtres millipore 0,22 μm (Greg *et al.*, 2002). Pour éviter toutes transformations des composés, l'extrait de l'ail est préparé le jour même des expériences.

I.3.1.1.2. Extraction hydro-méthanolique

L'extraction a été effectuée par macération de 25 g de la poudre végétale (*L. inermis* et *P. persica*) dans 500 ml d'un mélange Méthanol-Eau (70/30, V/V) (Fathiazad *et al.*, 2011). Le mélange a été agité vigoureusement pendant 48 heures à l'aide d'un agitateur magnétique. Après filtration par le papier filtre whatman, la phase hydro-alcoolique résultant a été évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif (Modele : Buchi Switzer land, Type : 201) à 50°C pour éliminer le méthanol.

I.3.1.1.3. Extraction par l'acétate d'éthyle et le butanol

Plus tard, la phase aqueuse obtenue par l'extraction hydro-méthanolique a été fractionnée par extraction liquide-liquide par les solvants, d'abord avec l'acétate d'éthyle et puis avec le n-butanol, en utilisant une ampoule à décanter. Deux fractions de flavonoïdes ont été obtenues pour chaque plante, à savoir la fraction obtenue par l'acétate d'éthyle et la fraction obtenue par le n-butanol. Les fractions ont été ensuite concentrées à sec sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C pour l'évaporation de l'acétate d'éthyle et à 60°C pour l'évaporation de n-butanol (Bekkara *et al.*, 1998) (Figure 12).

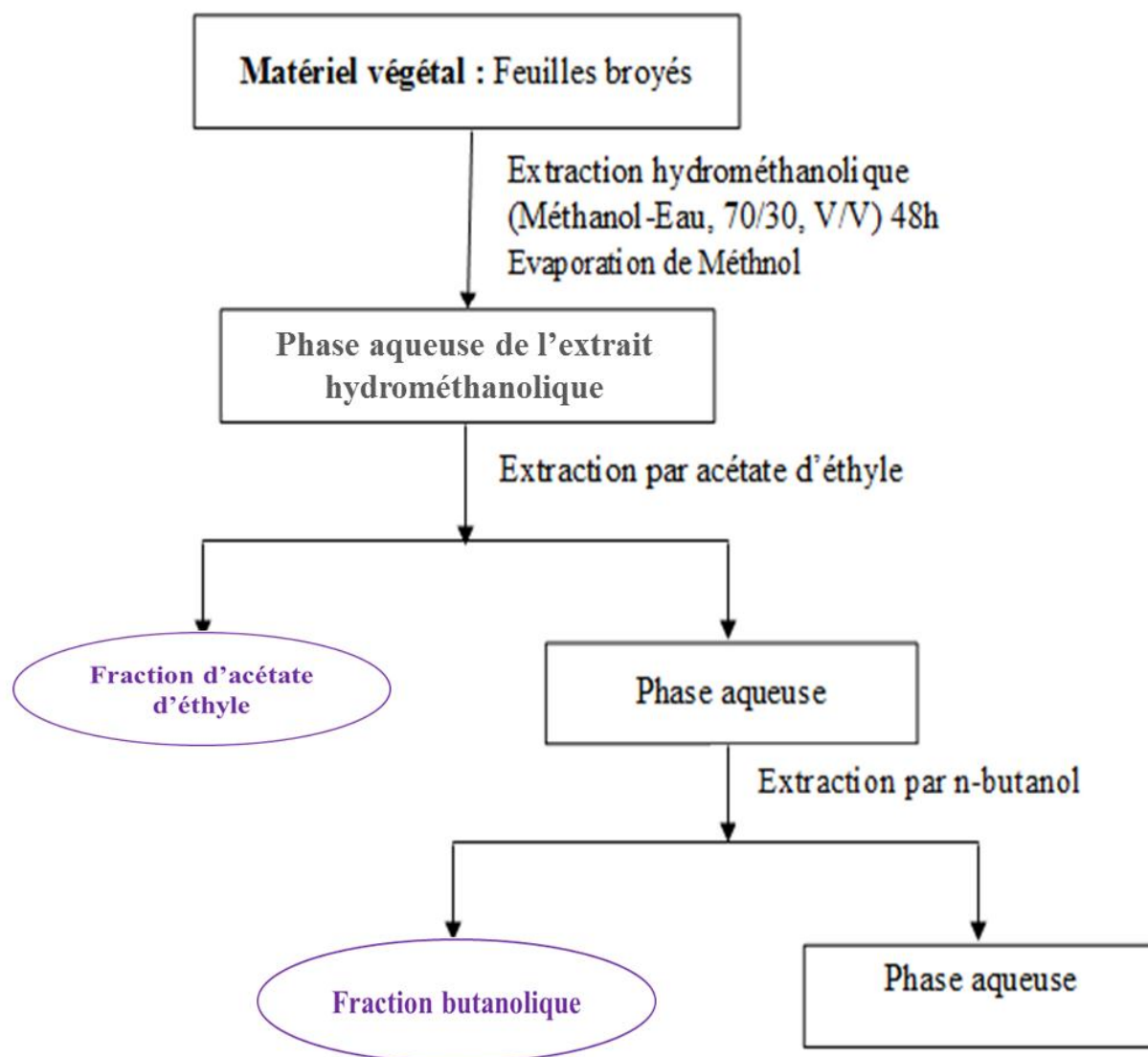


Figure 12 : Protocole d'extraction utilisé pour les feuilles de *Lawsonia inermis* et *Prunus persica* (Bekkara *et al.*, 1998)

I.3.1.2. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est le rapport entre le poids d'extrait et le poids de la plante sèche à traiter. Il est exprimé en pourcentage suivant la formule donnée par Falleh *et al.* (2008)

$$R (\%) = 100 \text{ Mext/Méch.}$$

Où :

R est le rendement en %.

Mext est la masse de l'extrait après évaporation du solvant en gramme.

Méch est la masse sèche de l'échantillon végétal en gramme.

I.3.1.3. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux ont été estimés par la méthode décrite par Othman *et al.* (2007). La réduction du réactif de folin-ciocalteu (RFC) entraîne une diminution de ses propriétés colorimétriques. Une aliquote de 0,2 ml de l'échantillon à doser (extrait ou solution étalon) a été mélangée avec 1.5 ml de réactif de phénol de folin-Ciocalteu's (dilué à 1/10). Après, 1,5 ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3 , 7.5%) a été additionné au mélange et suivi par une incubation à l'abri de la lumière pendant 90 min à température ambiante. L'absorbance a été ensuite mesurée à 750 nm (spectrophotomètre Jenway 6405 UV/Visible). La teneur en polyphénols totaux est déterminée par extrapolation sur une courbe d'étalonnage obtenue à partir d'une série de dilutions à l'eau distillée de l'acide gallique (1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $Y = 0,006X + 0,011$, $R^2 = 0,998$, où « Y » est l'absorbance et « X » est l'équivalent d'acide gallique (mg EAG/g extrait). Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) d'extrait.

I.3.1.4. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes totaux ont été évalués à l'aide d'un test colorimétrique selon la méthode décrite par Zhishen *et al.* (1999). Une aliquote de 0,5 ml de l'extrait dilué ou de solution étalon a été mélangée avec 1,5 ml d'eau distillée. Au temps zéro, 150 μl de nitrite de sodium (NaNO_2 , 5 %) est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 μl de trichlorure d'aluminium (AlCl_3 , 10%) est rajouté. Après l'incubation de 6 min à la température ambiante, 0,5 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH , 1M) est additionné. Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance contre un blanc du mélange obtenu a été directement mesurée au spectrophotomètre UV-visible à 510 nm. La quercétine a été employée pour la construction d'une courbe d'étalonnage (1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $Y = 0,004X + 0,037$, $R^2 = 0,989$, où « Y » est l'absorbance et « X » est la concentration standard). Les résultats ont été exprimés en mg équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g extrait).

I.3.2. Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits d'*A. sativum*, *L. inermis* et *P. persica*

I.3.2.1. L'effet antibactérien par la méthode de diffusion par disque

L'activité antimicrobienne des différents extraits préparés a été déterminée par la méthode de diffusion par disque en milieu gélosé Mueller-Hinton (MH) (Sacchetti *et al.*, 2005; Celiktas *et al.*, 2007).

A partir d'une culture pure de 20 heures sur gélose nutritif (GN), une suspension bactérienne a été préparée et ajusté à 10^6 UFC/ml avec de l'eau physiologique. 1 ml de cette suspension a été déposé sur chaque boîte de Pétri contenant 20 ml de gélose MH. Après une imprégnation de 2 min, l'excédent d'inoculum est éliminé par aspiration. 5 min plus tard, des disques en papier Whattman de 6 mm de diamètre stérile et imprégnés durant 15-20 min dans des solutés de 50% pour l'extrait d'*A. sativum* et de 100 mg/ml pour les extraits de *L. inermis* et de *P. persica* ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose des boîtes inoculées. Les boîtes sont laissées 15 min à température ambiante puis incubées à 37°C pendant 24 heures, l'activité antimicrobienne a été traduite par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques.

I.3.2.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 h. La technique de microdilution dans des microplaques à 96 puits est la méthode choisie pour déterminer la concentration minimale inhibitrice des différents extraits testés.

Avant la préparation de la gamme de concentration, les extraits sous forme de poudre ont été solubilisés dans 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour préparer une solution de 50mg/ml pour les extraits préparés à partir de *L. inermis* et *P. persica* puis stérilisés par une filtration par filtre millipore 0,22 μ m après une centrifugation à 10 000 tpm pendant 15 minutes. A partir de cette solution stérile pour chaque extrait préparé, une gamme de concentrations a été préparée dans des tubes à essai par la méthode d'une dilution selon une progression géométrique de raison 2, avec des concentrations allant de 50 mg/ml à 0,8 mg/ml. Pour l'extrait d'ail, une gamme de concentration allant de 25% à 0,4% a été préparée.

La répartition d'extrait végétal s'est faite de sorte que les puits de première ligne de microplaque remplie par 100 μ l de la plus grande concentration (50 mg/ml pour les extraits préparés à partir de *L. inermis* et *P. persica* et 25% pour l'extrait d'*A. sativum*). Les puits de la deuxième ligne par la deuxième concentration ainsi de suite jusqu'à la septième ligne qui recevra 100 μ l d'extrait végétal de 0,8 mg/ml pour les extraits préparés à partir de *L. inermis* et *P. persica* et 0,4% pour l'extrait d'*A. sativum*. La dernière ligne recevra 100 μ l d'eau distillée stérile à chaque puit qui a servi de témoin de croissance. Ensuite les puits de la microplaque sont inoculés par 100 μ l de TSB double concentré inoculé avec 10^6 UFC/ml. Les résultats sont lus après une incubation de la microplaque à 37 °C pendant 24 h. La CMI a été donc la concentration du premier puit à partir duquel aucun trouble à l'œil nu n'a été observé (Choukchou-Braham *et al.*, 2010) (Figure 13). Cette opération a été répétée 3 fois.

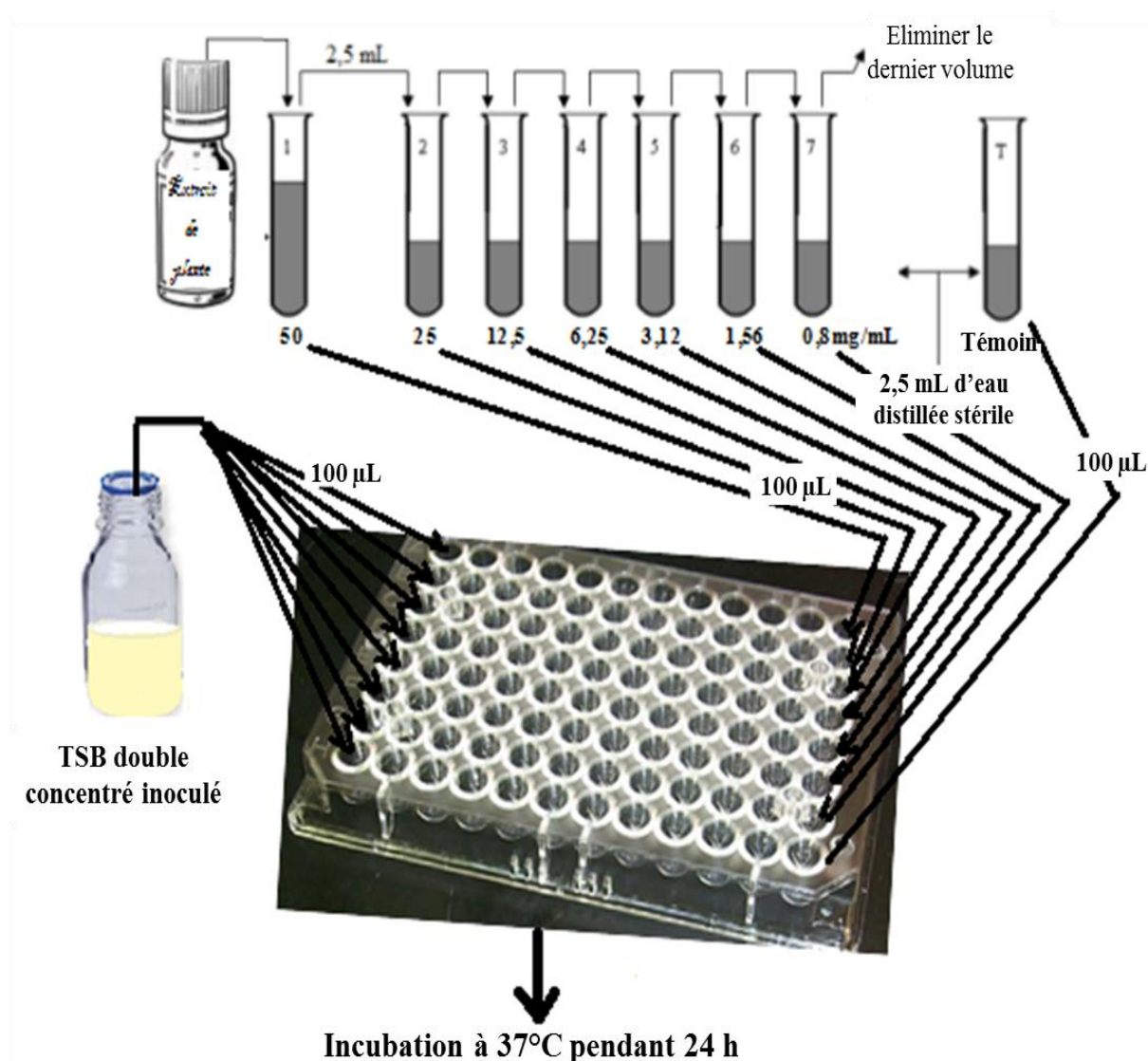


Figure 13 : Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.

I.3.2.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La Concentration Minimale Bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration en extrait capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants). Pour sa détermination, des prélèvements sont effectués dans chacun des puits dépourvus de trouble bactérien puis déposés « en stries » sur gélose Mueller Hinton puis incubés à 37°C. La CMB est déterminée après une incubation de 24 heures (Biyiti *et al.*, 2004).

I.3.3. Effet des extraits préparés sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa*

L'effet des différents extraits préparés sur la formation des biofilms par les isolats de *P. aeruginosa* a été examiné dans des tubes à hémolyse en verre (Todhanakasem *et al.*, 2010) et dans des microplaques à 96 puits (El abed *et al.*, 2011).

I.3.3.1. Effet des extraits sur la formation de biofilm en tubes

Dans une série de 8 tubes à hémolyse numérotés de C1 à C8, nous avons introduit 1ml d'extrait végétal de concentration bien connue selon la gamme de concentrations préparées. Cette répartition d'extrait végétal est faite de sorte que 1ml d'extrait végétal de 50 mg/ml soit transféré dans le tube C1, celui de 25 mg/ml dans le tube C2 ainsi de suite jusqu'au tube C7 qui recevra 1ml d'extrait végétal de 0,8 mg/ml. Le tube C8 recevra, à la place d'extrait végétal, 1 ml d'eau distillée stérile qui a servi de témoin. Ensuite nous avons ajouté dans ces mêmes tubes 1ml de TSB double concentré déjàensemencé par la souche de *P. aeruginosa* à tester (10^6 UFC/ml). Cette répartition d'extrait végétal de concentration bien connue dans chacun des tubes a ramené la concentration du milieu en extrait végétal à sa moitié, où la concentration du tube C1 est passée de 50 mg/ml à 25 mg/ml et celui du tube C2 de 25 mg/ml à 12,5 mg/ml jusqu'au tube C7 avec une nouvelle concentration de 0,4 mg/ml. L'ensemble de ces tubes a été incubé pendant 24 h à 37 °C (Todhanakasem *et al.*, 2010).

Après l'incubation, le milieu de culture est éliminé et les tubes sont lavés 3 fois à l'aide de 3 ml d'eau physiologique afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Après le séchage, la biomasse des biofilms attachés aux tubes est évaluée semi-quantitativement par l'analyse cristal violet suivant la méthode de Djordjevic *et al.* (2002) précédemment décrite, où la lecture des résultats est faite par la mesure de l'absorbance du liquide obtenu par la solubilisation du colorant lié aux cellules adhérentes à une longueur d'onde de 580 nm (Figure 14).

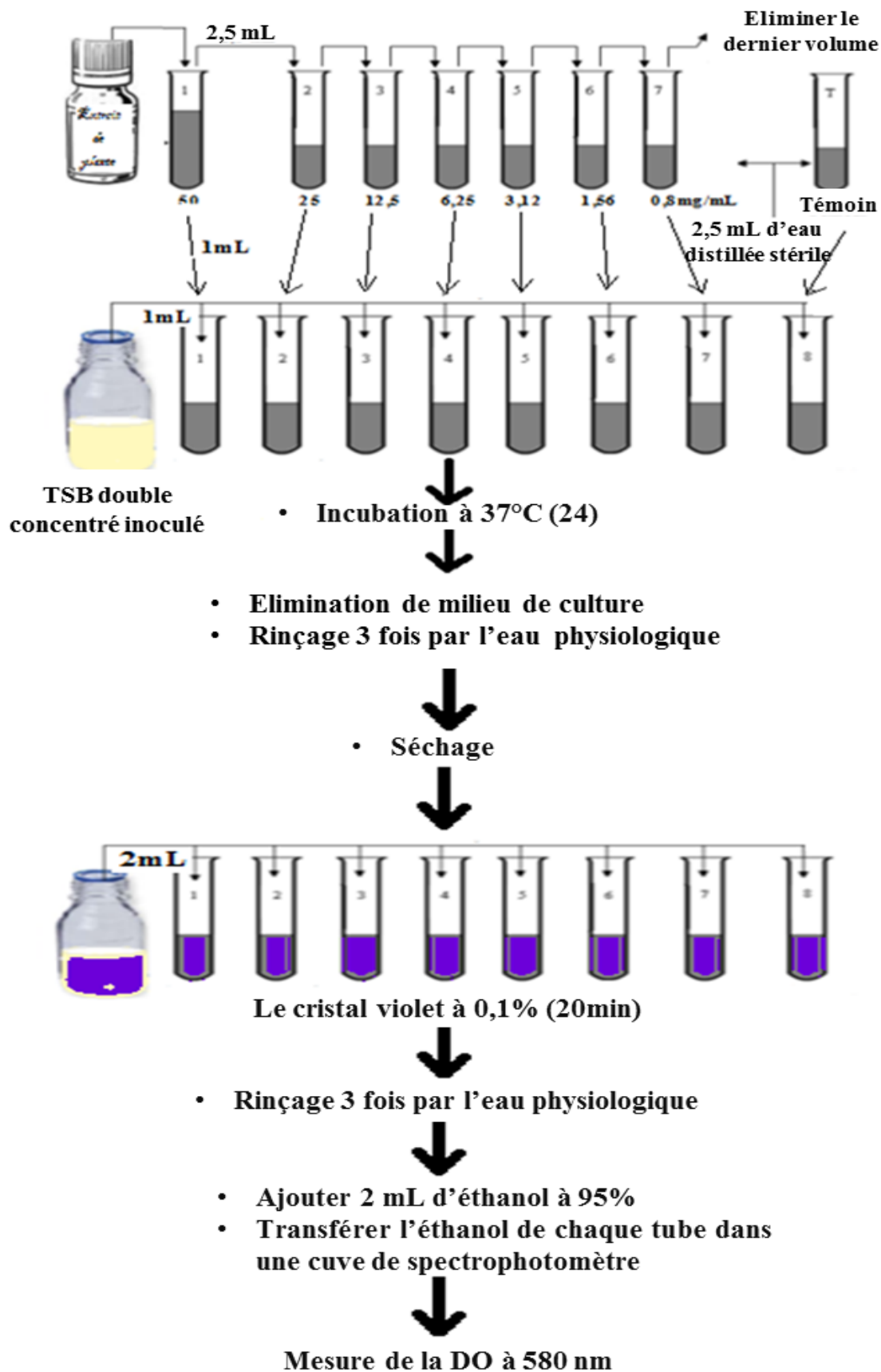


Figure 14 : Etapes du protocole de suivi de la formation du biofilm en tubes.

I.3.3.2. Effet des extraits sur la formation de biofilm en microplaque

Les isolats cliniques et la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 ont été inoculés en présence et en absence des concentrations des extraits (de 1/8CMI à la CMI). Les étapes de préparation des concentrations des extraits et l'inoculation sont faites de la même manière à ceux effectuées dans la détermination de la concentration minimale inhibitrice. La formation du biofilm est évaluée après 24 heures d'incubation de la culture à 37°C. Le milieu de culture est ensuite aspiré, les puits de la microplaque sont lavés 3 fois à l'aide de 200 µl d'eau distillée afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Après séchage à l'air pendant 45 min, les cellules adhérentes sont colorées par une solution de cristal violet à 0,1 % (m/v) et le colorant est laissé en contact avec les puits pendant 45 min. Ensuite, l'excès de colorant est éliminé et les puits sont lavés 3 fois à l'aide de 300 µl d'eau distillée et séchés de nouveau à l'air. La lecture de la formation de biofilm a été faite à l'œil nu et des photos ont été prises (Figure 15) (El abed *et al.*, 2011).

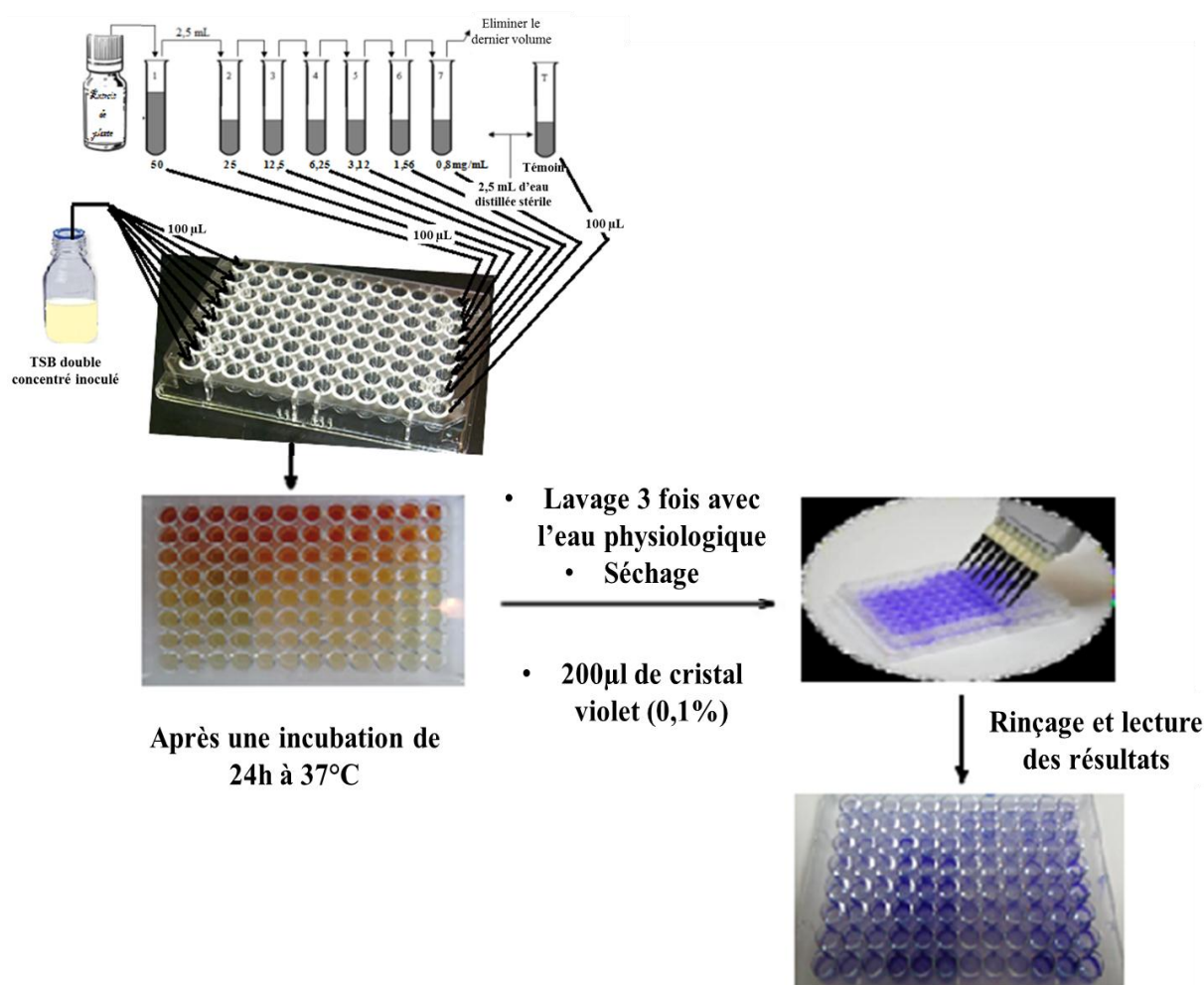


Figure 15 : Etapes du protocole de suivi de la formation du biofilm sur microplaque.

I.4. Analyse des extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Les analyses par HPLC sont effectuées à l'aide d'un appareil Shimadzu équipé d'une pompe de chromatographie liquide de haute pression (LC-2030C) muni d'un détecteur UV à deutérium (LC-2030/2040 PDA) (Figure 16). Les analyses sont réalisées en phase reverse avec une colonne Ultra IBD (5 μ m, 250 x 4,6 mm) (USA). Les solvants utilisés sont de qualité HPLC. La phase mobile optimisée est constituée d'eau/acide acétique (0,075%) à pH = 3 (solvant A) et de méthanol/acide acétique (0,075%, solvant B). Le débit de la phase mobile est fixé à 0,8 mL/min. Le détecteur UV est réglé sur les signaux de 280 nanomètres.



Figure 16 : Appareil Shimadzu équipé d'une pompe de chromatographie liquide de haute pression (LC-2030C) muni d'un détecteur UV à deutérium (LC-2030/2040 PDA).

I.5. Effet de l'acide salicylique

L'acide salicylique (AS) est un acide phénolique produit par les plantes en réponse aux stress biotiques (infection par les pathogènes) et abiotiques (excès de radiation UV, des niveaux d'ozone accrus...).

Dans ce travail, Après la détermination de la CMI et la CMB de ce composé, l'effet de l'AS a été déterminé sur la formation de biofilm à *P. aeruginosa* et sur trois facteurs de virulences (la motilité, la production de pyocyanin et les rhamnolipides) très souvent décrits dans la littérature comme étant en relation avec la formation de biofilm.

I.5.1. Détermination de la CMI et la CMB

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'acide salicylique est effectuée dans des microplaques par la technique de microdilution. Les isolats de *P. aeruginosa* ont été inoculés en présence des concentrations de l'acide salicylique (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 et 20 mM). Les étapes de préparation des concentrations de l'acide salicylique et l'inoculation sont faites par la même manière que ceux effectuées dans la détermination de la concentration minimale inhibitrice des extraits des plantes testées.

I.5.2. Effet de l'acide salicylique sur la formation du biofilm

Les mêmes étapes réalisées pour l'étude de l'effet des extraits sur la formation de biofilm ont été effectuées pour analyser l'effet de l'acide salicylique (0.5, 1, 2 et 4 mM) sur la formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et les six autres isolats (Todhanakasem *et al.*, 2010).

I.5.3. Effet de l'acide salicylique sur la mobilité

La mobilité de type *swarming* (essaimage sur une surface) a été étudiée selon le protocole décrit par Overhage *et al.* (2008). Des concentrations de l'acide salicylique (0, 0.5, 1, 2 et 4 mM) ont été incorporées dans le milieu de culture Biofilm Modifié (BM2) à 0,5 % (m/v) d'agar mis dans des boîtes de Pétri. 3 µl d'une suspension bactérienne préparée dans un bouillon Luria Bertani (LB) à partir d'une culture jeune de 24 h et ajustée à 10⁶ UFC/ml ont été déposés en surface du milieu et incubée à 28°C. Après 24 h d'incubation, le diamètre de la zone de motilité des souches est mesuré et les résultats sont exprimés en millimètre.

I.5.4. Effet de l'acide salicylique sur la production de pyocyanine

Pour déterminer l'effet de l'acide salicylique sur la production de pyocyanine, 200 µl d'une suspension bactérienne à 10⁶ UFC/ml de *P. aeruginosa* ATCC 27853 et les six isolats ont été inoculés dans des tubes contenant 3 ml de bouillon de LB avec 0, 0.5, 1, 2 et 4 mM d'AS. Les tubes ont été incubés pendant 48 h à 37°C dans des conditions agitées (180 tpm). Après l'incubation, la pyocyanine a été extraite et quantifiée suivant la méthode décrite par Essar *et al.* (1990). Les suspensions bactériennes ont été centrifugées à 6000 tpm pendant 20 minutes pour préparer le surnageant. Un volume de 2,5 ml a été extrait par 1.5 ml de chloroforme puis transféré dans un tube propre. Un volume de 0,8 ml d'acide chlorhydrique (HCl, 1N) a été ajouté et doucement secoué pour permettre l'extraction de pyocyanine dans la phase aqueuse. L'absorbance du soluté a été mesurée à 520 nm et les concentrations de pyocyanine (µg/ml) ont été déterminées en multipliant ces mesures par la valeur 17.07 (Drenkard, 2003).

I.5.5. Effet de l'acide salicylique sur la production des Rhamnolipides

I.5.5.1 Production des Rhamnolipides par les souches testées

Afin d'examiner la production des rhamnolipides par les isolats testés, nous avons réalisé un dosage à l'orcinol dans le surnageant du milieu de culture (Wilhelm *et al.*, 2007). Les rhamnolipides contiennent 1 ou 2 molécules de rhamnose liées à 1 ou 2 molécules d'acide β-hydroxyalcanoïque (principalement en C10). Parmi les méthodes d'analyse des rhamnolipides, on a utilisé la méthode colorimétrique à l'orcinol. Cette méthode implique l'extraction dans un solvant organique des rhamnolipides de l'échantillon aqueux, suivie d'une hydrolyse acide pour séparer le rhamnose (3-deoxy-hexose) de la portion lipidique de la molécule. Le sucre est ensuite quantifié par spectrophotométrie après réaction avec l'orcinol.

L'expérience a été entreprise dans des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de Proteose Peptone-Glucose-Ammonium Salts (PPGAS). Les flacons ont été inoculés avec 1ml de la suspension bactérienne (10⁶ UFC/ml) de l'isolat de *P. aeruginosa* et incubés dans des conditions agitées (180 t/mn) à 30°C pendant 3 et 8 jours. Après chaque durée d'incubation, les suspensions de cellules ont été centrifugées à 8000 tpm pendant 20 minutes pour préparer le surnageant. 300 µl de ce surnageant ont été extraits 2 fois avec 600 µl de l'éther diéthylique, les 2 extraits sont rassemblés et évaporés à sec. Le résidu obtenu est dissous dans 100 µl d'eau

distillée et mélangé à 100 µl d'orcinol de 1,6% et 800 µl d'acide sulfurique à 60%. Le mélange a été chauffé à 80°C pendant 30 minutes, puis l'absorbance est lue à 421 nm. Les absorbances obtenues avec les échantillons sont comparées à une courbe standard établie avec des concentrations croissantes de L-rhamnose (0 à 50 µg/ml) et les résultats sont multipliés par un coefficient de 3.4 obtenus à partir de la corrélation de rhamnolipides/rhamnose (Benincasa *et al.*, 2004).

I.5.5.2 Effet de l'acide salicylique sur la production des rhamnolipides

Ce test est réalisé sur la seule souche (*P. aeruginosa* P2) qui a produit des rhamnolipides dans le milieu PPGAS. Pour déterminer l'influence d'AS sur cette production, des flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu de Proteose Peptone-Glucose-Ammonium Salts (PPGAS) incorporés avec 0, 0.5, 1, 2 et 4 mM d'AS ont été inoculés avec 1ml d'une suspension bactérienne (10^6 UFC/ml). L'incubation est réalisée dans des conditions agitées (180 tpm) à 30°C pendant 3 jours. Après l'incubation, les suspensions bactériennes ont été centrifugées à 6000 tpm pendant 20 min pour préparer le surnageant puis les mêmes étapes d'extraction et de quantification des rhamnolipides ont été suivis (Benincasa *et al.*, 2004).

I.6. Calculs et traitement statistique des données

Les données ont été fournies en (Moyenne \pm Ecart-type). Une Analyse de variance à un critère de classification a été appliquée pour déterminer l'effet des extraits de plantes testés et de l'acide salicylique sur la formation de biofilm. Un dispositif factoriel (2x4) en randomisation total et à trois répétitions a été désigné pour étudier l'effet de la variété, des différentes concentrations et leur interaction sur la formation de biofilm en suivant la procédure GLM (pour General Linear Model). Le test de Duncan pour comparaisons multiples a été appliqué pour séparer les moyennes. Les différences ont été déclarées significatives au seuil de 5%. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel IBM SPSS version 20.

CHAPITRE II

Résultats et discussion

II. Résultats et Discussion

II.1. Isolement et identification des *Pseudomonas*

Les prélèvements réalisés à partir des patients diabétiques présentant des infections cutanées ont permis de sélectionner six isolats de *Pseudomonas*. Tous ces isolats montrent une production de pyocyanine et de pyoverdine sur les milieux King A et King B respectivement. Ils présentent une réaction positive à l'oxydase et à la catalase et poussent à 42°C mais pas à 4°C. Les résultats obtenus par le système d'identification API 20NE montrent que les isolats sont similaires à *P. aeruginosa* (Tableau 2).

Tableau 2 : Résultats d'identification phénotypique des isolats.

Isolats	Forme et coloration de Gram	Oxydase	Catalase	Pigment sur King B agar	Pigment sur King A agar	C. à 42°C	C. à 4°C	Profile API 20 NE
P1	Bacille - G ⁻	+	+	Jaune verdâtre	Bleu	+	-	1154575
P2	Bacille - G ⁻	+	+	Jaune verdâtre	Bleu	+	-	1354575
P3	Bacille - G ⁻	+	+	Jaune verdâtre	Bleu	+	-	1154575
P4	Bacille - G ⁻	+	+	Jaune verdâtre	Bleu	+	-	1354575
P5	Bacille - G ⁻	+	+	Jaune verdâtre	Bleu	+	-	1354575
P6	Bacille - G ⁻	+	+	Jaune verdâtre	Bleu	+	-	1154575

C : Croissance

(+) : Résultat positive

(-) : Résultat négative

Le profil d'électrophorèse après amplification par PCR (Figure 17) présente des bandes similaires d'environ 1500 pb montrant que ces isolats appartiennent aux espèces de *Pseudomonas*.

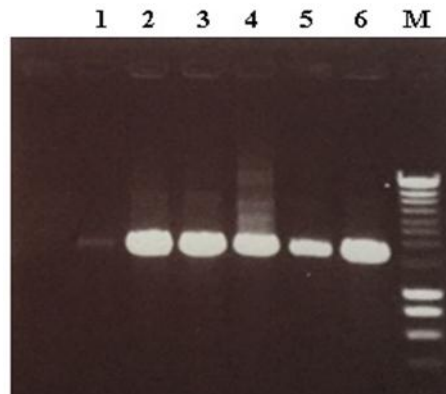


Figure 17 : Électrophorèse en gel d'agarose du gène 16S-ARNr amplifié par PCR pour les isolats cliniques (1-6). M : marqueur de taille d'ADN.

Le séquençage du gène de l'ARNr 16S de trois isolats a montré que les souches P2, P3 et P6 sont similaire à 99% à *P. aeruginosa* CJM, *P. aeruginosa* NO5 et *P. aeruginosa* F23 respectivement.

II.2. Etude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques

Les résultats de la susceptibilité des isolats testés aux antibiotiques utilisés ont été déterminés suivant les valeurs de référence fournies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2015) (Figure 18 et Tableau 3). Toutes les souches de *P. aeruginosa* testées montrent une résistance élevée envers les antibiotiques testés appartenant aux groupes des β -lactames (Pénicilline G, Pipéracilline et Ticarcilline-clavulanate), Carbapénèmes (Imipénème) et céphalosporines (Céfépime). Cette résistance peut être due à la diminution de la concentration intracellulaire des β -lactames par la production de métallo- β -lactamases (MBLs) ou par l'augmentation de l'expression des pompes d'efflux comme MexAB, MexCD et MexXY. Ces mécanismes de résistance aux β -lactamines sont les plus répandus chez *P. aeruginosa* (Mesaros *et al.*, 2007). Une augmentation du nombre de souches de *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes a été constaté ces dernières années, ce qui a généré un problème de santé d'un grand intérêt pour les traitements thérapeutiques dans plusieurs pays d'Afrique, d'Europe et d'Amérique (Romano-Mazzotti *et al.*, 2008, Tsakris *et al.*, 2009). Les études présentées par Kumar *et al.* (2012) et Sara *et al.* (2013) ont conclu que la forte prévalence des souches de *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes et producteurs de

MBLs était due à l'utilisation excessive de carbapénèmes dans les hôpitaux lors du traitement des infections nosocomiales. Les résultats de notre étude montrent aussi une sensibilité totale des souches aux antibiotiques testés appartenant aux groupes des Fluoroquinolones (Ciprofloxacine et Lévofloxacine) et d'Aminosides (Gentamycine, Amikacine, Nétilmicine, Tobramycine). Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par Tripathi *et al.* (2011) où les auteurs ont constaté que tous les isolats cliniques de *P. aeruginosa* étaient sensibles à une variété d'antibiotiques d'Aminosides. Les isolats ont montré une susceptibilité variable vers le Ceftazidime et le Fosfomycine.

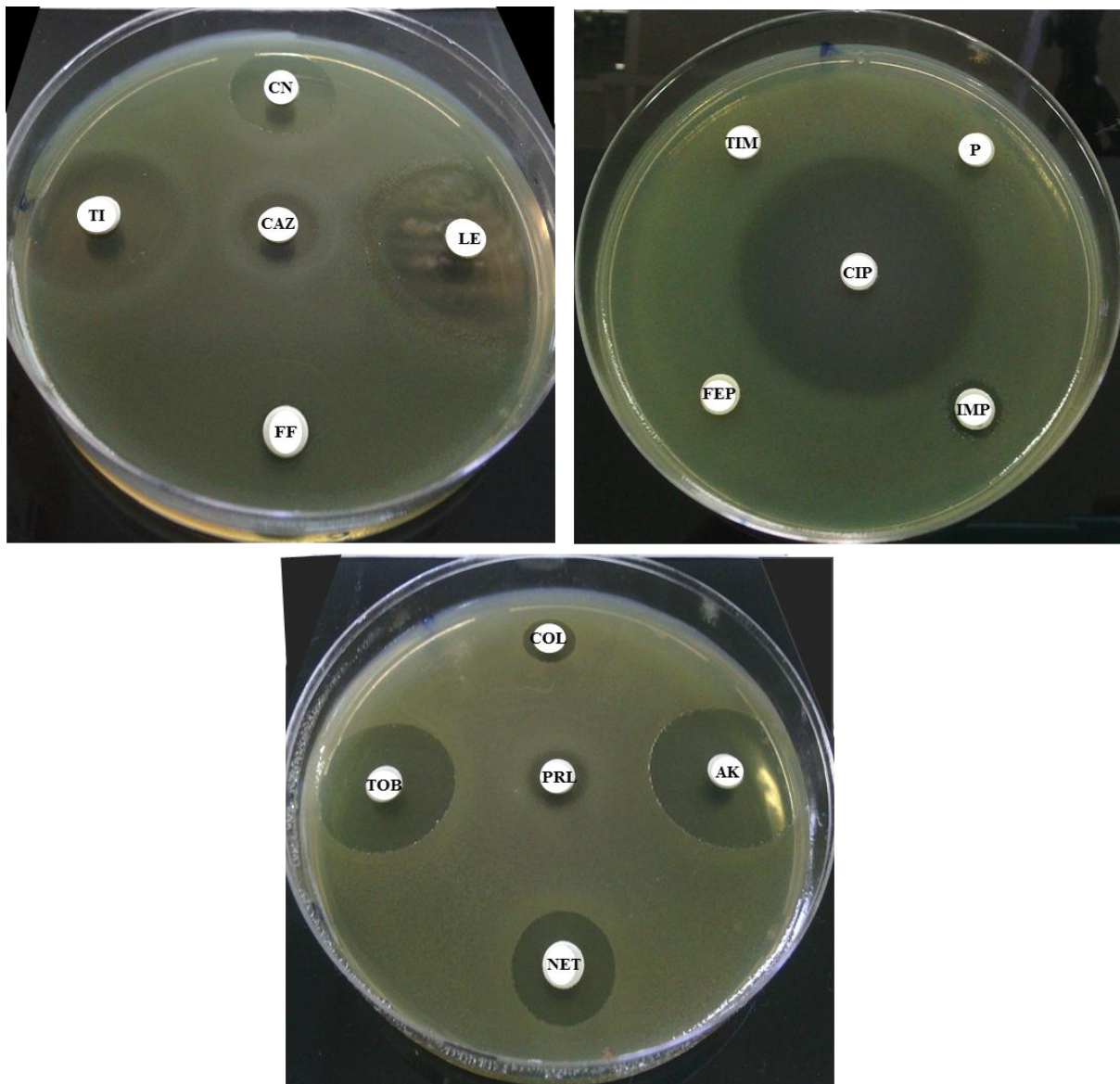


Figure 18 : Sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques testés

Pénicilline G (P), Pipéracilline (PRL), Ticarcilline (TI), Ticarcilline-clavulanate (TIM), Imipénème (IMP), Ceftazidime (CAZ), Céfépime (FEP), Gentamycine (CN), Amikacine (AK), Nétilmicine (NET), Tobramycine (TOB), Ciprofloxacine (CIP), Lévofloxacine (LE), Colistine (COL), Fosfomycine (FF).

Tableau 3 : Susceptibilité des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* vers des antibiotiques testés

Les isolats testés		β-lactamines				Carbapénèmes	Céphalosporines		Aminosides				Fluoroquinolones		Divers	
		P	PRL	TI	TIM	IMP	CAZ	FEP	CN	AK	NET	TOB	CIP	LE	COL	FF
P₁	DI (mm)	/	9,93 ± 1,69	22,83 ± 1,43	/	8,16 ± 0,94	13,50 ± 0,40	/	22,50 ± 0,40	24,33 ± 0,47	12,33 ± 0,62	21,83 ± 1,02	37,50 ± 0,70	32,66 ± 0,94	11,83 ± 0,23	10,33 ± 0,47
		R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S		R
P₂	DI (mm)	/	12,83 ± 3,47	20,33 ± 2,62	/	8,66 ± 0,94	11,33 ± 0,23	/	20,00 ± 1,63	23,83 ± 0,23	11,83 ± 0,62	21,66 ± 1,69	33,00 ± 1,41	29,50 ± 2,48	12,16 ± 0,62	8,66 ± 1,02
		R	R	S	R	R	R	R	S	S		S	S	S		R
P₃	DI (mm)	/	14,5 ± 2,85	24,16 ± 2,24	/	10,50 ± 1,47	16,33 ± 1,24	/	24,66 ± 1,24	29,33 ± 0,47	15,83 ± 0,62	26,00 ± 1,41	38,33 ± 1,24	32,16 ± 1,84	11,66 ± 0,62	9,83 ± 1,02
		R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S		R
P₄	DI (mm)	/	11,83 ± 1,64	24,00 ± 1,08	/	9,16 ± 1,31	16,16 ± 1,54	/	24,33 ± 0,84	27,33 ± 0,47	15,50 ± 0,40	24,66 ± 0,94	34,33 ± 0,47	31,66 ± 1,24	11,66 ± 0,62	20,16 ± 3,47
		R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S		S
P₅	DI (mm)	/	16,16 ± 0,62	23,00 ± 1,63	/	8,00 ± 0,81	15,00 ± 1,41	/	24,66 ± 1,24	28,83 ± 0,62	16,00 ± 0,81	26,33 ± 0,84	40,00 ± 0,81	35,83 ± 1,43	13,00 ± 0,40	13,50 ± 2,94
		R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S		R
P₆	DI (mm)	/	15,00 ± 2,85	22,50 ± 0,40	/	/	15,50 ± 0,70	/	23,66 ± 0,23	25,50 ± 0,40	15,00 ± 0,50	24,66 ± 0,62	36,33 ± 0,47	29,16 ± 0,62	10,83 ± 0,23	7,50 ± 0,47
		R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S		R
P_R	DI (mm)	/	13,83 ± 0,94	27,33 ± 0,47	/	7,33 ± 0,47	17,33 ± 1,02	/	24,66 ± 0,62	27,00 ± 0,81	16,00 ± 0,00	24,33 ± 0,94	34,66 ± 0,47	30,66 ± 1,24	11,83 ± 0,23	23,16 ± 2,24
		R	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S		S

P_R : *Pseudomonas aeruginosa* 27853

S : sensible, R : résistant

P: Pénicilline G, PRL: Pipéracilline, TI: Ticarcilline, TIM: Ticarcilline-clavulanate, IMP: Imipénème, CAZ: Ceftazidime, FEP: Céfépime, CN: Gentamycine, AK: Amikacine, NET: Nétilmicine, TOB: Tobramycine, CIP: Ciprofloxacine, Lévofloxacine LE, COL: Colistine, FF : Fosfomycine.

/ : Pas de zone d'inhibition

II.3. Formation du biofilm

II.3.1. Evaluation de la biomasse adhérente en fonction des isolats testés

D'après les résultats obtenus par l'analyse au cristal violet on a remarqué que la quantité de biomasse adhérente aux parois des tubes et des puits des microplaques varie d'une souche à une autre (Figures 19 et 20). Un taux de formation des biofilms élevé a été enregistré chez la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 et la souche P5. La formation des biofilms est un processus complexe régulé par des caractéristiques diverses. La souche bactérienne elle-même est considérée comme un facteur important parmi les facteurs qui influent l'adhésion des bactéries aux supports. Cette dernière varie aussi en fonction de l'hydrophobicité extérieure des cellules, la production de substances polymériques extracellulaires (EPS), la présence des flagelles et des fimbriae. D'une manière générale, l'adhésion se fait principalement grâce à des protéines adhérentes appelées adhésines, qui se trouvent dans la paroi des bactéries comme le cas des lectines. Ces derniers sont des protéines d'origine non-immune, qui reconnaissent spécifiquement et de façon réversible les sucres sans les modifier à la surface des cellules. *P. aeruginosa* est composé de deux lectines solubles PA-IL (gène *lecA*) et PA-IIL (gène *lecB*) ayant une spécificité respectivement pour le D-galactose et le L-fucose (Imberty *et al.*, 2006). Ces lectines ont été également identifiées sur la membrane externe des bactéries et seraient impliquées dans la formation et la maturation du biofilm (Tielker *et al.*, 2005, Diggle *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* possède aussi des adhésines situées à l'extrémité d'organelles extracellulaires (Flagelles, pili et fimbriae). Par exemple, la protéine de coiffe du flagelle FliD reconnaît les mucines (Arora *et al.*, 2005). Les pilines assemblées par les pili de type IV interagissent avec les glycolipides de type asialo-GM1 et -GM2. Trois opérons *cupA*, *cupB* et *cupC* codant pour des systèmes chaperone/usher (Cup) capables d'assembler des fimbriae ont été caractérisés chez *P. aeruginosa* et leur rôle dans la formation de biofilm a été démontré (Vallet *et al.*, 2001 ; Ruer *et al.*, 2007). En plus, le mode de vie en biofilm n'est possible que si les organismes sont transitoirement immobilisés dans une matrice d'EPS (Flemming, 2011). Ces derniers sont des complexes de biopolymères constitués de polysaccharides, protéines et/ou acides nucléiques qui sont fréquemment adsorbés à la surface de la membrane externe des bactéries. C'est au cours de l'étape de la maturation que les cellules bactériennes sécrètent des substances exopolymériques (EPS) qui vont permettre de les immobiliser et les maintenir à proximité les unes des autres, favorisant les interactions étroites bactérie-bactérie telles que la

communication intercellulaire et l'échange d'ADN (Flemming et Wingender, 2010 ; Tashiro *et al.*, 2013).

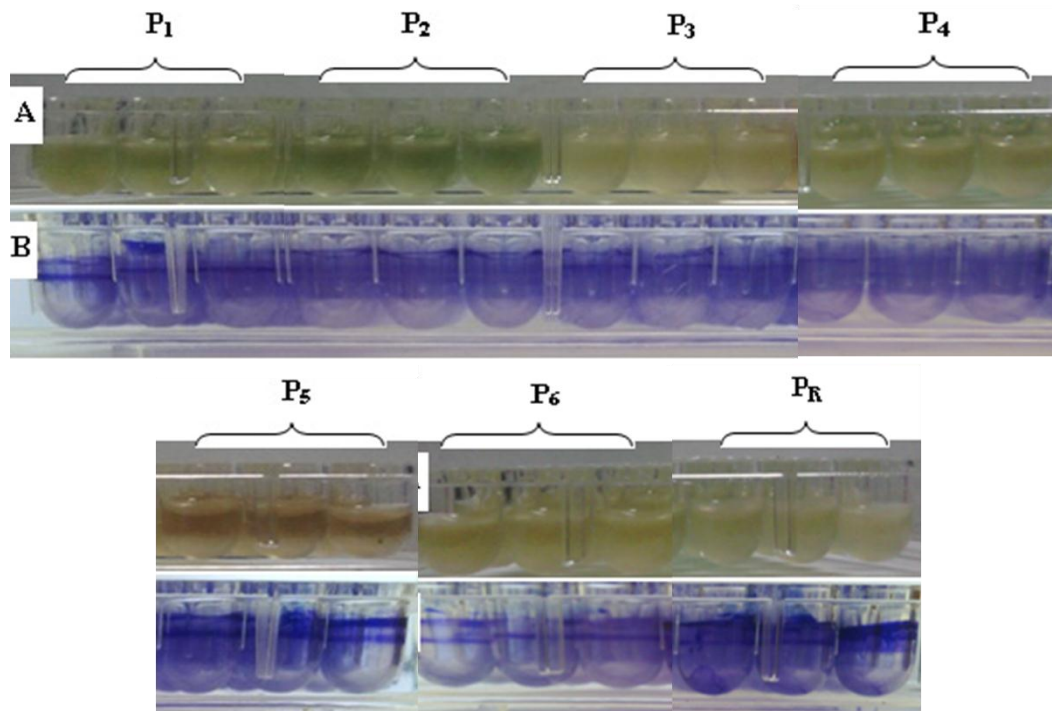


Figure 19 : La différence remarquée entre les souches testées de *P. aeruginosa*.

(A) : Culture de 24 h en milieu TSB, (B) : Visualisation de biofilm formé par coloration au cristal violet.

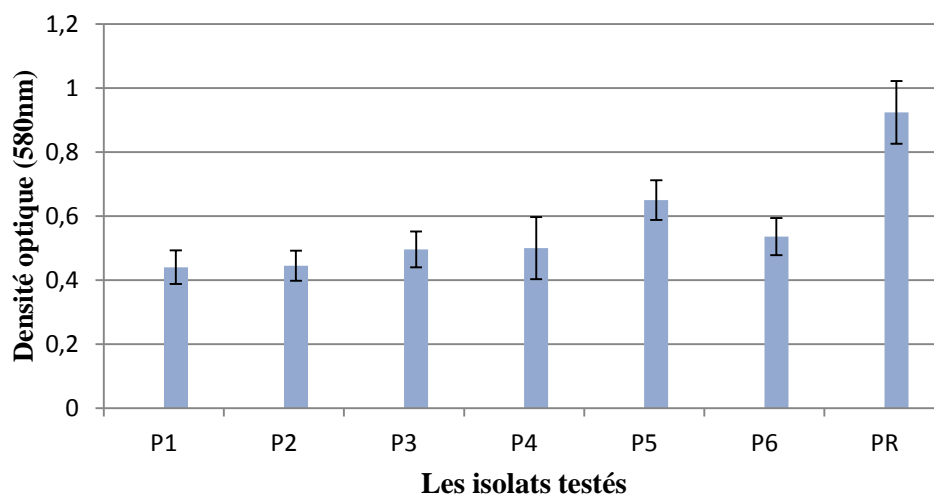


Figure 20 : La variation de la densité optique en fonction de la variation de la souche testée de *Pseudomonas aeruginosa*.

II.3.2. Evaluation de la biomasse adhérente en fonction de la charge d'inoculum et du temps d'incubation

Pour évaluer l'effet de la charge initiale d'inoculum sur l'adhésion et la cinétique de formation de biofilm en fonction du temps chez *P. aeruginosa*, on a suivi la variation de la densité optique de la biomasse adhérente au paroi des tubes à différents temps d'incubation.

La figure 21 indique les valeurs de DO enregistrées pour la souche *P. aeruginosa* ATCC27853 aux différents temps d'incubation avec deux charges d'inoculum initial différentes. Dans le cas où la charge initiale est faible (10^4 UFC/ml), aucune augmentation importante de l'absorbance n'est détectée durant les premières 4 heures d'incubation. Pour la deuxième charge (10^8 UFC/ml), une augmentation de l'absorbance a été enregistrée après seulement 2 h d'incubation. Ces résultats obtenus suggèrent que la charge initiale de l'inoculum accélère la formation de biofilms. Par contre après 24 h d'incubation aucune relation n'a été observée entre la quantité de biofilm formée et la charge initiale d'inoculum où des quantités de biomasse élevées et rapprochées ont été enregistrées pour les deux cas d'inoculums testés.

L'augmentation de la population cellulaire entraîne une activation du mécanisme de communication cellulaire et d'adaptation « le quorum-sensing » ce qui permet aux bactéries de prendre des décisions collectives. Le fonctionnement de ce système est lié à la production des auto-inducteurs induite à forte densité cellulaire (Petrova et Sauer, 2012). Après que la concentration de ces molécules diffusibles (auto-inducteurs) atteint un certain niveau leur liaison avec les protéines réceptrices appropriées active l'expression des gènes cibles, dont les gènes en relation avec la formation de biofilm (Lee et Zhang, 2015).

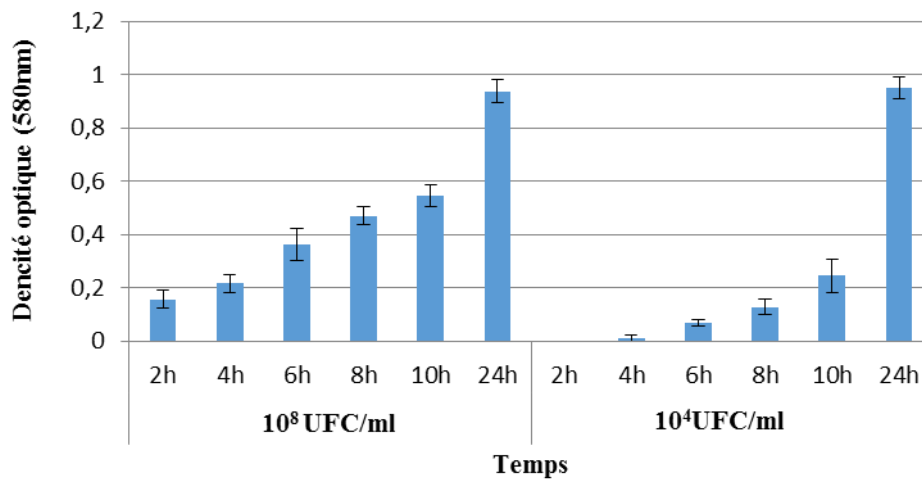


Figure 21 : Les valeurs de la densité optique enregistrées pour la souche de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 aux différents temps d'incubation avec deux charges d'inoculum initial différentes.

II.3.3. Evaluation de la biomasse adhérente en fonction du milieu de culture utilisé (TSB et BBM)

La quantité de biofilms formée par les six isolats et *P. aeruginosa* ATCC 27853 dépend aussi du milieu de culture utilisé (Figure 22). La comparaison de la formation des biofilms entre les deux milieux de culture utilisés (milieu TSB ou BBM) prouve que le taux des bactéries adhérentes dans le milieu de bouillon trypticase de soja (TSB) est plus important que dans le milieu Bouillon Biofilm Modifié (BBM). Le BBM contient seulement du glucose comme une source de carbone, alors que le TSB contient du dextrose et des acides aminés (Par digestion pancréatique de caséine et digestion enzymatique de farine de soja).

Dans la formation des biofilms, les interactions entre les cellules et les surfaces sont influencés par les caractéristiques du milieu de culture, dont la composition, la viscosité, la force ionique, le type des sels et le pH (Saulou, 2009). La même idée a été mentionnée par Martinez et Casadevall (2007) qui ont confirmé que la source de carbone influence la formation de biofilm et sa maturation. Spormann (2008) a également indiqué que les concentrations des éléments dans un milieu statique doivent être hautes de sorte qu'ils puissent former des biofilms. Comme indiqué aussi par Huang *et al.* (2009) qui démontrent que l'augmentation de la concentration du glucose dans le milieu de culture entraîne une formation plus importante de biofilms par *P. aeruginosa* et *P. putida* HB45 et une augmentation dans la résistance de ces

biofilms formés aux biocides testés (Chlorure d'alkyl diméthylbenzylammonium, 2,2-dibromo-3-nitrilopropionamide (DBNPA) et isothiazolone)

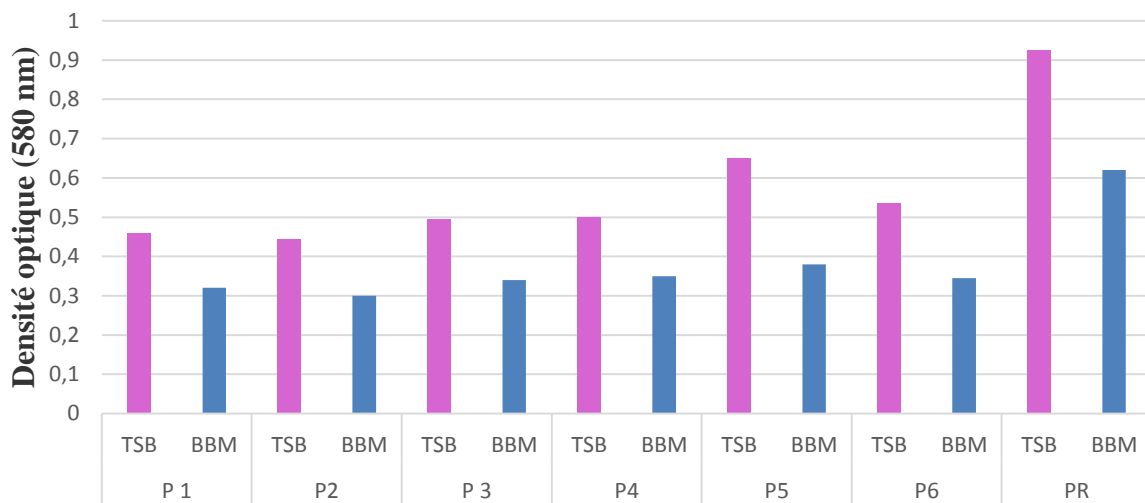


Figure 22 : Evaluation de la formation de biofilm en fonction des milieux de culture utilisés (TSB, BBM).

II.3.4. Evaluation de la biomasse adhérente en fonction de la matière du support (verre et polystyrène)

La comparaison de la quantité de biofilms formée par les souches de *P. aeruginosa* testés sur deux supports de nature différente (verre et polystyrène) révèle que le taux des bactéries adhérentes sur le polystyrène est plus important par rapport au verre (Figure 23). Le même résultat a été mentionné par l'étude de Todhanakasem *et al.* (2010) sur la formation des biofilms par *Salmonella typhimurium* où le résultat indique que *S. typhimurium* est mieux attaché avec la plus grande résistance au matériau hydrophobe (Polystyrène) que le matériau hydrophile (verre). L'étude de Huang *et al.* (2009) a démontré aussi que le polystyrène est plus favorable à l'adhésion et la formation de biofilm par *P. aeruginosa* et *P. putida* HB45 que l'acier inoxydable.

Les caractéristiques de la surface du support sont importantes dans le procédé d'attachement des microorganismes. Le taux de la colonisation microbienne augmente par l'augmentation de la rugosité où les forces de cisaillement sont diminuées (Characklis *et al.*, 1990). Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent également exercer une forte influence sur le taux de l'attachement. Une hydrophobie importante est souvent corrélée à une forte adhésion, où la plupart des investigateurs ont constaté que les micro-organismes

s'attachent plus rapidement aux surfaces non polaires telles que le téflon et les plastiques (McEldowney et Fletcher, 1986) par l'intermédiaire de forces d'attractions hydrophobes (An et Friedman, 1998 ; Donlan, 2002) qu'aux matériaux hydrophiles tels que le verre ou les métaux qui présentent une forte affinité pour l'eau et les solvants polaires.

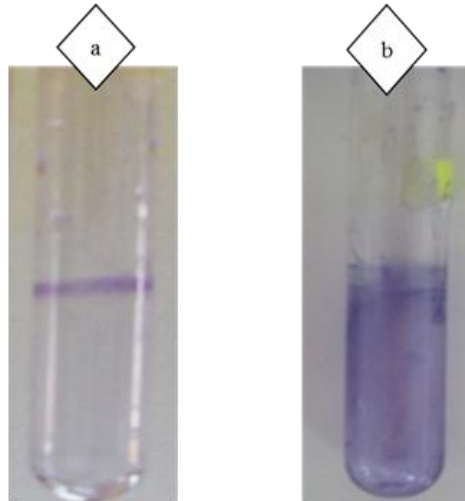


Figure 23 : La formation de biofilm dans des tubes en verre (a) et des tubes en polystyrène (b) (après une coloration avec 0,1% de cristal violet).

II.4. Activité antibactérienne et effet sur la formation de biofilm des extraits de plantes contre *Pseudomonas aeruginosa*

II.4.1. Extraction

Les extractions qui ont été réalisées sur des ampoules fraîches d'*A. sativum* et la poudre de feuilles de *P. persica* et *L. inermis* ont abouti à la préparation d'un extrait aqueux brut d'*A. sativum* et deux fractions à savoir une fraction d'acétate d'éthyle et une fraction butanolique pour *P. persica* et les deux variétés testées de *L. inermis*.

II.4.1.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction des fractions d'acétate d'éthyle et de butanol de *P. persica* et de deux variétés testées de *L. inermis* a été calculé par rapport au poids total de la poudre végétale des trois plantes. Selon les résultats obtenus (Figure 24), le rendement d'extraction dépend à la fois de la plante choisie où on a enregistré que le rendement d'extraction obtenu pour les feuilles des deux variétés de *L. inermis* est élevé par rapport au rendement d'extraction obtenu pour les feuilles de *P. persica*. On a remarqué aussi que le rendement d'extraction est

varié suivant le solvant utilisé. Les résultats montrent que l'extrait obtenu de *L. inermis* par le butanol à un rendement d'extraction de 12,87% et 12,31% pour les échantillons d'Adrar et de Biskra respectivement. Ce rendement est moins important pour les fractions d'acétate d'éthyle où il était de 6,56% pour l'échantillon d'Adrar et de 6,36% pour celui de Biskra. Cette constatation a été remarquée aussi par Anis *et al.* en 2011. Ils ont enregistré un rendement plus important pour l'extrait butanolique des feuilles de *L. inermis* comparativement avec d'autres solvants testés dont l'extrait d'acétate d'éthyle. Le rendement de l'extrait butanolique de *P. persica* est de 9,65% et celui de l'extrait d'acétate d'éthyle est de 5,45% ce qui confirme encore que l'extrait butanolique est plus adéquat pour un meilleur rendement d'extraction. L'effet de la variété sur le rendement d'extraction n'était pas vraiment remarquable puisque la comparaison entre les deux variétés testées de *L. inermis* pour le même solvant montre un rapprochement des valeurs enregistrées.

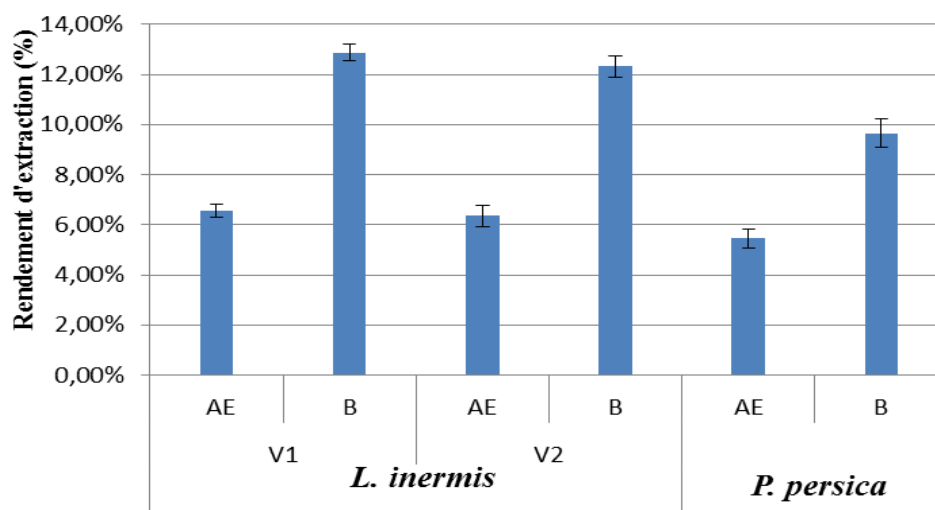


Figure 24 : Rendement d'extraction des fractions d'acétate d'éthyle (AE) et butanolique (B) de *P. persica* et des deux variétés (V1, V2) de *L. inermis*.

II.4.1.2. Détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes

Les fractions obtenues par l'extraction liquide-liquide à partir de l'extrait hydrométhanolique pour les deux variétés de *L. inermis* et *P. persica* ont été analysées quantitativement par un spectrophotomètre UV-visible pour déterminer la teneur en polyphénols et en flavonoïdes. Les résultats de teneur en polyphénols totaux sont exprimés en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) d'extrait (mg EAG/g E) et en

milligramme (mg) équivalents de quercétine par gramme (g) d'extrait (mg EQ/g E) pour la teneur en flavonoïdes.

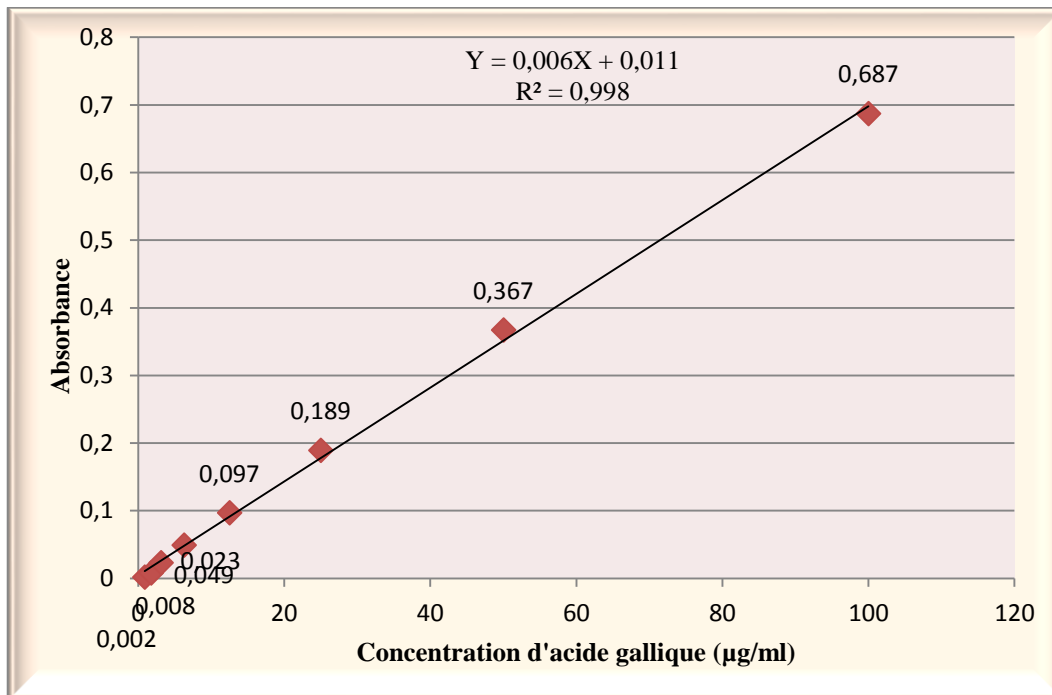


Figure 25 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux réalisée à l'aide de l'acide gallique.

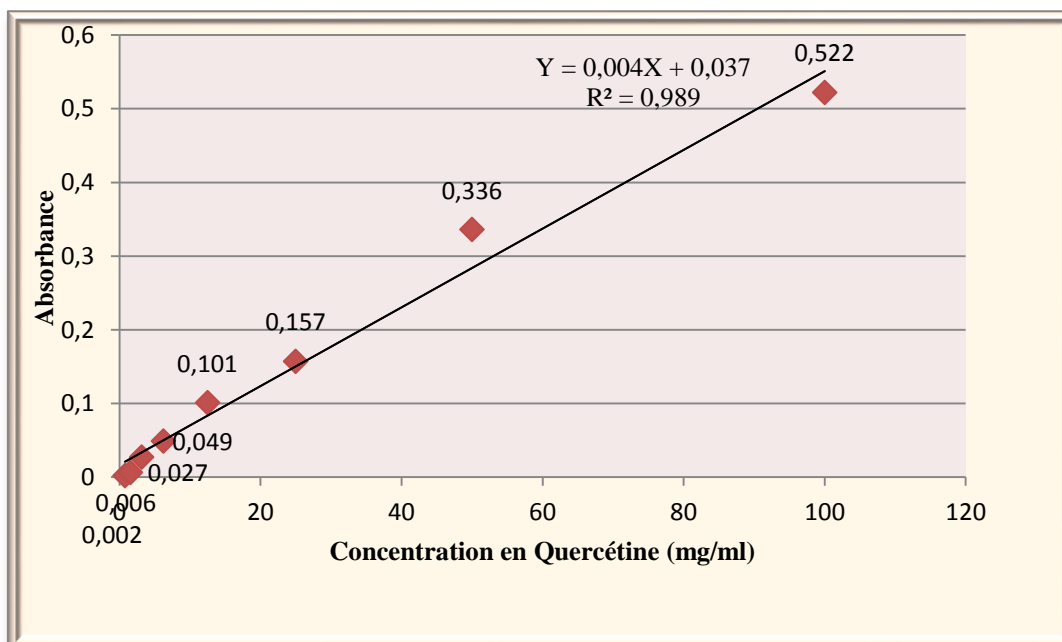


Figure 26 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes réalisée à l'aide du quercétine.

Les résultats de cette étude montrent que les teneurs en ces substances varient considérablement entre les deux fractions (Acétate d'éthyle, Butanol) pour *P. persica* et les deux variétés étudiées de *L. inermis*. Le solvant est l'un des facteurs qui peut affecter l'extraction des polyphénols (Haddad et Dezashibi, 2007). Les extraits d'acétate d'éthyle de *L. inermis* ont donné les teneurs les plus élevées avec les valeurs de $224,83 \pm 20,07$ mg EAG/g d'extrait et $244,58 \pm 25,54$ mg EAG/g d'extrait pour les feuilles de la région d'Adrar et de la région de Biskra respectivement et de $169,79$ mg EAG/g d'extrait pour les feuilles de *P. persica* comparativement avec l'extrait butanolique (Tableau 4). La richesse de la fraction d'acétate d'éthyle en polyphénols comparativement avec la fraction butanolique a été remarquée aussi par l'étude de Anis *et al.* (2011) sur les feuilles de *L. inermis*. Les teneurs en polyphénols trouvés sont de l'ordre de 367 ± 19 mg EAG/g d'extrait pour la fraction d'acétate d'éthyle et de $286 \pm 8,0$ mg EAG/g d'extrait pour la fraction butanolique. Ces teneurs sont supérieures à celles de nos résultats et ceci peut être dû à la méthode d'extraction utilisée où le fractionnement commencé par le n-Hexane et suivi par le chloroforme, puis par l'acétate d'éthyle et déterminé par le butanol. L'hexane élimine les cires, les lipides et la chlorophylle ce qui provoque l'augmentation de la capacité d'extraction des polyphénols par les étapes ultérieures.

La variabilité des teneurs en polyphénols chez les espèces végétales est due probablement à la composition phénolique des extraits qui varient des composés simples à fortement polymérisés (Hayouni *et al.*, 2007), aux facteurs génotypiques (El-Waziry, 2007), à l'espèce, à l'organe et à l'étape physiologique (Ksouri *et al.*, 2008), et aussi à la nature du sol et le type du climat où poussent ces plantes (Atmani *et al.*, 2009).

La même remarque a été enregistrée pour la teneur en flavonoïdes, les résultats obtenus montrent la richesse des fractions d'acétate d'éthyle en ces substances où on a enregistré des teneurs en flavonoïdes de l'ordre de $20,15 \pm 1,41$ mg EQ/g d'extrait et $24,92 \pm 2,47$ mg EQ/g d'extrait pour les feuilles de la région d'Adrar et de la région de Biskra respectivement et de $35,91 \pm 0,48$ mg EQ/g d'extrait pour les feuilles de *P. persica*. Alors que les fractions butanoliques de l'ordre de $18,81 \pm 2,33$ mg EQ/g d'extrait et $15,65 \pm 1,43$ mg EQ/g d'extrait pour les deux variétés testées et de $27,28 \pm 0,46$ mg EQ/g d'extrait pour les feuilles de *P. persica*.

Tableau 4 : Teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits d'acétate d'éthyle et de butanol obtenus chez les deux variétés de *L. inermis* et *P. persica*

Extraits des plantes		Polyphénols (mg GAE/g d'extrait)	Flavonoïdes (mg QE/g d'extrait)
<i>L. inermis</i> (V1)	Acétate d'éthyle	224,83 ± 20,07	20,15 ± 1,41
	Butanol	147,5 ± 6,60	18,81 ± 2,33
<i>L. inermis</i> (V2)	Acétate d'éthyle	244,58 ± 25,54	24,92 ± 2,47
	Butanol	136,95 ± 4,76	15,65 ± 1,43
<i>P. persica</i>	Acétate d'éthyle	169,79 ± 7,92	35,91 ± 0,48
	Butanol	124,86 ± 10,25	27,28 ± 0,46

V1 : *L. inermis* de la région d'Adrar.

V2 : *L. inermis* de la région de Biskra.

II.4.2 Evaluation du pouvoir antibactérien des extraits d'*Allium sativum*, *Lawsonia inermis* et *Prunus persica*

II.4.2.1. L'effet antibactérien par la méthode de diffusion en milieu gélosé

On a utilisé la méthode de diffusion par disques sur le milieu gélosé MH pour caractériser l'activité antibactérienne des extraits étudiés (Figure 27). C'est une technique qualitative basée sur la détermination du diamètre des zones d'inhibition apparentées autour des disques chargés par les extraits testés. Le tableau 5 représente les diamètres des zones d'inhibition d'extrait brut d'ail et les fractions d'acétate d'éthyle et de butanol pour *P. persica* et les deux variétés de *L. inermis*.

L'extrait brut d'ail montre une activité antibactérienne contre tous les isolats testés de *P. aeruginosa* avec des zones d'inhibition comprises entre 14,5 et 16 mm. Une activité antimicrobienne pour les fractions d'acétate d'éthyle et de butanol obtenues par l'extraction liquide-liquide d'extrait hydrométhanolique de deux variétés de *L. inermis* a été enregistrée aussi contre tous les isolats testés de *P. aeruginosa* (Tableau 5). Cependant, les feuilles obtenues à partir de la région d'Adrar présentaient l'activité la plus élevée contre *P. aeruginosa* comparativement à celle obtenue par les feuilles de la région de Biskra. Selon les zones d'inhibition obtenues par les deux fractions testées, on a remarqué que la fraction butanolique présentait une activité antibactérienne élevée contre tous les isolats testés pour les deux variétés testées comparativement avec les fractions d'acétate d'éthyle. Suite à nos résultats et en comparaison avec l'activité obtenue par l'extrait d'ail et les deux variétés de *L. inermis*, on a

constaté que les fractions d'acétate d'éthyle et de butanol obtenues par les feuilles de *P. persica* présentent une faible activité contre les isolats testés.

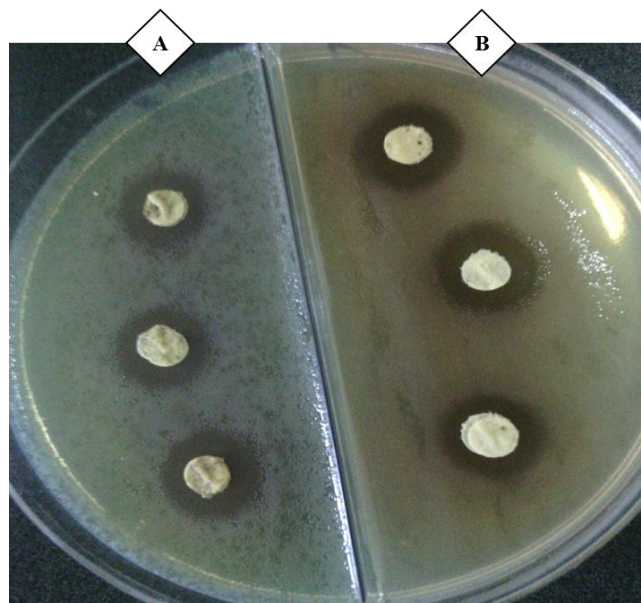


Figure 27 : Activité antibactérienne d'extrait d'acétate d'éthyle (A) et d'extrait butanolique (B) des feuilles de *Lawsonia inermis* de la région de Biskra.

Tableau 5 : Activité antibactérienne (Zones d'inhibition) de différents extraits préparés à partir d'*A. sativum*, *P. persica* et les deux variétés de *L. inermis* sur milieu MH.

Extraits des plantes		Zones d'inhibition en mm						
		Isolats testés de <i>P. aeruginosa</i>						
		P1	P2	P3	P4	P5	P6	PR
<i>A. sativum</i>	Extrait brut (50%)	14,66 ± 0,28	15,00 ± 0,50	14,66 ± 0,76	15,83 ± 0,28	16,16 ± 0,57	15,66 ± 0,57	15,16 ± 0,28
<i>L. inermis</i> (V1)	Acétate d'éthyle (100 mg/ml)	12,83 ± 0,57	12,16 ± 1,25	11,50 ± 0,50	12,30 ± 0,57	11,83 ± 0,28	11,00 ± 1,25	11,33 ± 0,76
	Butanolique (100 mg/ml)	17,16 ± 0,76	17,00 ± 1,00	16,16 ± 0,84	17,66 ± 1,15	17,16 ± 0,76	16,50 ± 1,0	17,00 ± 1,0
<i>L. inermis</i> (V2)	Acétate d'éthyle (100 mg/ml)	08 ± 0,50	9,66 ± 1,15	8,83 ± 1,52	9,66 ± 0,67	8,83 ± 1,51	8,16 ± 0,57	7,50 ± 0,5
	Butanolique (100 mg/ml)	11,66 ± 0,28	12,66 ± 0,76	12,33 ± 0,28	12,16 ± 0,76	11,83 ± 0,57	11,5 ± 0,50	11,16 ± 0,28
<i>P. persica</i>	Acétate d'éthyle (100 mg/ml)	7,16 ± 0,28	7,83 ± 0,57	7,66 ± 0,28	7,83 ± 0,57	7,66 ± 0,76	7,50 ± 0,5	7,33 ± 0,28
	Butanolique (100 mg/ml)	7,83 ± 0,57	8,66 ± 0,76	8,50 ± 0,50	8,83 ± 0,28	8,66 ± 0,76	8,33 ± 0,28	8,16 ± 0,57

V1 : *L. inermis* de la région d'Adrar.

V2 : *L. inermis* de la région de Biskra.

II.4.2.2. Détermination de La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La technique de microdilution en milieu liquide dans des microplaques de 96 puits a révélé les valeurs de la CMI allant de 3,15 % à 6,25 % (v/v) pour l'extrait brut d'ail avec une CMB de 6,25 % à 12,5 % (Tableau 6). Cette activité enregistrée contre les isolats testés de *P. aeruginosa* suggère que cet extrait contient des composés phytochimiques efficaces responsables de l'inhibition de la croissance de la bactérie testée.

L'ail est l'une des espèces importantes d'*Allium* consommée dans le monde entier et contient beaucoup de produits d'intérêt thérapeutique. Il est utilisé depuis des décennies comme remède médicinal (Mnayer *et al.*, 2014 ; Gupta *et al.*, 2015). Il peut être préparé sous diverses formes, à savoir l'huile, la poudre, le jus cru et les différents extraits (Jabar et Al-Mossawi, 2007 ; Ried *et al.*, 2010). Il est traditionnellement employé en tant qu'antiseptique, expectorant, antihypertensif, stimulant, carminative, aphrodisiaque, diaphorétique, diurétique, antiscorbutique et pour les traitements des infections virales. Comme il a aussi des activités biologiques y compris l'activité antioxydante, insecticide, antinociceptive, l'activité antitrypanosomal et antimicrobienne (Yusuf et Ekanem, 2010 ; Rahman *et al.*, 2012 ; Gupta *et al.*, 2015). L'effet thérapeutique de l'ail a été attribué à ses constituants organosulfurés, qui sont également responsables de sa saveur et de son odeur typique (Rahman, 2007 ; Zeng *et al.*, 2012). L'activité antibactérienne de l'ail est largement attribuée à ses produits phytochimiques. L'allicine (allyl-2 propènethiosulfate) est exclusivement responsable de l'activité antimicrobienne de l'ail fraîche écrasé (Borlinghaus *et al.*, 2014). L'allicine, constituant important de l'ail interfère avec la production d'ARN et la synthèse des lipides qui se produit par une transformation enzymatique de l'alliine (Le composant principal de l'ail frais non contuse) par l'allinase lorsque l'ail subi un traitement physique comme la blessure, l'écrasement ou le coupage.

Pour *L. inermis*, la comparaison de l'activité antibactérienne entre les deux fractions obtenues par l'acétate d'éthyle et le butanol indique que la fraction butanolique inhibe la bactérie testée plus que la fraction d'acétate d'éthyle avec des CMI de 3,12 mg/ml et 6,25 mg/ml obtenu à partir des feuilles de *L. inermis* de la région d'Adrar et de Biskra respectivement. Ceci peut être dû à la grande quantité des substances actives précipitées au cours du processus d'extraction. Cependant, la fraction d'acétate d'éthyle exerce une activité inhibitrice (CMI) à une concentration de 6,25 mg/ml et de 12,5 mg/ml pour les deux variétés testées (Adrar et

Biskra) (Figure 28, 29, 30, 31 et tableau 6). Les résultats obtenus par Anis *et al.* (2011) montrent que la fraction butanolique de *L. inermis* exerce une activité antioxydante plus élevée comparativement à celle obtenue par la fraction d'acétate d'éthyle, d'hexane et de chloroforme. Suivant ces résultats, on peut conclure que le butanol est le solvant le plus adéquat pour l'extraction des substances actives présentes dans les feuilles de *L. inermis*. La concentration minimale bactéricide (CMB) était d'environ 6,25 mg/ml et de 12,5mg/ml pour l'extrait butanolique des feuilles de *L. inermis* de la région d'Adrar et de la région de Biskra respectivement et de 12,5 mg/ml pour l'extrait d'acétate d'éthyle des deux variétés testées (Tableau 6).

L. inermis est un arbuste tropical et subtropical, cultivé au Moyen-Orient, le long de la côte africaine de la mer Méditerranéenne. Le henné a de nombreuses utilisations traditionnelles et commerciales, le plus courant en tant que colorant pour les cheveux, la peau et les ongles, en tant que colorant et conservateur pour le cuir et les tissus. Outre son utilisation dans les cosmétiques, les feuilles de henné sont utilisées comme remède dans la médecine perse, arabe, turque et juive pour traiter les maladies de la peau sous forme de pâte ou de décoction contre les brûlures, les ecchymoses et l'inflammation de la peau. Les feuilles sous forme de pâte ont été utilisées comme application externe dans les maux de tête et frottées sur les semelles des pieds brûlés (Bhuvaneswari *et al.*, 2002). *L. inermis* est connu d'avoir des propriétés antimicrobiennes qui ont été attribuées aux naphthoquinones, y compris lawsone (2-hydroxynaphthoquinone) qui constituent 0,5 à 1,5% de ses ingrédients (Arun *et al.*, 2010 ; Mostefa-Kara *et al.*, 2010). Sa caractéristique bioactive est due à sa capacité de liaison élevée aux protéines (Kelmanson *et al.*, 2002). Les recherches phytochimiques sur les feuilles de *L. inermis* ont montré la présence aussi de coumarines, de flavonoïdes, d'acides gallic, de dérivés de naphthalène, de triterpénoïdes, de glycosides phénoliques et de xanthones (Chaudhary *et al.*, 2010 ; Hsouna *et al.*, 2011). L'activité antibactérienne peut être due aussi à de nombreux groupes hydroxylés libres qui ont la capacité de combiner avec les glucides et les protéines dans la paroi cellulaire bactérienne. Comme ils peuvent s'attacher aux sites enzymatiques en les rendant inactifs. Les quinones présentent dans le henné sont des anneaux aromatiques avec deux substitutions cétones. Ils sont intermédiaires dans la voie de synthèse de la mélanine dans la peau humaine (Scherer et Kumer, 2010). Ils ont la capacité de se complexer de manière irréversible avec des acides aminés nucléophiles dans les protéines conduisant souvent à l'inactivation de la protéine et à la perte de fonction (Tan et Berridge, 2008).

Les fractions de butanol et d'acétate d'éthyle des feuilles de *P. persica* montrent une inhibition de croissance (CMI) à une concentration de 25 mg/ml et de 50 mg/ml respectivement et une activité bactéricide a été enregistrée dans ces mêmes concentrations pour les deux extraits (Figure 32, 33 et tableau 6). Cette activité est faible en comparaison avec l'activité antibactérienne exercée par l'extrait brut d'ail et les fractions testées pour les deux variétés de *L. inermis* étudiées.

Dans ses dernières années l'utilisation de *P. persica* dans la phytothérapie était largement répandue. Les feuilles de *P. persica* se sont révélées contenir plusieurs composés phénoliques tels que l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'acide p-coumarique, le kaempferol, la quercétine, l'isoquercétine, la quercitrine, l'acide quinique, le tanin, l'acide ursolique et l'acide prusique (Gilani *et al.*, 2000 ; Liakopoulos *et al.*, 2001 ; Upyr et Komissarenko, 2002). La pâte des feuilles est utilisée pour tuer les vers dans les plaies et les infections fongiques. Le traitement de la gastrite, de la coqueluche et de la bronchite chronique est effectué par des extraits à base des feuilles de *P. persica* (Kritikar et Basu, 1984). Des études sur les feuilles de pêche ont montré leur propriétés antipaludiques, hépatoprotectives, antiasthmatiques et anticoagulantes (Gilani *et al.*, 2000), antioxydantes par la présence des composés actifs tels que la prunetine, la quercétine et le kaempferol (Jung *et al.*, 2002 ; Lokesh *et al.*, 2010), anti-inflammatoires (Shin *et al.*, 2010) et antihyperglycémiant (Shirosaki *et al.*, 2012). L'activité antibactérienne des feuilles de *P. persica* a été montrée par Salem *et al.* en 2013 contre des souches bactériennes à coloration de Gram positive testées (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*) et des souches à Gram négatifs (*Proteus vulgaris* et *Citrobactor freundii*).

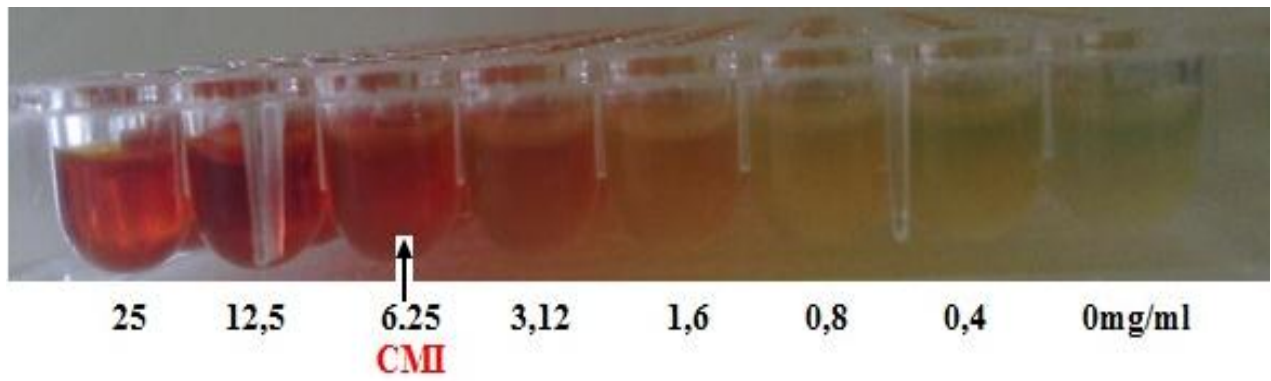


Figure 28 : La CMI de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *L. inermis* de la région d'Adrar.

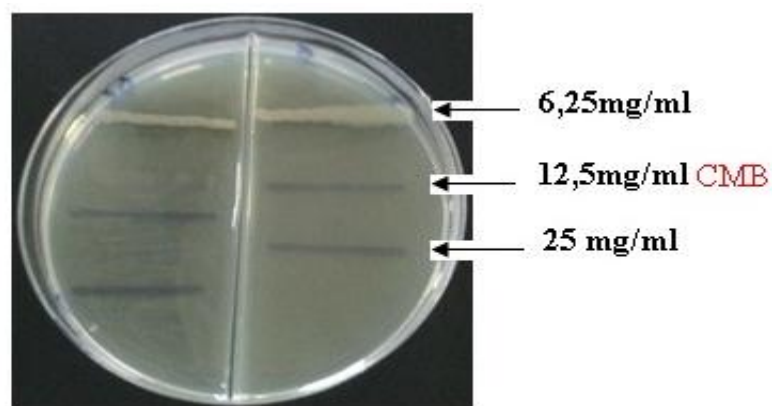


Figure 29 : La CMB de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles de *Lawsonia inermis* de la région d'Adrar.

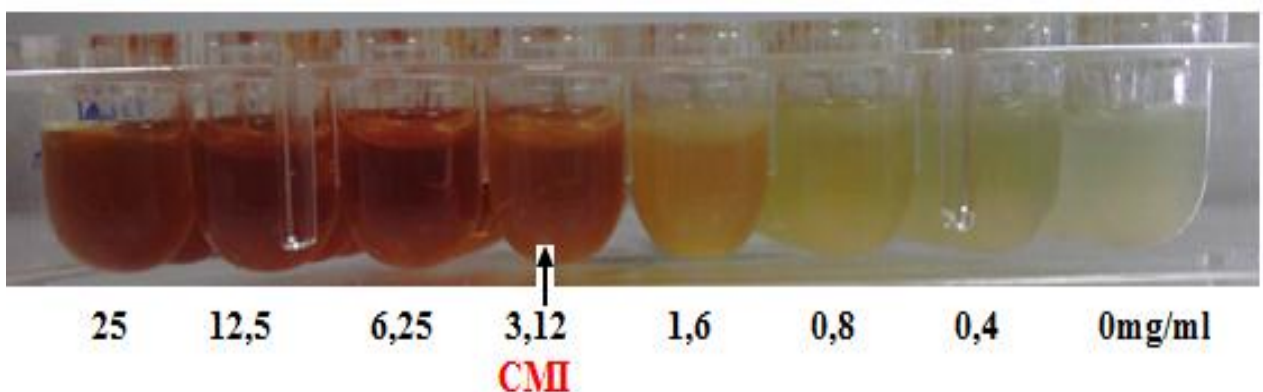


Figure 30 : La CMI de l'extrait butanolique des feuilles de *Lawsonia inermis* de la région d'Adrar.

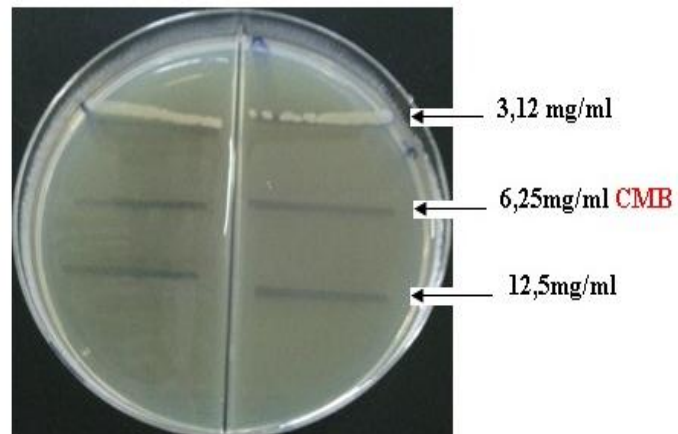


Figure 31 : La CMB de l'extrait butanolique des feuilles de *L. inermis* de la région d'Adrar.

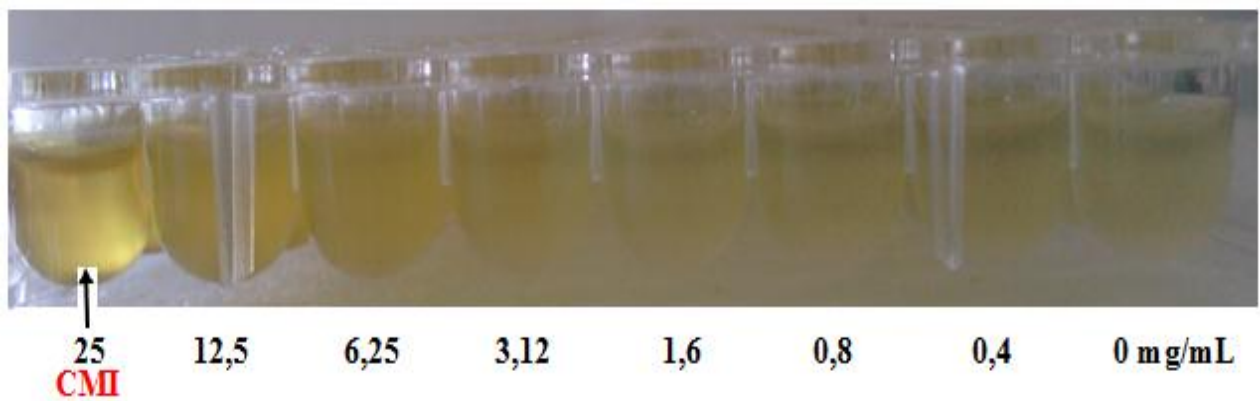


Figure 32 : La CMI de l'extrait butanolique des feuilles de *Prunus persica*.

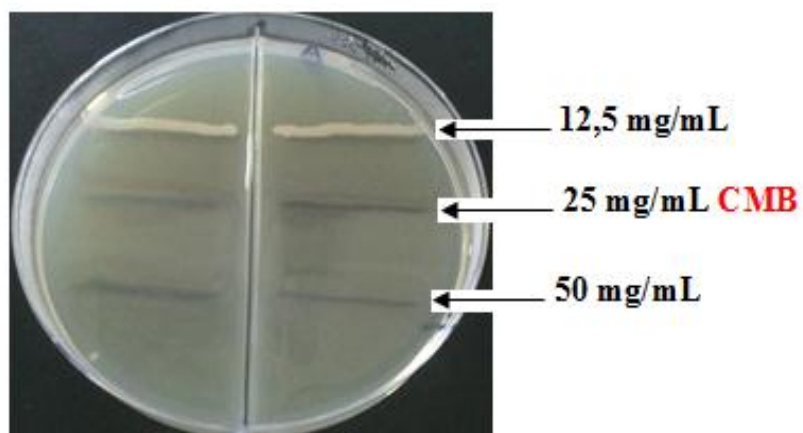


Figure 33 : La CMB de l'extrait butanolique des feuilles de *Prunus persica*.

Tableau 6 : Valeurs des paramètres antibactériens (CMI et CMB) des différents extraits testés sur les souches étudiées de *P. aeruginosa*.

Extraits des plantes			Les isolats testés de <i>P. aeruginosa</i>								CMB/CMI
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	PR	
<i>A. sativum</i>	EA	CMI (%)	3,15	3,15	3,15	6,25	3,15	6,25	6,25	6,25	2
		CMB (%)	6,25	6,25	6,25	12,5	6,25	12,5	12,5	12,5	
<i>L. inermis</i> (V1)	AE	CMI (mg/ml)	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	2
		CMB (mg/ml)	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	
	B	CMI (mg/ml)	3,15	3,15	3,15	3,15	3,15	3,15	3,15	3,15	1-2
		CMB (mg/ml)	6,25	6,25	3,15	6,25	3,15	6,25	3,15	6,25	
<i>L. inermis</i> (V2)	AE	CMI (mg/ml)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	1
		CMB (mg/ml)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	
	B	CMI (mg/ml)	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	1
		CMB (mg/ml)	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	
<i>P. persica</i>	AE	CMI (mg/ml)	50,0	50,0	50,0	50,0	25,0	25,0	25,0	25,0	1
		CMB (mg/ml)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	
	B	CMI (mg/ml)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	1
		CMB (mg/ml)	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	

EA : Extrait aqueux d'ail

AE : Fraction d'acétate éthylique

B : Fraction butanolique

II.4.3. L'effet des extraits préparés sur la formation de biofilm par des souches de *Pseudomonas aeruginosa*

II.4.3.1. L'effet d'extrait aqueux d'*Allium sativum*

L'effet des concentrations sub-inhibitrices de l'extrait aqueux de l'ail frais sur la formation des biofilms par les souches de *P. aeruginosa* a été étudié. Les résultats ont prouvé que le taux de formation des biofilms a été diminué par l'augmentation de la concentration de l'extrait. On a enregistré une diminution d'absorbance de 0,908 à 0,135 pour la souche de référence de *P. aeruginosa* ATCC 27853 ce qui signifie une réduction de 85% par la concentration de 3,15% (1/2 CMI) (Figures 34, 35, 36 et tableau 7).

D'après Bjarnsholt *et al.* (2005) et Rasmussen *et al.* (2005), l'extrait d'ail a augmenté la susceptibilité de *P. aeruginosa* à la tobramycine et à la phagocytose. Cet extrait a inhibé aussi l'expression des facteurs de virulence extracellulaires tels que l'alginate, la pyoverdine, l'hémolysine et la phospholipase C (Harjai *et al.*, 2010). Dans un modèle d'infection de poumon, Bjarnsholt *et al.* (2005) ont montré que l'extrait d'ail a un effet sur le système de régulation QS où le biofilm de *P. aeruginosa* de type sauvage traité par l'extrait d'ail et le biofilm de *P. aeruginosa* de type mutant déficients en QS (*AlasR*, *rhlR*) traité et non traité avec l'ail ont provoqué *in vitro* une activation des leucocytes polymorphonucléaires (neutrophiles) humains (PMN) alors que le biofilm de *P. aeruginosa* de type sauvage non traité par l'extrait d'ail n'a montré aucune activation des PMN. *In vivo*, l'effet de l'ail a été démontré chez des souris, traitées prophylactiquement avec un extrait d'ail. Les résultats ont indiqué que le taux de mortalité chez les souris atteintes d'une infection pulmonaire de *P. aeruginosa* a été réduit, probablement en raison de l'activation de PMN dans les tissus pulmonaire, ce qui a entraîné une augmentation de la clairance bactérienne (Bjarnsholt *et al.*, 2005). L'étude de Ourvind *et al.* (2015) a montré aussi l'efficacité antimicrobienne et antibiofilm de l'extrait aqueux (jus) d'*A. sativum* contre *Enterococcus faecalis*. Une étude sur deux extraits aqueux et un extrait de toluène a enregistré une réduction significative dans la production des molécules de signal de quorum sensing (MSQS), la formation de biofilm et sur les trois types de mobilité (swarming, swimming et twitching) chez des isolats cliniques de *P. aeruginosa* et la souche PAO1 comparativement avec les isolats cultivés en absence des extraits (Harjai *et al.*, 2014). L'extrait d'ail a réduit la réponse LuxR, AhyR et TraR de QS chez *E. coli* et *A. tumefaciens* (Bodini *et al.*, 2009). Une étude de Jakobsen *et al.* (2012) a montré que l'extrait d'ail et son composant actif (ajoène) augmentent la susceptibilité des biofilms constitués par des isolats pulmonaires

de *P. aeruginosa* à la tobramycine. Une étude *in vivo* dans un modèle de lapin, il a été constaté que l'allicine inhibe la formation de biofilm et améliore l'effet bactéricide de la vancomycine contre *S. epidermidis* sur les surfaces implantaires des infections articulaires prothétiques (Zhai *et al.*, 2014).

Tableau 7 : Effet de l'extrait d'*Allium sativum* sur la formation de biofilm par des isolats testés de *P. aeruginosa*.

Les isolats testés	Concentration (mg/ml)						Var rés	F et sig
	0%	0,4%	0,8%	1,58%	3,12%	6,25%		
P1	0,64a	0,48b	0,26c	0,18c	0,00d	0,00d	0,003	73,8***
P2	0,53a	0,36b	0,26c	0,19d	0,00e	0,00e	0,001	145,8***
P3	0,52a	0,38b	0,33b	0,25c	0,00d	0,00d	0,001	127,5***
P4	0,50a	0,39b	0,30c	0,23cd	0,17d	0,00e	0,002	42,4***
P5	0,69a	0,40b	0,31c	0,18d	0,00e	0,00e	0,001	218,5***
P6	0,60a	0,47b	0,36c	0,26d	0,16e	0,00f	0,002	60,9***
PR	0,91ab	0,68	0,50c	0,33d	0,17e	0,00f	0,005	73,8***

a, b, c, d, e, f : les lettre différentes sur la même ligne indiquent des moyennes significativement différentes ($P < 0.001$).

Var_{rés} : variance résiduelle.

F : formule de Fisher

Sig : signification

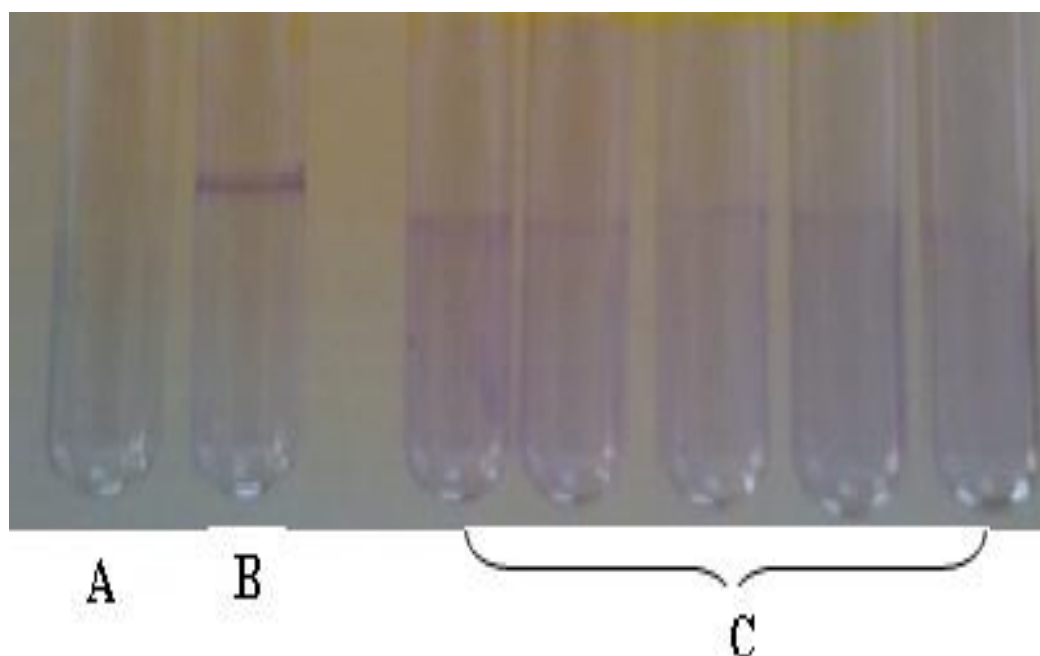


Figure 34 : Effet de l'extrait d'*A. sativum* sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa* ATCC 27853 (méthode en tubes). A : control négative, B : Témoin, C : biofilm traité par l'extrait.

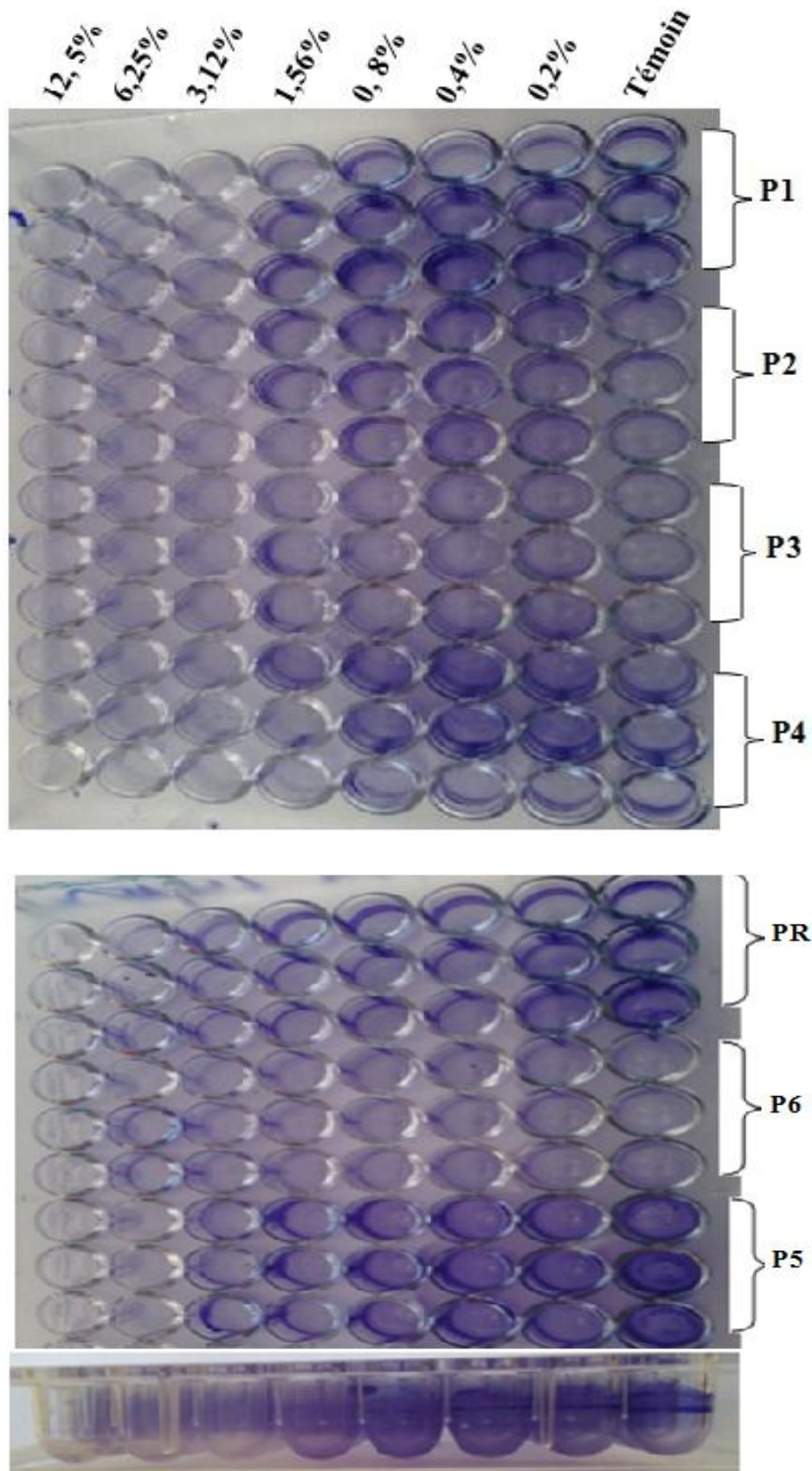


Figure 35 : Effet de l'extrait d'*Allium sativum* sur la formation de biofilm par les isolats testés de *Pseudomonas aeruginosa*.

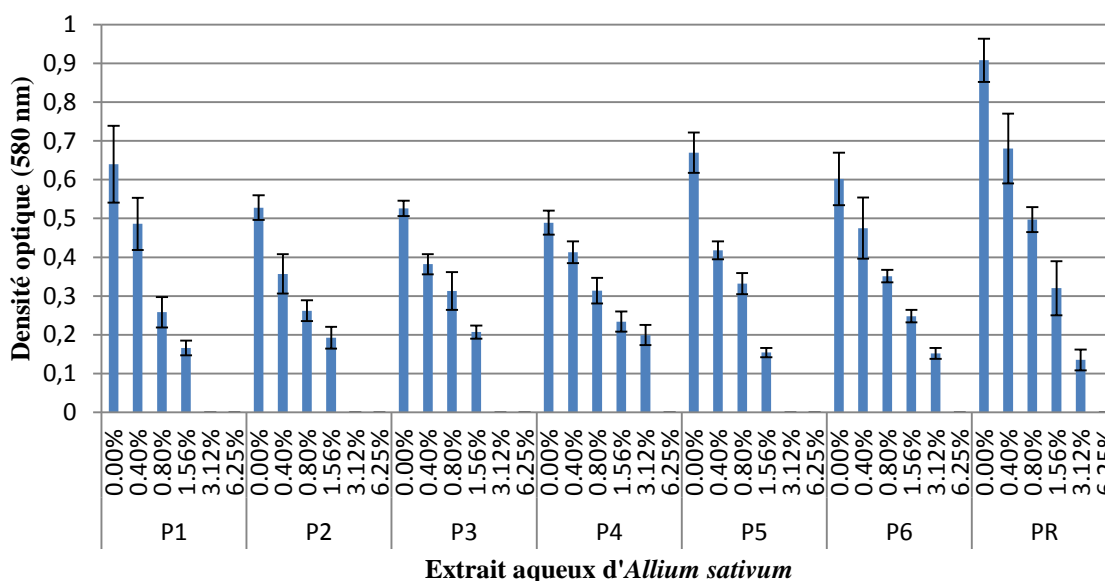


Figure 36 : Effet d'extrait d'*Allium sativum* sur la formation des biofilms par les isolats testés de *Pseudomonas aeruginosa*.

II.4.3.2. L'effet des extraits des deux variétés de *Lawsonia inermis*

Les concentrations sub-inhibitrices de la croissance des extraits des deux variétés testées de *L. inermis* ont été examinées sur la formation de biofilm chez *P. aeruginosa*. Les résultats (Figures 37, 38, 39, 40, tableau 8 et 9) ont montré que les fractions butanolique peuvent réduire la formation de biofilm par les deux variétés testées à une concentration de 1/2 CMI indiqué par une diminution de la quantité des biofilms attachés aux paroi des puits des microplaques et des tubes. Alors que la comparaison de la quantité des biofilms formés en présence des concentrations inférieures à la concentration 1/2 CMI avec les biofilms non traités par les extraits a montré une stimulation de la formation du biofilm. La même remarque a été enregistrée pour les fractions d'acétate d'éthyle pour les deux variétés testées où les concentrations sub-inhibitrices entraînées une stimulation de la formation de biofilm chez la majorité des isolats testés de *P. aeruginosa* par les deux méthodes utilisées (Figures 41, 42, 43 et 44).

Les extraits végétaux et les produits phytochimiques ont été reconnus comme des traitements efficaces contre les infections microbiennes dont la plupart d'entre eux sont inoffensifs pour la santé humaine. Durant les dernières années, les extraits végétaux et phytochimiques ont également été mis en évidence comme des inhibiteurs du système de quorum sensing (QSI). Atkinson et Williams (2009) ont démontré que les mécanismes du QS

amplifient la virulence bactérienne en stimulant l'expression d'attributs pathologiques, tels que la motilité, la sécrétion des facteurs de virulence et la formation de biofilm.

Les flavonoïdes ont fait l'objet de recherches pendant de nombreuses années principalement en raison de leur rôle en tant qu'agents antioxydants, anti-inflammatoires et anticancéreux. Les teneurs en flavonoïdes de *L. inermis* telles que la quercétine et l'apigénine ont été évaluées pour leurs activités anti-QS. Vikram *et al.* (2010) ont rapporté une modulation potentielle de la communication cellule-cellule bactérienne, en diminuant la formation de biofilm d'*Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) et sur la virulence de *Vibrio harveyi*, par les deux composés flavonoïques quercétine et apigénine.

Tableau 8 : Effet de l'extrait butanolique de *L. inermis* de la région d'Adrar sur la formation de biofilm chez les isolats testés de *P. aeruginosa*.

Les souches testées	Concentration (mg/ml)					Var _{rés}	F et sig
	0	0,4	0,8	1,58	3,12		
P1	0,441b	0,516ab	0,602a	0,224c	0,00d	0,004	45,4***
P2	0,53a	0,49a	0,49a	0,29b	0,00c	0,006	24,2***
P3	0,500abc	0,510abc	0,574a	0,374c	0,00d	0,006	25,4***
P4	0,500a	0,382b	0,318bc	0,221c	0,00d	0,004	30,1***
P5	0,650a	0,692a	0,814a	0,221b	0,00c	0,005	66,6***
P6	0,536a	0,596a	0,620a	0,344b	0,00c	0,005	39,1***
PR	0,924a	0,952a	0,996a	0,561b	0,00c	0,006	88,2***

a, b, c, d : les lettres différentes sur la même ligne indiquent des moyennes significativement différentes ($P < 0.001$) ; Var_{rés} = variance résiduelle.

F : formule de Fisher

Sig : signification

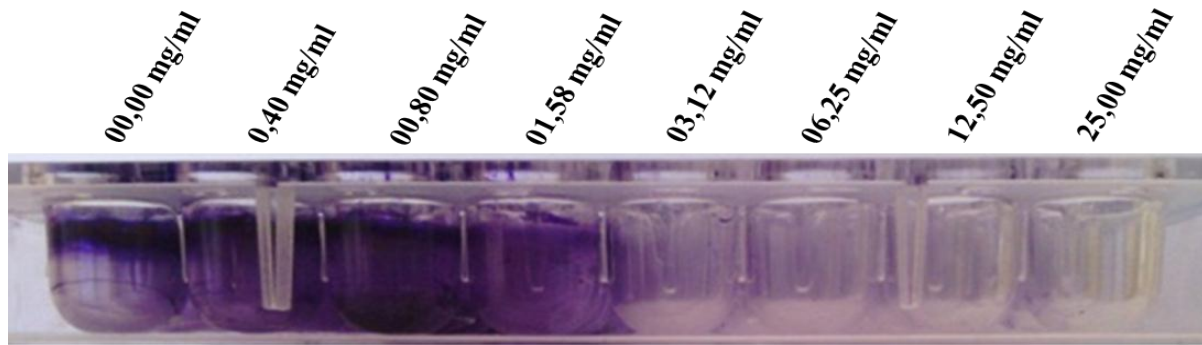


Figure 37 : Effet de l'extrait butanolique de *Lawsonia inermis* de la région d'Adrar sur la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

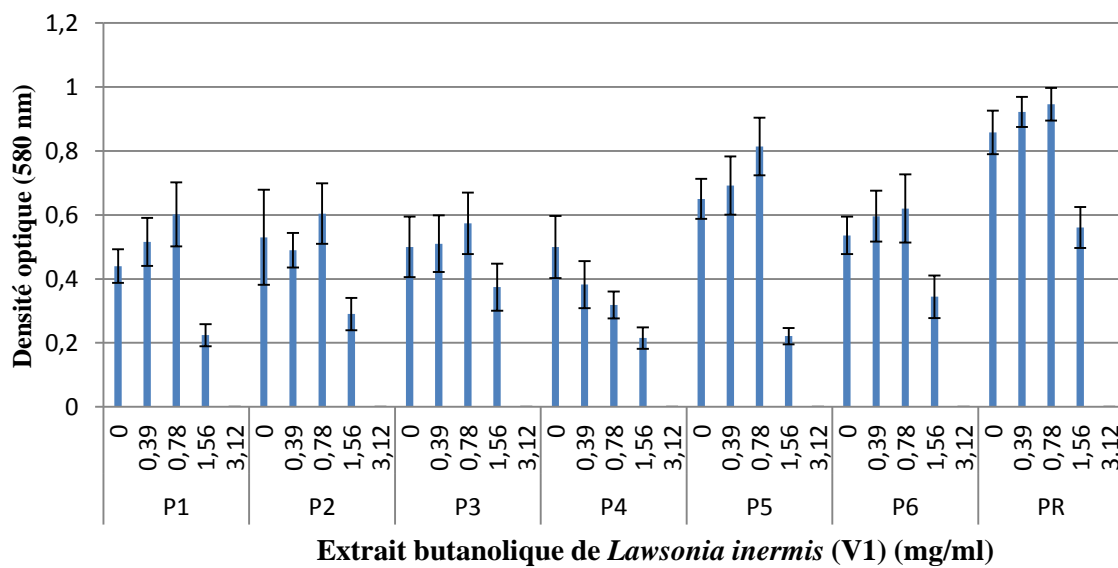


Figure 38 : Effet de l'extrait butanolique de *Lawsonia inermis* de la région d'Adrar sur la formation de biofilm par les souches testées de *Pseudomonas aeruginosa*.

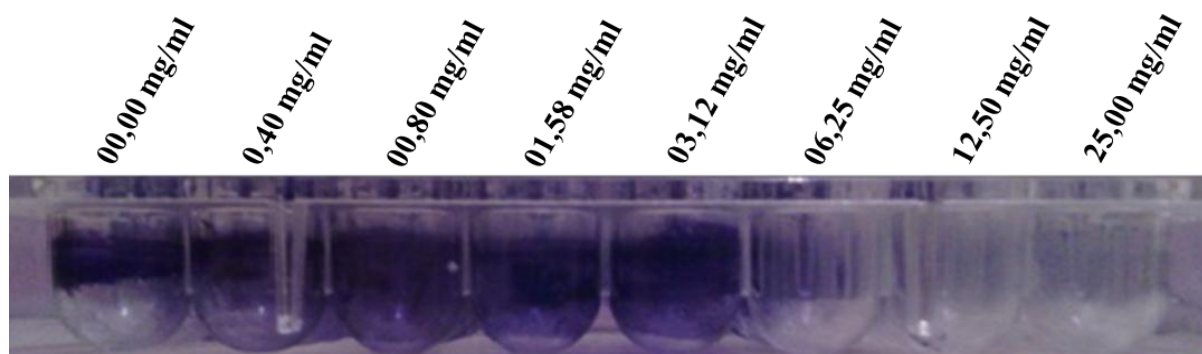


Figure 39 : Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Lawsonia inermis* de la région d'Adrar sur la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

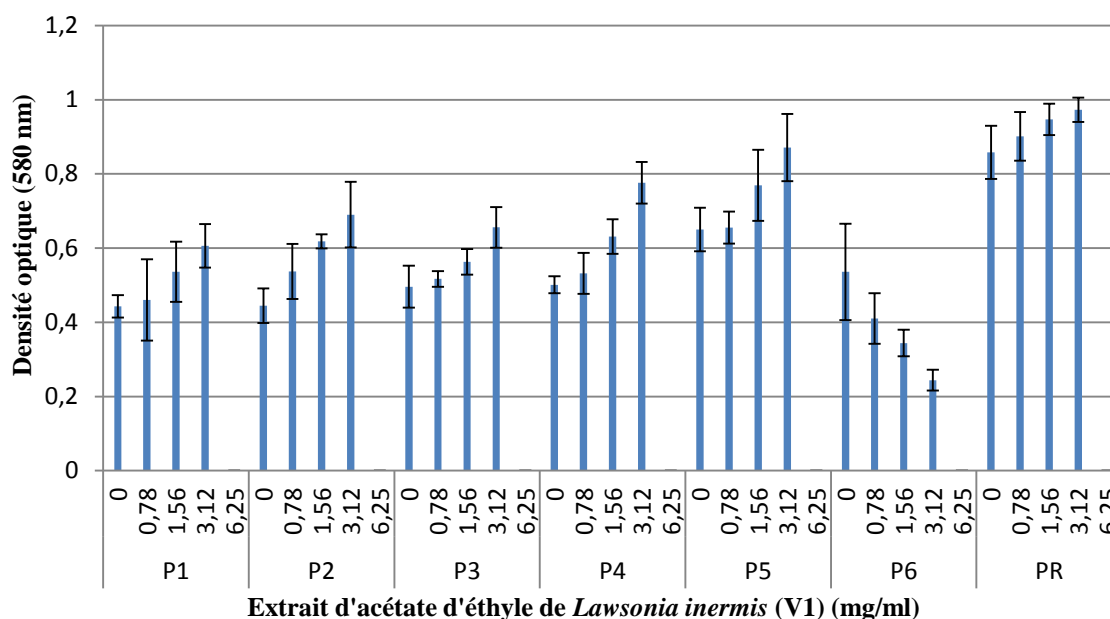


Figure 40 : Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Lawsonia inermis* de la région d'Adrar sur la formation de biofilm par les souches testées de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 9 : Effet de l'extrait butanolique de *L. inermis* de la région de Biskra sur la formation de biofilm chez les isolats testés de *P. aeruginosa*.

Les souches testées	Concentration (mg/ml)					Var rés	F et sig
	0	0,8	1,58	3,12	6,25		
P1	0,44b	0,52b	0,63a	0,34c	0,00d	0,002	70,6***
P2	0,44ab	0,51a	0,59a	0,28c	0,00d	0,003	62,3***
P3	0,49c	0,61b	0,73a	0,30d	0,00e	0,004	61,1***
P4	0,49a	0,55a	0,59a	0,29b	0,00c	0,005	33,5***
P5	0,74b	0,77b	0,89a	0,45c	0,00d	0,003	149,4***
P6	0,53b	0,66a	0,78a	0,25c	0,00d	0,005	64,3***
PR	0,90b	0,86b	0,96a	0,62c	0,00d	0,003	169,6***

a, b, c, d, e : les lettres différentes sur la même ligne indiquent des moyennes significativement différentes ($P < 0.001$) ; Var_{rés} = variance résiduelle.

F : formule de Fisher

Sig : signification

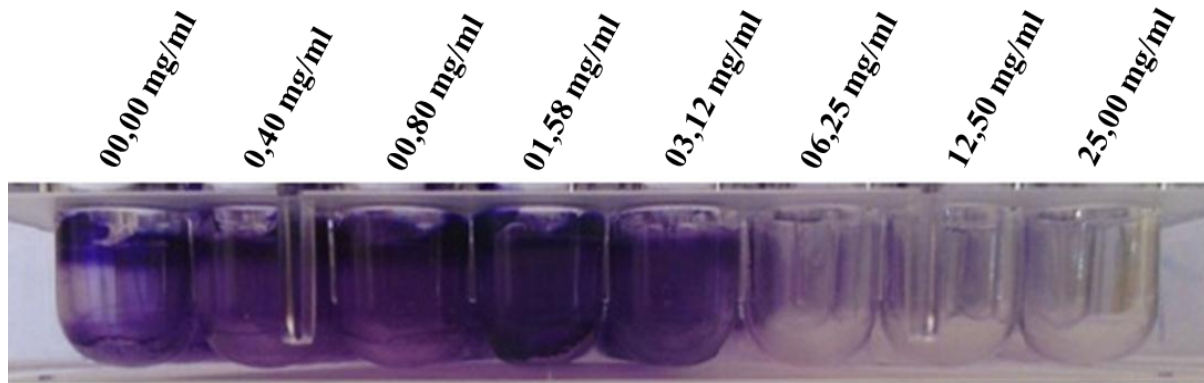


Figure 41 : Effet de l'extrait butanolique de *Lawsonia inermis* de la région de Biskra sur la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

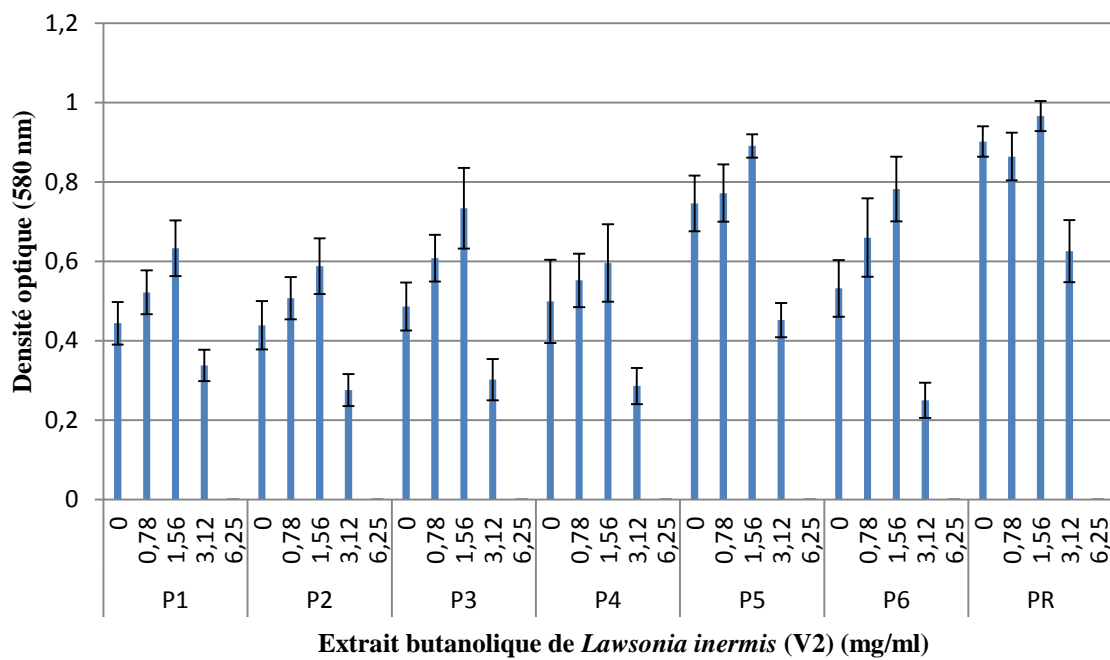


Figure 42 : Effet de l'extrait butanolique de *Lawsonia inermis* de la région de Biskra sur la formation de biofilm par les isolats testés de *Pseudomonas aeruginosa*.

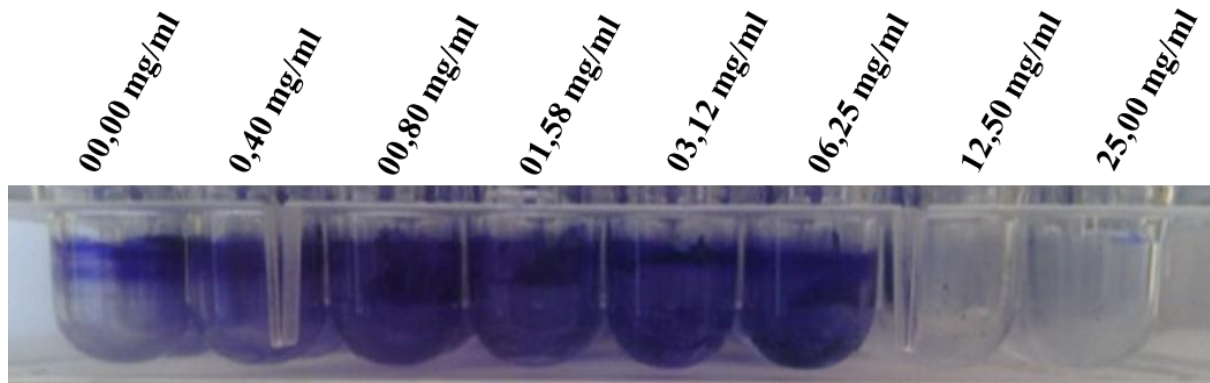


Figure 43 : Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle de *L. inermis* de la région de Biskra sur la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

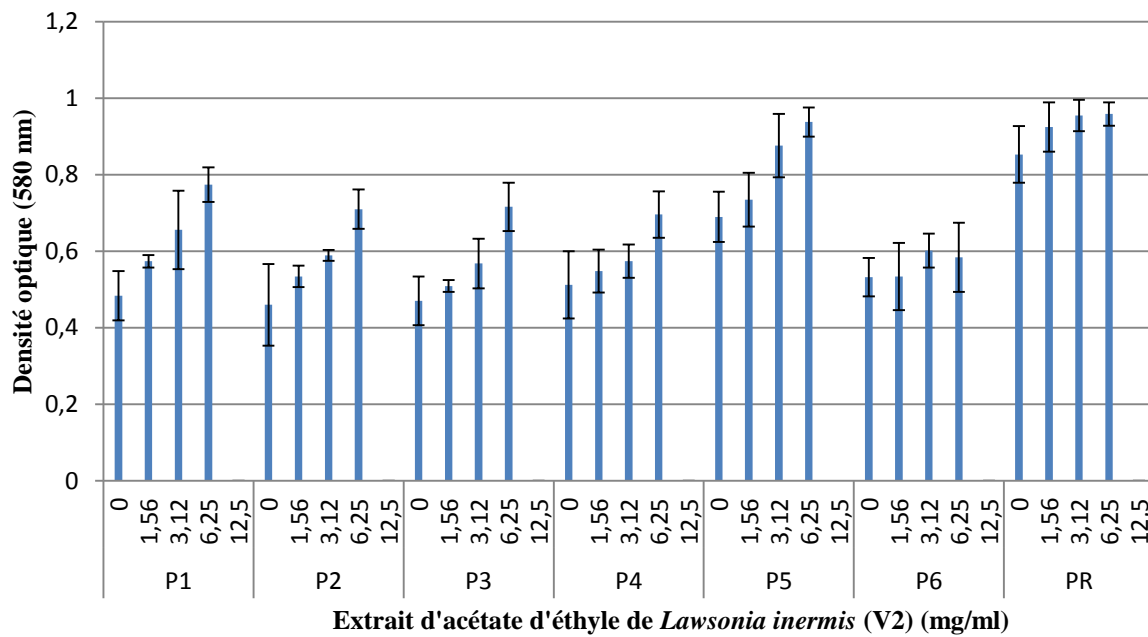


Figure 44 : Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Lawsonia inermis* de la région de Biskra sur la formation de biofilm par les souches testées de *Pseudomonas aeruginosa*.

II.4.3.3. L'effet des extraits de *Prunus persica*

Les résultats obtenus de l'effet des concentrations sub-inhibitrices des extraits testés (acétate d'éthyle et butanolique) des feuilles de *P. persica* sur la formation de biofilm des isolats de *P. aeruginosa* (Figures 45 et 46) montrent une augmentation progressive dans la quantité de biofilm adhérente aux parois des puits des microplaques par l'augmentation de la concentration des extraits jusqu'à la concentration 1/2 CMI de l'extrait butanolique où on a enregistré une légère diminution dans la quantité de biofilm adhérente à la paroi, mais cette quantité formée est restée toujours élevée comparativement à la quantité de biofilm non traitée par les extraits.

La stimulation de la formation des biofilm sous l'effet de la présence des concentrations sub-inhibitrices des extraits de *P. persica* et les extraits d'acétate d'éthyle de *L. inermis* et même pour les faibles concentrations de l'extrait butanolique (concentrations < 1/2CMI) de *L. inermis* peut être dû à la présence des substances à effet stimulateur de formation de biofilm chez *P. aeruginosa*. Comme il peut être dû à l'adaptation de la bactérie à la présence des concentrations sub-inhibitrices des extraits testés dans le milieu de culture. Ce cas a été observé lors de traitement des bactéries par des concentrations sub-inhibitrices des antibiotiques. Hoffman *et al.* (2005) ont montré que les concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques d'aminoglycosides induisent une formation de biofilm chez *P. aeruginosa* et *Escherichia coli*. Chez *P. aeruginosa*, un gène régulateur de réponse à l'aminoglycoside (*arr*), était essentiel pour cette induction et contribue dans la résistance spécifique du biofilm aux aminoglycosides. Le gène *arr* devrait coder pour une phosphodiesterase de la membrane interne dont le substrat est le di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP) un deuxième messager bactérien qui régule l'adhésivité de la surface cellulaire. L'étude de Elisabetta *et al.* en 2009 a indiqué que l'exposition de *Acinetobacter baumannii* à des concentrations sub-inhibitrices d'imipénème (0,03-0,125 µg/ml) entraîne une stimulation de l'adhérence jusqu'à 3 fois. La formation de biofilm par *Staphylococcus aureus* BWMR22 a été améliorée en présence des concentrations sub-inhibitrices de la vancomycine, où le traitement par cet antibiotique a provoqué une augmentation de la composition chimique de la protéine par rapport aux glucides des vésicules membranaires (VM) sécrétés, une propriété fortement associée à l'hydrophobie bactérienne, à l'adhésion de surface et à l'agrégation intercellulaire (He *et al.*, 2017). Une étude réalisée par Jaimee et Prakash en 2017 montre que la formation de biofilm a considérablement augmenté lorsque *Lactobacillus plantarum* MCC 3011 a été cultivée en présence de concentrations sub-inhibitrices de gentamicine (4 µg/ml), de kanamycine (8 µg/ml) et de streptomycine (2 µg/ml). Cette étude indique aussi que l'exposition constante aux

concentrations sub-inhibitrices de gentamicine permet à *L. plantarum* de s'adapter aux doses plus élevées d'aminoglycosides.

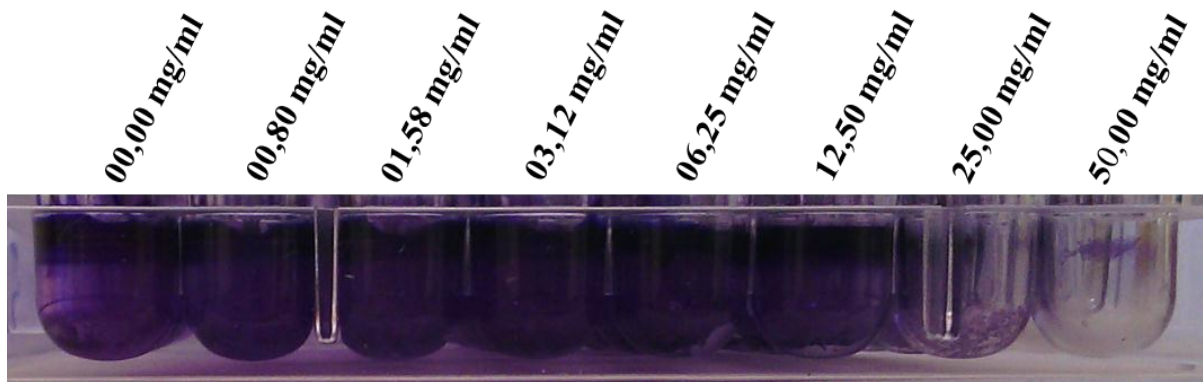


Figure 45 : Effet de l'extrait butanolique de *Prunus persica* sur la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

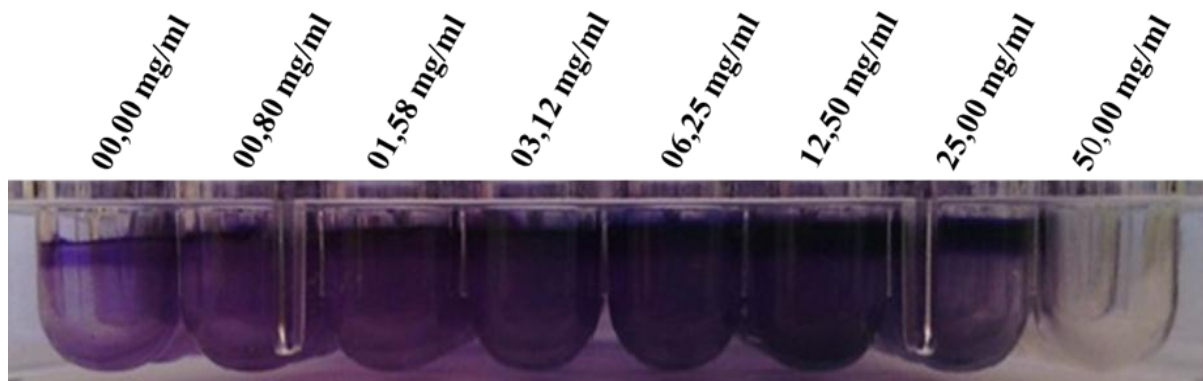


Figure 46 : Effet de l'extrait d'acétate d'éthyle de *P. persica* sur la formation de biofilm à *P. aeruginosa* ATCC 27853.

II.5. Résultats des analyses par HPLC des fractions testées de *P. persica* et de deux variétés de *L. inermis*

Les profils chromatographiques de différentes fractions de deux variétés de *L. inermis* et de *P. persica* analysées sont représentés au niveau des figures 47, 48, 49, 50, 51 et 52. Les profils HPLC montrent des composés mentionnés par leurs pics et leurs temps de rétention dans les spectres des extraits étudiés. Les résultats sont présentés dans le tableau 10 et 11.

La comparaison entre les chromatogrammes enregistrés par les fractions d'acétate d'éthyle et les fractions butanolique de deux variétés de *L. inermis* montre la richesse de la fraction butanolique en composé mentionnés par leurs pics. Cette richesse est plus remarquée dans la partie située entre 20 et 40 min dans les chromatogrammes des fractions butanolique dont certains sont absent dans les fractions d'acétate d'éthyle. On a enregistré aussi dans cette partie que les composés présentent dans les deux fractions sont à des pourcentages élevé dans les fractions butanolique a celui dans les fractions d'acétate d'éthyle. Ce qui signifie la différence de composition entre les deux fractions testés de *L. inermis*. La même observation a été enregistrée entre les deux fractions testés de *P. persica*.

La comparaison entre les deux variétés testées de *L. inermis* montre la présence de quelques différences, où on a enregistré des pics dans la fraction butanolique de *L. inermis* de la région de Biskra qui ne sont pas détecté dans la fraction butanolique de *L. inermis* de la région d'Adrar. Puis une différence a été enregistrée dans les pourcentages des composés détectés où la fraction butanolique de la *L. inermis* de la région d'Adrar présente des pourcentages élevé comparativement à celui de la région de Biskra (Tableau 10), qui signifie que les quantités des composés diffèrent d'une variété à une autre. Cette variabilité dans la composition entre les deux variétés pourrait être liée aux conditions climatiques des endroits testés (Adrar et Biskra). Cette remarque a été notée lors d'une étude menée par Gallo *et al.* (2014). Ils ont fait une comparaison de la composition de l'extrait méthanolique des échantillons de feuilles de *L. inermis* originaires des pays différents. Les résultats montrent certaines divergences entre les profils chromatographiques des échantillons testés.

La variabilité de composition enregistrée dans les fractions et les variétés testés de *L. inermis* et *P. persica* peut expliquer l'écart remarqué dans l'activité antibactérienne et l'effet sur la formation du biofilm par les souches de *P. aeruginosa* étudiées.

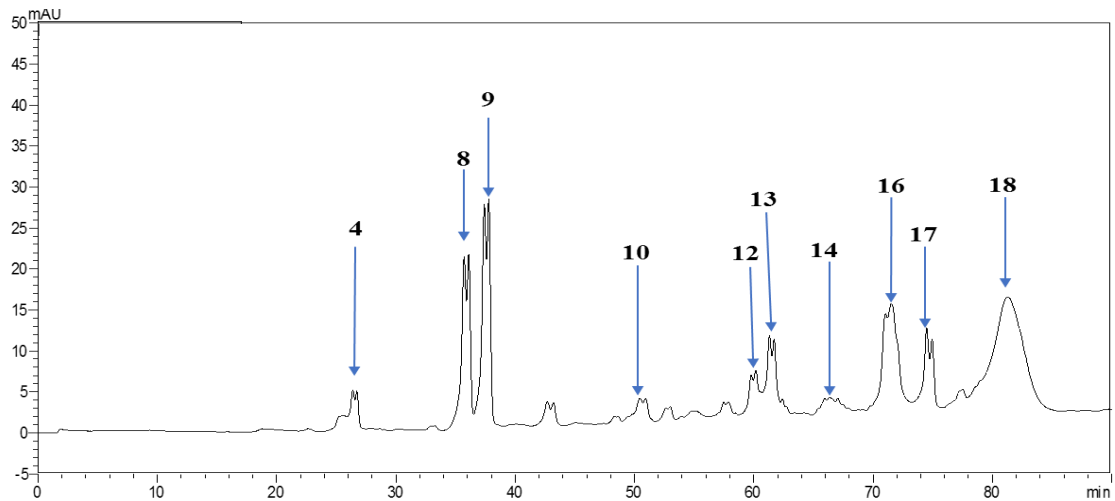


Figure 47 : Profil chromatographique d'extract d'acétate d'éthyle des feuilles de *Lawsonia inermis* de la région d' Adrar.

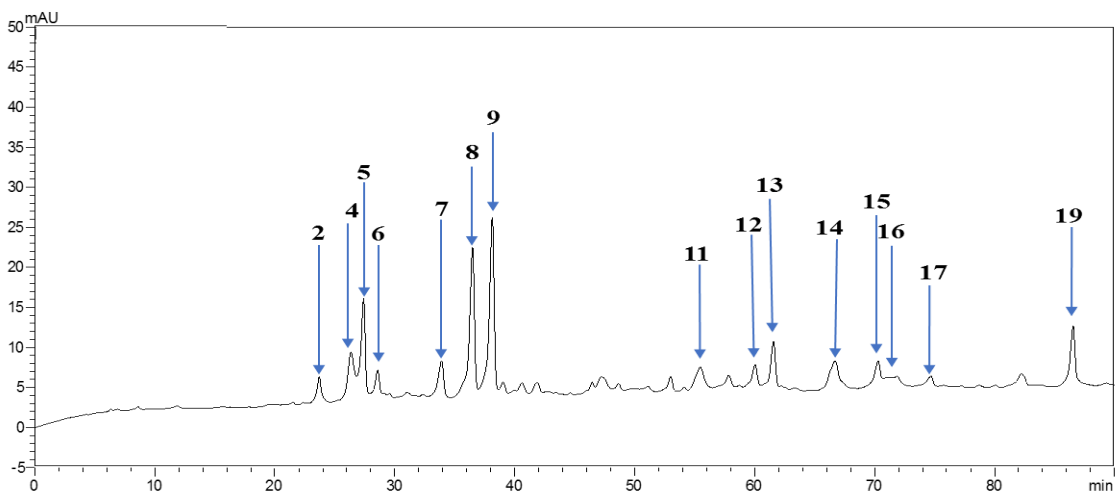


Figure 48 : Profil chromatographique d'extract butanolique des feuilles de *Lawsonia inermis* de la région d' Adrar.

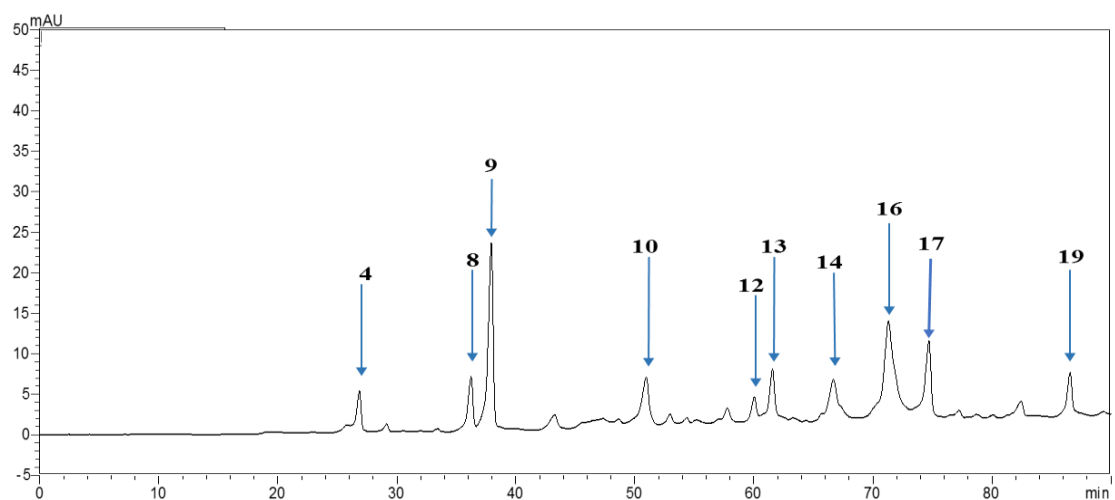


Figure 49 : Profil chromatographique d'extract d'acétate d'éthyle des feuilles de *Lawsonia inermis* de la région de Biskra.

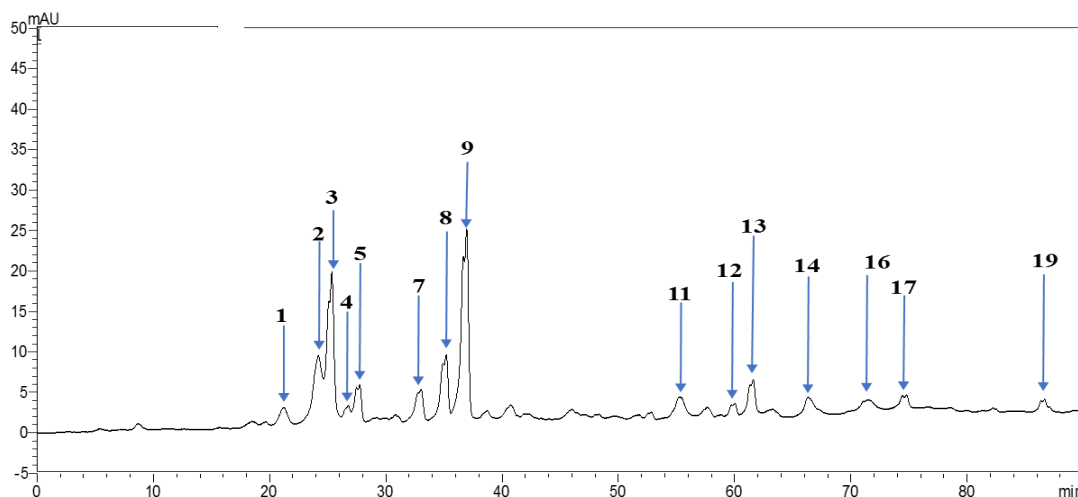


Figure 50 : Profil chromatographique d'extrait butanolique des feuilles de *Lawsonia inermis* de la région de Biskra.

Tableau 10 : Résultat d'analyse par HPLC des fractions testées des deux variétés de *L. inermis*

N° de Pic	Temps de rétention (min)	Pourcentage (%)			
		A1	A2	B1	B2
1	21,20	/	/	/	2,376
2	23,86		2,25	/	10,29
3	25,35	/	/	/	10,290
4	26,55	0,668	5,545	1,918	1,175
5	27,39	/	7,99	/	2,354
6	28,58	/	1,711	/	/
7	33,59	/	3,643	/	4,033
8	36,48	3,756	13,937	3,424	11,918
9	37,92	4,472	15,36	12,582	11,626
10	50,45	1,069	/	4,554	/
11	55,46	/	3,824	/	3,299
12	60,17	1,505	2,388	1,625	0,611
13	61,56	1,956	4,351	3,958	2,147
14	66,70	0,548	6,541	4,643	3,113
15	70,29	/	1,455	/	/
16	71,537	5,941	0,219	12,463	2,017
17	74,50	2,379	1,012	5,434	0,913
18	81,25	20,533	/	/	/
19	86,55	/	6,087	3,19	0,607

A1 : Fraction d'acétate d'éthyle de *L. inermis* de la région d'Adrar

A2 : Fraction butanolique de *L. inermis* de la région d'Adrar

B1 : Fraction d'acétate d'éthyle de *L. inermis* de la région de Biskra

B2 : Fraction butanolique de *L. inermis* de la région de Biskra

/ : Absence de pic

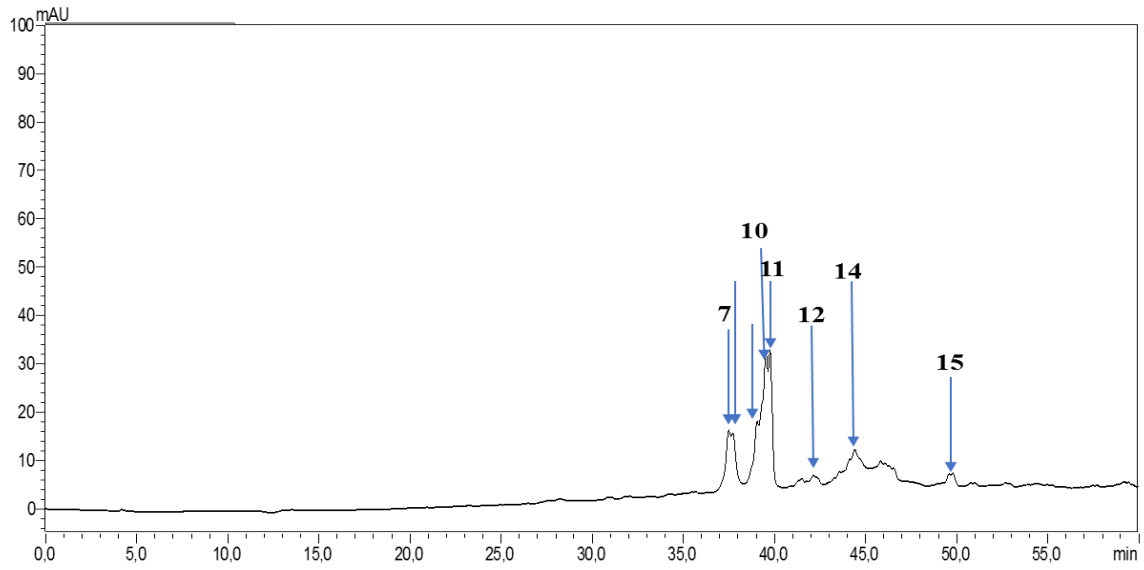


Figure 51 : Profil chromatographique d'extract d'acétate d'éthyle des feuilles de *P. persica*.

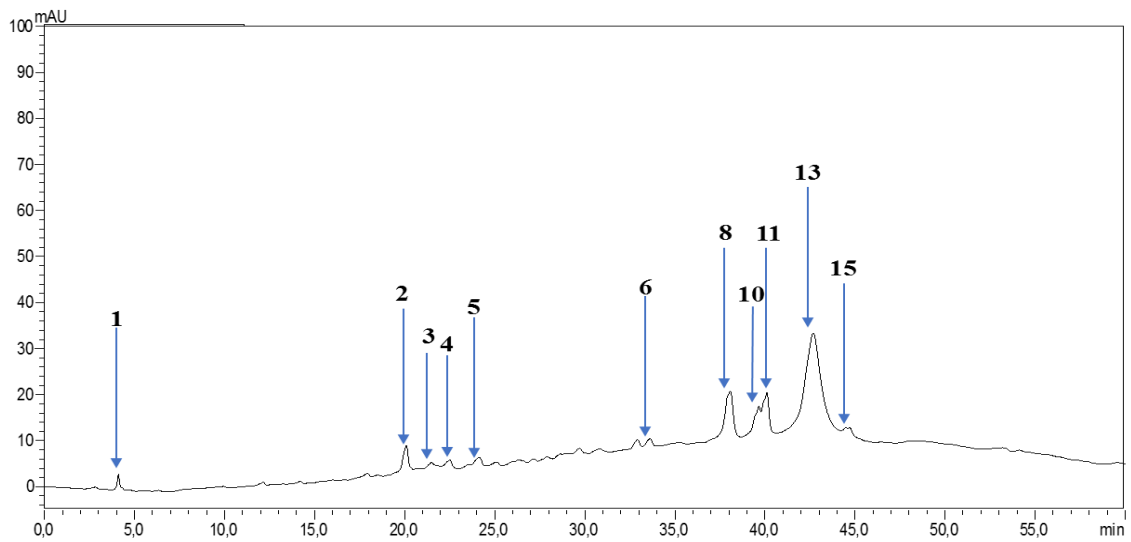


Figure 52 : Profil chromatographique d'extract butanolique des feuilles de *P. persica*.

Tableau 11 : Résultat d'analyse par HPLC des fractions testées de *P. persica*

N° de Pic	Temps de rétention (min)	Pourcentage (%)	
		P1	P2
1	4,11	/	1,139
2	20,09	/	3,69
3	22,50	/	1,631
4	24,13	/	1,945
5	32,92	/	1,227
6	33,62	/	1,261
7	37,49	9,782	/
8	37,82	8,959	11,224
9	39,05	11,359	/
10	39,538	23,929	5,166
11	39,76	15,704	6,923
12	42,14	2,177	/
13	42,68	/	50,98
14	44,409	8,046	0,720
15	49,79	1,456	/

B1 : Fraction d'acétate d'éthyle de *P. persica* de la région de Biskra

B2 : Fraction butanolique de *P. persica* de la région de Biskra

/ : Absence de pic

II.6. Acide salicylique

II.6.1. Concentration minimale inhibitrice

L'activité antibactérienne d'AS a été examinée contre les six isolats de *P. aeruginosa* et *P. aeruginosa* ATCC 27853. Les résultats indiquent que les concentrations d'AS ≥ 10 mM inhibent la croissance des souches dans tous les tubes lorsqu'ils sont observés à l'oeil nu. La CMB de l'acide phénolique (AS) était d'environ 20mM. Les propriétés médicinales de l'acide salicylique sont connues depuis l'Antiquité. Des études sur l'inhibition de la croissance des cellules planctoniques ont démontré des propriétés antimicrobiennes remarquables d'AS (Delaney *et al.*, 1994, Kus *et al.*, 2002, Prithiviraj *et al.*, 2005, Samuel *et al.*, 2011).

II.6.2. Effet de l'acide salicylique sur la formation du biofilm

Pour tester si la présence d'AS a affecté la formation du biofilm chez *P. aeruginosa*, les souches ont été inoculées dans le milieu de culture en présence des concentrations sub-inhibitrices d'AS (0,5, 1, 2 et 4 mM). Les résultats obtenus indiquent que l'addition d'AS réduit la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* par rapport au témoin non traité par l'AS (Figures 53, 54 et tableau 12). Ce résultat est confirmé par des études qui montrent que l'AS pouvait réduire la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (Prithiviraj *et al.*, 2005, Da *et al.*, 2010, Samuel *et al.*, 2011). Les films des polymères libérant l'acide salicylique inhibent la formation de biofilm, comme le montrent les bioluminescents et les GFP dans des souches de *P. aeruginosa* et de *E. coli* (Nowatzki *et al.*, 2012). Rosenberg *et al.* (2008) et Nowatzki *et al.* (2012) ont constaté que les polymères à base d'acide salicylique réduisaient significativement la formation de biofilm par *Salmonella typhimurium* et *E. coli*.

Une hypothèse qui pourrait expliquer l'inhibition du biofilm observée est que l'AS affecte d'une façon ou d'une autre le système de communication de QS en tant que nécessaire à la différenciation des cellules au biofilm mature (Davies *et al.*, 1998). Des données fournies par certaines études ont montré que les mutants avec un manque de QS forment des biofilms déstructurés et sensibles aux agents chimiques par rapport aux types sauvages (Bjarnsholt *et al.*, 2005). Yang *et al.* (2009) ont signalé que l'AS supprimait l'expression de gènes associés au système de signalisation QS chez *P. aeruginosa* par l'inhibition de LasR, Rhl et Pqs. L'interférence avec le QS peut affecter la formation du biofilm et rendre les bactéries plus sensibles aux antimicrobiens (Landini *et al.*, 2010).

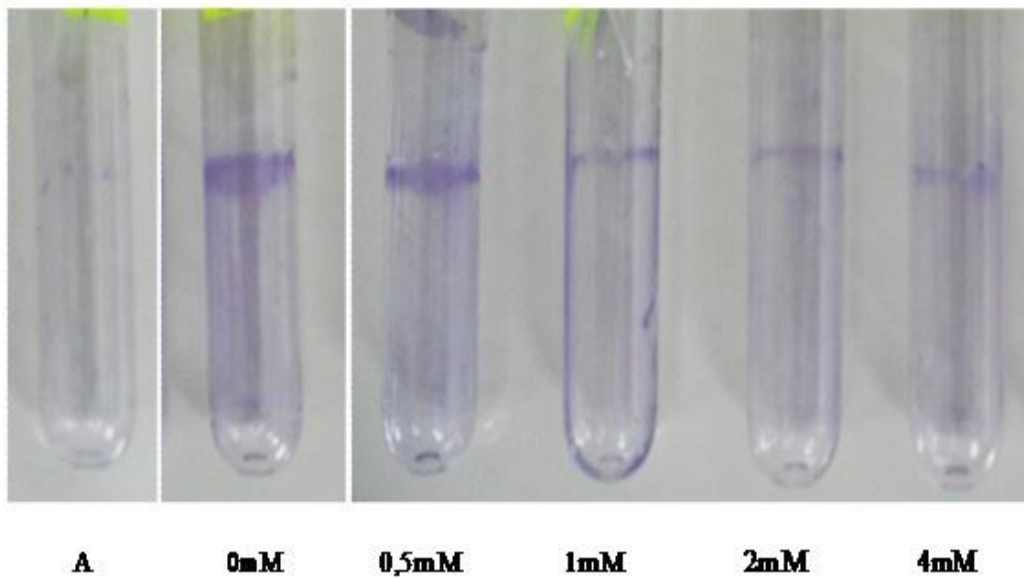


Figure 53 : Effet de l'acide salicylique sur la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853: A : control négatif (tube non inoculé).

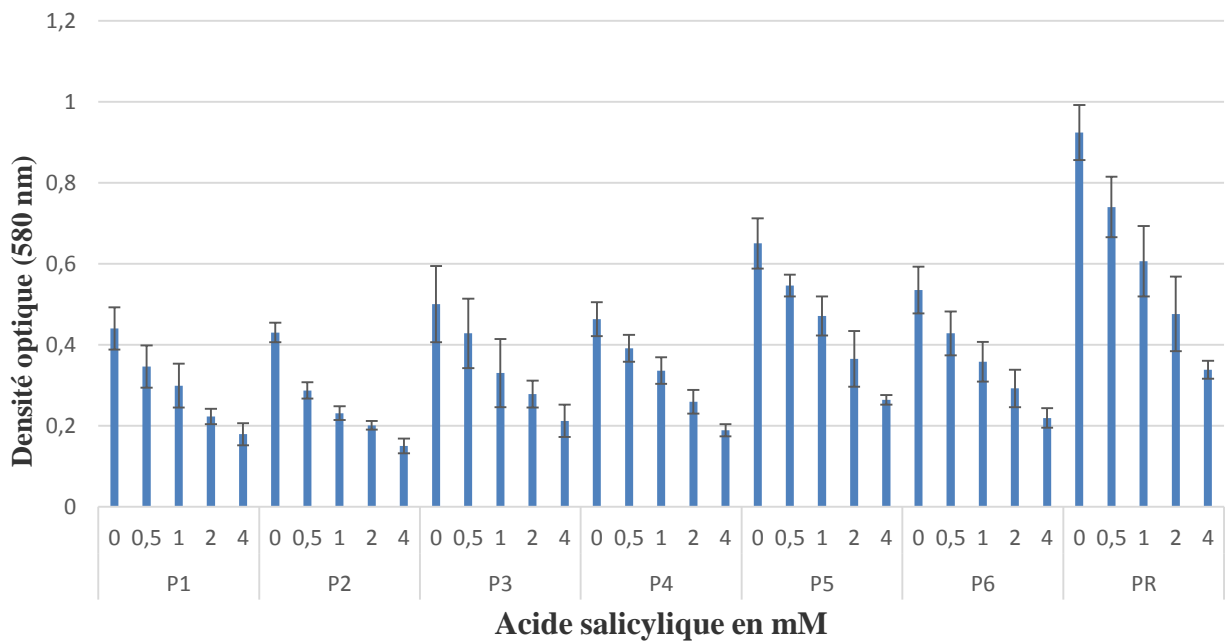


Figure 54 : Réduction de la formation du biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et les six isolats cliniques en présence de 0.5, 1, 2 et 4 mM d'AS.

Tableau 12 : Effet de l'acide salicylique sur la formation des biofilms par les isolats testés de *P. aeruginosa*.

Souche	Concentrations de l'acide salicylique (mM)					σ rés	F et sig
	0	0,5	1	2	4		
P1	0,44a	0,35b	0,30bc	0,22cd	0,18d	0,002	16,4***
P2	0,43a	0,29b	0,23c	0,20c	0,15d	0,00	96,7***
P3	0,50a	0,43b	0,33bc	0,28bc	0,21c	0,005	7,6**
P4	0,46a	0,39b	0,34b	0,26c	0,19d	0,001	33,5***
P5	0,65a	0,55b	0,47b	0,37c	0,26d	0,002	28,3***
P6	0,54a	0,43b	0,36bc	0,29cd	0,22d	0,002	19,2***
PR	0,92a	0,74b	0,61bc	0,48cd	0,34d	0,006	24,2***

a, b, c, d : les lettres différentes sur la même ligne indiquent des moyennes significativement différentes ($P < 0,001$) ; σ rés = variance résiduelle.

F : formule de Fisher

Sig : signification

II.6.3 Effet de l'acide salicylique sur la mobilité

L'essaimage sur une surface (Swarming) est un type de motilité complexe régulée par le système de régulation du quorum sensing qui se produit sur des surfaces semi-solides et nécessite des flagelles, des pili de type IV et une production de biosurfactants (Pamp et Tolker-Nielsen, 2007). La motilité chez *P. aeruginosa* joue un rôle vital dans l'attachement initial pour former le biofilm (Arora *et al.*, 2005). Les concentrations sub-inhibitrices (0, 0.5, 1, 2 et 4 mM) d'AS ont diminué la motilité de type swarming dans toutes les souches étudiées de *P. aeruginosa* (Figures 55). Samuel *et al.* (2011) ont mené des tests de motilité sur des souches de *P. aeruginosa* de type sauvage et des mutants des flagelles et des pili de type IV et ont constaté que l'acide salicylique avait des effets significatifs dans la diminution de la mobilité de type swarming, swimming et twitching. La motilité de type swarming s'est avérée importante pour les premiers stades de la formation du biofilm (Shrout *et al.*, 2006). Elle se produit en surmontant les forces répulsives à longue portée qui facilitent le rapprochement des surfaces, permettant une adhérence de surface accélérée (Karatan et Watnick, 2009). Houry *et al.* (2010) ont également signalé l'importance de la motilité dans la formation de biofilm de *B. cereus* dans des plaques de microtitrage.

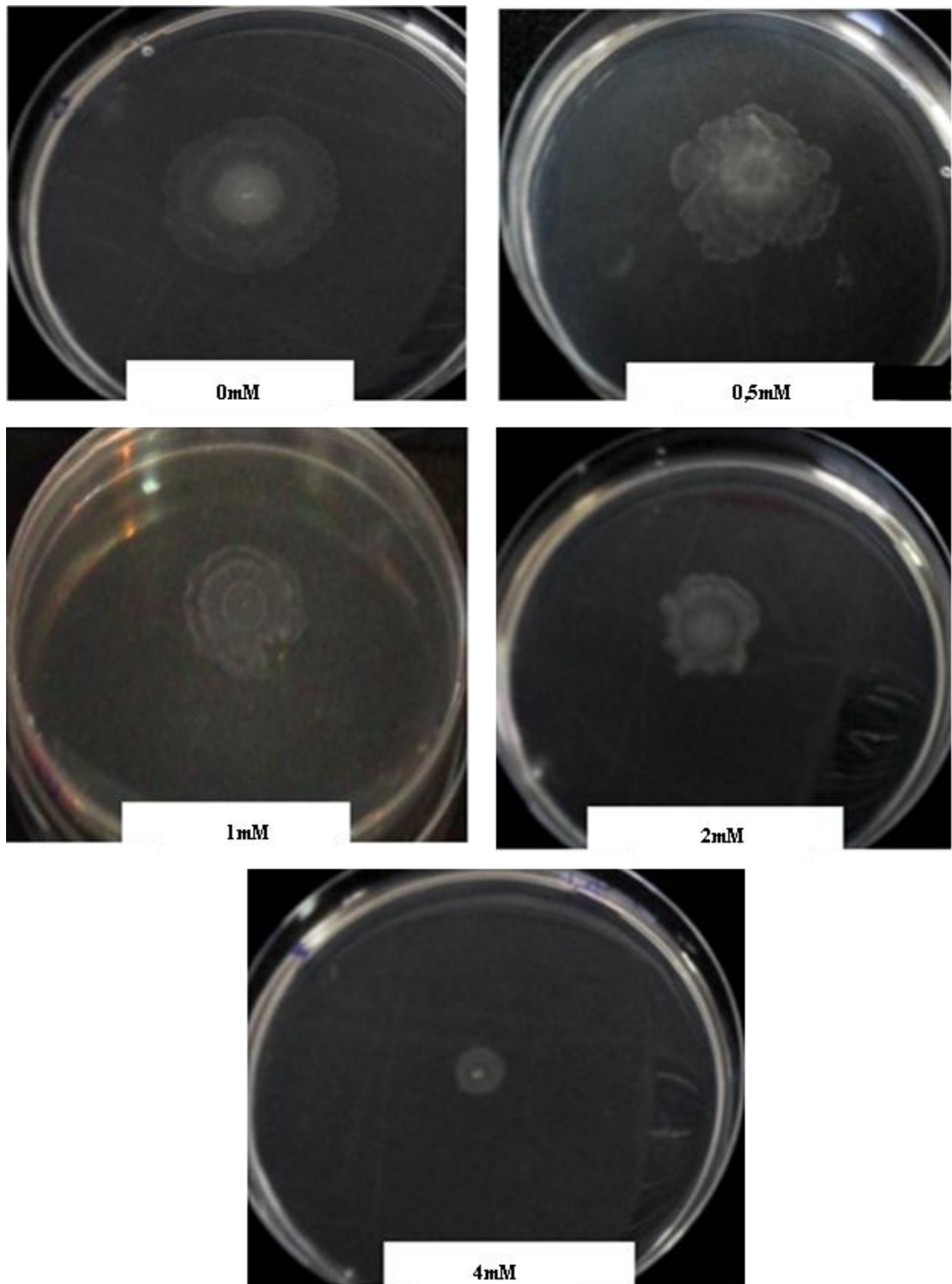


Figure 55 : Effet de l'acide salicylique sur la motilité de type swarming chez *Pseudomonas aeruginosa*.

II.6.3. Effet de l'acide salicylique sur la production de pyocyanine

La pyocyanine est une phénazine bleu-vert produite par les souches de *P. aeruginosa* (Dietrich *et al.*, 2006). Elle est l'une des nombreuses molécules contrôlées par le QS, synthétisées à des densités cellulaires élevées et associées à la formation de biofilm (Costerton *et al.*, 1999).

Nous avons testé l'effet de l'AS sur la production de pyocyanine par les souches testées de *P. aeruginosa*. L'addition d'AS au milieu de culture a réduit la production de pyocyanine (Figures 56 et 57). Prithiviraj *et al.* (2005) ont montré que l'addition de 0,1 mM d'AS a réduit la production de pyocyanine de $\approx 50\%$ et 1,0 mM d'AS a entraîné une réduction de 80% de la production de pyocyanine sans effet apparent sur la croissance des bactéries. Ils ont également évalué l'effet des dérivés d'AS, y compris l'acide acétyl salicylique, le salicylamide et le salicylate de méthyle, et l'acide benzoïque sur la production de pyocyanine par PA14. Tous ces dérivés ont conduit à réduire la production de pyocyanine et les niveaux de réduction provoqués par le salicylate de méthyle, le salicylamide et l'acide benzoïque étaient proches de ceux provoqués par l'AS. Prithiviraj *et al.* (2005) ont aussi indiqué que l'acide salicylique régularise négativement *rhlR* et *lasA* dans *P. aeruginosa* PA14 et provoque l'inhibition des activités de la pyocyanine, de protéase et d'élastase (Yang *et al.*, 2009 ; Guo *et al.*, 2013).

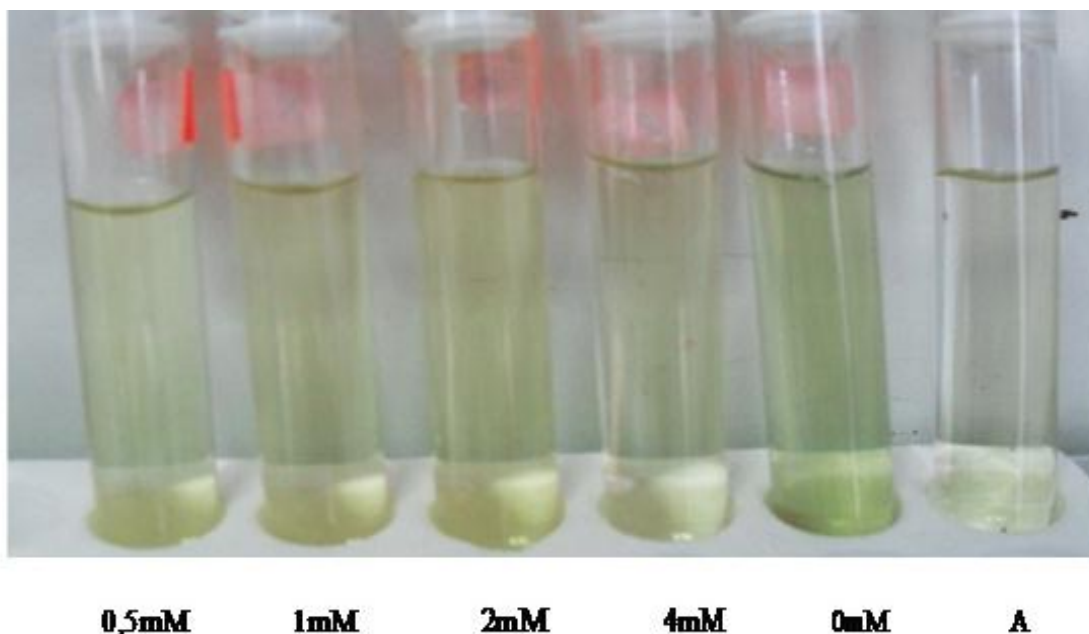


Figure 56 : Effet de l'acide salicylique sur la production de pyocyanine par *Pseudomonas aeruginosa*, A: contrôle négatif.

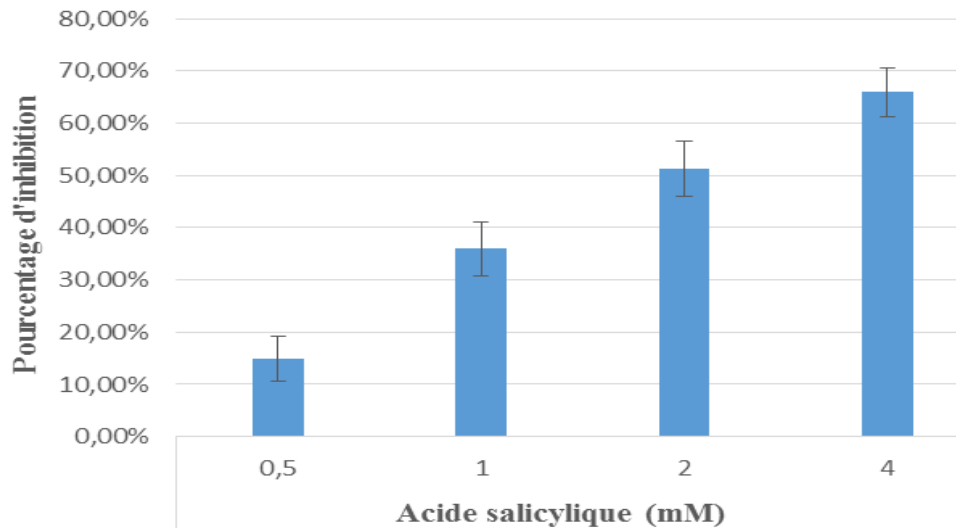


Figure 57 : Inhibition de la production de pyocyanine chez *P. aeruginosa* ATCC 27853 par l'acide salicylique.

II.6.4. Effet de l'acide salicylique sur la production des Rhamnolipides

II.6.4.1. Production des Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont les constituants principaux des biosurfactants produits par *P. aeruginosa* (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). Ce sont des glycolipides amphiphiles extracellulaires utilisés par cette bactérie comme des facteurs de virulence. Les rhamnolipides jouent un rôle dans la formation et le maintien des structures dites «champignons» caractéristiques d'un biofilm mature. Ils jouent un rôle dans la formation des canaux d'eau dans le biofilm et le détachement de bactéries du biofilm pour coloniser de nouvelles surfaces (Davey *et al.*, 2003). Ils favorisent significativement la formation de microcolonies en facilitant la migration par «twitching» des cellules mobiles constitutives de la tête des structures «champignons» (Lequette et Greenberg, 2005 ; Pamp et Tolker-Nielsen, 2007). Les résultats montrés dans la figure 58 indiquent que sauf un seul isolat (P2) produit des rhamnolipides dans le milieu PPGAS. Ces rhamnolipides ont été extraits d'un surnageant d'une culture bactérienne discontinu de 3 jours d'incubation avec un rendement de 4,54 mg/l et d'une autre culture de 8 jours d'un rendement de 5,48 mg/l. Nagant *et al.* (2013) ont indiqué que la production de rhamnolipides était fortement liée à l'espèce bactérienne et aux conditions de culture. Cette remarque a été également citée par Juan *et al.* (2001), dans une étude de production des rhamnolipides chez *P. aeruginosa* UG2 dans différentes conditions de culture où les résultats

ont montré que le rendement en rhamnolipides a été affecté par la nature des sources de carbone, les concentrations en nutriments, le pH et l'âge de la culture.

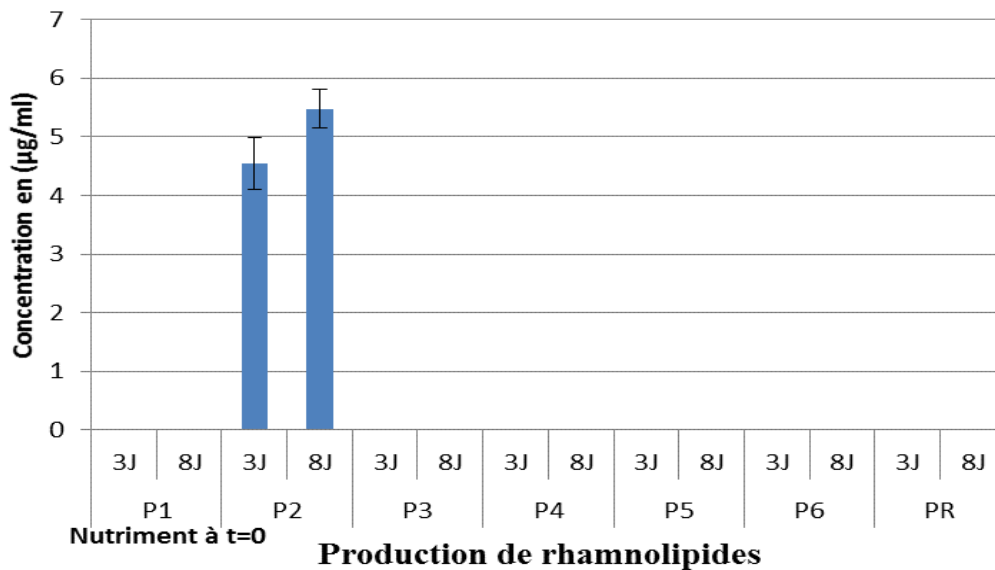


Figure 58 : Production des Rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (PR) et les souches cliniques de même espèce dans le milieu PPGAS.

II.6.4.1. Effet de l'acide salicylique sur la production des Rhamnolipides

Les rhamnolipides possèdent un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire les rendant ainsi plus accessibles aux phospholipases bactériennes. Ils altèrent la jonction entre les cellules épithéliales des voies respiratoires et favorisent l'infiltration des épithéliums humains des voies aériennes par *P. aeruginosa* (Zulianello *et al.*, 2006). Ils participent à la protection de *P. aeruginosa* contre le système immunitaire en inhibant la phagocytose et en provoquant la lyse des macrophages (Alhede *et al.*, 2014).

Nos résultats indiquent que la production des rhamnolipides par *P. aeruginosa* P2 (la souche productrice des rhamnolipides dans le milieu PPGAS) était fortement affectée par la présence de l'AS dans le milieu de culture avec une inhibition totale à une concentration de 2mM d'AS (Figure 59). Les rhamnolipides sont produit lors de la formation du biofilm sous le contrôle du système de détection du quorum (QS) (Jensen *et al.*, 2007). L'expression des gènes *rhlB* et *rhlA* codant pour une rhamnosyltransférase impliquée dans la synthèse des rhamnolipides a été diminuée en présence d'un peptide antimicrobien (Ochsner *et al.*, 1995).

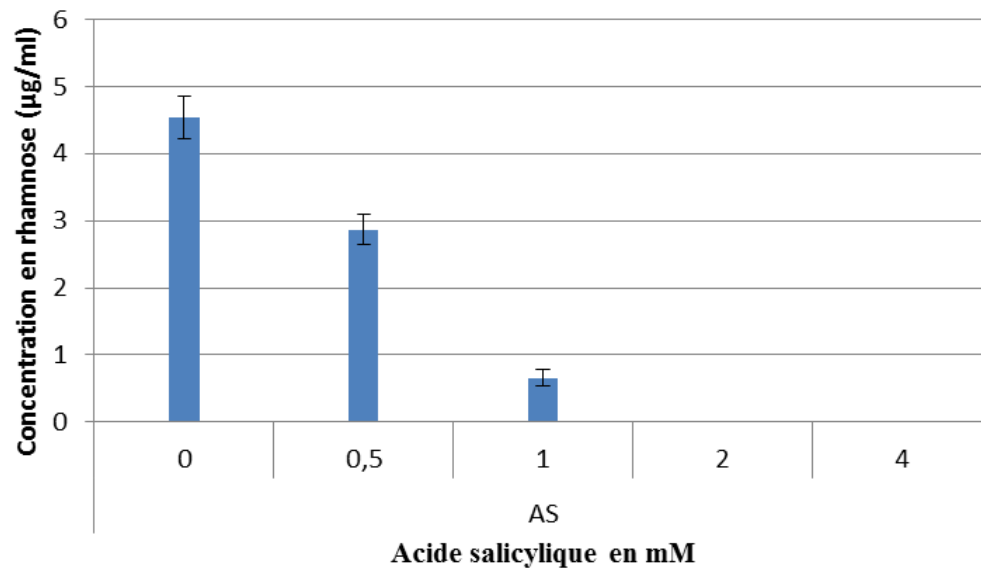


Figure 59 : Effet de l'acide salicylique sur la production de rhamnolipides par *Pseudomonas aeruginosa* (P2).

Conclusion

Conclusion

Les infections à *P. aeruginosa* impliquant la formation de biofilms sont une préoccupation majeure chez les patients atteints de mucoviscidose, les personnes immunodéprimées et les grands brûlés. La formation d'un biofilm est un mode commun de développement bactérien dans la nature. Il a été estimé que 99 % de l'ensemble des bactéries dans un environnement naturel existent sous forme d'un biofilm.

Le biofilm peut être contrôlé soit par réduction de la population bactérienne planctonique, par inhibition de la formation du biofilm ou par éradication du biofilm établi. Dans cette thèse, nous avons testé l'activité antibactérienne et l'effet sur la formation de biofilm des extraits obtenus à partir d'*Allium sativum*, *Prunus persica* et deux variétés de *Lawsonia inermis*.

La formation de biofilm par les isolats a été testée sur deux types de support et deux types de milieu de culture à savoir Bouillon de trypticase de soja (TSB) et Bouillon Biofilm Modifié (BBM). Nous avons constaté que la quantité de biofilm formé par *P. aeruginosa* dépendait de l'isolat testé, du milieu de culture utilisé et aussi de la matière du support sur lequel l'isolat s'adhère.

Les résultats de la détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes obtenus montrent la richesse de la fraction d'acétate d'éthyle en polyphénols et en flavonoïdes comparativement avec l'extrait butanolique pour *P. persica* et les deux variétés étudiées de *L. inermis*. L'extrait d'acétate d'éthyle de *L. inermis* a donné les teneurs les plus élevées, avec des valeurs en polyphénols de $224,83 \pm 20,07$ mg EAG/g d'extrait et $244,58 \pm 25,54$ mg EAG/g d'extrait pour les feuilles de la région d'Adrar et la région de Biskra, respectivement. Et de $169,79$ mg EAG/g d'extrait pour les feuilles de *P. persica*. On a remarqué aussi que le rendement d'extraction dépend à la fois de la plante choisie et du solvant utilisé pour l'extraction.

Selon les résultats obtenus, il ressort que les extraits des plantes (*Allium sativum*, *Prunus persica* et deux variétés de *Lawsonia inermis*) ont présenté des propriétés antibactériennes variables contre les isolats testés de *P. aeruginosa*. Nous avons remarqué une activité élevée pour l'extrait d'Ail et les extraits des deux variétés de *L. inermis* mais faible pour les extraits de feuilles de *P. persica*. En plus cet effet varie selon la variété testée et le solvant utilisé pour l'extraction. La variété de *L. inermis* obtenue de la région d'Adrar avait la plus haute activité antibactérienne contre les isolats testés par rapport à celle obtenue de la région de Biskra. Cependant, les fractions butanoliques des deux variétés testées de *L. inermis* ont le meilleur

effet avec une CMI de 3,12 mg/ml et 6,25 mg/ml pour les échantillons d'Adrar et Biskra respectivement, par rapport aux fractions d'acétate d'éthyle qui ont montré une CMI de 6,25 mg/mL et 12,5 mg/mL pour les mêmes échantillons.

Les résultats montrent aussi que le taux de formation des biofilms a été diminué par l'augmentation des concentrations de l'extrait d'*A. sativum*, où on a enregistré une diminution d'absorbance de 0,908 à 0,135 à la concentration de 3,15% (1/2CMI) pour la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 ce qui signifie une réduction de 85%. En outre, la formation de biofilm a diminué lorsqu'elle a été incubée avec la 1/2CMI de fraction butanolique pour les deux variétés de *L. inermis* testées. Alors que la 1/2 CMI d'acétate d'éthyle n'a pas affecté la formation de biofilm pour la majorité des isolats testés de *P. aeruginosa*. Nous pouvons conclure que l'extraction par le butanol permet de concentrer mieux les constituants actifs contre la formation des biofilms présents dans l'extrait hydro-méthanolique (70%) des feuilles de *Lawsonia inermis*. En plus, la concentration de 1/2 CMI pour les deux fractions (acétate d'éthyle et butanolique) des feuilles de *P. persica* qui ont montré une faible activité antibactérienne a provoqué une augmentation de la quantité du biofilm formée par les isolats testés.

Les résultats d'analyse des fractions des deux variétés de *L. inermis* et *P. persica* par HPLC montrent une variabilité de la composition. Ceci peut expliquer la différence remarquée dans l'activité antibactérienne et l'effet sur la formation du biofilm par les souches de *P. aeruginosa* étudiées.

Nous pouvons conclure aussi dans notre étude que l'utilisation d'acide salicylique (AS) qui est un composé phénolique qui possède un rôle clé dans les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes a inhibé la croissance de *P. aeruginosa*. La CMI et le CMB de l'AS enregistrés sont autour de 10 mM et 20 mM respectivement. La motilité de type swarming et la production de pyocyanine par les *Pseudomonas* étudiés ont été également affectées par la présence de l'AS. La production des rhamnolipides chez la seule souche (P2) qui produit ces substances a été complètement inhibée dans le milieu PPGAS additionné de 2 mM d'AS.

En perspectives, les recommandations suivantes sont suggérées :

Tester l'effet des extraits qui ont montré un effet sur la formation de biofilm sur la viabilité cellulaire et sur des biofilms établi.

Confirmer par des tests «*in vivo*» l'intérêt thérapeutique.

En outre, le développement de nouveaux médicaments à base de plantes nécessite un meilleur fractionnement entre les constituants et une compréhension de leurs mécanismes d'action.

Références bibliographiques

Référence bibliographiques

- Aaron SD, Ferris W, Ramotar K, Vandemheen K, Chan F, Saginur R.** 2002. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *Journal Clinical Microbiology*, **40**(11), 4172-4179.
- Afzal M, Al-Oriquat G, Al-Hassan JM, Muhammand N.** 1984. Isolation of 1,2-dihydroxy-4-glucosyloxynaphthalene from *Lawsonia inermis*. *Heterocycles*, **22**(4), 813-816.
- Alhede M, Bjarnsholt T, Givskov M.** 2014. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. *Advances in applied microbiology*, **86**, 1-40.
- Alhede M, Bjarnsholt T, Jensen PØ, Phipps RK, Moser C, Christophersen L, Christensen LD, van Gennip M, Parsek M, Højby N, Rasmussen TB, Givskov M.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiology*, **155**(11), 3500-3508.
- Allen L, Dockrell DH, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, Whyte MK.** 2005. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *Journal of Immunology*, **174**(6), 3643-3649.
- Allen WJ, Phan G, Waksman G.** 2012. Pilus biogenesis at the outer membrane of gramnegative bacterial pathogens. *Current Opinion In Structural Biology*, **22**(4), 500-506.
- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L et al.** 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, **59** (4), 1114–1128.
- Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S, Itakura Y.** 2001. Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition*, **131**(3), 955-962.
- Amit SB, Babasaheb NK and Rajkumar VS.** 2011. A phytopharmacological review on *Lawsonia inermis* (Linn.). *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*, **2**(1), 536-541.
- An YH, Friedman RJ.** 1998. Concise review of mecanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of biomedical matererial research*, **43**(3), 338-348.
- Anis BH, Mohamed T, Gérald C, Yves B, Samir J.** 2011. Antioxidant constituents from *Lawsonia inermis* leaves: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity. *Food Chemistry*, **125**(1), 193–200.
- Aurélié Rousselin.** 2016. Contribution des pratiques culturales (irrigation et fertilisation azotée) à la gestion des populations de pucerons en verger fruitier : Cas des systèmes pêcher - puceron vert du pêcher (*Prunus persica* – *Myzus persicae*) et pommier - puceron cendré (*Malus domestica* - *Dysaphis plantaginea*). Thèse de doctorat. Université d'Avignon, 145p.
- Antunes LC, Ferreira RB, Buckner MM, Finlay BB.** 2010. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*, **156**(8), 2271-2282.
- Aranzana MJ, Abbassi EK, Howad W, Arus P.** 2010. Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. *BMC Genetics*, **11**(69), 1-12.

Arora SK, Neely AN, Blair B, Lory S, Ramphal R. 2005. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *P. aeruginosa* burn wound infections. *Infection and Immunity*, **73**(7), 4395-4398.

Arun P, Purushotham KG, Jayarani J and Kumari V. 2010. In vitro anti-bacterial activity and flavonoid contents of *Lawsonia inermis*. *International Journal of PharmTech Research*, **2**(2), 1178-1181.

Asikyan ML, Kus JV, Burrows LL. 2008. Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **190**(21), 7022-7034.

Atkinson S, Williams P. 2009. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of the Royal Society Interface*, **6**(40), 959-978.

Atmani D, Chaher N, Berboucha M, Ayouni K, Lounis H, Boudaoud H, Debbache N, Atmani D. 2009. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, **112**(2), 303–309.

Bachmann J, Hinman T. 2008. Garlic: Organic Production, *National Center for Appropriate Technology, une publication d'ATTRA*, États-Unis. [En ligne], <https://attra.ncat.org/>.

Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Høiby N. 2004. Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**(4), 1168–1174.

Bajmoczy M, Gadjeva M, Alper SL, Pier GB, Golan DE. 2009. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and caveolin-1 regulate epithelial cell internalization of *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **297**(2), C263-C277.

Bala A, Kumar R, Harjai K. 2011. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by azithromycin and its effectiveness in urinary tract infections. *Journal of Medical Microbiology*, **60**(3), 300-306.

Bandara BM, Zhu H, Sankaridurg PR, Willcox MD. 2006. Salicylic acid reduces the production of several potential virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with microbial keratitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **47**(10), 4453-4460.

Barequet IS, Ben Simon GJ, Safrin M, Ohman DE, Kessler E. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* LasA protease in treatment of experimental staphylococcal keratitis. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**(5), 1681-1687.

Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M, Givskov M, Whitchurch CB, Engel JN, Tolker-Nielsen T. 2008. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental microbiology*, **10**(9), 2331-2343.

Barker AP, Vasil AL, Filloux A, Ball G, Wilderman PJ, Vasil ML. 2004. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol. Microbiol*, **53**(4): 1089-1098.

- Beare PA, For RJ, Martin LW, Lamont IL.** 2003. Siderophore-mediated cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*: divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Molecular Microbiology*, **47**(1), 195-207.
- Beaufort N, Corvazier E, Hervieu A, Choqueux C, Dussiot M, Louedec L, Cady A, de Bentzmann S, Michel JB, Pidard D.** 2011. The thermolysin-like metalloproteinase and virulence factor LasB from pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* induces anoikis of human vascular cells. *Cellular microbiology*, **13**(8), 1149-1167.
- Beaufort N, Corvazier E, Mlanaoindrou S, de Bentzmann S, Pidard D.** 2013. Disruption of the endothelial barrier by proteases from the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: implication of matrilysin and receptor cleavage. *PloS one*, **8**(9), e75708.
- Beaussart A, Baker AE, Kuchma SL, El-Kirat-Chatel S, O'Toole GA, Dufrene YF.** 2014. Nanoscale adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* type IV Pili. *American Chemical Society nano*, **8**(10), 10723-10733.
- Bekkara F, Jay M, Viricel MR, Rome S.** 1998. Distribution of phenolic compounds 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 and Soil*, **203**(1), 27-36.
- Beloin C, Roux A, Ghigo JM.** 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **322**, 249- 289.
- Benincasa M, Abalos A, Oliveira I, Manresa A.** 2004. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soap stock. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **85**(1), 1-8.
- Berthelot P, Grattard F, Mallaval FO, Ros A, Lucht F, Pozzetto B.** 2005. Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathologie Biologie (Paris)*, **53**(6), 341-348.
- Bertrand CA, Frizzell RA.** 2003. The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *American Journal Physiology-Cell Physiology*, **285**(1), 1-18.
- Bharali P, Saikia JP, Ray A and Konwar BK.** 2013. Rhamnolipid (RL) from *Pseudomonas aeruginosa* OBP1: A novel chemotaxis and antibacterial agent. *Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces*, **103**: 502-509.
- Bhuvanewari K, Poongothai SG, Kruvilla A, Raju BA.** 2002. Inhibitory concentrations of *Lawsonia inermis* dry powder for urinary pathogens. *Indian Journal of Pharmacology*, **34**(4), 260-263.
- Biyiti LF, Meko'o DJL, Tamze V, Amvam Zollo PH.** 2004. Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, **13**, 11-20.
- Bjarnsholt T, Jensen PØ, Burmolle M, Hentzer M, Haagensen JA, Hougen HP, Calum H, Madsen KG, Moser C, Molin S, Høiby N, Givskov M.** 2005. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology*, **151**(2), 373-383.

- Block E.** 1992. The organosulfur chemistry of the genus *Allium*. Implications for the organic chemistry of sulphur. *Angewandte Chemie International Edition*, **31**(9),1135-1178.
- Bodini SF, Manfredini S, Epp M, Valentini S, Santori F.** 2009. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid. *Letters in Applied Microbiology*, **49**(5), 551-555.
- Boles BR, Singh PK.** 2008. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(34), 12503-12508.
- Bolivar A, Cevallos-Casals, Byrne D, Okie WR, Cisneros-Zevallos L.** 2006. Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties *Food Chemistry*, **96**, 273-280.
- Borlinghaus J, Albrecht F, Gruhlke MCH, Nwachukwu ID, Slusarenko AJ.** 2014. Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules*, **19**(8), 12591-12618.
- Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS.** 2004. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of in biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**(7), 2659-2664.
- Breidenstein EBM, De la Fuente-Núñez C, Hancock REW.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, **19**(8), 419-426.
- Brencic A, McFarland KA, McManus HR et al.** 2009. The GacS/GacA signal transduction system of *Pseudomonas aeruginosa* acts exclusively through its control over the transcription of the RsmY and RsmZ regulatory small RNAs. *Molecular Microbiology*, **73**(3), 434-445.
- Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F.** 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, **27**(9), 1017-1032.
- Bruzaud J, Tarrade J, Coudreuse A, Canette A, Herry J-M, Taffin de Givenchy E, et al.** 2015. Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces, B, Biointerfaces*, **131**, 59-66.
- Bucior I, Pielage JF, Engel JN.** 2012. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. *PLoS Pathogens*, **8**(4), e1002616.
- Burrows LL.** 2012. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual Review in Microbiology*, **66**, 493-520.
- Byers JT, Lucas C, Salmond GPC, Welch M.** 2002. Nonenzymatic turnover of an *Erwinia carotovora* quorum-sensing signaling molecule. *Journal of Bacteriology*, **184**(4), 1163-1171.
- CA-SFM.** 2015. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (www.sfm.asso.fr).
- Cady NC, McKean KA, Behnke J et al.** 2012. Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds. *PLoS ONE*, **7**(6), e38492.

Caiazza NC, Shanks RM, O'Toole GA. 2005. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **187**(21), 7351-7361.

Campanac C, Pineau L, Payard A, Baziard-Mouysset G, Roques C. 2002. Interactions between biocide cationic agents and bacterial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**(5), 1469-1474.

Carneiro VA, Dos Santos HS, Arruda FVS et al. 2011. Casbane diterpene as a promising natural antimicrobial agent against biofilm-associated infections. *Molecules*, **16**(1), 190-201.

Celiktas OY, Hames Kocabas EE, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser, KHC. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, **100**(2), 553-559.

Chan KG, Atkinson S, Mathee K, Sam CK, Chhabra SR, Cámara M et al. 2011. Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC Microbiology*, **11**, 51.

Characklis WG, McFeters GA, Marshall KC. 1990. Physiological ecology in biofilm systems. In: Characklis WG, Marshall KC, editors. *Biofilms*. New York: *John Wiley & Sons*, 341-394.

Chaudhary G, Goyal S, Poonia P. 2010. *Lawsonia inermis* Linnaeus: a phyto pharmacological review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, **2**(2), 91-98.

Chemani C, Imberty A, de Bentzmann S, Pierre M, Wimmerova M, Guery BP, Faure K. 2009. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infection and immunity*, **77**(5), 2065-2075.

Chew SC, Kundukad B, Seviour T, van der Maarel JRC, Yang L, Rice SA, Doyle P, Kjelleberg S. 2014. Dynamic remodeling of microbial biofilms by functionally distinct exopolysaccharides. *mBio*, **5**(4), e01536-14.

Chiang WC, Nilsson M, Jensen PO, Hoiby N, Nielsen TE, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2013. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**(5), 2352-2361.

Choi SH, Greenberg EP. 1991. The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**(24), 11115-11119.

Choukchou-Braham N, Rahmoun MN, Benabdallah M, Villemin D, Boucherit K, Mostefa-Kara B, Ziani-Cherif C. 2010. Antimicrobial screening of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). *Der Pharma Chemica*, **2**(6), 320-332.

Chugani S, Greenberg EP. 2010. LuxR homolog-independent gene regulation by acyl-homoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(23), 10673-10678.

- Clutterbuck AL, Woods EJ et al.** 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, **121**(1-2), 1-17.
- Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, Wong GCL, Parsek MR.** 2011. The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, **7**(1), e1001264.
- Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, Howell PL, Wozniak DJ, Parsek MR.** 2012. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental microbiology*, **14**(8), 1913-1928.
- Conrad JC, Gibiansky ML, Jin F, Gordon VD, Motto DA, Mathewson MA, Stopka WG, Zelasko DC, Shrout JD, Wong GC.** 2011. Flagella and pili-mediated near-surface singlecell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophysical journal*, **100**(7), 1608-1616.
- Cooley BJ, Thatcher TW, Hashmi SM, L'Her G, Le HH, Hurwitz DA, Provenzano, Touhami A, Gordon VD.** 2013. The extracellular polysaccharide Pel makes the attachment of *P. aeruginosa* to surfaces symmetric and short-ranged. *Soft Matter*, **9**(14), 3871-3876.
- Corzo-Martiez M, Corzo N, Villamiel M.** 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, **18**(12), 609-625.
- Costerton JW.** 1999. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **11**(3-4), 217-221.
- Costerton JW.** 2001. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends in Microbiology*, **9**(2), 50-52.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ.** 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, **238**(1), 86-95.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE et al.** 1995. Microbial biofilms. *Annual Review Microbiology*; **49**, 711-745.
- Cronquist A.** 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. *Columbia University Press, New York* , 1262.
- Cullen L, McClean S.** 2015. Bacterial Adaptation during Chronic Respiratory Infections. *Pathogens*, **4**(1), 66-89.
- Czajkowski R, Jafra S.** 2009. Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochimica Polonica*, **56**(1), 1–16.
- Da ML, Heroux AK, Pakzad Z, Schiffmacher KFES.** 2010. Salicylic acid attenuates biofilm formation but not swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, **14**, 69-73.
- Das T, Kutty SK, Kumar N, Manefield M.** 2013. Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. *PLoS One*, **8**(3), e58299.

Das T, Kutty SK, Tavallaie R, Ibugo AI, Panchompoo J, Sehar S, Aldous L, Yeung AWS, Thomas SR, Kumar N, Gooding JJ, Manefield M. 2015. Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Scientific Reports*, **5**, 8398.

Das T, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mai HC, Krom B.P. (2010). Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(10), 3405-3408.

Dasgupta T, Rao AR, Yadava PK. 2003. Modulatory effect of henna leaf (*Lawsonia inermis*) on drug metabolising phase I and phase II enzymes, antioxidant enzymes, lipid peroxidation and chemically induced skin and forestomach papillomagenesis in mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **245**(1-2), 11-22.

Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. 2003. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Journal of Bacteriology*, **185**(3), 1027-1036.

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, **5361**(280), 295-298.

De Bentzmann S, Plésiat P. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: Une virulence complexe. *Revue Francophone des Laboratoires*, **435**, 73-81.

De Kievit TR, (2008). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, **11**(2), 279-288.

De Kievit TR. 2009. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology*, **11**(2), 279–288.

Defoirdt T, Boon N, Bossier P, Verstraete W. 2004. Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture*, **240**, 69-88.

Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann H, Ward E, Ryals J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, **266**(5188), 1247-1250.

Dempsey DA, Shah J, Klessig DF. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **18**(14), 547-575.

Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK. 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, **61**(5), 1308-1321.

Diggle SP, Matthijs S, Wright VJ, Fletcher MP, Chhabra SR, Lamont IL, Kong X, Hider RC, Cornelis P, Cámara M, Williams P. 2007. The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chemistry and Biology*, **14**(1), 87-96.

Diggle SP, Stacey RE, Dodd C, Camara M, Williams P, Winzer K. 2006. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, **8**(6), 1095-1104.

Djordjevic D, Wiedmann M, Mclandsborough LA. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(6), 2950-2958.

Dobretsov S, Teplitski M, Paul V. 2009. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*. **25**(5), 413-427.

Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH. 2002. Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(4), 1754-1759.

Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging. Infectious. Diseases*. **8**(9), 881-890.

Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**(2), 167-193.

Doring G. 2012. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* by early antibiotic treatment has been one of the major advances in the last decade for subjects with CF. *Journal of cystic fibrosis*, **11**(1), 1.

Drenkard E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*, **5**(13), 1213-1219.

Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. 2008. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Journal of Antimicrobial. Chemotherapy*, **61**(5), 1053-1056.

Dunne WM. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately. *Clinical Microbiology Reviews*, **15**(2), 155-166.

Dwivedi C, John LM, Schmidt DS, Engineer FN. 1998. Effects of oil-soluble organosulfur compounds from garlic on doxorubicin-induced lipid peroxidation. *Anti-Cancer Drugs*. **9**(3), 291-294.

El abed S, Ibsouda kS, Latrache H, Zineb Gh, Mouradi H, Remmal A. 2011, Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation, *African Journal of Microbiology Research*, **5**(20), 3229-3232.

Elisabetta N, Laura S, Giulia F, Roberta M, Ernesto G, Antonella N, Laura P, Paolo L. 2009. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Bio Med Central Microbiology*, **9**(270), 1-14.

El-Waziry AM. 2007. Nutritive value assessment of ensiling or mixing *Acacia* and *Atriplex* using in vitro gas production technique. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, **3**(6), 605-614.

- Engel J, Balachandran P.** 2009. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Current Opinion in Microbiology*, **12**(1), 61-66.
- Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, Buer J, Jahn D, Schobert M.** 2004. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *Journal of Bacteriology*, **186**(14), 4596-4604.
- Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP.** 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of Bacteriology*, **172**(2), 884-900.
- Estrellas PS, Aliante LG. Jr. and J.A. Hobden.** (2000). A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a contact lens-induced acute red eye (CLARE) is protease-deficient. *Current Eye Reseach*, **20**:157-165.
- Evans LR, Linker A.** 1973. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **116**(2), 915-924.
- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M, Abdelly C.** 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, **331**(5), 372-379.
- Fathiazad F, Mazandarani M, Hamedeyazdan S.** 2011. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from Iran. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, **1**(2), 63-67.
- Faure K, Leberre R, Guery B.** 2006. *Pseudomonas aeruginosa* and Surfactant associated Proteins A and D. *Médecine et maladies infectieuses*, **36**(2), 63-71.
- Favre-Bonté S, Köhler T Van Delden C.** 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**(4), 598-604.
- Filiatrault MJ, Wagner VE, Bushnell D, Haidaris CG, Iglewski BH, Passador L.** (2005). Effect of anaerobiosis and nitrate on gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, **73**(6), 3764-3772.
- Filloux A, Vallet I.** 2003. Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Médecine Sciences*, **19**(1), 77-83.
- Flemming HC, Wingender J.** 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*, **8**(9), 623-633.
- Flemming HC.** 2011. The perfect slime. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, **86**(2), 251-259.
- Franklin M.J., Nivens D.E., Weadge J.T., Howell P.L.** (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel and Psl. *Frontiers in Microbiology*, **2**(167), 1-16.

- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P.** 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *TRENDS in Microbiology*, **13**(1), 34-40.
- Gallo FR, Multari G, Palazzino G, Pagliuca G, Zadeh SMM, Biapa PCN, Nicoletti M.** 2014. Henna through the centuries: a quick HPTLC analysis proposal to check henna identity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **24**(2), 133–140.
- Gambello MJ, Iglewski BH.** 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *Journal of Bacteriology* **173**(9), 3000–3009.
- Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH.** 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (apr) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infection and Immunity*, **61**(4), 1180–1184.
- Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z.** 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, **18**(9), 1049-1056.
- Garnett JA, Matthews S.** 2012. Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective. *Current Protein and Peptide Science*, **13**(8), 739-755.
- Gbolade AA.** 2009. Inventory of antidiabetic plants in selected districts of Lagos State, Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, **121**(1), 135–139.
- Gellatly SL, Hancock RE.** 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, **67**(3), 159-173.
- Ghafoor A, Hay ID, Rehm, BH.** 2011. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and environmental microbiology*, **77**(15), 5238-5246.
- Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Kader AA.** 2002. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**(17), 4976–4982.
- Gilbert KB, Kim TH, Gupta R, Greenberg EP, Schuster M.** 2009. Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Molecular Microbiology*, **73**(6), 1072–1085.
- Gilani AH, Aziz N, Ali SM, Saeed M.** 2000. Pharmacological basis for the use of peach leaves in constipation, *Journal of Ethnopharmacology*, **73**(1-2), 87–93.
- Giraud C, de Bentzmann S.** 2012. Inside the complex regulation of *Pseudomonas aeruginosa* chaperone usher systems. *Environmental Microbiology*, **14**(8), 1805-1816.
- Giraud C, Bernard CS, Calderon V, Yang L, Filloux A, Molin S., Fichant G., Bordi C. and de Bentzmann S.** 2011. The PprA-PprB two-component system activates CupE, the first nonerchetypal *Pseudomonas aeruginosa* chaperone-usher pathway system assembling fimbriae. *Environmental microbiology*, **13**(3), 666-683.

Giraud C, Bernard C, Ruer S, De Bentzmann S. 2010. Biological 'glue' and 'velcro': molecular tools for adhesion and biofilm formation in the hairy and gluey bug *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports*, **2**(3), 343-358.

Girre L. 2001. Les plantes et les médicaments: l'origine végétale de nos médicaments Paris: Delachaux et Niestlé, 253.

Golovkine G, Faudry E, Bouillot S, Voulhoux R, Attree I. and Huber P. (2014). VE-Cadherin Cleavage by LasB Protease from *Pseudomonas aeruginosa* Facilitates Type III Secretion System Toxicity in Endothelial Cells. *PLoS pathogens*, **10**(3), e1003939.

Golovlev EL. 2002. The mechanism of formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a type of structured population. *Microbiology*, **71**(3), 293-300.

Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS, Lory S. 2004. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Developmental Cell*, **7**(5), 745–754.

Goodman AL, Merighi M, Hyodo M, Ventre I, Filloux A, Lory S. 2009. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes and Development*, **23**(2), 249-259.

Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H, Ryals J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, **8**(4), 629-643.

Greg H, Sandy H, Ping H. 2002. *Allium sativum* (Garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production in vitro: potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytometry*, **48**(4), 209-215.

GRUN-THOMAS Stéphanie. 1998. Etude de trois plantes médicinales et condimentaires : l'ail, le safran, le romarin Th. : Pharm. : Nancy 1 : 63. 137.

Guo M, Gamby S, Zheng Y, Sintim HO. 2013. Small molecule inhibitors of AI-2 signaling in bacteria: state-of-the-art and future perspectives for quorum sensing agents. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 17694-17728.

Gupta S, Ali M, Alam MS. 1993. A naphthoquinone from *Lawsonia inermis* stem bark. *Phytochemistry*, **33**(3), 723-724.

Gupta S, Kapur S, Padmavathi DV, Verma A. 2015. Garlic: an effective functional food to combat the growing antimicrobial resistance. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Sciences*, **38**(2), 271-278.

Haddad Kh, Mohammad H, Dezashibi Z. 2007. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Henna Leaves Extracts (*Lawsonia Inermis*). *World Journal of Dairy & Food Sciences*, **2** (1), 38-41.

Haiko J, Westerlund-Wikström B. 2013. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, **2**(2), 1242-1267.

- Hall-Stoodley L, Stoodley P.** 2005. Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**(1), 228-223.
- Hall-Stoodley L, Stoodley P.** 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, **11**(7), 1034-1043.
- Hänsch GM, Brenner-Weiss G, Prior B, Wagner C, Obst U.** 2008. The extracellular matrix of *Pseudomonas aeruginosa*: too slippery to migrate on?. *International Journal Artificial Organs*, **31**(9), 796-803.
- Harjai K, Anitha V, Sanjay C.** 2014. Analysis of quorum sensing inhibition and phytochemicals in different extracts of garlic, *International Journal of Pharma Bio Science*, **5**(3), 873- 884.
- Harjai K, Kumar R, Singh S.** 2010. Garlic blocks quorum sensing and attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **58**(2), 161-168.
- Hauser AR.** 2012. Ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Care Medicine*, **40**(8), 2503-2504.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A.** 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, **410**(6832), 1099-1103.
- Hayouni E, Abedrabba M, Bouix M, Hamdi M.** 2007. The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quecus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, *Food Chemistry*. **105**(3), 1126-1134.
- He X, Yuan F, Lu F, Yin Y, Cao J.** 2017. Vancomycin-induced biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with the secretion of membrane vesicles. *Microbial Pathogenesis*, **110**, 225-231.
- Hengge R.** 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, **7**(4), 263–273.
- Henrici AT.** 1933. Studies of Freshwater Bacteria: A Direct Microscopic Technique. *Journal Bacteriology*, **25**(3), 277-287.
- Hentzer M.** 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO Journal*, **22**(15), 3803-3815.
- Heurlier K, Denervaud V, Haas D.** 2006. Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medecal Microbiology*, **296**(2-3), 93-102.
- Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS.** 2005. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(40),14422–14427.
- Hoang T, Schweizer H.** 1999. Characterization of the *Pseusomonas aeruginosa* enoyl-acyl-carrier protein reductase: a target for triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *Journal Bacteriology*, **181**(17), 5489–5497.

- Hoffman LR, D'Argenio DA, McCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI.** 2005. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, **436**(7054), 1171-1175.
- Høiby 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 Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Supplement*, **262**, 1-96.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O.** 2010b. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **35**(4), 322-332.
- Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T.** 2010a. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology*. **5**(11), 1663-1674.
- Holm JP, Hilberg O, Noerskov-Lauritsen N, Bendstrup E.** 2013. *Pseudomonas aeruginosa* in patients without cystic fibrosis is strongly associated with chronic obstructive lung disease. *Danish medical journal*, **60**(6), A4636.
- Houry A, Briandet R, Aymerich S, Gohar M.** 2010. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, **156**(4), 1009-1018.
- Hsouna AB, Trigui M, Culioli G, Blache Y, Jaoua S.** 2011. Antioxidant constituents from *Lawsonia inermis* leaves: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity. *Food Chemistry*, **125**(1), 193-200.
- Huang X.** 2003. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Corneal Infection Using an *Oligonucleotide Microarray*, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **44**(8), 3409-3416.
- Huang CY, Hsieh SP, Pei-An Kuo, Wann-Neng Jane, Jenn Tu, Ya-Nan Wang, Chun-Han Ko.** 2009. Impact of disinfectant and nutrient concentration on growth and biofilm formation for a *Pseudomonas* strain and the mixed cultures from a fine papermachine system, *International Biodeterioration & Biodegradation*, **63**(8), 998-1007.
- Imberty A, Wimmerova M, Sabin C, Mitchell EP.** 2006. Structures and Roles of *Pseudomonas aeruginosa* Lectins. In *Protein-Carbohydrate Interactions in Infectious Diseases*. Bewley, C. (ed), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 30-48
- Irie Y, Parsek MR.** 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **322**, 67- 84.
- Irie Y, Borlee BR, O'Connor JR, Hill PJ, Harwood CS, Wozniak DJ, Parsek MR.** 2012. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **109**(50): 20632-20636.
- Irie Y, Starkey M, Edwards AN, Wozniak DJ, Romeo T, Parsek MR.** 2010. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Molecular Microbiology*, **78**(1), 158-172.
- Jabar MA, Al-Mossawi A.** 2007. Susceptibility of some multiple resistant bacteria to garlic, *African Journal of Biotechnology*, **6**(6), 771-776.

Jaimee G, Prakash MH. 2017. Sub-inhibitory concentrations of gentamicin triggers the expression of *aac(6')le-aph(2'')la*, chaperons and biofilm related genes in *Lactobacillus plantarum* MCC 3011, *Research in Microbiology*, **168(8)**:722-731.

Jain VC, Shah DP, Sonani NG, Dhakara S, Patel NM. 2010. Pharmacognostical and preliminary phytochemical investigation of *Lawsonia inermis* L. leaf. *Romania Journal of Biology-Plant Biology*, **55(2)**, 127–133.

Jakobsen TH, Van gennip M, Phipps RK, Shanmugham MS, Christensen LD. 2012. Ajoene, a sulfur rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrob Agents Chemother*, **56(5)**, 2314-2325.

Jensen PØ, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H, Christoffersen L, Moser C, Williams P, Pressler T, Givskov M, Høiby N. 2007. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. **153(5)**, 1329-1338.

Jimenez PN, Koch G, Papaioannou E., Wahjudi M., Krzeslak J., Coenye T., Cool R. H. and Quax W. J. 2010. Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiology*, **156(1)**, 49-59.

Joo HS, Otto M. 2012. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemistry and Biology*, **19(12)**, 1503-1513.

Jorgensen R, Wang Y, Visschedyk D, Merrill AR. 2008. The nature and character of the transition state for the ADP-ribosyltransferase reaction. *EMBO reports*, **9(8)**, 802-809.

Juan C, Mata S, Jeffrey K, Alba T. 2001. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiological Research*, **155(4)**, 249-256.

Jung HA, Kim AR, Chung HY, Choi JS. 2002. In vitro anti-oxidant activity of some selected *Prunus* species in Korea. *Archives of Pharmacal Research*, **25(6)**, 865–872.

Jung S. 2005. Apport des drogues végétales dans la prévention des maladies cardiovasculaires liées à l'hypercholestérolémie. Thèse de doctorat. Faculté de pharmacie, Université Henri Poincare – Nancy, 149p.

Kalia VC. 2013. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, **31(2)**, 224-245.

Kaplan JB. 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, **89(3)**, 205-218.

Karatan E, Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **73(2)**, 310-347.

Kay E, Humair B, D'enervaud V et al. 2006. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **188(16)**, 6026–6033.

- Kazan A, Koyu H, Turu IC, Celiktas OY.** 2014. Supercritical fluid extraction of *Prunus persica* leaves and utilization possibilities as a source of phenolic compounds. *The Journal of supercritical Fluid*, **92**, 55-59.
- Kearns DB.** 2010. A field of guide to bacterial swarming motility. *Nature Review in Microbiology*, **8**(9), 634-644.
- Kelmanson JE, Jager AK, Staden JV.** 2002. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *Journal Ethnopharmacol.*, **69**(3), 241-246.
- Kessler E, Safrin M, Abrams WR, Rosenbloom J, Ohman DE.** 1997. Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *Journal of Biological Chemistry*, **272**(15), 9884-9889.
- Kessler E, Safrin M, Olson JC, Ohman DE.** 1993. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *The Journal of biological chemistry*, **268**(10), 7503-7508.
- Khalilzadeh P, Lajoie B, El Hage S, Furiga A, Baziard G, Bergé M, Roques C.** 2010. Growth inhibition of adherent *Pseudomonas aeruginosa* by a N-butanoyl-homoserine lactone analog. *Canadian Journal of Microbiolgy*, **56**(4), 317-325.
- Kim HS, Park HD.** 2013. Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PLoS ONE*, **8**(9), e76106.
- Kim J, Park HD, Chung S.** 2012. Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules*. **17**(8), 9818-9834.
- King JD, Kocincova D, Westman EL, Lam JS.** 2009. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate Immunity*, **15**(5), 261-312.
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J.** 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et Maladies Infectieuses*. **36**(2), 78-91.
- Kong W, Chen L, Zhao J et al.,** 2013. Hybrid sensor kinase PA1611 in *Pseudomonas aeruginosa* regulates transitions between acute and chronic infection through direct interaction with RetS. *Molecular Microbiology*, **88**(4), 784-797.
- Kritkar K.R., Basu B.D.** 1984. *Indian Medicinal Plants*, Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehra Dun 1:954.
- Ksouri R, Megdiche W, Falleh H, Trabelsi N, Boulaaba M, Smaoui A, Abdelly C.** 2008. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biologies*, **331**(11), 865-873.
- Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE, Lau GW.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PloS One*. **6**(11), e27091.
- Kukavica-Ibrulj I.** 2007. Génomique fonctionnelle du régulateur transcriptionnel PYCR de *Pseudomonas aeruginosa* essentiel in vivo et comparaison des cinétiques d'infection pulmonaire chronique. Thèse de doctorat, Faculté de médecine, Université Laval Québec.

- Kumar L, Chhibber S, Harjai K.** 2013. Zingerone inhibit biofilm formation and improve antibiofilm efficacy of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Fitoterapia*, 90, 73–78.
- Kumar SH, De AS, Baveja SM, Gore MA.** 2012. Prevalence and risk factors of metallo β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in burns and surgical wards in a tertiary care hospital. *Journal of Laboratory Physicians*, 4(1), 39-42.
- Kumar S, Singh YV, Singh M.** 2005. Agro-History, Uses, Ecology and Distribution of Henna (*Lawsonia inermis* L. syn. *Alba* Lam). *Henna: Cultivation, Improvement, and Trade*. Jodhpur: Central Arid Zone Research Institute, 11-12.
- Kus JV, Zaton K, Sarkar R, Cameron RK.** 2002. Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, 14(12), 479-490.
- Lam JS, Taylor VL, Islam ST, Hao Y, Kocincova D.** 2011. Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *FRONTIERS in Microbiology*, 2, 118.
- Landini P, Antoniani D, Burgess JG, Nijland R.** 2010. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(3), 813-823.
- Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F.** 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, 10(12), 599-606.
- Lee J, Zhang L.** 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26-41.
- Lee VT, Matewish JM, Kessler JL, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S.** 2007. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production, *Molecular Microbiology*, 65(6), 1474–1484.
- Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK.** 2005. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing. *Journal Immunology*, 175(11), 7512-7518.
- Lequette Y, Greenberg EP.** 2005. Timing and localization of rhamnolipid synthesis gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 37-44.
- Lequette Y, Lee JH, Ledgham F, Lazdunski A, Greenberg EP.** 2006. A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *Journal of Bacteriology*, 188(9), 3365-3370.
- Leva E, Amarb Z.** 2008. "Fossils" of practical medical knowledge from medieval Cairo. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(1), 24-40.
- Lewis K.** (2012). Persister Cells: Molecular Mechanisms Related to Antibiotic Tolerance Antimicrobial Discovery. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 211, 121-133.
- Li J, Johnson XD, Iazvovskaia S, Tan A, Lin A, Hershenson MB.** 2003. Signaling intermediates required for NF-kappa B activation and IL-8 expression in CF bronchial epithelial

cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, **284**(2), L307-315.

Liakopoulos G, Stavrianakou S, Karabourniotis G. 2001. Analysis of epicuticularphenolics of *Prunus persica* and *Olea europaea* leaves: evidence for the chemical origin of the UV-induced blue fluorescence of stomata, *Annals of Botany*, **87**(5), 641-648.

Lindhout T, Lau PCY, Brewer D, Lam JS. 2009. Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology*, **155**, 3449-3460.

Loake G, Grant M. 2007. Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*. **10**(5), 466-472.

Lokesh d, Binduswari P, bhowmik D, Dutta AS. 2010. Free radical scavenging activity of aqueous n- butanol fraction of *Prunus Persica* l aqueous extract. *Der Pharmacia Lettre*, **2**(5), 379-386.

Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, **2**(9), 1051-1060.

Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K and Wozniak DJ. 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*, **5**(3), e1000354.

Ma L, Lu H, Sprinkle A, Parsek MR, Wozniak DJ. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactos and mannose-rich exopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, **189**(22), 8353-8356.

Manefield M, de Nys R, Naresh K, Roger R, Givskov M, Peter S, Kjelleberg S. 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, **145**(2), 283-291.

Mann EE, Wozniak DJ. 2012. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *Federation of European Microbiological Societies Microbiological Review*, **36**(4), 893-916.

Marc EB, Nelly A, Annick DD, Frederic D. 2008. Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *Journal of Ethnopharmacology*, **120**(3), 315-334.

Martinez LR, 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**(14), 4592- 4601.

Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, Qiu X, Matewish JM, Koehrsen M et al. 2008. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proceedings National of the Academy of Sciences of U S A*. **105**(8), 3100-3105.

McEldowney S, Fletcher M. 1986. Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, **52**(3), 460-465.

- Merighi M, Lee VT, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S.** 2007. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, **65**(4), 876-895.
- Mesaros N, Tulkens PM, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Devallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Van Bambeke F.** 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: Résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Clinical Microbiology and Infection*, **126**(8), 305-316.
- Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH.** 2005. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **49**(4), 1306-1311.
- Mikhaeil BR, Badria FA, Maatooq GT, Amer MMA.** 2004. Antioxidant and immunomodulatory constituents of henna leaves. *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C Journal of Biosciences*, **59**(7-8), 468-476.
- Mikkelsen H, McMullan R, Filloux A.** 2011. The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 displays increased virulence due to a mutation in *ladS*. *PLoS ONE*, **6**(12), e29113.
- Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K.** 2009. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Journal of infection and public health*, **2**(3), 101-111.
- Mnayer D, Fabiano-Tixier AS, Petitcolas E, Hamieh T, Nehme N, Ferrant C, et al.** 2014. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the Alliaceae Family. *Molecules*, **19**(12), 20034-20053.
- Molin S, Tolker-Nielsen T.** 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*. **14**(3), 255-261.
- Morris SW, Vernooij B, Titatarn S, Starrett M, Thomas S, Wiltse CC, Frederiksen RA, Bhandhufalck A, Hulbert S, Uknes S.** 1998. Induced resistance responses in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**(7), 643-658.
- Mostefa-Kara B, Ziani-Cherif C, Benabdallah M, Rahmoun NM, Villemin D, Choukchou-Braham N, Boucherit K.** 2010. New chemical tools for the assessment of hemolytic anemia induced by naph-toquinones. *Der Pharma Chemica*, **2**(1), 14-21.
- Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K.** 2014. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial ecology*, **68**(1), 1-12.
- Nadell CD, Xavier LB, Levin SA, Foster KR.** 2008. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biology*, **6**(1), 171-179.
- Nagant C, Seil M, Nachtergaele A, Dulanto SA, Dehaye JP.** 2013. Contribution of the production of quorumones to some phenotypic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Journal of Medical Microbiology*, **62**(7), 951-958.

Nowatzki PJ, Koepsel RR, Stoodley P, Min K, Harper A, Murata H, Donfack J, Hortelano ER, Ehrlich GD, Russell AJ. 2012. Salicylic acid-releasing polyurethane acrylate polymers as anti-biofilm urological catheter coatings. *Acta Biomaterialia*, **8**(5), 1869-1880.

Ochsner UA, Reiser J, Fiechter A, Witholt B. 1995. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(9), 3503-3506.

Ohta R, Yamada N, Kaneko H, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T, Suzuki A. 1999. *In vitro* inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-macerated garlic constituents. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, **43**(7), 1811-1812.

Oinuma K. and Greenberg E.P. 2011. Acyl-homoserine lactone binding to and stability of the orphan *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal receptor QscR. *Journal of Bacteriology*, **193**(2), 421-428.

O'Malley YQ, Reszka KJ, Spitz DR, Denning GM, Britigan BE. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and de-creases its levels in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, **287**(1), 94-103.

Ostroff RM, Vasil AI, Vasil ML. 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, **172**(10), 5915-5923.

Othman A, Ismail N, Ghani A, Adenam I. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, **100**(4), 1523-1530.

O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, **30**(2), 295–304.

Ourvind JSB, Iluminada LV, Phides N. 2015. Anti-microbial efficacy of *Allium sativum* extract against *Enterococcus faecalis* biofilm and its penetration into the root dentin: An *in vitro* study, *Indian Journal of Dental Reseach*, **26** (5), 477-482.

Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock REW. 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology*, **190**(8), 2671–2679.

Ozpinar H, Dag S, Yigit E. 2013. Antibacterial effect of peach (*Persica vulgaris* Miller) leaves extract, *Cumhuriyet Medicinal J*, **35**, 172–178.

Palma M, Bayer A, Kupferwasser LI, Joska T, Yeaman MR, Cheung A. 2006. Salicylic acid activates sigma factor B by rsbU-dependent and –independent mechanisms, *Journal of Bacteriology*, **188**(16), 5896-5903.

Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **189**(6), 2531-2539.

Paraje MG. 2011. Antimicrobial resistance in biofilms. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. *Ed. A. Mendez-Vilas*, **2**, 736-744.

- Parkins MD, Ceri H, Storey DG.** (2001). *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation, *Molecular Microbiology*, **40**(5), 1215-1226.
- Parsek MR, Tolker-Nielsen T.** 2008. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, **11**(6), 1-7.
- Patrick P, de Bentzmann S.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: une virulence complexe. *Revue Francophone des Laboratoires*, **41**(435), 73-81.
- Pechère JC.** 2001. Azithromycin reduces the production of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum sensing,” *Japanese Journal of Antibiotics*, **54**(C), 87-89.
- Pérez-Martínez I, Haas D.** 2011. Azithromycin inhibits expression of the GacA-dependent small RNAs RsmY and RsmZ in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55**(7), 3399-3405.
- Pesci EC, Milbank JBJ, Pearson JP, McKnight S, Kende, AS, Greenberg, EP et Iglewski BH.** 1999. Quinolone signaling in the cell to cellcommunication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of National Academy Sciences of U.S.A.*, **96**(20), 11229-11234.
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH.** 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Bacteriology*, **179**(10), 3127-3132.
- Petrova OA, Sauer K.** 2012. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of Bacteriology*, **194**(10), 2413-2425.
- Pitt TL.** 1998. *Pseudomonas, Burkholderia*, and related genera, *Microbiology and Microbial Infections*, Oxford University Press Inc, New York, **2**, 1109-1138.
- Polonio RE, Mermel LA, Paquette GE, Sperry JF.** 2001. Eradication of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**(11), 3262-3266.
- Poole K.** 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in Microbiology*, **2**(65), 1-13.
- Prithiviraj B, Bais HP, Jha A.K. and Vivanco J.M.** (2005). *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of salicylic acid on the pathogen or by SA-dependent, NPR1-independent host responses. *Plant Journal*, **42**(3), 417-432.
- Qiu X, Kulasekara BR, Lory S.** 2009. Role of Horizontal Gene Transfer in the Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Genome Dynamics*. **6**, 126-139.
- Rada B, Leto TL.** 2013. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends in microbiology*, **21**(2), 73-81.
- Rahman K.** 2007. Effects of garlic on platelet biochemistry and physi-ology, *Molecular Nutrition & Food Research*, **51**(11), 1335–1344.

- Rahman MM, Fazlic V, Saad NW.** 2012. Antioxidant properties of raw garlic (*Allium sativum*) extract. *International Food Research Journal*, **19**(2): 589-591.
- Rahmat A, Edrini S, Ismail P, Yap T, Hin Y, Bakar MFA.** 2006. Chemical constituents, antioxidant activity and cytotoxic effects of essential oil from *Strobilanthes crispus* and *Lawsonia inermis*. *Journal of Biological Sciences*, **6**(6), 1005–1010.
- Ramachandran G.** 2014. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. *Virulence*, **5**(1), 213-218.
- Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M.** 2015. The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms, *BioMed Research International*, **2015**, Article ID 759348, 17
- Rasmussen TB, Givskov M.** 2006. Quorum-sensing inhibitors as antipathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology*, **296**(2-3), 149–61.
- Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M, Kristoffersen P, Kote M, Nielsen J, Eberl L, Givskov M.** 2005. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *Journal of Bacteriology*, **187**(5), 1799-1814.
- Records AR, Gross DC.** 2010. Sensor kinases RetS and LadS regulate *Pseudomonas syringae* type VI secretion and virulence factors. *Journal of Bacteriology*, **192**(14), 3584–3596.
- Reimann C, Beyeler M, Latifi A et al.** 1997. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyl-L-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Molecular Microbiology*, **24**(2), 309–319.
- Ren D, Zuo R, González-Barrios AF et al.** 2005. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(7), 4022–4034.
- Renner LD, Weibel DB.** 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin*, **36**(5), 347-355.
- Ried K, Frank OR, Stocks NP.** 2010. Aged garlic extract lowers bloodpressure in patients with treated but uncontrolled hypertension: a randomised controlled trial, *Maturitas*, **67**(2), 144-150.
- Riordan JT, Muthaiyan A, van Borr is W, Price CT, Gram JE, Wilkinson BJ, Gustafson JE.** 2007. Response of *Staphylococcus aureus* to salicylate challenge, *Journal of Bacteriology*, **189**(1), 220-227.
- Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, M ejean V, Foglino M.** 2000. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many?. *Trends in Microbiology*, **8**(11), 498–504.
- Romano-Mazzotti L, Gayosso C, Alc antar CMD, Santos-Preciado JI et Alpuche-Aranda CM.** 2008. Transmisión cruzada: un factor primordial en bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenemes en un hospital pedi trico de tercer nivel. *Enferm Infecciosas Microbiologia*, **28**(1), S83.

- Rosenberg LE, Carbone AL, Romling U, Uhrich KE, Chikindas ML.** 2008. Salicylic acid-based poly (anhydride esters) for control of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Letters in Applied Microbiology*, **46**(5), 593-599.
- Rudrappa T, Bais HP.** 2008. Curcumin, a known phenolic from *Curcuma longa*, attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(5), 1955-1962.
- Rudrappa T, Quinn WJ, Stanley-Wall NR, Bais HP.** 2007. A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*, **226**(2), 283-297.
- Ruer S, Stender S, Filloux A, de Bentzmann S.** 2007. Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone usher machineries. *Journal of Bacteriology*. **189**(9), 3547-3555.
- Ruimy, R, Andreumont A.** 2004. Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. *Réanimation*, **13**, 176-184.
- Rupasinghe VHP, Clegg S.** 2007. Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *Journal of Food Composition and Analysis*, **20**, 133-137.
- Rutherford ST, Bassler BL.** 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in medicine*, **2**(11), a012427.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD.** 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **8**, 1809-1819.
- Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ.** 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion Microbiology*, **10**(6), 644-648.
- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R.** 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*. **91**, 621-632.
- Sakuragi Y, Kolter R.** 2007. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology*, **189**(14), 5383–5386.
- Salem E, Fouzy A, Ashok K.** 2013. Preliminary Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of *Pistacia atlantica* and *Prunus persica* Plants of Libyan. *Origin International Journal of Science and Research*, **4**(2), 1552-1555.
- Samuel C, Kevin G, Lucy J, Anthony N.** 2011. Salicylic Acid Affects Swimming, Twitching and Swarming Motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in Decreased Biofilm Formation. *Experimental Microbiology and Immunology*, **15**, 22-29.
- Sara A. Ochoa, Fernanda López-Montiel, Gerardo Escalona, Ariadna Cruz-Córdova, Leticia B. Dávila, Briseida López-Martínez, Yolanda Jiménez-Tapia, Silvia Giono, Carlos Eslava, Rigoberto Hernández-Castro and Juan Xicohtencatl-Cortes,** 2013. Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation, *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, **70**(2), 133-144.

- Sarabhai S, Sharma P, Capalash N.** 2013. Ellagic acid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. Downregulate the expression of quorum sensing genes to attenuate *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence, *PLoS ONE*, **8**(1), e53441.
- Sato H, Frank DW, Hillard CJ, Feix JB, Pankhaniya RR, Moriyama K et al.** 2003. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *Embo Journal*, **22**(12), 2959-2969.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, **184**(4), 1140-1154.
- Saulou C,** (2009), Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma, Thèse de doctorat en Ingénieries Microbienne et Enzymatique, L'Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse. 312p.
- Schalk IJ, Hannauer M, Braud A.** 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology*, **13**(11), 844-2854.
- Scherer D, Kumer R.** 2010. Genetics of pigmentation in skin cancer-a review. *Mutation Research*, **705**(2), 141-153.
- Schipper C, Hornung C, Bijtenhoorn P, Quitschau M, Grond S, Streit WR.** 2009. Metagenomederived clones encoding two novel lactonase family proteins involved in biofilm inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(1), 224-38.
- Schroeder TH, Zaidi T, Pier GB.** 2001. Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM(1) on epithelial cells. *Infection and immunity*, **69**(2), 719-729.
- Schurr MJ.** 2013. Which Bacterial Biofilm Exopolysaccharide is Preferred, Psl or Alginate?. *Journal of Bacteriology*, **195**(8), 1623-1626.
- Schuster M, Greenberg EP.** 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, **296**(2-3), 73-81.
- Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP.** 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*, **185**(7), 2066-2079.
- Seed PC, Passador L, Iglewski BH.** 1995. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: An autoinduction regulatory hierarchy. *Journal of Bacteriology*, **177**(3), 654-659.
- Sethi S.** 2000. Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest*, **117**(5), 286S-291S.
- Sevens AM, Schuster M, Rumbaugh KP.** 2012. Working together for the common good: cell-cell communication in bacteria. *Journal of bacteriology*, **194**(9), 2131-2141.

- Shah J, Kachroo P, Klessig DF.** 1999. The *Arabidopsis ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell*, **11**(2), 191-206.
- Shaver CM, Hauser AR.** 2004. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infection and Immunity*. **72**(12), 6969-6977.
- Shin TY, Park SB, Yoo JS et al.** 2010. Anti-allergic inflammatory activity of the fruit of *Prunus persica*: role of calcium and NF- κ B. *Food and Chemical Toxicology*, **48**(10), 2797-2802.
- Shirosaki M, Koyama T, Yazawa K.** 2012. Suppressive effect of peach leaf extract on glucose absorption from the small intestine of mice, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, **76**(1), 89-94.
- Shivananda NB, Isitor G, Davis EM, Pillai GK.** 2007. The evidence based wound healing activity of *Lawsonia inermis* Linn. *Phytotherapy Research*, **21**(9), 827-831.
- Shrout JD, Chopp DL, Just CL, Hentzer M, Givskov M, Parsek MR.** 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology*, **62**(5), 1264-1277.
- Siddiqui BS, Kardar MN.** 2001. Triterpenoids from *Lawsonia alba*. *Phytochemistry*, **58**(8), 1195-1198.
- Siddiqui BS, Kardar MN, Tarig AS, Khan S.** (2003). Two new and a known compound from *Lawsonia inermis*. *Helvetica Chimica Acta*, **86**(6), 2164-2169.
- Singh M, Jindal SK, Kavia ZD, Jangid BL, Khem C.** 2005. Traditional Methods of Cultivation and Processing of Henna. Henna, Cultivation, Improvement and Trade: 21-14. Jodhpur, India: Central Arid Zone Research Institute.
- Skindersoe ME, Alhede M, Phipps R et al.** 2008. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**(10), 3648-3663.
- Smith R, Iglewski B.** 2003. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. *Journal of Clinical Investigation*, **112**(10), 1460-1465.
- Smith KM, Bu Y, Suga H.** 2003. Induction and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by synthetic autoinducer analogs. *Chemistry & Biology*, **10**(1), 81-89.
- Spormann AM.** 2008. Physiology of microbes in biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **322**, 17- 36.
- Soberon-Chavez G, Lepine F, Deziel E.** 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **68**(6), 718-725.
- Sofer D, Gilboa-Garber N, Belz A, Garber NC.** 1999. Subinhibitory erythromycin represses production of *Pseudomonas aeruginosa* lectins, autoinducer and virulence factors. *Chemotherapy*, **45**(5), 335-341.

- Stapper AP, Narasimhan G, Ohman DE, Barakat J, Hentzer M, Molin S, Kharazmi A, Høiby N, Mathee K.** 2004. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, **53**(7), 679-690.
- Steinberg PD, De Nys R.** 2002. Chemical mediation of colonisation of seaweed surface. *Journal of Phycology*, **38**(4), 621-629.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW.** 2002. Biofilm as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, **56**(1), 187-209.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock REW, Lory S et Olson MV.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. **406**(6799), 959-964.
- Strateva T, Mitov I.** 2011. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of Microbiology*, **61**(4), 717-732.
- Sundin C, Hallberg B, Forsberg A.** 2004. ADP-ribosylation by exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* induces an irreversible effect on the host cell cytoskeleton *in vivo*. *FEMS Microbiology Letters*, **234**(1), 87-91.
- Takhtajan A.** 1997. Diversity and Classification of Flowering Plants. New York, Columbia University Press: 643.
- Tan AS, Berridge MV.** 2008. Differential effects of redox-cycling and arylating quinones on trans-plasma membrane electron transport. *Biofactors*, **34**(3), 183-190.
- Tashiro Y, Yawata Y, Toyofuku M, Uchiyama H, Nomura N.** 2013. Interspecies Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and Other Microorganisms. *Microbes and Environments*, **28**(1), 13-24.
- Tateda K, Comte R, Pechere JC, Kohler T, Yamaguchi K, Van Delden C.** 2001. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **45**(6), 1930-1933.
- Teasdale ME, Liu J, Wallace J, Akhlaghi F & Rowley DC. 2009. Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(3), 567-572.
- Tetz GV, Artemenko NK, Tetz VV.** 2009. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(3), 1204-1209.
- Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, Rosenau F, Jaeger KE.** 2005. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*, **151**(5), 1313-1323.

- Toder DS, Gambello MJ, Iglewski BH.** 1991. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Molecular Microbiology*, **5**(8), 2003-2010.
- Todhanakasem T, Duangkamol P, Ramida J.** 2010. Reduced Formation and Elimination of Salmonella typhimurium Biofilm Using Crude Garlic Extract, *KKU Research Journal*, **15**(5), 331-342.
- Tripathi P, Banerjee G, Saxena S, Gupta SM, Ramteke PW.** 2011. Antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of lower respiratory tract infection. *African Journal of Microbiology Research*, **5**(19), 2955-2959.
- Truchado P, Mar L, Irene CI, Ana A.** 2015. Plant food extracts and phytochemicals: Their role as Quorum Sensing Inhibitors. *Trends in Food Science & Technology*, **43**(2), 189-204.
- Tsakris A, Poulou A, Kristo I, Pittaras T, Spanakis N, Pournaras S et al.** 2009. Large dissemination of VIM-2-metallo-b-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains causing health care-associated community-onset infections. *Journal Clinical Microbiology*, **47**(11), 3524-3529.
- Tsantili E, Shin Y, Nock JF, Watkins CB.** 2010. Antioxidant concentrations during chilling injury development in peaches. *Postharvest Biology and Technology*, **57**(1), 27-34.
- Upyr LV, Komissarenko AN.** 2002. Coumarins of *Persica vulgaris*, *Chemistry of Natural Compounds*, **38**(1), 97.
- Uroz S, Dessaux Y, Oger P.** 2009. Quorum sensing and quorum: the yin and yang of bacterial communication. *Chembiochem*, **105**(2), 205-216.
- Usharani Ch, Sumalatha G, Vimochana B.** 2014. Antihelmintic activity of leaves of *Prunus persica*. *International research journal of pharmacy*, **5**(7), 610-612.
- Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A.** 2001. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy Sciences of the U S A*, **98**(12), 6911-6916.
- Van Houdt R, Michiels C.** 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, **156**(5-6), 626-633.
- Van Gennip M, Christensen LD, Alhede M et al.** 2009. Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, **117**(7), 537-546.
- Van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, Qvortrup K, Jensen PØ, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T.** 2012. Interactions between polymorphonuclear leukocytes and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on silicone implants in vivo. *Infection and Immunity*, **80**(8), 2601-2607.
- Van Schaik EJ, Giltener CL, Audette GF, Keizer DW, Bautista DL, Slupsky CM, Sykes BD, Irvin RT.** 2005. DNA binding : a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* Type IV pili. *Journal of bacteriology*, **187**(4), 1455-1464.

- Van Wyk BE, Wink M.** 2004. *Medicinal plants of the world*, 1st edition. Briza publications, South Africa.
- Vance RE, Rietsch A, Mekalanos JJ.** 2005. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *in vivo*. *Infection and Immunity*, **73**(3), 1706-1713.
- Vander W.C., Pierard A., Kley-Raymann M. and Haas D.** (1984). *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *Journal of Bacteriology*, **160**(3), 928-934.
- Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I et al.** 2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(1), 171-176.
- Vikram A, Jayaprakasha GK, Jesudhasan PR, Pillai SD, Patil BS.** 2010. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *Journal of Applied Microbiology*, **109**(2), 515-527.
- Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP, Pesci EC.** 2005. Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **187**(13), 4372-4380.
- Wagner VE, Iglewski BH.** 2008. *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, **35**(3), 124-134.
- Walters MC 3rd, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS.** 2003. Contribution of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**(1), 317-323.
- Wargo MJ, Gross MJ, Rajamani S, Allard JL, Lundblad LK, Allen GB, Vasil ML, Leclair LW, Hogan DA.** 2011. Hemolytic phospholipase C inhibition protects lung function during *Pseudomonas aeruginosa* infection. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, **184**(3), 345-354.
- Wichtl M, Anton R.** 2003. *Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique - 2^{ème} édition* Paris: Ed. Tee & doc-Lavoisier; Cachan: *Ed. médicales internationales*, 692p.
- Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger KE.** 2007. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal Bacteriology*, **189**(18), 6695-6703.
- Williams BJ, Dehnhostel J, Blackwell TS.** 2010. *Pseudomonas aeruginosa*: host defence in lung diseases. *Respirology*, **15**(7), 1037-1056.
- Wingender G, Rogers P, Batzer G, Myung SL, Bai D, Pei B, Khurana A, Kronenberg M, Horner AA.** 2011. Invariant NKT cells are crucial for airway inflammation induced by environmental antigens. *Journal of Experimental Medicine*, **208**(6), 1151-1162.

- Wingender J, Neu TR, Flemming HC.** 1999. Microbial extracellular polymeric substances - Characterization, Structure and Function. *Berlin: Springer*, 231–251.
- Winstanley C, Fothergill JL.** 2009. The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiology Letters*, **290**(1), 1-9.
- Wolfgang MC, Kulasekara BR, Liang X, Boyd D, Wu K, Yang Q, Miyada CG, Lory S.** 2003. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy Sciences of the U S A*, **100**(14), 8484-8489.
- Wong KC, Teng YE.** 1995. Volatile component of *Lawsonia inermis* L. Fowers. *Journal Essential Oil Research*, **7**(4), 425-428.
- Xavier JB, Foster KR.** 2007. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(3), 876-881.
- Yang L, Barken KB, Skindersoe ME, Christensen AB, Givskov M, Tolker-Nielsen T.** 2007. Effects of iron on DNA release and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **153**(5), 1318-1328.
- Yang L, Rybtke MT, Jakobsen TH, Hentzer M, Bjarnsholt T, Givskov M, Tolker-Nielsen T.** 2009. Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **53**(6), 2432-2443.
- Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, Goldner M, Dessaux Y, Cámara M, Smith H, Williams P.** 2002. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, **70**(10), 5635-5646.
- Yuan ZC, Edlind MP, Liu P, Saenkham P, Banta LM, Wise AA et al.** 2007. The plant signal salicylic acid shuts down expression of the vir regulon and activates quorum quenching genes in *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(28), 11790-11795.
- Yusuf OK, Ekanem JT** 2010. Studies of phytochemical constituents and anti-trypanosomal properties of fermented wheat germ and garlic bulbs extract on *Trypanosoma brucei*-infected rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, **4**(19), 2016-2020.
- Zemanick ET, Sagel SD, Harris JK** 2011. The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. *Current Opinion Pediatrics*, **23**(3), 319-324.
- Zeng T, Guo TT, Zhang CL, Song FY, Zhao XL, Xie KQ.** 2012. A meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials for the effects of garlic on serum lipid profiles. *Journal Science of Food and Agriculture*, **92**(9), 1892-1902.
- Zhai H, Pan J, Pang E, Bai B.** 2014. Lavage with allicin in combination with vancomycin inhibits biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* in a rabbit model of prosthetic joint infection. *PLOS ONE*, **9**(7), e102760.

Zhang LH, Dong YH. 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Molecular Microbiology*, **53**(6), 1563-1571.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, **64**, 555-559.

Zulianello L, Canard C, Kohler T, Caille D, Lacroix JS, Meda P. 2006. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*; **74**(6), 3134-3147.

Annexe

Annexe

Coloration de Gram

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50-60°C (brièvement supportable à la main), ce qui les sèche puis laisser refroidir la lame.
- Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1mn.
- Lavage à l'eau en transvasant les lames ou sous le robinet.
- Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 1 mn en les agitant.
- Laver à nouveau à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
- Laver à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50°C. Les lames doivent être parfaitement sèches.
- Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.

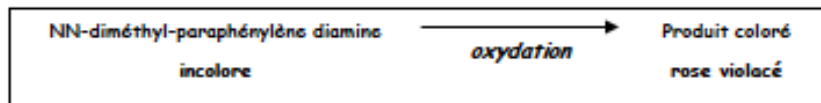
L'OXYDASE

1. Intérêt

La recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram -.

2. Principe

Le test consiste à mettre en évidence la capacité que possède la bactérie à oxyder un réactif incolore (la NN-diméthyl-paraphénylène diamine) en un dérivé rose violacé.



3. Technique

- placer un disque non imprégné sur une lame à l'aide d'une pince flambée,
- déposer une goutte de réactif sur le disque non imprégné,
- avec une pipette Pasteur prélever une colonie sur milieu solide (GO) et la déposer doucement sur le disque





Remarques :

- Ne pas utiliser l'anse métallique pour prélever les bactéries. En effet, le métal peut être recouvert d'un oxyde et donner un résultat faussement positif.
- Le milieu solide ne doit pas contenir d'indicateur de pH, ni de glucides

4. Lecture

Pas de lecture avant 30 secondes environ

Tâche rose violette	Pas de tâche rose violette
La bactérie possède l'activité oxydase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite :
Oxydase + 	Oxydase - 

Causes d'erreurs :

- réalisation du test sur un milieu glucidique (une fermentation peut cacher une respiration)
- humidification trop importante du disque, entraînant une élimination du réactif
- quantité de bactéries insuffisante
- réactif périmé (l tester avec une souche oxydase + et une souche oxydase -)
- utilisation d'un instrument « oxydase + »
- lecture trop tardive : au delà de 30 secondes

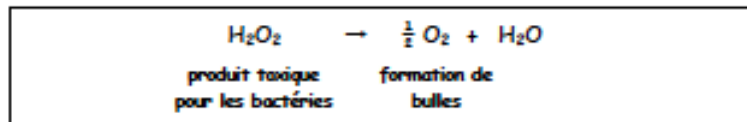
LA CATALASE

1. Intérêt

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram +.

2. Principe

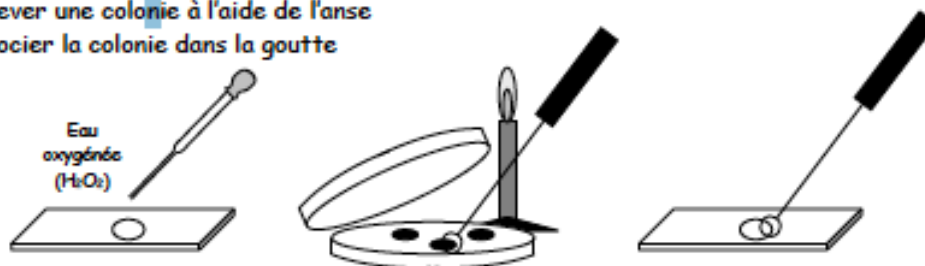
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.



3. Technique

- déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (= peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur
- prélever une colonie à l'aide de l'anse
- dissocier la colonie dans la goutte



Remarque : l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

4. Lecture

Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase + 	Catalase - 

Causes d'erreurs :

- o réalisation du test sur un milieu contenant la catalase
Exemple : réalisation du test à partir de colonies prélevées sur gélose au sang (l'hémoglobine possède une activité catalasique pouvant donc donner des résultats faussement positifs)
- o quantité de bactéries insuffisante
- o eau oxygénée périmée (la tester avec une souche catalase +)

Tableau de lecture d'API 20NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO3	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	incoloré	rose-rouge
			réduction des Nitrates en azote	Rose	incoloré
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptophane)	JAMES / immédiat	
				incoloré vert pâle / jaune	rose
<u>GLU</u>	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose /rouge
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose /rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0,22	β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase)	incoloré	jaune
<u>GLU</u>	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
<u>ARA</u>	L-arabinose	1,4	assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
<u>MNE</u>	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
<u>MAN</u>	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
<u>NAG</u>	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
<u>MAL</u>	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
<u>GNT</u>	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
<u>CAP</u>	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
<u>ADI</u>	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
<u>MLT</u>	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
<u>CIT</u>	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
<u>PAC</u>	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

Composition des 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

Milieu King B

Peptone de caséine :	20g
Sulfate de magnésium :	1,5g
Phosphate bipotassique :	1,5g
Glycérol :	10mL
Agar :	20g
Eau distillée :	1000mL
pH :	7,2

Milieu Mueller Hinton (MH)

Extrait de viande :	3g
Acide hydrolysa de caséine	17g
Amidan	1,5g
Agar	20g
Eau distillée :	1000mL
pH :	7,2

Bouillon Biofilm Modifié (BBM)

MgSO ₄ .2H ₂ O :	0,2 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O :	0,0005 g/L
Na ₂ HPO ₄ :	1,25 g/L
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	0,1 g/L
Glucose :	0,05 g/L
pH :	7,2

Milieu BM2 (Biofilm Modifié 2)

Na ₂ HPO ₄ :	1,25 g/L
KH ₂ PO ₄ :	0,5 g/L
MgSO ₄ .2H ₂ O :	0,2 g/L
FeSO ₄ .7H ₂ O :	0,0005 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄ :	0,1 g/L
Glucose :	5 g/L

Bouillon nutritif

Peptone :	6g
Extrait de viande :	1g
Extrait de levure :	2g
NaCl:	5g
Eau distillée :	1000 mL
pH :	7,2

Milieu King A

Peptone de caséine :	20g
Sulfate de potassium :	10g
Chlorure de magnésium :	1,4g
Glycérol :	10mL
Agar :	20g
Eau distillée :	1000mL
pH :	7,2

Bouillon de Trypticase de Soja (TSB)

Digestion pancréatique de caséine :	17 g/L
Digestion enzymatique de farine de soja :	3 g/L
NaCl :	5 g/L
K ₂ HPO ₄ :	2,5 g/L
Dextrose :	2,5 g/L
pH :	7,2

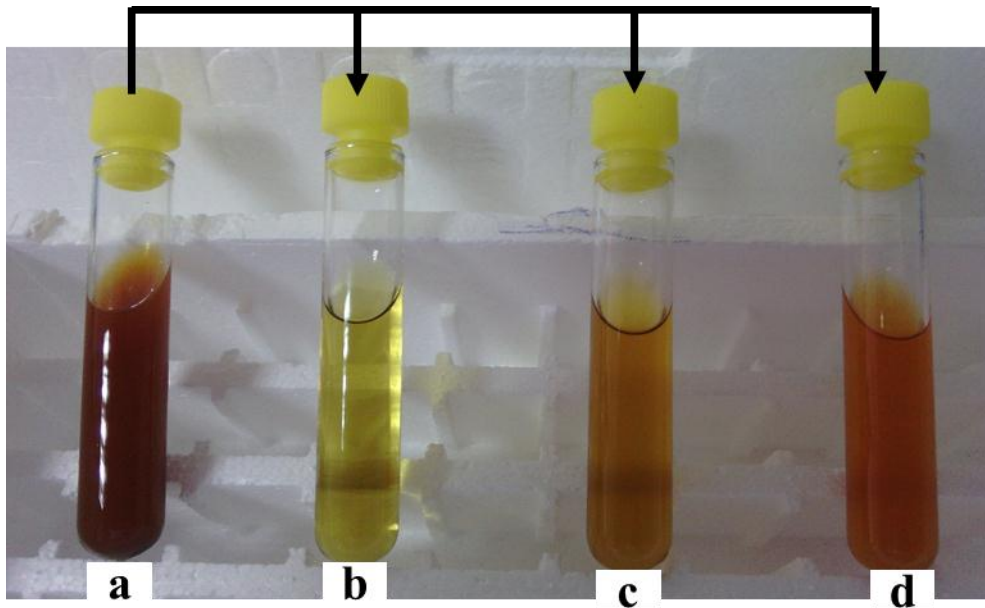
Milieu Proteose Peptone-Glucose-Ammonium Salts (PPGAS)

NH ₄ Cl :	1 g/L
KCl :	1,5 g/L
TRIS-HCl :	19 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O :	0,4 g/L
Glucose :	5 g/L
Peptone :	10 g/L
pH :	7,2

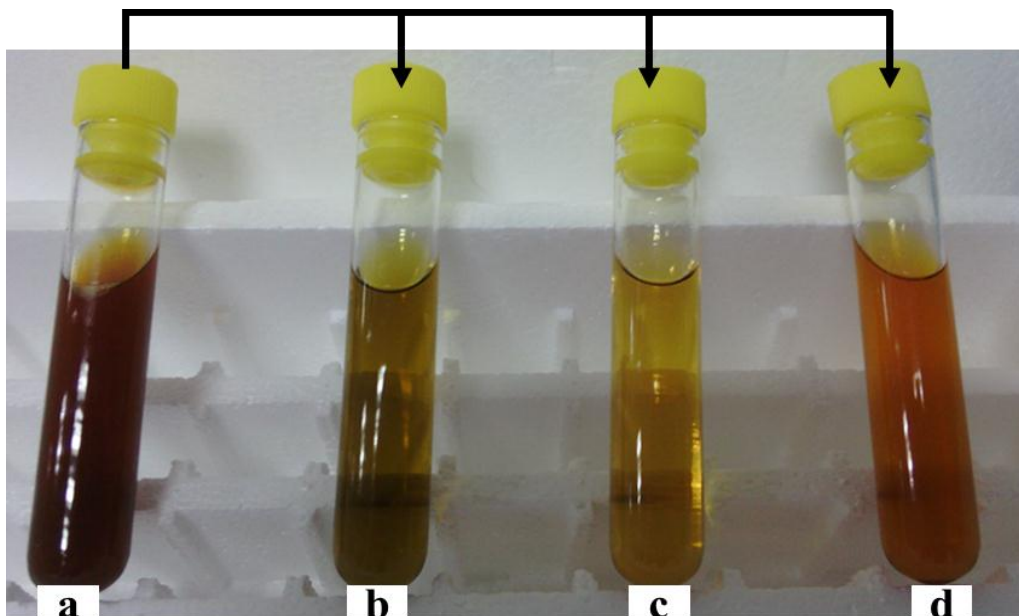
Milieu Luria Bertani (LB)

Tryptone :	10 g/L
Extrait de levures :	5 g/L
NaCl :	10 g/L
pH :	7,2

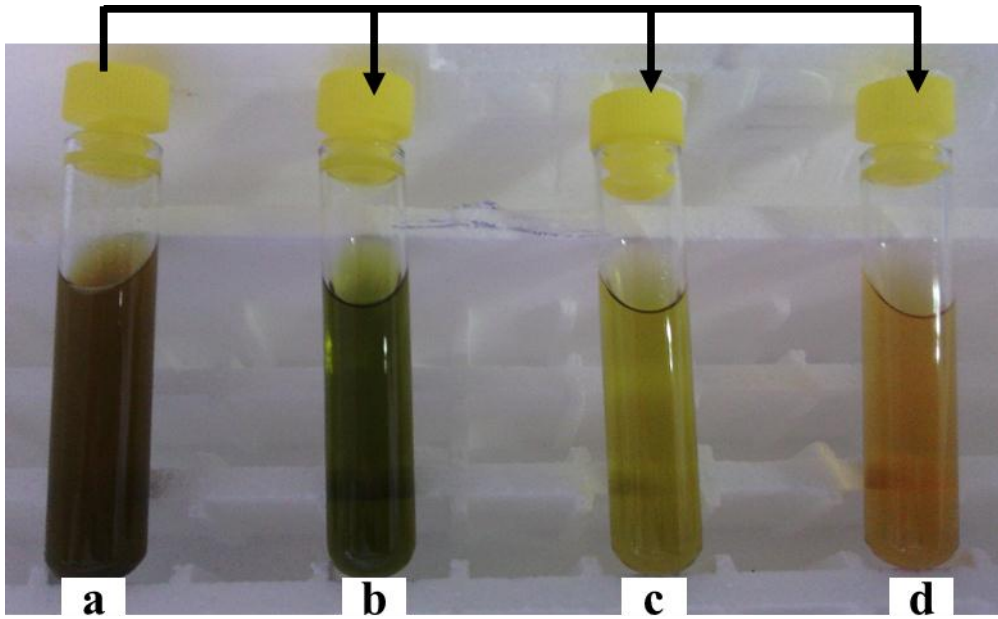
Extraits préparés à partir des feuilles des deux variétés de *L. inermis* et *P. persica*



Extraits des feuilles de *L. inermis* de la région d'Adrar, a : l'extraits hydrométhanolique, b : fraction d'acétate d'éthyle, c : fraction butanolique, d : phase aqueuse.



Extraits des feuilles de *L. inermis* de la région de Biskra, a : l'extraits hydrométhanolique, b : fraction d'acétate d'éthyle, c : fraction butanolique, d : phase aqueuse.



Extraits des feuilles de *P. persica*, a : l'extraits hydrométhanolique, b : fraction d'acétate d'éthyle, c : fraction butanolique, d : phase aqueuse.

Travaux scientifiques

Antibacterial Activity and Anti-Biofilm Formation of Henna (*Lawsonia inermis*) Extracts against *Pseudomonas aeruginosa*

LATTAB Aicha*, DJIBAOUI Rachid and ARABI Abed

Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mostaganem, B.P. 227, 27000 Mostaganem, Algeria.

Received: February 9, 2017

Accepted: March 15, 2017

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterium causing severe nosocomial infections. It is characterized by its ability to form attached biofilm to protect itself from various external pressures. These adherent cells of *P. aeruginosa* make treatment of their infections complicated and demand new therapies. The present work was focused on the study of *L. inermis* extracts effects on planktonic cells and on biofilm formation by seven strains of *P. aeruginosa*. The henna plant was harvested from two different regions in Algeria: Adrar and Biskra. Two solvents were used to extract *L. inermis* flavonoids compounds. The ethyl acetate and butanolic fractions were prepared from a hydro-methanolic extract (70%). The results show that all studied extracts present antibacterial properties against all the isolates tested. It was also indicated that *L. inermis* of Adrar had the highest anti-*P. aeruginosa* activity compared with henna of Biskra. However the butanolic fractions of both *L. inermis* samples have the highest effect with a MIC of 3.12mg/ml and 6.25mg/ml for samples of Adrar and Biskra respectively, compared with the fractions of ethyl acetate which showed a MIC of 6.25mg/ml and 12.5mg/ml for the same samples. Also, the biofilm formation was decreased when incubated with the ½ MIC of butanolic fraction for both *L. inermis* tested. Whereas the ½ MIC of ethyl acetate extracts did not affect biofilm formation in all isolates of *P. aeruginosa*. The quantitative estimation showed that ethyl acetate extracts for both varieties of *L. inermis* are rich in polyphenols (224,83-136,95 mg GAE/g) and flavonoids (20,15-24,92 mg QE/g) compared to butanolic extracts. Finally we can conclude that extraction by butanol makes it possible to better concentrate the antibacterial active ingredients present in the hydro-methanolic extract of *L. inermis* leaves.

KEYWORDS: *Pseudomonas aeruginosa*, *Lawsonia inermis*, Antibacterial activity, MIC, MBC, Biofilm.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous Gram-negative bacteria found in many environments. It is one of the major opportunistic pathogens implicated in serious nosocomial infections. It is a versatile microorganism able to tolerate unfavorable conditions. These properties allow it to attach itself and survive on many biotic and abiotic surfaces, which favors the beginning of infections especially in immunocompromised patients [1]. Treatment of the infections due to *P. aeruginosa* are difficult because of their elevated intrinsic resistance against most antibiotics and their capacity to acquire new mechanisms of resistance following the exposure to antibiotic during treatments [2] and are associated with high mortality rates, ranging from 18% to 61% [3].

In addition to its resistance to antibiotics, *P. aeruginosa* is characterized by its ability to form biofilms. Bacterial biofilms are surface-attached communities of microorganisms embedded in a matrix of complex polysaccharides [4]. Bacteria grown in a biofilm have increased resistance to antibiotics and to the host immune system compared to the non-surface attached (planktonic) bacteria.

Bacterial behavior within biofilms is regulated by the quorum sensing (QS) system [5]. It's a key regulator of biofilm development [6] resistance to antibiotics [7] and expression of virulence factors [8]. The main components of quorum sensing system are the quorum sensing signal synthesis, the signal molecule and the signal receptor [9].

For many years, it is well known that plants have been used in traditional herbal medicine to prevent or cure infectious diseases. However, in the recent years, many research studies have reported the quorum

*Corresponding Author: LATTAB Aicha, Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mostaganem, B.P. 227, 27000 Mostaganem, Algeria.
Phone: 00 312 796 270 846, E-mail: Aichalatab@yahoo.com

sensing-blocking properties of plant extracts by their similarity in chemical structure to quorum sensing signals and also their ability to degrade signal receptors [10].

Lawsonia inermis is commonly called as henna. It is the sole species of the genus *Lawsonia*, belonging to the family *Lythraceae* [11]. It is known by various names in different languages; in Arabic (alhenna), in French (henné) and in English (henna) [12, 13]. It is grown in various tropical regions in Northern Africa, Asia and Australia. *L. inermis* has long been used for many medicinal purposes including as an astringent, an antifungal, an antihemorrhagic agent and for its cardio-inhibitory, hypotensive, and anti-bacterial herb for the skin and hair [14]. Phytochemical investigations of *L. inermis* leaves have shown the presence of flavonoids, coumarins, gallic acid, triterpenoids, naphthalene derivatives, Lawsone, phenolic glycosides and xanthenes [15, 16]. Out of these ingredients, the main compound is Lawsone (2-hydroxynaphthoquinone). About 0.5-1.5% of leaves of henna made of Lawsone [17].

The purpose of this study was to examine the effect of ethyl acetate and butanolic fractions of *L. inermis* on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and six clinical isolates of the same species. The plant leaves were harvested from Adrar and Biskra regions in Algeria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains:

P. aeruginosa ATCC 27853 and six clinical isolates of *P. aeruginosa* obtained from different skin infections in diabetic patients in a health center of Sidi Lakhdar Mostaganem (Algeria). The bacterial colonies morphology were examined and several tests such as Gram stain, catalase, oxidase, pyocyanin and pyoverdinin production, the growth at 42°C and at 4°C were used to identify the bacterial isolates. Each isolate was also identified by an API 20NE system.

Genotypic identification

PCR amplification was carried out in Biorad iCycler thermocycler (Biorad, USA) using the universal primers 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') and 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'). 4µl of a genomic DNA extracted using a rapid method based on thermal shock, are amplified in a 25µl of The reaction mixture consisted of 1 U Taq polymerase, 0,2mM dNTP, 1X PCR reaction buffer, 1,5mM MgCl₂ and 1,25 µl of each of the primers at 10µM. The amplified products were analyzed by agarose gels electrophoresis. 10µl of PCR products were stained with ethidium bromide followed by a migration at a constant voltage. The DNA was visualized and pictures were taken under UV.

Amplified products of three isolates (P2, P3 and P6) obtained were sequenced to validate their identities. Primer 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') was used for amplification and sequencing. An additional primer 27F (5'ACTCCTACGGGAGGCAGCA 3') was used for sequencing.

The sequences obtained were analyzed using GenBank's BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Blast) tool (National Centre for Biotechnology Information).

Antibiotic susceptibility testing

The test was performed on Mueller- Hinton (MH) agar using the standard disc-diffusion method according to the recommendations 2015 of the French Society of Microbiology Antibioqram committee (FSM-AC) (www.sfm.asso.fr). A total of 15 antibiotics were assessed: Penicillin G (P, 10 U), Piperacillin (PRL, 100µg), Ticarcillin (TI, 75 µg), Ticarcillin-clavulanate (TIM, 75/10 µg), Imipenem (IMP, 10mg), Ceftazidime (CAZ, 10 µg), Cefepime (FEP, 30 µg), Gentamycin (CN, 15µg), Amikacin (AK, 30µg), Netilmicin (NET, 10), Tobramycin (TOB, 10µg), Ciprofloxacin (CIP, 5 µg), Levofloxacin (LE, 5 µg), Colistin (COL, 10), Fosfomycin (FF, 50µg). Inhibition zones around the disc were determined after incubation for 24h. Susceptibility results for each strain were reported according to the criteria established by the FSM-AC -2015.

Plant material

Lawsonia inermis samples used in this study were harvested from two different regions of Algeria: Adrar and Biskra. The leaves (Figure 1) were dried under shade and powdered with a mechanical grinder and stored away from light at room temperature.



Figure 1. *L. inermis* samples used in this study, **S1:** leaves from Adrar region and **S2:** leaves from Besra region.

Plant extracts Preparation:

Hydro-methanolic extracts

The extraction was done by maceration of 25 g of fine powder in 500 ml of methanol-water (70/30, v/v). The mixture was agitated for 48h at room temperature (27 ± 2 °C) in enclosed flasks [18]. After filtration through whatman N°1 filter paper, the MeOH of resultant hydroalcoholic extracts was evaporated at 40°C under reduced pressure in a rotary evaporator (Modal: Buchi Switzer land, Type: 201) and affording the aqueous extracts.

Ethyl acetate and butanolic fractions

The crude extract was then fractionated by solvent – solvent extraction, the aqueous solution was firstly extracted ethyl acetate, then with n-butanol. 2 fractions of extracts, namely ethyl acetate and butanolic were obtained. The all fractions were concentrated and dried to a constant weight in a vacuum oven at 45°C. The extracts were stored at 4°C [19].

Total phenolic content determination:

The total phenolic content in ethyl acetate and butanolic extracts was determined by colorimetric assay using Folin-Ciocalteu reagent assay. A volume of 0,2 mL of standard solution (Gallic acid with different concentrations) or the extracts was mixed with 1,5 mL of Folin-Ciocalteu reagent diluted 10 times in water. Afterwards, the obtained solution was added to 1,5 mL of 7,5% aqueous sodium carbonate. The absorbance was then measured at 750 nm against a blank after incubation for 90 min in obscurity at room temperature. [20].

Gallic acid was used as a standard for the calibration curve (1-200µg/mL). The Total phenolic content was expressed as milligram Gallic acid equivalents per gram extract (mg GAE/g extract).

Flavonoids content determination:

The total flavonoids content were determined spectrophotometrically using a method described by Pothitirat *et al.* [21]. In brief 1,5 mL of diluted extract or standard solution was allowed to 1,5 mL of 2% $AlCl_3$. After incubation for 30 min at ambient temperature, the absorbance of the mixture was measured at 430 nm. Quercetin was used to prepare standard solution (1-400 µg/mL). The flavonoids content were expressed as milligram quercetin equivalents per gram extract (mg QE/g extract).

Antibacterial Activity:

The antibacterial activity of *L. inermis* extracts was evaluated by using disc diffusion method on Mueller-Hinton agar plates [22, 23]. Overnight grown culture of microorganisms at 37°C for 24h was used for inoculums preparation. A colony was inoculated in 5ml of tryptic soy broth (TSB) at 37°C for 3h. The turbidity of resulting suspension was measured in order to adjust the cellular concentration to 10^6 CFU/mL. 100µL of the standardized bacterial suspensions of each isolate were inoculated on Mueller-Hinton agar plates. 5min later, filter paper discs (6 mm in diameter) saturated with plant extract (10 µl at 200mg/ml) were placed on the surface of the plates. After pre-incubation for 20min to allow for proper diffusion of the extracts into the media, plates were incubated at 37 °C for 24h. The activity was determined after 24hr of incubation by the measurement of the inhibitory zone diameter.

Determination of MIC and MBC:

The minimal inhibitory concentration (MIC) of the ethyl acetate and butanolic fractions of two samples of *L. inermis* were determined by a broth microdilution method by using 96-well microplates. The optical density at 600 nm of bacterial suspension was measured in order to adjust the cellular concentration to 10^6 CFU/mL.

The lyophilized ethyl acetate and butanolic extracts stock solution were prepared by dissolution in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). 100µl of the dilution extracts were introduced in each well we to be tested. Subsequently, 100µL of an inoculum (10⁶ CFU/mL) was added to each well. The plates were incubated at 37°C for 24hr and the MIC was calculated as the lowest concentration of extract that inhibited visible growth of the organism [24]. The MBC was determined by spreading out 0.1 ml of the wells contents of concentration ≥ MIC on Mueller-Hinton agar. The MBC is the smallest concentration which permits the survival of 0.01% or more of the bacterial suspension after 24 h incubation.

Effect of plant extracts on *P. aeruginosa* biofilm formation:

Effect of ethyl acetate and butanolic fractions of the two different samples of *L. inermis* leaves on biofilm formation was tested by Tissue Culture Plate Method and Tube Method. The first was effectuated on polystyrene 96-well microplates as described by Adonizio *et al.* [25] and the second was made in glass tubes. Cultures were grown overnight in 5 ml of LB, the optical density at 600 nm of bacterial suspension was measured in order to adjust the cellular concentration to 10⁶ CFU/mL. 100 µl was dispensed into each well of 96 well polystyrene flat-bottomed microtiter plates in the presence of 100 µl of TSB with plants extracts (ranging from final concentration MIC to 1/8MIC). 100 µl of bacterial culture added to the same volume of medium without plant extract were used as control. In the Tube Method, 1ml was inoculated in tubes containing 1ml of TSB (as a control), and TSB with the appropriate concentration of plants extract (ranging from final concentration of MIC to 1/8 MIC). Biofilms were allowed to develop under static conditions at 37°C for 24h. The quantitative analysis of biofilm formation was performed using crystal violet staining (1% w/v) of the attached cells, the supernatant in the tubes and microplates were aspirated and rinsed 3 times with physiological water and fixed by drying at room temperature until they were fully dried out. The total of 200µl and 2 ml of 1% crystal violet was added into each well and tube respectively for 15 min. The excess stain was washed off 3 times with distilled water. The crystal violet that stained the attached cells in glass tubes was distained with 2 ml of 95% ethanol at room temperature for 2 min. The optical density (OD at 580nm) of 2 ml distained solution was examined using a spectrophotometer [26]. The absorbance value is positively correlated to the amount of the bacterial adhesion or biofilm. All tests were performed in three triplicate and the absorbance readings were averaged.

Statistical analysis

The experimental results were expressed as mean ± standard deviation of three replicates. The data were evaluated by analysis of variance using Statbox 6. The comparison of means was performed using the least significant difference were considered statistically significant if P < 0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and identification

The six clinical isolates obtained from different skin infections were belonged to *P. aeruginosa*. All of them produce pyocyanin and pyoverdine on King A and King B agar medium respectively. They present a positive oxidase and catalase reactions. They grow at 42°C but not at 4°C. The results of API 20NE system show a percentage of similarity of 99.5% and 99.9% to *P. aeruginosa* (Table 1).

Table 1. Results of the biochemical identification for all the isolates

Isolates	Gram staining	Oxidase test	Catalase test	King B agar	King A agar	G. at 42°C	G. at 4°C	Profile API 20 NE	Identification APIWEB™
P1	Bacilli -	+	+	+	+	+	-	1154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%
P2	Bacilli -	+	+	+	+	+	-	1354575	<i>P. aeruginosa</i> 99.9%
P3	Bacilli -	+	+	+	+	+	-	1154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%
P4	Bacilli -	+	+	+	+	+	-	1354575	<i>P. aeruginosa</i> 99.9%
P5	Bacilli -	+	+	+	+	+	-	1354575	<i>P. aeruginosa</i> 99.9%
P6	Bacilli -	+	+	+	+	+	-	1154575	<i>P. aeruginosa</i> 99.5%

(+): Positive result
(-): Negative result

G.: Growth

The PCR profile (Figure 2) present similar bands size around 1500 bp showing that all of the isolates belong to the species of *Pseudomonas*.

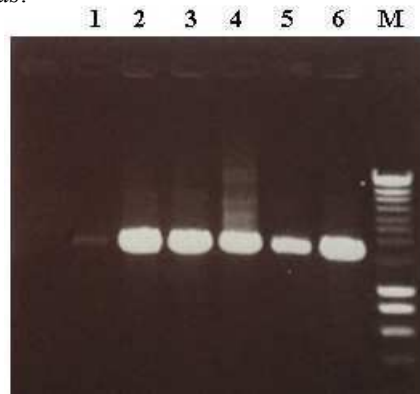


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified 16S-rRNA gene for the clinical isolates (lanes1-6). Lane M: DNA size marker.

The 16S rRNA sequencing analysis of the isolates P2, P3 and P6 confirmed as *P. aeruginosa* (P2: 99% *P. aeruginosa* CJM, P3: *P. aeruginosa* NO5 and P6: 99% *P. aeruginosa* strain F23).

Antibiotic sensitivity

Susceptibility of *P. aeruginosa* towards studied antibiotics has generated the results shown in Table 2 and Figure 3. All *P. aeruginosa* isolates showed high resistance towards β -lactams (Penicillin G, Piperacillin, Ticarcillin-clavulanate), Carbapenems (Imipenem), Cephalosporins (Cefepime). We can argue that the decreasing intracellular β -lactams concentration by MBLs producers and increased the expression of efflux pumps as MexAB, MexCD and MexXY [27] are the most prevalent β -lactams resistance mechanisms in our isolates. An increase in *P. aeruginosa* strains resistant to carbapenems has been observed, which has generated a health problem in several countries (Africa, Europe, America) [28, 29]. The studies presented by Kumar *et al.* [30] and Sara *et al.* [31] reported that the high prevalence of *P. aeruginosa* strains resistant to MBL producers and carbapenems was due to the excessive use of carbapenems. On the other hand, all the strains showed sensitivity towards Fluoroquinolones (Ciprofloxacin and Levofloxacin) and Aminocyclitol antibiotics (Gentamycin, Amikacin, Netilmicin, Tobramycin). These results were comparable with results obtained by Tripathi *et al.* [32], the authors found that the isolates of *P. aeruginosa* were sensitive to variety of Aminocyclitol antibiotic. The isolates showed variable susceptibility toward the Ceftazidime and Fosfomycin.

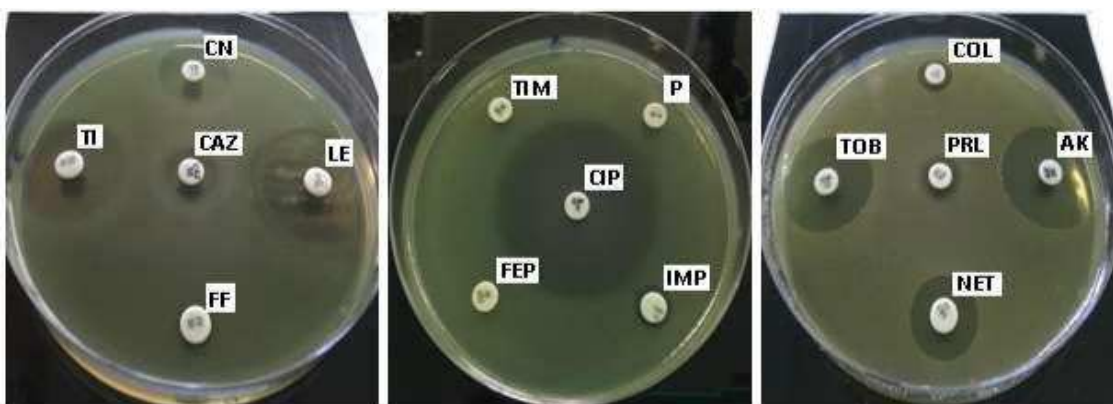


Figure 3. Sensitivity of *P. aeruginosa* towards antibiotics studied: Penicillin G (P), Piperacillin (PRL), Ticarcillin (TI), Ticarcillin-clavulanate (TIM), Imipenem (IMP), Ceftazidime (CAZ), Cefepime (FEP), Gentamycin (CN), Amikacin (AK), Netilmicin (NET), Tobramycin (TOB), Ciprofloxacin (CIP), Levofloxacin (LE), Colistin (COL), Fosfomycin (FF).

Table 2. Susceptibility of *P. aeruginosa* isolates towards antibiotics studied

Antibiotic group	ATB		Isolates tested of <i>P. aeruginosa</i>						
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	PR
β-lactamins	P	ID	/	/	/	/	/	/	/
		(mm)							
			R	R	R	R	R	R	R
	PRL	ID	9,33	12,83	14,5	11,83	16,16	15,00	13,83
		(mm)	± 2,08	± 4,25	± 3,50	± 2,02	± 0,62	± 3,50	± 1,15
			R	R	R	R	R	R	R
	TI	ID	22,83	20,33	24,16	24,00	23,00	22,50	27,33
		(mm)	± 1,75	± 3,21	± 2,75	± 1,32	± 2,00	± 0,50	± 0,57
			S	S	S	S	S	S	S
	TIM	ID	/	/	/	/	/	/	/
(mm)									
		R	R	R	R	R	R	R	
Carbapenems	IMP	ID	8,16	8,66	10,50	9,16	8,00	/	7,33
		(mm)	± 1,15	± 1,15	± 1,80	± 1,60	± 1,00		± 0,57
			R	R	R	R	R	R	R
Cephalosporins	CAZ	ID	13,50	11,33	16,33	16,16	15,00	15,50	17,33
		(mm)	± 0,50	± 0,28	± 1,52	± 1,89	± 1,73	± 0,86	± 1,25
			R	R	S	S	R	R	S
	FEP	ID	/	/	/	/	/	/	/
		(mm)							
			R	R	R	R	R	R	R
Aminosides	CN	ID	22,50	20,00	24,66	24,33	24,66	23,66	24,66
		(mm)	± 0,50	± 2,00	± 1,52	± 1,04	± 1,52	± 0,28	± 0,76
			S	S	S	S	S	S	S
	AK	ID	24,33	23,83	29,33	27,33	28,83	25,50	27,00
		(mm)	± 0,57	± 0,28	± 0,57	± 0,57	± 0,76	± 0,50	± 1,00
			S	S	S	S	S	S	S
	NET	ID	12,33±	11,83±	15,83±	15,50±	16,00±	15,00±	16,00±
		(mm)	0,76	0,57	0,76	0,50	1,00	0,50	0,00
			S	S	S	S	S	S	S
	TOB	ID	21,83	21,66	26,00	24,66	26,33	24,66	24,33
(mm)		± 1,25	± 2,08	± 1,73	± 1,15	± 1,04	± 0,76	± 1,15	
		S	S	S	S	S	S	S	
Fluoroquinolones	CIP	ID	37,50	33,00	38,33	34,33	40,00	36,33	34,66
		(mm)	± 0,86	± 1,73	± 1,52	± 0,57	± 1,00	± 0,57	± 0,57
			S	S	S	S	S	S	S
	LE	ID	32,66	29,50	32,16	31,66	35,83	29,16	30,66
		(mm)	± 1,15	± 3,04	± 2,25	± 1,53	± 1,75	± 0,76	± 1,52
			S	S	S	S	S	S	S
/	FF	ID	10,33	8,66	9,83	20,83	12,33	7,50	23,16
		(mm)	± 0,57	± 1,25	± 1,25	± 3,01	± 3,21	± 0,47	± 2,75
			R	R	R	S	R	R	S

/: no zone of inhibition

Extraction yields

Ethyl acetate and butanolic extracts from leaves of *L. inermis* obtained from two different regions are shown in Figure 4. According to the results obtained, a low difference was noticed between the tested varieties of *L. inermis*. On the other hand, comparison of flavonoids extraction yield of solvents showed that butanol fraction extract was found: 12,87% and 12,31% for samples of Adrar and Biskra respectively and found less important (6,56% and 6,36%) for ethyl acetate fractions.

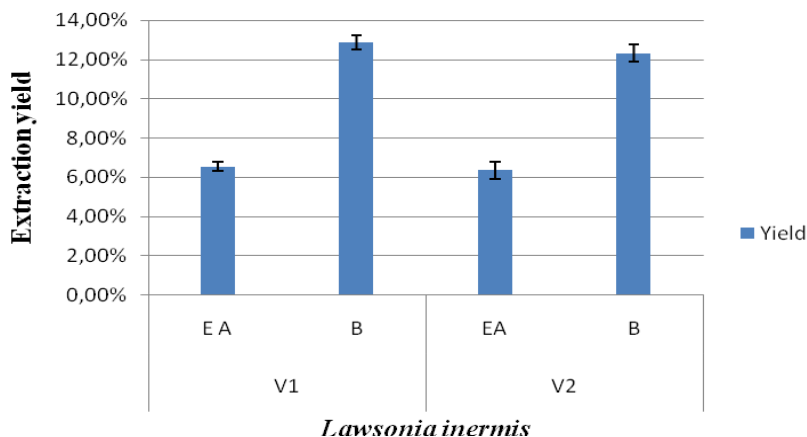


Figure 4. Extraction yield of ethyl acetate and butanolic fractions of two different varieties of *L. inermis*.

Total phenols and flavonoids contents:

The table 3 summarizes the results of the phenols and flavonoids contents. It was found that total phenolic and flavonoids compound extracted from henna leaves are affected with solvent system. The quantitative estimation showed that ethyl-acetate extracts for both samples of *L. inermis* are rich in polyphenols (224,83-136,95 mg GAE/g) and flavonoids (20,15-24,92 mg QE/g) comparatively with butanolic extract.

The solvent is one the factors that can affect the extraction of polyphenols [33]. The extraction of phenolic compounds is also influenced by the extraction method, time and the condition of storage of plant material, chemical structure and sizes of particles forming the phenolic compounds [34].

Table 3. Total phenols and flavonoids contents of ethyl acetate and butanol extracts of *L. inermis* leaves.

Plant extract		Total phenols (mg GAE/g extract)	Flavonoids (mg QE/g extract)
<i>L. inermis</i> (S1)	Ethyl-acetate	224,83±20,07	20,15±1,41
	Butanolic	147,5±6,60	18,81±2,33
<i>L. inermis</i> (S2)	Ethyl-acetate	244,58±25,54	24,92±2,47
	Butanolic	136,95±4,76	15,65±1,43

S1: *L. inermis* from Adrar region
 S2: *L. inermis* from Biskra region

Antibacterial Activity:

The antimicrobial activity of ethyl acetate and butanolic fractions of the two *L. inermis* extracts revealed significant antibacterial activity against all tested isolate of *P. aeruginosa* (Table 4). However, leaves obtained from Adrar region had the highest anti- *P. aeruginosa* activity compared with *L. inermis* from Biskra. The comparison of the zones inhibition obtained by the two extracts tested show that the butanolic fractions exhibited a greater antibacterial activity against all isolates tested for both tested varieties comparatively to ethyl acetate fractions.

L. inermis is a natural colorant showing a high compatibility with the environment [35]. It has been widely used to treat skin infections, such as tinea. Naphthoquinones, including lawsone (2-hydroxynaphthoquinone) are the principal constituent responsible for the antimicrobial properties of the plant [36, 37].

Minimal inhibitory concentration:

The results indicate that the butanolic fraction inhibit the tested bacteria more than ethyl acetate, with a CMI of 3,12 mg/ml and 6,25 mg/ml obtained from *L. inermis* leaves of Adrar and Biskra respectively. However the ethyl acetate fraction exerts an inhibitory activity (MIC) at a concentration of 6.25mg/ml and 12,5mg/ml (Table

5). The minimum bactericidal concentration (MBC) was around 6,25mg/ml and 12,5 mg/ml for the butanolic leaves extract of *L. inermis* obtained from Adrar region and Biskra region and at concentration of 12,5 mg/ml for ethyl acetate extracts for both varieties (Table 5). The butanolic extract showed the lowest MICs

compared to ethyl acetate extracts and this may be due to the large quantity of bioactive compounds that were retained by the solvent (Butanol) during the extraction process.

Table 4. Antimicrobial activity of two varieties of *L. inermis* extracts against isolates of *P. aeruginosa*

Plants extract		P1	P2	P3	P4	P5	P6	PR
<i>L. inermis</i> (S1)	Ethyl acetate	12,83 ±0,57	12,16 ±1,25	11,50 ±0,50	12,30 ±0,57	11,83 ±0,28	11,00 ±1,25	11,33 ±0,76
	Butanolic	17,16 ±0,76	17,00 ±1,00	16,16 ±0,84	17,66 ±1,15	17,16 ±0,76	16,50 ±1,0	17,00 ±1,0
<i>L. inermis</i> (S2)	Ethyl acetate	08 ±0,50	9,66 ±1,15	8,83 ±1,52	9,66 ±0,67	8,83 ±1,51	8,16 ±0,57	7,50 ±0,5
	Butanolic	12,66 ±0,76	12,33 ±0,28	11,66 ±0,28	12,16 ±0,76	11,83 ±0,57	11,5 ±0,50	11,16 ±0,28

S1: *L. inermis* from Adrar region

S2: *L. inermis* from Biskra region

Table 5. MIC and MBC of ethyl acetate and butanolic extracts of two different varieties of *L. inermis*

Plants extracts			Isolates of <i>P. aeruginosa</i> tested							CMB/CMI
			P1	P2	P3	P4	P5	P6	PR	
<i>L. inermis</i> (S1)	AE	MIC (mg/ml)	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	2
		MBC (mg/mL)	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	
	BE	MIC (mg/mL)	3,15	3,15	3,15	3,15	3,15	3,15	3,15	1-2
		MBC (mg/mL)	6,25	6,25	3,15	6,25	3,15	6,25	6,25	
<i>L. inermis</i> (S2)	AE	MIC (mg/mL)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	1
		MBC (mg/mL)	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	
	BE	MIC (mg/mL)	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	1
		MBC (mg/mL)	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	

S1: *L. inermis* from Adrar region

S2: *L. inermis* from Biskra region

AE: Ethyl acetate extract

BE: butanolic extract

Effect of plant extracts on *P. aeruginosa* biofilm formation:

The non growth inhibition concentration of the flavonoids extracts of *L. inermis* samples on the *P. aeruginosa* cells was selected for the study to allow the growth of planktonic cells to develop biofilms. The results (Figures 5, 7 and 8) showed that the butanol fractions can reduce biofilm formation for both *L. inermis* samples tested. However subinhibitory concentrations of ethyl acetate did not affect biofilm formation in all isolates of *P. aeruginosa* in both methods (Figures 6, 9 and 10). The significant effect of the butanolic extract was found at the concentration of ½ MIC as indicated from the remarkable decreased in the number of attached cells (biofilm) and significant reduction in the OD580nm value after 24h incubation.

Plant extracts and other biologically active compounds isolated from plants are known to exhibit antimicrobial properties. In recent years, plant extracts and phytochemicals have also been highlighted as Quorum Sensing Inhibitors (QSI), providing an opportunity to develop new drugs against these targets to combat biofilm formation. Phenolic substances, including flavonoids are a major class of phytochemicals that have demonstrated significant anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer properties. Flavonoids

contents of *L. inermis* such as quercetin and apigenin have been reported to have quorum sensing inhibitors activities. Vikram *et al.* [39] demonstrated a potential modulation of bacterial cell to cell communication, decreasing biofilm formation on enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and *Vibrio harveyi* virulence, by the two flavonoids compounds quercetin and apigenin.

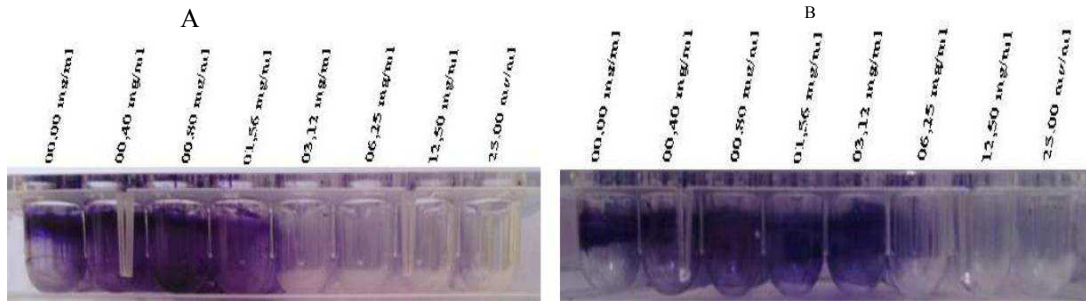


Figure 5. Effect of the butanolic extract (A) and ethyl acetate extract (B) of *L. inermis* (S1) on the biofilm formation by *P. aeruginosa* on polystyrene microtiter plates.

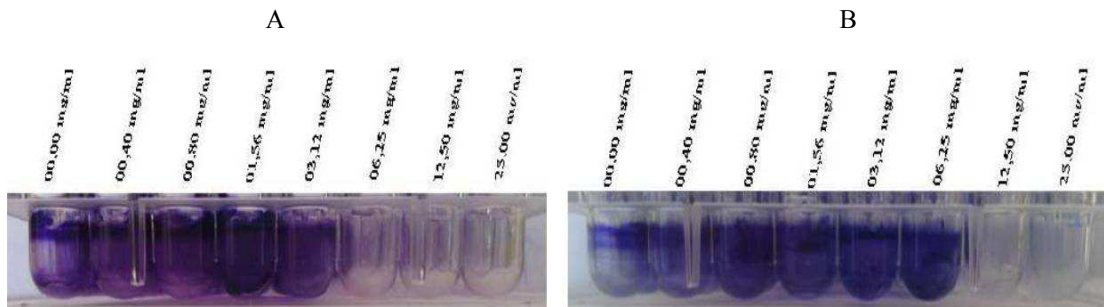


Figure 6. Effect of the butanolic extract (A) and ethyl acetate extract (B) of *L. inermis* (S2) on the biofilm formation by *P. aeruginosa* on polystyrene microtiter plates.

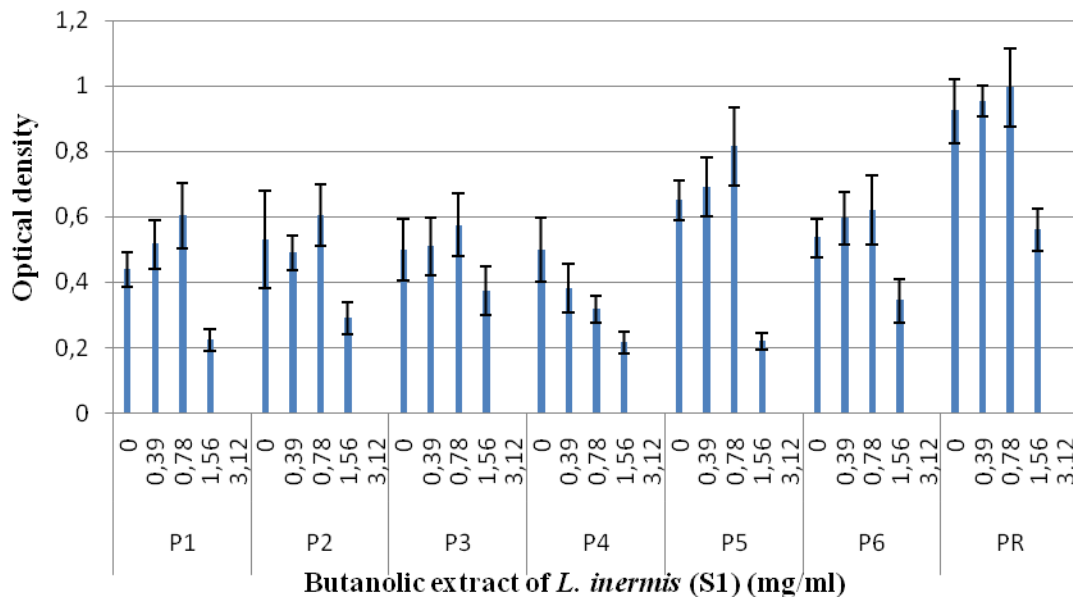


Figure 7. Effect of the butanolic extract of *L. inermis* (S1) on the biofilm formation by *P. aeruginosa*.

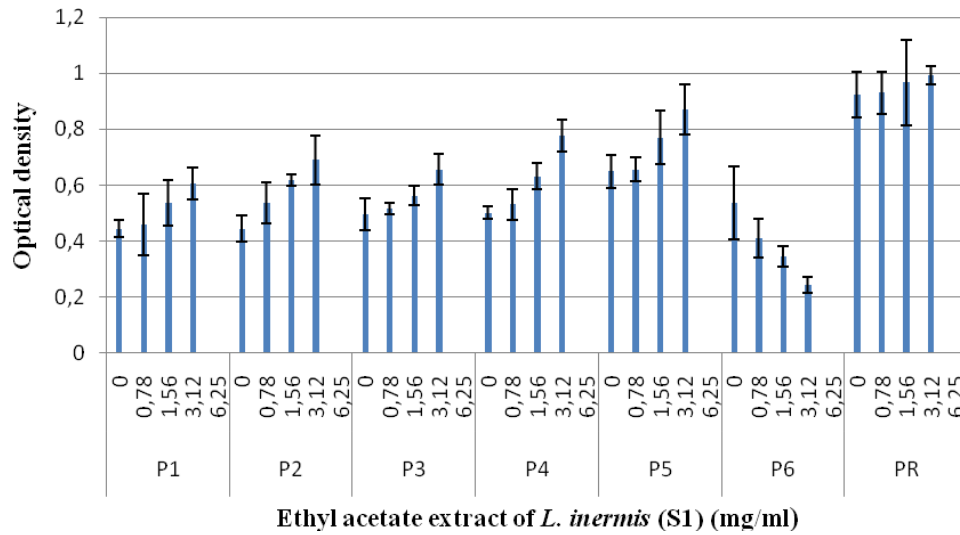


Figure 8. Effect of the ethyl acetate extract of *L. inermis* (S1) on the biofilm formation by *P. aeruginosa*.

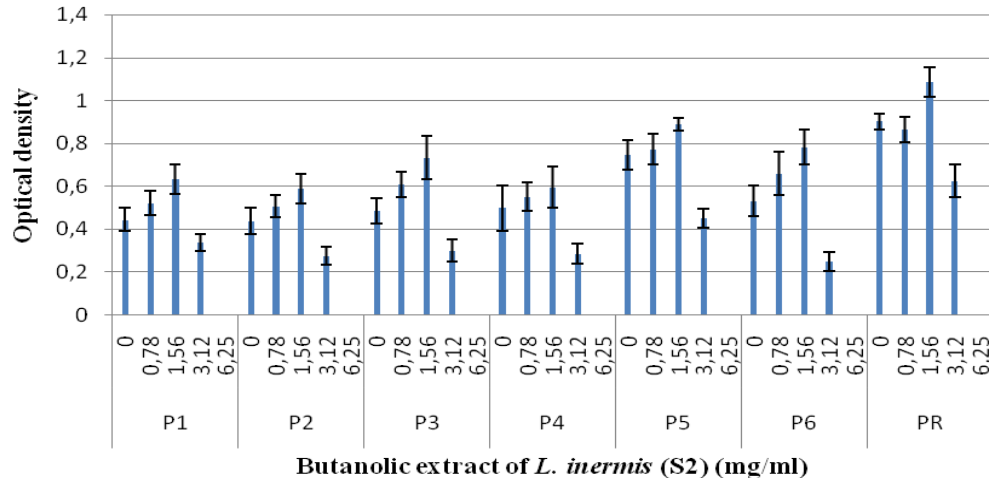


Figure 9. Effect of the butanolic extract of *L. inermis* (S2) on the biofilm formation by *P. aeruginosa*.

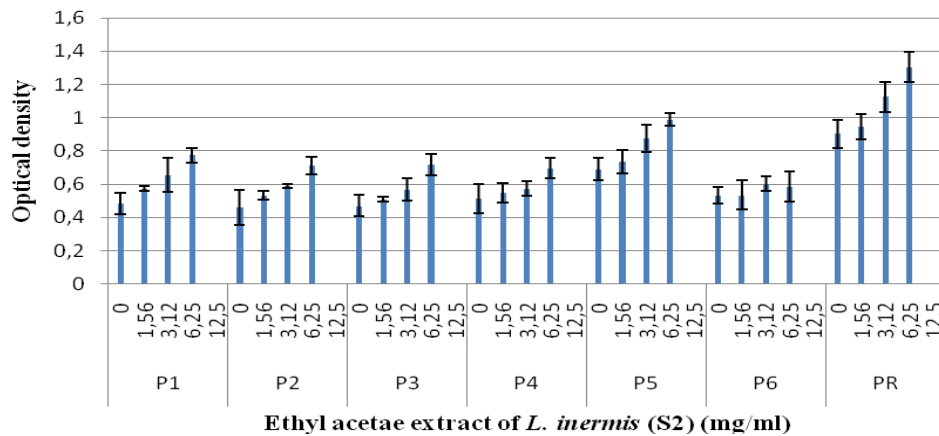


Figure 10. Effect of the ethyl acetate extract of *L. inermis* (S2) on the biofilm formation by *P. aeruginosa*.

CONCLUSION:

According to our results obtained, where all studied extracts present an antibacterial property against all the isolates tested. It was also indicated that *L. inermis* obtained from Adrar region had the highest anti- *P. aeruginosa* activity compared with that obtained from Biskra region. However the butanolic fractions of both *L. inermis* samples have the highest effect with a MIC of 3.12mg/ml and 6.25mg/ml for samples of Adrar and Biskra respectively, compared with the fractions of ethyl acetate which showed a MIC of 6.25mg/ml and 12.5mg/ml for the same samples. Also, the biofilm formation was decreased when incubated with the ½ MIC of butanolic fraction for both *L. inermis* samples tested. Whereas the ½ MIC of ethyl acetate did not affect biofilm formation in all isolates of *P. aeruginosa*. We conclude that the extraction by butanol is that which makes it possible to better concentrate the antibacterial active ingredients present in the hydro-methanolic (70%) extract of *Lawsonia inermis* leaves.

REFERENCES

1. Engel, J. and P. Balachandran, 2009. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol*, 12: 61-66.
2. Breidenstein, E.B.M., 2011. De la Fuente-Nuñez C, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol*, 19: 419-426.
3. Poole, K., 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol*, 2-65.
4. Joo, H.S., M. Otto, 2012. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem. Biol.*, 19: 1503–1513.
5. Heurlier, K., V. Denervaud and D. Haas, 2006. Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 296: 93-102.
6. De Kievit T.R., 2008. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.*, 11: 279-88.
7. Høiby, N., T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin and O. Ciofu, 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35: 322-332.
8. Schuster, M., E.P. Greenberg, 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 296: 73-81.
9. Williams, P., 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world. *Microbiology*, 153: 3923-3938.
10. Kalia, V. C., 2013. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, 31(2): 224-245.
11. Singh M., S. K. Jindal, Z. D. Kavia, B. L. Jangid, Khem Chan, 2005. Traditional Methods of Cultivation and Processing of Henna. *Henna, Cultivation, Improvement and Trade*: 21-14. Jodhpur, India: Central Arid Zone Research Institute.
12. Borade A. S., B. N. Kale and R. V. Shete, 2011. A phytopharmacological review on *Lawsonia inermis* (Linn.). *Int. J. Pharm. Life Sci.*, 2: 536-41.
13. Yada, S., A. Kumar, J. Dora and A. Kumar, 2013. Essential perspectives of *Lawsonia inermis*. *Int. J. Pharm. Chemical. Sci.*, 2: 888-96.
14. Shivananda, N.B., G. Isitor, E.M. Davis and G.K. Pillai, 2007. The evidence based wound healing activity of *Lawsonia inermis* Linn. *Phytotherapy Research*, 21(9): 827-31.
15. Chaudhary, G., S. Goyal and P. Poonia, 2010. *Lawsonia inermis* Linnaeus: a phyto-pharmacological review. *Int. J. Pharma. Sci. Drug Res*, 2: 91-98.
16. Hsouna, A.B., M. Trigui, G. Culioli, Y. Blache and S. Jaoua, 2011. Antioxidant constituents from *Lawsonia inermis* leaves: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity. *Food Chem.*, 125: 193-200.

17. Kelmanson, J. E., A. K. Jager and J. V. Staden, 2002. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. *J. Ethnopharm.*, 69: 241-246.
18. Fathiazad, F., M. Mazandarani and S. Hamedeyazdan, 2011. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from Iran. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1(2): 63 – 67.
19. Bekkara, F., M. Jay, M.R. Viricel, and Rome, S. 1998. Distribution of phenolic compounds 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 and Soil*, 203 (1): 27–36.
20. Othman, A. Ismail, N.A. Ghani and I. Adenam, 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.*, 100: 1523-1530.
21. Pothitirat, W., M.T. Chomnawang, R. Supabphol and W. Gritsanapan, 2009. Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. *Fitoterapia*, 80: 442–447.
22. Sacchetti G, S. Maietti, M. Muzzoli, M. Scaglianti, S. Manfredini, M. Radice and R. Bruni, 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621-632.
23. Celiktas O. Y., E. E. Hames Kocabas, E. Bedir, F. Vardar Sukan, T. Ozek and K. H. C. Baser, 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100: 553-559.
24. Howaida, A. F., N. Skaug and W. Francis George, 2002. In vitro antimicrobial effects of crude miswak extracts on oral pathogens. *Saudi Journal of Dentistry*, 14: 26–32.
25. Adonizio, A., K.F. Kong and K. Mathee, 2008. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *P. aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 198-203.
26. Djordjevic, D., M. Wiedmann and L.A. McIandsborough, 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2950-2958.
27. Mesaros N., Tulkens P.M., P. Nordmann, P. Plésiat, M. Roussel-Devallez, J. Van Eldere, Y. Glupczynski, Y. Van Laethem, F. Jacobs, P. Lebecque, A. Malfroot and F. Van Bambeke, 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: Résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Clinical Microbiology and Infection*, 126 (8): 305-316
28. Romano-Mazzotti L, C. Gayosso, C.M.D. Alcántar, J.I.Santos-Preciado and C.M. Alpuche-Aranda, 2008. Transmisión cruzada: un factor primordial en bacteremias por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenemes en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Enferm. Infecc. Microbiol.*, 28(suppl 1): S83.
29. Tsakris, A., A. Poulou, I. Kristo, T. Pittaras, N. Spanakis, S. Pournaras, *et al.*, 2009. Large dissemination of VIM-2-metallo-b-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains causing health care-associated community-onset infections. *J. Clin. Microbiol.*, 47: 3524-3529.
30. Kumar, S.H., A.S. De, S.M. Baveja and M.A. Gore, 2012. Prevalence and risk factors of metallo-b-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species in burns and surgical wards in a tertiary care hospital. *J. Lab. Physicians.*, 4: 39-42.
31. Sara, A. Ochoa, Fernanda López-Montiel, Gerardo Escalona, Ariadna Cruz-Córdova, Leticia B. Dávila, Briseida López-Martínez, Yolanda Jiménez-Tapia, Silvia Giono, Carlos Eslava, Rigoberto Hernández-Castro and Juan Xicohtencatl-Cortes, 2013. Pathogenic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains resistant to carbapenems associated with biofilm formation, *Bol. Med. Hosp. Infant Mex*, 70 (2): 133-144

32. Tripathi, P., G. Banerjee, S. Saxena, S.M. Gupta and P.W. Ramteke, 2011. Antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of lower respiratory tract infection. African J. Microbiol. Res., 5(19): 2955-2959.
33. Haddad Khodaparast Mohammad Hosein and Dezashibi Zinab, 2007. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Henna Leaves Extracts (*Lawsonia Inermis*). World Journal of Dairy & Food Sciences, 2 (1): 38-41.
34. Naczki, M. and F. Shahidi, 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. J. Chromatogr. A, 1054: 95-111.
35. Phirke S. S. and M. Saha, 2013. An overview of *Lawsonia inermis* L: a natural dye plant. Bionano Frontier. 6: 181-4.
36. Arun, P., K. G. Purushotham, J. Jayarani and V. Kumari, 2010. In vitro anti-bacterial activity and flavonoid contents of *Lawsonia inermis*. Int. J. Pharm. Tech. Res., 2: 1178-81.
37. Mostefa-Kara B., C. Ziani-Cherif, M. Benabdallah, N. M. Rahmoun, D. Villemin, N. Choukchou-Braham, K. Boucherit, 2010. New chemical tools for the assessment of hemolytic anemia induced by naph-toquinones. Der. Pharma. Chemica., 2: 14-21.
38. Atkinson, S. and P. Williams, 2009. Quorum sensing and social networking in the microbial world. Journal of the Royal Society Interface, 6(40): 959-978.
39. Vikram, A., G.K. Jayaprakasha, P.R. Jesudhasan, S.D. Pillai and B.S. Patil, 2010. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. Journal of Applied Microbiology, 109(2): 515-527.



Effect of salicylic acid on biofilm formation and on some virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*

Lattab Aicha*, Djibaoui Rachid, Arabi Abed, Dahah Hichem

Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Natural Sciences and Life,
University of Mostaganem, Mostaganem, Algeria

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Rhamnolipids, Pyocyanin, Salicylic acid.

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/10.1.60-71>

Article published on January 15, 2017

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen resisting to several antibiotics. The resistance has been associated with bacterial biofilm formation favored by the presence of exopolysaccharides (EPS) and the ability to express many virulence factors. In our study, we investigated the use of salicylic acid (SA) to affect biofilm formation by use of crystal violet staining method (CVSM), swarming motility, pyocyanin and rhamnolipids production by *P. aeruginosa* ATCC 27853 and five clinical isolates of the same species. The results showed that MIC and MBC of SA against the studied bacteria were recorded around 10mM and 20mM respectively and the biofilm formation was highly decreased when incubated with the sub-inhibitory SA concentrations. Where we recorded an inhibition of 62,97% at the concentration of 4mM of SA for the reference strain *P. aeruginosa* ATCC 27853. Pyocyanin production and motility assay showed that sub-inhibitory concentrations of salicylic acid significantly decreased pyocyanin production and swarming motility, with relative swarming motility of 33% for *P. aeruginosa* ATCC 27853 at concentration of 4mM compared to non treated strain. Then the rhamnolipids production detected for only one isolate (P₂) in the utilized medium PPGAS among the tested isolates was completely inhibited by 2mM or more of SA.

* Corresponding Author: Lattab Aicha ✉ Aichalatab@yahoo.com

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterium causing nosocomial infections, especially in immune compromised patients. It colonizes lungs, urinary tract, kidneys, and also adheres to catheters, causing inflammation and septic shock in hospital patients (Donalan, 2011). The capacity of *P. aeruginosa* to cause a wide variety of diseases depends partially on its ability to express many virulence factors. The principal factor rendering the pathogen resistant to antibiotics and environmental fluctuations is the formation of biofilms. They are a complex structure composed of microbial cells adhered to a surface and enclosed in a matrix of hydrated extracellular polymeric substances (EPS). Biofilms have significant implications in medical settings, primarily due to their resistance to antimicrobial agents and to host immune system, resulting in chronic infections and medical equipment contaminations (Harmsen *et al.*, 2010).

Bacterial behavior within biofilms is regulated by the phenomenon of quorum sensing (QS) (Heurlier *et al.*, 2006). It's a regulatory mechanism that enables bacteria to make collective decisions with respect to the expression of a specific set of genes (Kalia, 2013). The main components of QS system are the QS signal synthase, the signal receptor and the signal molecule (Williams, 2007). In *P. aeruginosa*, there are two known complete conventional QS system, *las* and *rhl*. The synthase LasI and RhlI produce the homoserine lactones 3OC12-HSL and C4-HSL respectively, which complex with their correspondent transcriptional regulators, LasR and RhlR to modulate the transcription of 5-10% of the entire *P. aeruginosa* genome (Dekimpe and Deziel, 2009). Pesci *et al.* (1999) discovered a third *P. aeruginosa* quinolone signaling system (PQS). PQS belongs to the family of the 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ). Two operons are implied in the synthesis of the HAQ: *pqsABCDE* and *phnAB*, (Deziel *et al.*, 2004) the expression from these two operons is controlled positively by the factor transcriptionnel associated virulence PqsR (also called MvfR) (Deziel *et al.*, 2005).

The 4-hydroxy-2-heptylquinoline is transformed into PQS by PqsH of which the expression is controlled by LasR (Deziel *et al.*, 2004; Gallagher *et al.*, 2002). The PQS-PqsR system is controlled positively by LasR and negatively by Rhl. Pyocyanin is one of the main virulence factors in *P. aeruginosa* regulated by quorum sensing and synthesized by several strains of the genes at high cell densities, associated with biofilm formation (Costerton *et al.*, 1999). The Swarming motility is a complex phenomena also regulated by quorum sensing playing an important role in the pathogenicity and biofilm formation of *P. aeruginosa*. It requires flagella, type IV pili, and biosurfactants production (Pamp *et al.*, 2007). Among the best known biosurfactants produced by *P. aeruginosa* are Rhamnolipids. They are surface-active molecules considered as a key in swarming motility and by decreasing the surface tension between the cells and its environments.

Salicylic acid (SA) is the major phenolic acid plant product, a secondary metabolite which occurs in some fruits and vegetables. Besides its well-known function in regulating plant defense, a recent study demonstrated that the non-steroidal anti-inflammatory drug (SA) reduced biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* (Polonio *et al.*, 2001), *Bacillus subtilis* (Rudrappa *et al.*, 2007), *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. It affects motility and reduces other virulence factors in *P. aeruginosa* (Bandara *et al.*, 2006; Da *et al.*, 2010). The SA is also known by interfering with global regulators and the expression of *S. aureus* virulence factors (Riordan *et al.*, 2007).

The main goal in the present work was to study biofilm formation with and without SA and to explore the effects of SA on the growth, swarming motility, pyocyanin and rhamnolipides production in six isolates of *P. aeruginosa*.

Materials and methods

Bacterial strains

The tests were carried out using a reference strain *P. aeruginosa* ATCC 27853 and five clinical isolates of *P. aeruginosa* isolated from a health center in Sidi Lakhdar Mostaganem (Algeria).

The isolates were identified by some phenotypic tests and completed by the API 20NE system (bioMérieux Marcy-l'Etoile, France).

Effect of salicylic acid on the growth of P. aeruginosa

To determine whether the presence of SA had some effects on the bacterial growth in liquid medium, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the broth macrodilution method (Moroh *et al.*, 2008). 200 µl at 10⁶ cells/ml of five isolates and one strain of *P. aeruginosa* ATCC 27853 were inoculated with 2 ml trypticase soy broth (TSB) supplemented with 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 and 40mM SA. After 24 h incubation at 37°C, the Minimal inhibitory concentration (MIC) was calculated as the lowest concentration of SA that inhibited visible growth of the microorganism. The MBC was determined by spreading out 0.1 ml of the tubes contents of concentration ≥ MIC on Mueller-Hinton agar. The MBC is the smallest concentration which permits the survival of 0.01% or more of the bacterial suspension after 24 h incubation.

Effect of salicylic acid on biofilm formation

The studied strains of *P. aeruginosa* were screened for their ability to form biofilms. The quantitative assays on biofilm formation were performed in glass tubes. 200 µl of bacterial suspension (OD ≈ 0.08 at 620nm) was inoculated in tubes containing 2 ml of TSB (as a control) and TSB with the (0.5, 1, 2 and 4mM) of SA. Biofilms were allowed to develop under static conditions at 37°C quantified after 24h, by spectroscopic determination at 580 nm after a crystal violet staining (1% w/v) (Djordjevic *et al.*, 2002).

Swarming assay

Swarming motility was evaluated on modified BM2 glucose plates (62 mM potassium phosphate buffer pH 7, 0.5% casamino acids, 2 mM MgSO₄, 10 µM FeSO₄, 0.4% (w/v) glucose) containing 0.5% (w/v) agar (Overhage *et al.*, 2008). The SA at 0, 0.5, 1, 2 and 4mM was incorporated into the growth medium (tempered at 45 °C). A sub-inhibitory concentration was used to ensure that the effects on motility inhibition were not due to antimicrobial activity. 3 µL aliquots of the log phase cultures at 10⁶ cells/ml were

inoculated onto the centre of each plate that was subsequently incubated overnight at room temperature. The motility halos were measured after 24hours incubation. Three plates were used to evaluate the motility of each bacterium and three independent experiments were performed.

Effect of salicylic acid on pyocyanin production by P. aeruginosa

The pyocyanin assay was performed using Luria Bertani broth (LB; tryptone 1%, yeast extract 0.5% and NaCl 1.0%). To determine the effect of SA on pyocyanin production, 200 µl of the bacterial suspension (OD ≈ 0.08 at 620nm) of *P. aeruginosa* ATCC 27853 and five isolate were inoculated in tubes with 3 ml Luria Bertani broth (LB) supplemented with 0, 0.5, 1, 2 and 4mM of SA. The tubes were incubated for 48 h at 37°C under shaking conditions (180 rpm). Pyocyanin was extracted as described in the literature (Essar *et al.*, 1990). 2.5ml culture was extracted in 1.5 ml of chloroform and transferred to a clean tube. 0.8 ml of 1 N HCl was added and gently shaken to bring the pyocyanin to the pink aqueous phase. The OD at 520nm of the aqueous solution was measured and the pyocyanin concentration (mg/ml) was determined by multiplying this measurement by 17.07 (Drenkard, 2003).

Effect of SA on Rhamnolipids production

Rhamnolipids production was tested on Proteose Peptone-Glucose-Ammonium Salts (PPGAS) medium: NH₄Cl : 1 g/L, KCl : 1.5 g/L, TRIS-HCl : 19 g/L, MgSO₄·7H₂O : 0.4 g/L, Glucose : 5 g/L, Peptone : 10 g/L. The experiment was conducted in 250ml flasks containing 50ml of PPGAS medium. The flasks were inoculated with 1 ml of the bacterial suspension (10⁶cells/ml) of six isolate of *P. aeruginosa* and incubated under shaking conditions (180 rpm) at 30 °C for 3 and 8 days. To determine the influence of SA on rhamnolipids production, the bacterial suspensions were inoculated with PPGAS medium supplemented with 0, 0.5, 1, 2 and 4mM of SA. The cells suspensions were centrifuged at 8000g for 20 min to prepare the cell-free supernatant (CFS). 300 µL of the CFS was extracted 2 times with 600 µL of diethyl ether, the 2 extracts are gathered and

evaporated dry to yield rhamnolipids. The rhamnolipids were dissolved in 100 μ L of distilled water. The concentration of rhamnolipids was determined using the orcinol assay (Wilhelm *et al.*, 2007). By mixing 100 μ L of diluted solution of rhamnolipids (purified with liquid-liquid extraction) with 100 μ L of orcinol at 1.6% and 800 μ L of sulphuric acid at 60%. The mixture was heated at 80°C for 30 minutes, absorbance was measured spectrophotometrically at 421 nm. The concentration of rhamnolipids was calculated according to L-rhamnose standard curve (0 to 50 mg/l) and multiplying the result with a coefficient of 3.4 obtained from the correlation of pure rhamnolipids/rhamnose (Benincasa *et al.*, 2004).

Crystal violet analysis

The quantitative analysis of biofilm formation was performed using crystal violet staining of the attached cells, the supernatant in the tubes were aspirated and rinsed 3 times with distilled water and fixed by drying at room temperature until they were fully dried out. The total of 2 ml of 1% crystal violet was added into each tube for 15 min. The excess stain was washed off 3 times with distilled water. The crystal violet that

stained the attached cells was distilled with 2 ml of 95% ethanol at room temperature for 2 minutes. The optical density (OD at 580nm) of 2 ml distilled solution was examined using a spectrophotometer (Djordjevic *et al.*, 2002). The absorbance value is positively correlated to the amount of the bacterial adhesion or biofilm. All tests were performed in three triplicate and the absorbance readings were averaged.

Statistical analysis

The experimental results were expressed as mean \pm standard deviation of three replicates. The data were evaluated by analysis of variance using Statbox 6. The comparison of means was performed using the least significant difference were considered statistically significant if $P < 0.05$.

Results and discussion

Minimum inhibitory concentration

The antibacterial activity of SA was examined against five isolates of *P. aeruginosa* and *P. aeruginosa* ATCC27853. MIC assay results indicated that SA concentrations ≥ 10 mM inhibited strains growth in all tubes when viewed with naked eye. The MBC of the phenolic acid (SA) was around 20mM (Fig. 1).

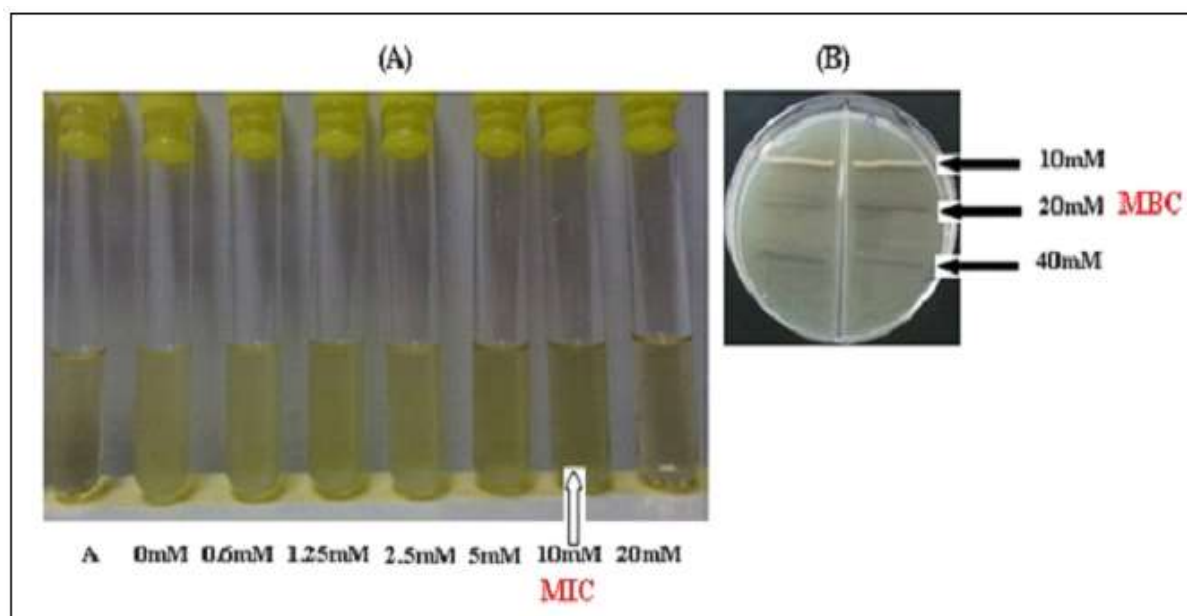


Fig. 1. Variation of turbidity due to the growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853 according to the concentration of Salicylic Acid (A) and minimal bactericidal concentration (B).

The medicinal properties of salicylic acid have been known since ancient times. There are studies on the inhibition of planktonic cell growth with SA demonstrated significant antimicrobial properties (Delaney *et al.*, 1994; Kus *et al.*, 2002; Prithiviraj *et al.*, 2005; Samuel *et al.*, 2011).

Biofilm formation assay

Biofilm development is associated with antibacterial resistance and can contribute to severe infections (Høiby *et al.*, 2010). To test whether the presence of SA affects the biofilm formation on *P. aeruginosa*, we carried out an in vitro experiment in which SA was supplemented into the culture medium with different concentrations (0.5, 1, 2, and 4mM).

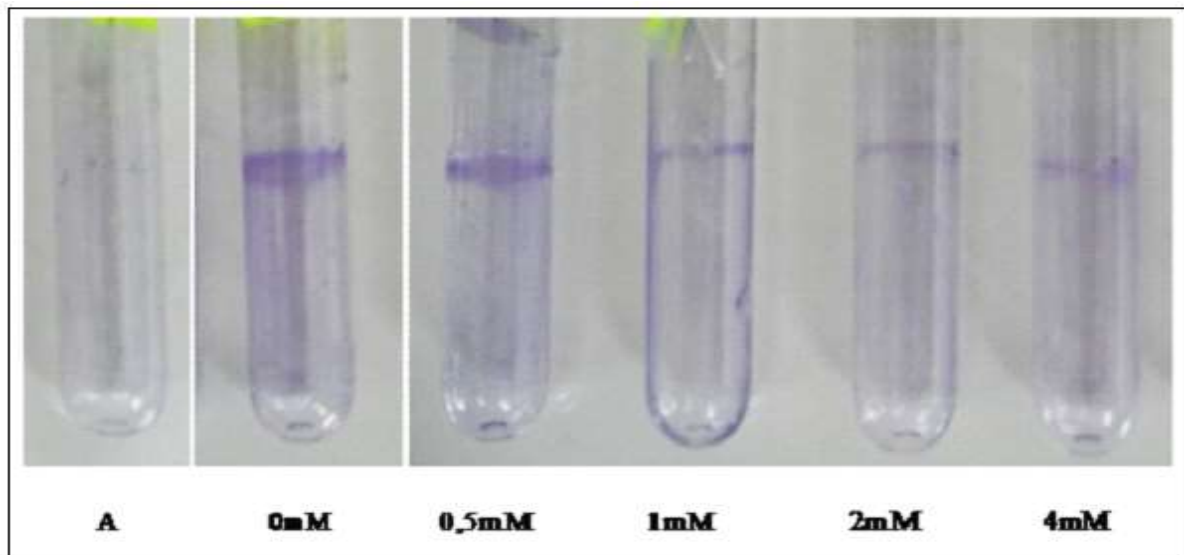


Fig. 2. Effect of the Salicylic Acid on the biofilm formation by *P. aeruginosa* ATCC 27853, A: negative control, 0mM: positive control.

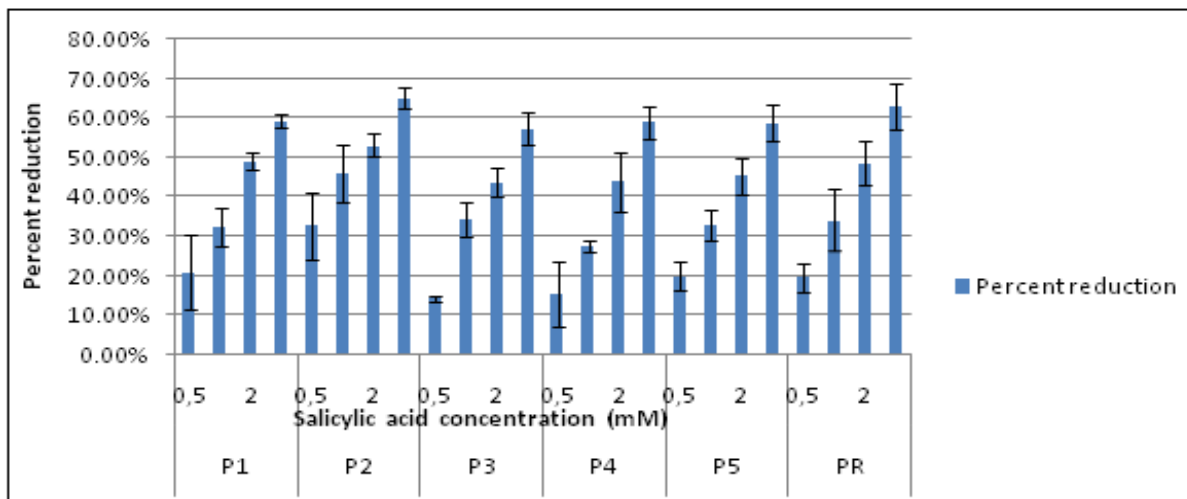


Fig. 3. Reduction of biofilm formation by *P. aeruginosa* ATCC 27853 and five isolates of *P. aeruginosa* in the presence of 0, 0.5, 1, 2 and 4mM of SA.

The obtained result reported that the addition of SA can reduce biofilm formation in *P. aeruginosa* compared to the untreated control (Fig. 2 and 3). A number of studies have found that SA can reduce

biofilm formation in *P. aeruginosa* (Prithiviraj *et al.*, 2005; Mei *et al.*, 2010; Samuel *et al.*, 2011). Films of the salicylic acid-releasing polymers were found to inhibit biofilm formation, as shown by

bioluminescent and GFP in *P. aeruginosa* and *E. coli* strains (Nowatzki *et al.*, 2012). Rosenberg *et al.* (2008) and Nowatzki *et al.* (2012) found that salicylic acid-based and realising polymers significantly reduced biofilm formation by *Salmonella enteric* serovar *typhimurium* and *E. coli*.

One hypothesis that could explain the observed biofilm inhibition is that the SA is somehow affecting quorum sensing (QS) known as cell to cell

communication which is required for the differentiation of the individual cell to the mature biofilm (Davies *et al.*, 1998). Data provided by some studies showed that mutants with lack of QS form biofilms that are more unstructured, and susceptible to chemical agents compared to wild types (Bjarnsholt *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* QS is composed of *las*, *rhl* and *pqs* circuits under control of *lasI/R* system (Rasmussen and Givskov, 2006; Jimenez *et al.*, 2012).

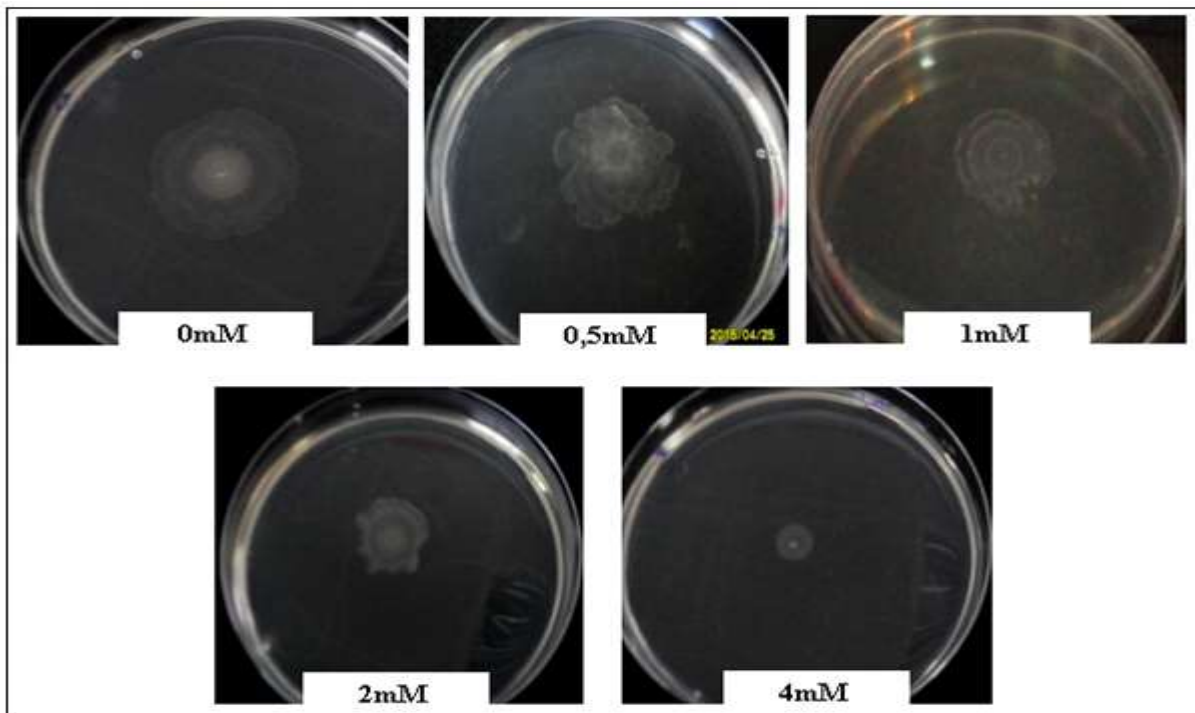


Fig. 4. Effect of SA on swarming motility in *P. aeruginosa* ATCC 27853.

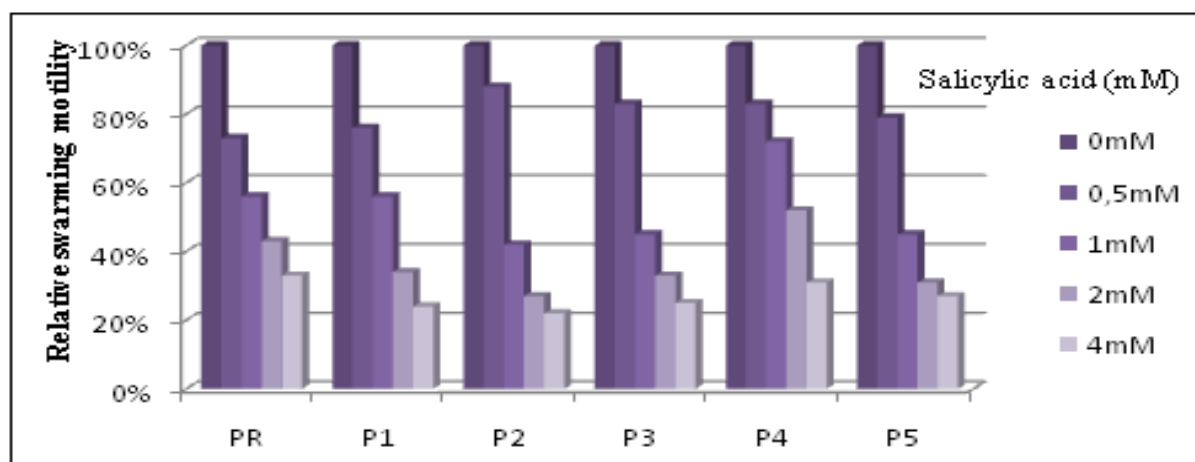


Fig. 5. Quantification of swarming motility by *P. aeruginosa* ATCC 27853 and five isolates of *P. aeruginosa* when exposed to increasing concentrations of salicylic acid.

Interference with QS can affect the biofilm development and make the bacteria more susceptible to anti-microbials (Landini *et al.*, 2010). Yang *et al.* (2009) reported that SA suppressed the expression of genes associated with the las/rhl quorum sensing autoinducer 1 (AI1) homoserine lactone-based signalling system in *P. aeruginosa*.

Effect of SA on swarming motility

P. aeruginosa motility plays a vital role in creation of biofilms in its initial attachment (Arora *et al.*, 2005).

The sub-inhibitor concentrations (0.5, 1, 2 and 4 mM) of SA decreased swarming motility in all studied strains of *P. aeruginosa* (Fig. 4 and 5). Samuel *et al.* (2011) conducted the motility assays on wild-type strains, flagella and type IV pili mutants and found that salicylic acid had significant effects in decreasing swarm, swim and twitch motility for all strains tested. The swarming motility has been shown to be important for the early stages of biofilm formation (Shrout *et al.*, 2006).

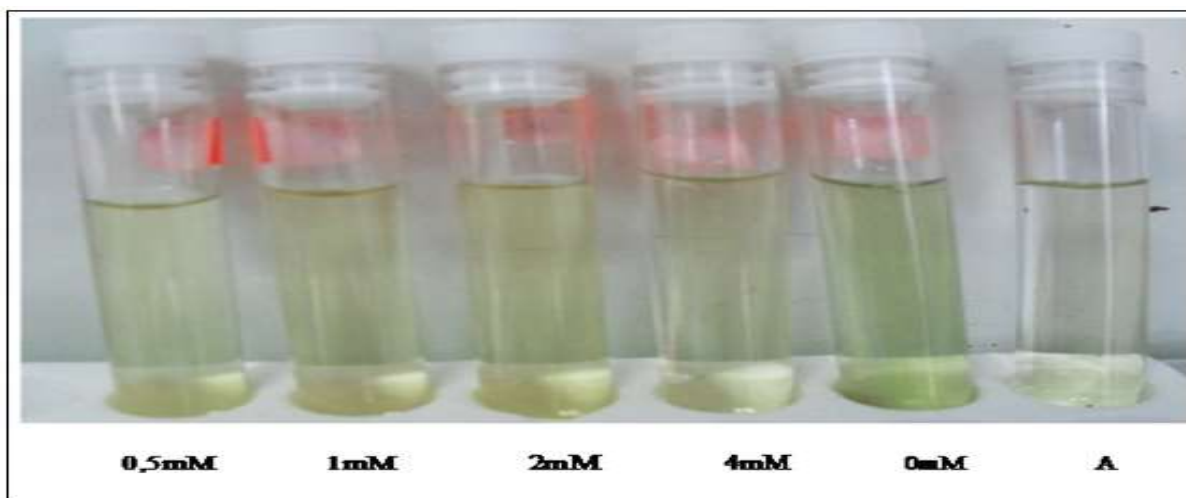


Fig. 6. Effect of the salicylic acid on the pyocyanin production by *P. aeruginosa*. A: negative control.

It occurs by overcoming the long-range repulsive forces that facilitate close approach to the surfaces, enabling accelerated surface adhesion (Karatan and Watnick, 2009). Houry *et al.* (2010) also reported the importance of motility in *B. cereus* biofilm formation in microtiter plates.

Swarming is a complex motility regulated by quorum sensing that occurs on semi-solid surfaces, and requires flagella, type IV pili and biosurfactant production (Pamp and Tolker-Nielsen, 2007).

Effect of salicylic acid on pyocyanin production

Pyocyanin is a blue-green phenazine produced by several strains of *P. aeruginosa* (Dietrich *et al.*, 2006). It is one of the many controlled molecules by the QS, synthesized at high cell densities, and associated with biofilm formation (Costerton *et al.*, 1999). We tested the effect of SA on pyocyanin production by supplementing the growth medium with different concentrations.

Addition of SA to the bacterial growth medium reduced the production of pyocyanin (Fig. 6).

Prithiviraj *et al.* (2005) showed while the addition of 0.1 mM SA reduced pyocyanin production by $\approx 50\%$, and 1.0 mM SA resulted in more than an 80% reduction of pyocyanin production with no apparent effect on the growth of the bacteria.

They also evaluated the effect of SA derivatives, including acetyl salicylic acid, salicylamide, and methyl salicylate, and benzoic acid, on pyocyanin production by PA14. All the SA derivatives led to reduce pyocyanin production, and the levels of reduction caused by methyl salicylate, salicylamide, and benzoic acid were close to those caused by SA. Prithiviraj *et al.* (2005) indicated that Salicylic acid down regulates rhlR and lasA in *P. aeruginosa* PA14 and cause subsequent inhibition of pyocyanin, protease, and elastase activities (Yang *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2013).

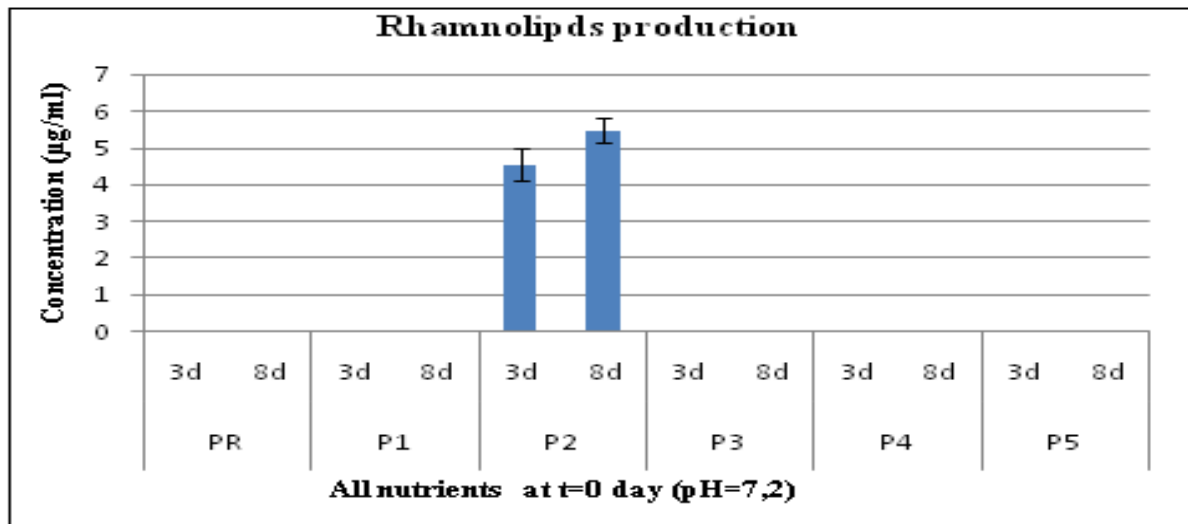


Fig. 7. Rhamnolipids production by *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PR) and five clinical isolates of *P. aeruginosa*.

Rhamnolipids production

Rhamnolipids are biosurfactants produced by *P. aeruginosa* (Soberon-Chavez *et al.*, 2005). They are extracellular amphiphilic glycolipides used by this bacterium like factors of virulence. They support the swarming because they act as wetting agents which reduce the surface stress (Caiazza *et al.*, 2005).

As show in Fig.7, Only one isolates (P2) showed a production of rhamnolipids. They were extracted from the cell free supernatant of the 3-day bacterial culture with yield of 4,5 mg/l. The other isolates did not show rhamnolipids production in the utilized medium PPGAS (Fig. 8).

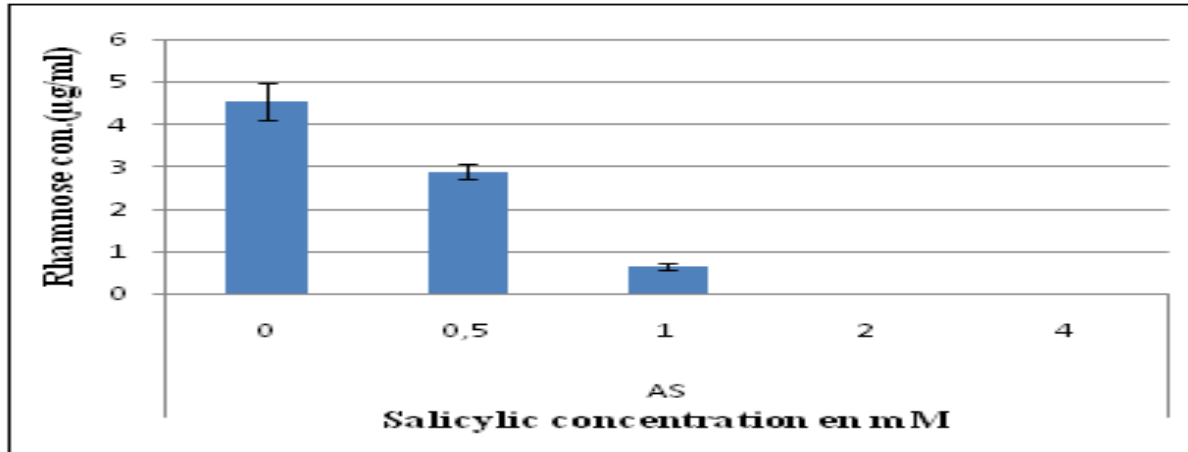


Fig. 8. Effect of salicylic acid on the production of rhamnolipids by *P. aeruginosa* (P₂).

Nagant *et al.* (2013) indicated that rhamnolipids production was highly related to bacteria species and to culture conditions. As also cited by Juan *et al.* (2001) *P. aeruginosa* UG2 was examined under different culture conditions show that the Rhamnolipid yield was affected by the nature of the carbon sources, the nutrient concentrations, pH, and age of the culture.

Our results indicated when using SA that rhamnolipids production was highly infected and the MIC was at 2mM (Fig. 8). Rhamnolipids are produced during the formation of the biofilm under the control of quorum sensing (QS) system (Jensen *et al.*, 2007). The expression of the genes *rhlB* and *rhlA* coding for a rhamnosyltransférase implicated in the synthesis of the rhamnolipids was decreased in the presence of an antimicrobial peptide (Ochsner *et al.*, 1995).

Conclusion

Following the obtained results we can conclude that SA inhibits bacterial growth depending on concentrations. The MIC and MBC of SA were recorded around 10mM and 20 mM respectively. We can also retain that SA decreased biofilm formation by the used *Pseudomonas*. The swarming motility and pyocyanin production by the studied *Pseudomonas* were also affected by the SA. The production of rhamnolipids was completely inhibited in (P2) the only one isolate producing them in PPGAS medium.

Acknowledgements

Acknowledgements are due to the members of laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mostaganem.

References

- Arora SK, Neely AN, Blair B, Lory S, Ramphal R.** 2005. Role of motility and flagellin glycosylation in the pathogenesis of *P. aeruginosa* burn wound infections. *Infection and Immunity* **73**, 4395-4398. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.7>.
- Bandara BM, Zhu H, Sankaridurg PR, Willcox MD.** 2006. Salicylic acid reduces the production of several potential virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with microbial keratitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **47**, 4453- 4460. <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.06-0288>.
- Benincasa M, Abalos A, Oliveira I, Manresa A.** 2004. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soap stock. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1**, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020148.45523.41>
- Bjarnsholt T, Jensen PO, Burmolle M, Hentzer M, Haagensen JAJ, Hougen HP, Calum H, Madsen KG, Moser C, Molin S, Hoiby N, Givskov M.** 2005. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology* **151**, 373-383. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27463-0>.
- Caiazza NC, Shanks RM, O'Toole GA.** 2005. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **187**, 7351-7361. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.21.7351-7361.2005>
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322. <http://dx.doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>.
- Da ML, Heroux AK, Pakzad Z, Schiffmacher KFES.** 2010. Salicylic acid attenuates biofilm formation but not swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* **14**, 69-73.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295-298. <http://dx.doi.org/10.1126/science.280.5361.295>.
- Dietrich LEP, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK.** 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* **61**, 1308-1321. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x>.
- Dekimpe V, Deziel E.** 2009. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* **155**, 712-723. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.022764-0>.
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella, M, Kessmann H, Ward E, Ryals J.** 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**, 1247-1250.
- Deziel E, Lepine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, Tompkins RG.** 2004. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**, 1339-1344. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307694100>.

- Deziel E, Gopalan S, Tampakaki AP, Lepine F, Padfield KE, Saucier M.** 2005. The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhIRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Molecular Microbiology* **55**, 998–1014.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04448.x>
- Djordjevic D, Wiedmann M, Mclandsborough LA.** 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2950–2958.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002>
- Donalan RM.** 2011. Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Clinical Infectious Diseases* **52**, 1038–1045.
<http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir077>.
- Drenkard E.** 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection* **5**, 1213–1219.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2003.08.009>.
- Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C.** 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **184**, 6472–6480.
<http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.23.6472-6480.2002>
- Guo M, Gamby S, Zheng Y, Sintim HO.** 2013. Small molecule inhibitors of AI-2 signaling in bacteria: state-of-the-art and future perspectives for anti-quorum sensing agents. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 17694–728.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms140917694>.
- Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP.** 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal Bacteriology* **172**, 884–900.
[http://dx.doi.org/00219193/90/02088417\\$02.00/0](http://dx.doi.org/00219193/90/02088417$02.00/0).
- Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T.** 2010. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm tolerance. dispersal. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **59**, 253–268.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00690.x>
- Heurlier K, Denervaud V, Haas D.** 2006. Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology* **296**, 93–102.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.043>.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O.** 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* **35**, 322–332.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.>
- Houry A, Briandet R, Aymerich S, Gohar M.** 2010. Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology* **156**, 1009–1018.
<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.034827-0>.
- Jensen PØ, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H, Christoffersen L, Moser C, Williams P, Pressler T, Givskov M, Høiby N.** 2007. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **153**, 1329–1338.
<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2006/003863-0>.
- Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ.** 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**, 46–65.
<http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.05007-11>.
- Juan C, Mata-Sandoval, Jeffrey Karns, Alba Torrents.** 2001. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiological Research* **155**, 249–256.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0944-5013\(01\)80001-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0944-5013(01)80001-X)

- Kalia VC.** 2013. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, **31**, 224-245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.10.004>.
- Karatan E, Watnick P.** 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**, 310-347. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00041-08>.
- Kus JV, Zaton K, Sarkar R, Cameron RK.** 2002. Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **14**, 479-490. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.010481>.
- Landini P, Antoniani D, Burgess, JG, Nijland R.** 2010. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**, 813-823. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2468-8>
- Mei Lin Da, Aron K, Heroux, Zahra Pakzad, Karl FES Schiffmacher.** 2010. Salicylic Acid Attenuates Biofilm Formation But Not Swarming In *Pseudomonas aeruginosa*. *Experimental Microbiology and Immunology* **14**, 69-73.
- Moroh JLA, Bahi C, Dje K, Loukou YG, Guede-Guina F.** 2008. Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (*rubiaceae*) acetatic extract (ACE) on *in-vitro* growth of *Escherichia coli* strains. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* **77**, 44 – 61.
- Nagant C, Seil M, Nachtergaele A, Dulanto SA, Dehaye JP.** 2013. Contribution of the production of quorumones to some phenotypic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Journal of Medical Microbiology* Sous presse. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.050807-0>.
- Nowatzki PJ, Koepsel RR, Stoodley P, Min K, Harper A, Murata H, Donfack, J, Hortelano ER, Ehrlich GD, Russell AJ.** 2012. Salicylic acid-releasing polyurethane acrylate polymers as anti-biofilm urological catheter coatings. *Acta Biomaterialia* **8**, 1869-1880. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.032>.
- Ochsner UA, Reiser J, Fiechter A, Witholt B.** 1995. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 3503-3506. [http://dx.doi.org/0099-2240/95/\\$04.0010](http://dx.doi.org/0099-2240/95/$04.0010).
- Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock REW.** 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology* **190**, 2671-2679. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01659-07>.
- Pamp SJ, Tolker-Nielsen T.** 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **189**, 2531-2539. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01515-06>.
- Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP.** 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**, 11229-11234. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.20.11229>.
- Polonio RE, Mermel LA, Paquette GE, Sperry JF.** 2001. Eradication of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 3262-3266. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.11.3262-3266.2001>
- Prithiviraj B, Bais HP, Jha AK, Vivanco JM.** 2005. *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of salicylic acid on the pathogen or by SA-dependent, NPR1-independent host responses. *Plant Journal* **42**, 417-432. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02385.x>.
- Prithiviraj B, Bais HP, Weir T, Suresh B, Najjarro EH, Dayakar BV.** 2005. Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity* **73**, 95319-95328. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.9.5319-5328>.

- Riordan JT, Muthaiyan A, van Borre'is, W, Price CT, Gram JE, Wilkinson BJ, Gustafson JE.** 2007. Response of *Staphylococcus aureus* to salicylate challenge. *Journal Bacteriology* **189**, 220-227.
<http://dx.doi.org/10.1128/JB.01149-06>.
- Rasmussen TB, Givskov M.** 2006. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology* **296**, 149-161.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.005>.
- Rosenberg LE, Carbone AL, Romling U, Uhrich KE, Chikindas ML.** 2008. Salicylic acid-based poly (anhydride esters) for control of biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Letters in Applied Microbiology* **46**, 593-599.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02356.x>.
- Rudrappa T, Quinn WJ, Stanley-Wall NR, Bais HP.** 2007. A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* **226**, 283-297.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00425-007-0480-8>.
- Samuel Chow, Kevin Gu, Lucy Jiang, Anthony Nassour.** 2011. Salicylic Acid Affects Swimming, Twitching and Swarming Motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in Decreased Biofilm Formation. *Experimental Microbiology and Immunology* **15**, 22 – 29.
- Shrout JD, Chopp DL, Just CL, Hentzer M, Givskov M, Parsek MR.** 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology* **62**, 1264–1277.
<http://dx.doi.org/10.1128/10.1111/j.13652958.2006.05421.x>.
- Soberon-Chavez G, Lepine F, Deziel E.** 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**, 718-725.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0150-3>.
- Wilhelm S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger KE.** 2007. The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *Journal of Bacteriology* **189**, 6695-6703.
<http://dx.doi.org/10.1128/JB.00023-07>.
- Williams P.** 2007. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signaling in the bacterial world. *Microbiology* **153**, 3923-3938.
<http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.2007/012856-0>
- Yang L, Rybtke MT, Jakobsen TH, Hentzer M, Bjarnsholt T, Givskov M, Tolker-Nielsen T.** 2009. Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2432-2443.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01283-08>.

**REGULAR ARTICLE**

Eradication of *Pseudomonas* biofilm by disinfectants and some plants extracts

Lattab Aicha*, Belkacem Imane, Djibaoui Rachid, Rebai Oifa, Chibani Abdelwaheb, Arabi Abed

Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Mostaganem, B.P. 227, 27000 Mostaganem, ALGERIA

ARTICLE INFO*Article History:*

Received: 11 Dec 2014

Revised: 20 Mar 2015

Accepted: 23 Mar 2015

**Corresponding Author:*

Email: aichalatab@yahoo.com

Tel: 00 213 778 845 379

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Allium sativum*, *Aloe vera*, *Lawsonia inermis*, biofilm

ABSTRACT

In the present study three isolates belonging to *Pseudomonas sp* and one reference strain of *P. aeruginosa* ATCC 27853 were tested for biofilm formation on two types of support (glass and polystyrene), using two cultures medium Tryptone Soy Broth (TSB) and Modified Biofilm Broth (MBB). The results showed that the quantity of biofilm formed depends on the nature of culture medium, where the rate of the adherent bacteria was more significant in TSB medium. Polystyrene was more favorable to bacteria for adherence compared to glass. We examined the effectiveness of three types of disinfectants, sodium hypochlorite, hydrogen peroxide and temperature on a biofilm formed by the studied bacteria. Sodium hypochlorite reached good levels of biofilm eradication using all isolates adhered on the two types of support. Hydrogen peroxide exerted less significant effect compared to sodium hypochlorite, eliminating approximately 56% from the biofilm adhered on polystyrene at concentration of 3%. The elimination of biofilm temperature (80°C) was rather weak compared with the two chemical disinfectants. Our study included the testing of extracts of three plants: *Allium sativum*, *Aloe vera* and *Lawsonia inermis* on biofilm eradication formed by *P. aeruginosa* ATCC 27853. The effect of these plant extracts on planktonic cells was also studied. The results showed that *Allium sativum* and *Lawsonia inermis* inhibit both bacterial growth and biofilm formation and no activity was detected for *Aloe vera* extract.

1. Introduction

For a long time bacteria were studied in planktonic form, as free cells, whereas, paradoxically, in natural environment, micro-organisms are attached to a surface, organized in structured communities, and included in a matrix of exo-polymers. These modes of development are called biofilms. These later can develop on various kinds of surface materials including glass, stainless steel, plastic and rubber that

are the main materials used in food processing where nutrients, ions and other organic materials are present to promote the growth (Chae and Schraft, 2000).

Research on bacteria should thus concentrate on this type of structure rather than on the planktonic forms. Indeed, the problems generated by biofilms are numerous and touch various fields. For example hospital sector is the most affected, where bio-

films cause many nosocomial pathologies. Biofilms cause also problems in industry where they degrade installations. The major problem with this form of life is that it confers a significant resistance to various stresses: UV, metal toxicity, desiccation, depletion in nutriment and antibiotics, (Costerton et al., 1999).

Like most bacteria, *Pseudomonas* is found in soils, plants, fresh and marine waters. Many stocks being able to develop in low temperature (psychrophilous stocks) contaminating foods or pharmaceutical products preserved in refrigerators. *P. aeruginosa* is also an opportunistic pathogen implicated in respiratory, urinary tract, gastrointestinal infections, keratitis and otitis media. *P. aeruginosa* is found in 10–20% of all hospital-acquired infections (Ikeno et al., 2007). It was always regarded as a difficult target in anti-infectious chemotherapy, where 0.3 % of its genes are directly implicated in mechanisms of resistance, as it is able to acquire new mechanisms of resistance following the exposure to antibiotic during treatments (Woods, 2004; Kipnis et al., 2006).

We tested the effect of three disinfectants sodium hypochlorite, hydrogen peroxide and temperature on biofilms formed by *Pseudomonas sp* on two types of support material. Then we tested the effect of extracts prepared from three medicinal plants, garlic (*Allium sativum*), henna (*Lawsonia inermis*) and aloe (*Aloe vera*) on biofilm formation and bacterial growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strains

The tests were carried out with the stock reference strain *P. aeruginosa* ATCC 27853, and three isolates of *Pseudomonas sp* obtained from different food-stuffs. These were identified microscopically and biochemically with the API 20E system.

2.2. Biofilm assays

P. aeruginosa strain ATCC 27853 and three isolates (P1, P2 and P3) of *Pseudomonas sp* were screened for their ability to form biofilms. The quantitative assays on biofilm formation were performed in glass tubes. 200 µl of bacterial suspension ($OD_{620nm} \approx 0.05$) was inoculated in tubes containing 2 ml of TSB. Biofilms were allowed to develop under static conditions at 37°C. Biofilm developments in all conditions were quantified after 2h, 4h, 6h, 20h, 24h, 30h and 48h by crystal violet staining (1% w/v) and

spectroscopic determination at 580 nm (Djordjevic et al., 2002).

2.3. Biofilm assays according to the culture medium and support material

To quantify the formation of biofilm according to culture medium and type of support, we used two culture media: Trypticase Soy Broth (TSB) and Modified Biofilm Broth (MBB), in polystyrene and glass tubes. These later were rinsed with distilled water, air-dried and autoclaved at 120°C for 20 minutes. Polystyrene (PS) tubes were soaked in 95% ethanol for 30 min and air-dried in a laminar flow for 30 min before use.

200 µl bacterial suspensions ($OD_{620nm} \approx 0.05$) were inoculated into tubes containing 2 ml of TSB or 2ml of MBB, Biofilms were allowed to develop under static conditions at 37°C and quantified after 48 h of incubation by crystal violet staining (1% w/v) and spectroscopic determination at 580nm (Djordjevic et al., 2002).

2.4. Effect of disinfectants on biofilms of *Pseudomonas sp*:

To eliminate the biofilm formed by *P. aeruginosa* ATCC 27853 and three isolates of *Pseudomonas sp*, we tested three types of disinfectants, sodium hypochlorite (13°), hydrogen peroxide (30%) and heating at 80°C. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite were prepared as dilutions ranging from 10^{-1} to 10^{-4} . The effect of temperature was carried out in a water bath at 80°C for 1 h (Pécastaings, 2010).

Biofilms were allowed to develop on glass and polystyrene surfaces tubes by inoculating 200µl bacterial suspension (OD_{620nm} about 0.05) in tubes containing 2ml of culture medium. After 48 h of incubation, the planktonic cells were aspirated out and biofilms or attached cells remained on the surface of the tubes were submerged for 1 h in sterile physiological water with the appropriate concentration of disinfectants. Sterile physiological water was used to submerged mature biofilms in control tubes and in temperature effect experience. The quantity of biofilm under all conditions was examined using crystal violet staining method. All tests were performed in three replicates and the absorbance readings were averaged. The percentage of elimination of biofilm was calculated according to the equation (Olson et al., 2002):

$$\text{Elimination rate} = (A_C - A_T) / A_C \times 100$$

A_c: Optical density at 580 nm of the positive control (Biofilm untreated by disinfectants).

A_r: Optical density at 580 nm of the biofilm treated by disinfectants.

2.5. Effect of some plant extracts on the growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853 and their biofilm formation

Plant extracts

We used the juice of *Aloe vera* and the liquid part extracted from fresh bulbs of *A. sativum* as a crude extracts of both plants. Methanol extract of *L. inermis* was prepared by the Soxhlet apparatus: 50 g of leaves powder extracted with 300 ml of methanol for 6 h at a temperature of 50 to 55°C. The resulting extract was concentrated, under reduced pressure in a rotary evaporates and stored at 4°C (Negrette et al., 1987).

Antibacterial Activity:

The evaluation of antimicrobial activity of extracts of *A. sativum*, *Aloe vera* and *L. inermis* was performed against *P. aeruginosa* ATCC 27853 by disc diffusion method on Mueller-Hinton agar plates. (Sacchetti et al., 2005; Celiktas et al., 2007). Bacterial cultures were grown in trypticase soy broth (TSB) at 37°C. After 6 h of incubation, 10⁶ cells/ml of bacteria were inoculated on the surface of Mueller-Hinton agar plates. Subsequently, filter paper discs (6 mm in diameter) saturated with plant extract (50 µl) were placed on the surface of the plates and incubated at 37 °C for 24 h.

Plant extracts showing antimicrobial activity were tested to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimal Bactericidal Concentration (MBC). 200 µl at 10⁶ cells/ml of *P. aeruginosa* ATCC 27853 were inoculated in tubes with 2 ml trypticase soy broth (TSB) supplemented with increasing concentrations of plant extracts. After 24 h at 37°C, the MIC of each sample was determined by measuring the optical density at 620 nm comparing the sample readout with the non inoculated nutrient broth (Moroh et al., 2008). The MBC was determined by spreading out 0.1 ml of the tubes contents of concentration ≥ MIC on Mueller-Hinton agar. The MBC is the smallest concentration which permits the survival of 0.01 % or more of the bacterial suspension after 24 h incubation.

The effect of plant extracts prepared on the biofilm formation by *P. aeruginosa* ATCC 27853:

The quantitative analysis on the effect of plant extracts on the cell adhesion was performed using crystal violet staining of the attached cells. The quantitative assays on the effect of crude garlic extract and methanol extract of *L. inermis* on *P. aeruginosa* ATCC 27853 biofilm formation were performed in glass tubes. 200 µl of the bacterial suspension (OD_{620nm} ≈ 0.05) were inoculated into 2 ml of TSB (as a control), and TSB with the appropriate concentration of crude extract of *A. sativum* and methanol extract of *L. inermis*.

Crystal violet analysis

The quantitative analysis of biofilm formation was performed using crystal violet staining of the attached cells, the supernatant in the tubes were aspirated and rinsed 3 times with distilled water and fixed by drying at room temperature until they were fully dried out. The total of 2 ml of 1% crystal violet was added into each tube for 15 min. The excess stain was washed off 3 times with distilled water. The crystal violet that stained the attached cells was distained with 2 ml of 95% ethanol at room temperature for 2 min. The optical density (OD_{580nm}) of 2 ml distained solution was examined using a spectrophotometer (Djordjevic et al., 2002). The absorbance value is positively correlated to the amount of the bacterial adhesion or biofilm. All tests were performed in three triplicate and the absorbance readings were averaged.

3. Results and Discussion

3.1. Biofilm assays

In comparison between the three isolates and *P. aeruginosa* ATCC 27853, we noted that the capacity of biofilm formation differs depending on the time of incubation, where we observed that the capacity of *P. aeruginosa* ATCC 27853 to form a biofilm is higher compared to the other isolates (Figure 1).

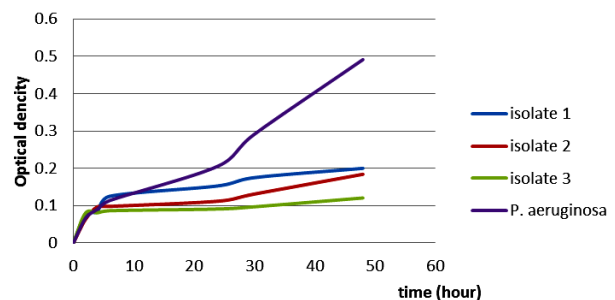


Figure 1: Inventory of the biomass adhered according to time of incubation of four isolates of *Pseudomonas sp* in TSB medium.

The composition of the cell wall, as well as the physicochemical properties of the surface evolves according to the stage of growth and the physiological state of the cell (Palmer *et al.*, 2007). These results corroborate those of Chen and Strevett (2001), who studied the adhesion of various bacteria (*E. coli*, *P. fluorescens*, *B. subtilis*) according to their phase of growth. They determined that bacteria in stationary phase were most adhesive, because of the reduction in the free energy of interaction between the micro-organisms and the support. The more the bacterial concentration increases, the more the number of adhered cells is significant, until the surface is entirely covered (Piette and Idziak, 1992). Thus the longer the contact between the micro-organism and the support the more the reinforcement of the established connections (Nejadnik *et al.*, 2008).

3.2. Biofilm assays according to culture medium and type of support

Figure 2 shows that the quantity of biofilm formed by the three isolates of *Pseudomonas sp* and *P. aeruginosa* ATCC 27853 was dependent on the nature of the culture medium, where the comparison of the biofilm formation between two culture media (TSB or MBB medium) show that the rate of the adherent bacteria in Trypticase Soy Broth medium (TSB) is more significant than the Modified Biofilm Broth medium (MBB).

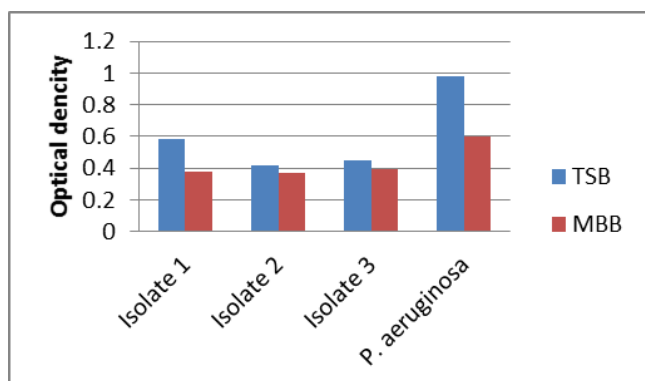


Figure 2: Evaluation of the Biomass adhered according to the culture medium (TSB / MBB).

The results on the effect of nature of support (glass or polystyrene) on biofilm formation (Figures 3 and 4) showed that the rate of adherent bacteria on polystyrene tubes was more important compared with glass tubes.

The characteristics of the medium influence the interactions between cells and the solid surface depending on its nature and, viscosity, ionic force, type salts and pH (Saulou, 2009). The same idea

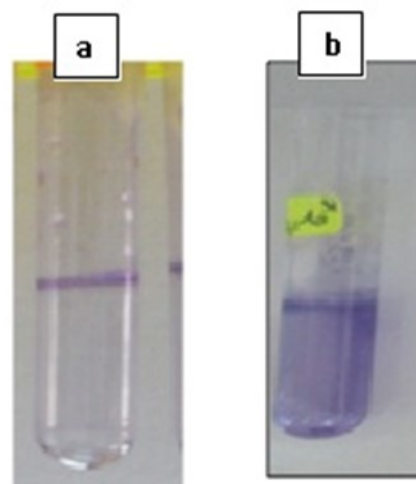


Figure 3: Representative biofilm formation in glass tube (a) and polystyrene tube (b) after staining with 1% crystal violet solution.

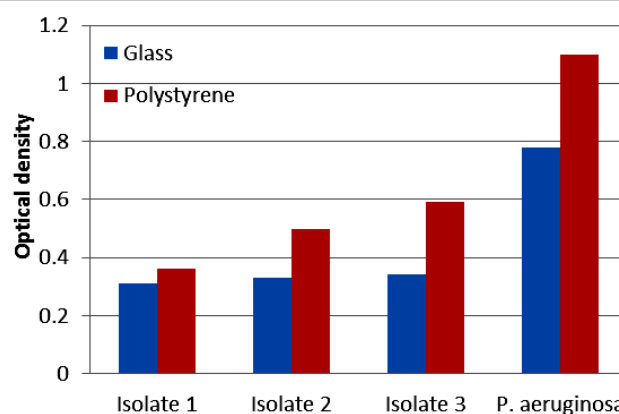


Figure 4: Evaluation of the Biomass adhered according to support material (glass/polystyrene).

was mentioned by Martinez and Casadevall (2007) who confirmed that the sources of carbon available have an influence on the biofilm formation and its maturation. Spormann (2008) has also indicated that the concentrations of nutrients in a static medium must be high so that it can form biofilms.

A significant hydrophobia is often correlated with a strong adhesion, in particular on hydrophobic surfaces like plastics (McEldowney and Fletcher, 1986), via hydrophobic attraction forces (An and Friedman, 1998; Donlan, 2002).

Several studies realized in various applicability, showed that micro-organisms adhere with difficulty to hydrophilic materials (ex: glass, metals...), presenting a strong affinity for polar water and solvents, compared with hydrophobic materials like polyethylene, polystyrene and Teflon (Bos *et al.*, 1999; Bruinsma *et al.*, 2001).

3.3. Effect of disinfectants and temperature on

biofilms of *Pseudomonas sp*

The results obtained using sodium hypochlorite, hydrogen peroxide and temperature to eradicate mature biofilms formed by three isolates of *Pseudomonas sp* and *P. aeruginosa* ATCC 27853, showed that both chemical disinfectants exerted a remarkable effect on biofilms formed. We also revealed that the rate of disinfection is different for both disinfectants and temperature; this is due to the variation of the treatments applied and also to the concentration of disinfectants used. We recorded that by using sodium hypochlorite at 10^{-1} dilution in TSB medium (Figure 5) an elimination of 53% of biofilm formed by *P. aeruginosa* ATCC 27853 in polystyrene, and 34% in glass tubes. With hydrogen peroxide at 10^{-1} dilution (Figure 7), we obtained an elimination of 23% on polystyrene tubes, and 27% on glass tubes.

We also noted that biofilms formed by the three isolates of *Pseudomonas sp* and *P. aeruginosa* in BBM medium were more sensitive to various concentrations of disinfectants compared to those formed in TSB medium. We recorded that by using sodium hypochlorite at 10^{-1} dilution in BBM medium (Figure 6) an elimination of 63% in polystyrene and 44% in glass tubes of biofilm formed by *P. aeruginosa* ATCC 27853. With hydrogen peroxide (Figure 8), the rate of elimination on the polystyrene tubes was 26% and 39% in glass tubes.

Hydrogen peroxide has a good activity on the planktonic cells (Tote et al., 2009), but its activity decreased on some bacterial biofilms (Presterl et al., 2007; Peeters et al., 2008).

A study undertaken on biofilms in a system equipped with the dentist's chairs showed that the hydrogen peroxide alone allowed the elimination of 35 to 67 % of viable cells of the biofilm without leading to a complete elimination (Liaqat and Sabri, 2008).

For the effect of temperature (80°C) we recorded an elimination of 24% of biofilm formed by *P. aeruginosa* ATCC 27853 in glass tubes (Figure 9). Our study shows that *P. aeruginosa* ATCC27853 is more resistant to different treatment used than the three isolates. In front of the weak bactericidal activity of hydrogen peroxide on biofilms of *P. aeruginosa*, several formulations were developed. Dequeiroz and Day (2007) for example, described the use of sodium hypochlorite combined with hydrogen peroxide to eliminate the cells from biofilms of *P. aeru-*

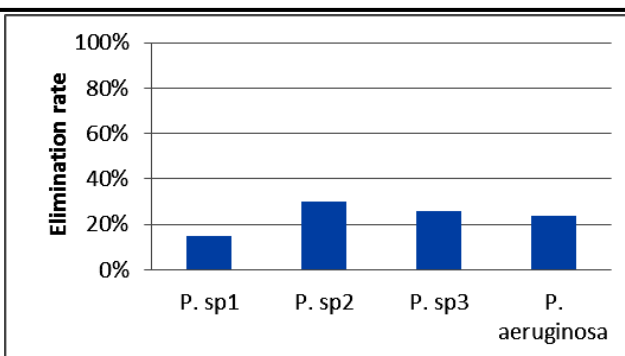


Figure 9: Effect of temperature on the mature biofilm of three isolates of *Pseudomonas sp* and *P. aeruginosa* ATCC 27853.

ginosa. Other formulations associate hydrogen peroxide with acetic acid.

3.4. Effect of plant extracts on the growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853 and biofilm formation

Antibacterial Activity of plant extracts

The results (Figure 10) showed antibacterial activity of crude garlic extract (*A. sativum*) and the methanol extract of *L. inermis* against *P. aeruginosa* ATCC 27853, but no activity was detected for the extract of *Aloe vera*.

Figures 11 and 12 show the effect crude garlic extract and the methanol extract of *L. inermis* on the growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853. The spectrophotometer reading at 620nm showed a decrease in optical density of the culture with the increased concentration of garlic extract (1% ; 2% ; 3% ; 4% ; 5% ; 6% ; 7% ; 8% ; 9% and 10%) (v/v) and methanol extract of *L. inermis* (0,1 ; 0,2 ; 0,4, 0,8 ; 1,6 ; 3,2 ; 6,25 ; 12,50 ; 25 et 50 mg/ml). The MICs of garlic extract and methanol extract of *L. inermis* were 6%, and 12.5mg/ml respectively.

The effect of plants extracts prepared on the biofilm formation by *P. aeruginosa* ATCC 27853

The effect of plant extracts on biofilm formation is presented in Figures 13 and 14. The results showed that the increasing concentrations of crude extract of *A. sativum* and methanol extract of *L. inermis* reduced biofilm formation of *P. aeruginosa* ATCC 27853 tested after 24 h incubation. The presence of garlic extract was speculated to interrupt the mature biofilm formation in *P. aeruginosa* that the biofilm amount also dramatically diminished according to the reduction in the OD at 595nm value of the treated culture when compared to the untreated ones.

Several studies showed that garlic extract and its

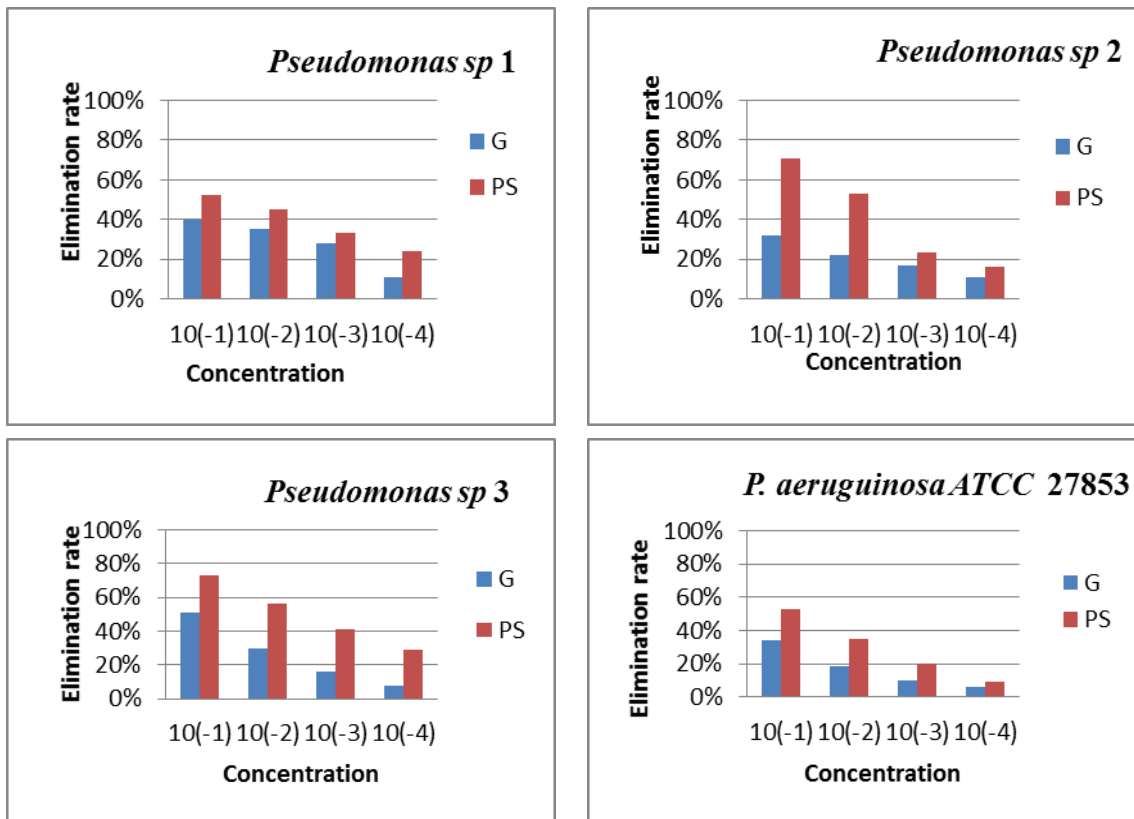


Figure 5: Effect of sodium hypochlorite on the mature biofilm of three isolates of *Pseudomonas sp* and *P. aeruginosa* ATCC 27853 in TSB medium (G: Glass, PS: Polystyrene).

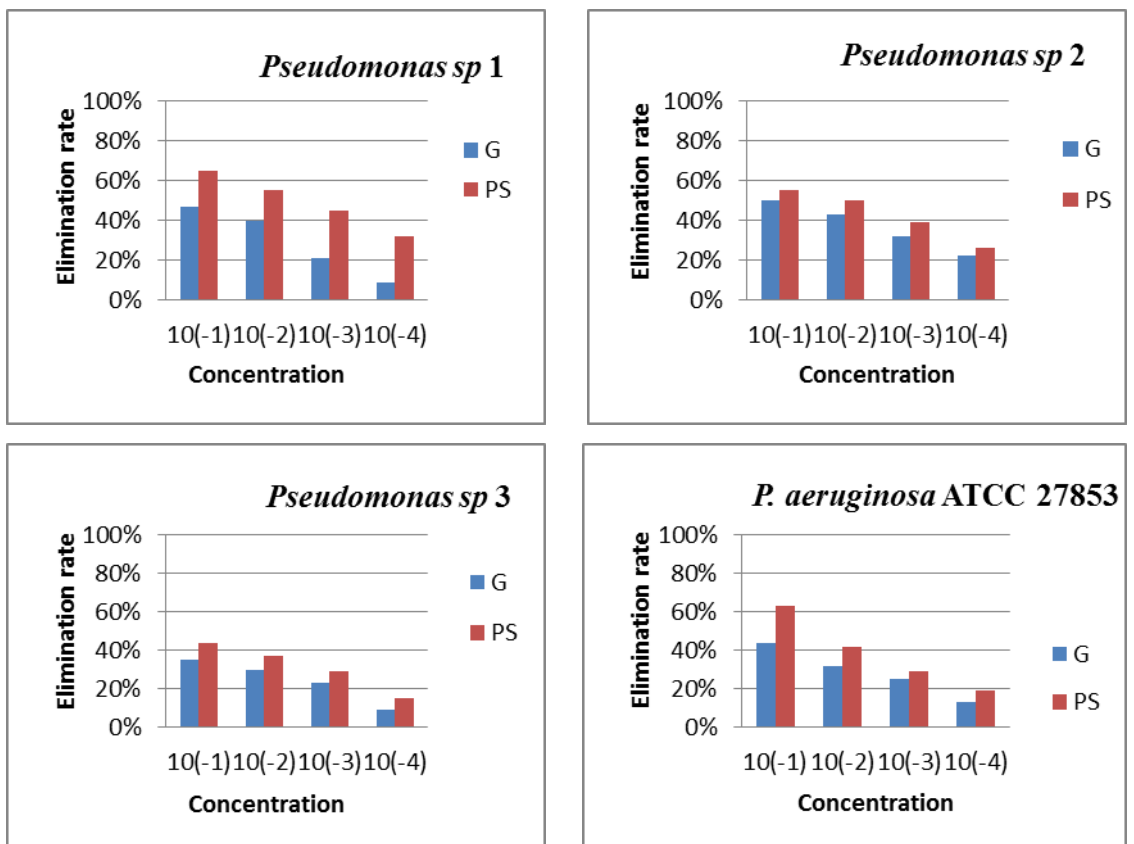


Figure 6: Effect of sodium hypochlorite on the mature biofilm of three isolates of *Pseudomonas sp* and *P. aeruginosa* ATCC 27853 in BBM medium (G: Glass, PS: Polystyrene).

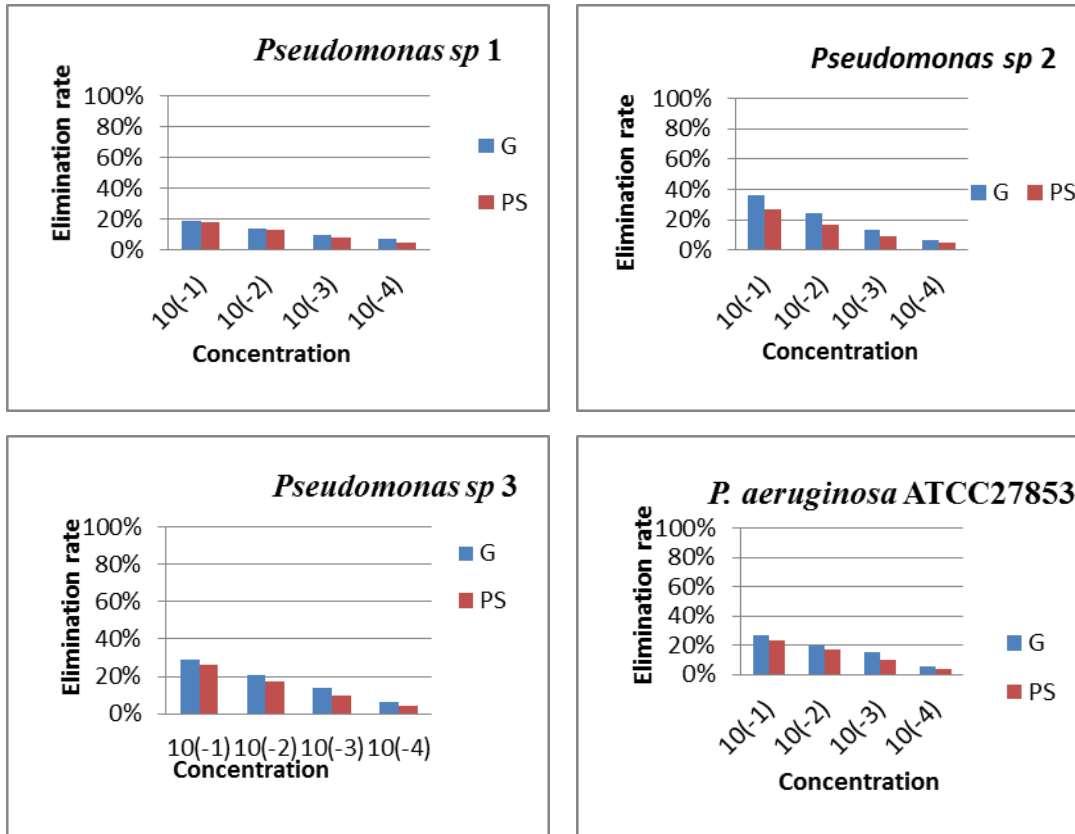


Figure 7: Effect of the hydrogen peroxide on the mature biofilm of three isolates of *Pseudomonas sp* and *P. aeruginosa* ATCC 27853 in TSB medium (G: Glass, PS: Polystyrene).

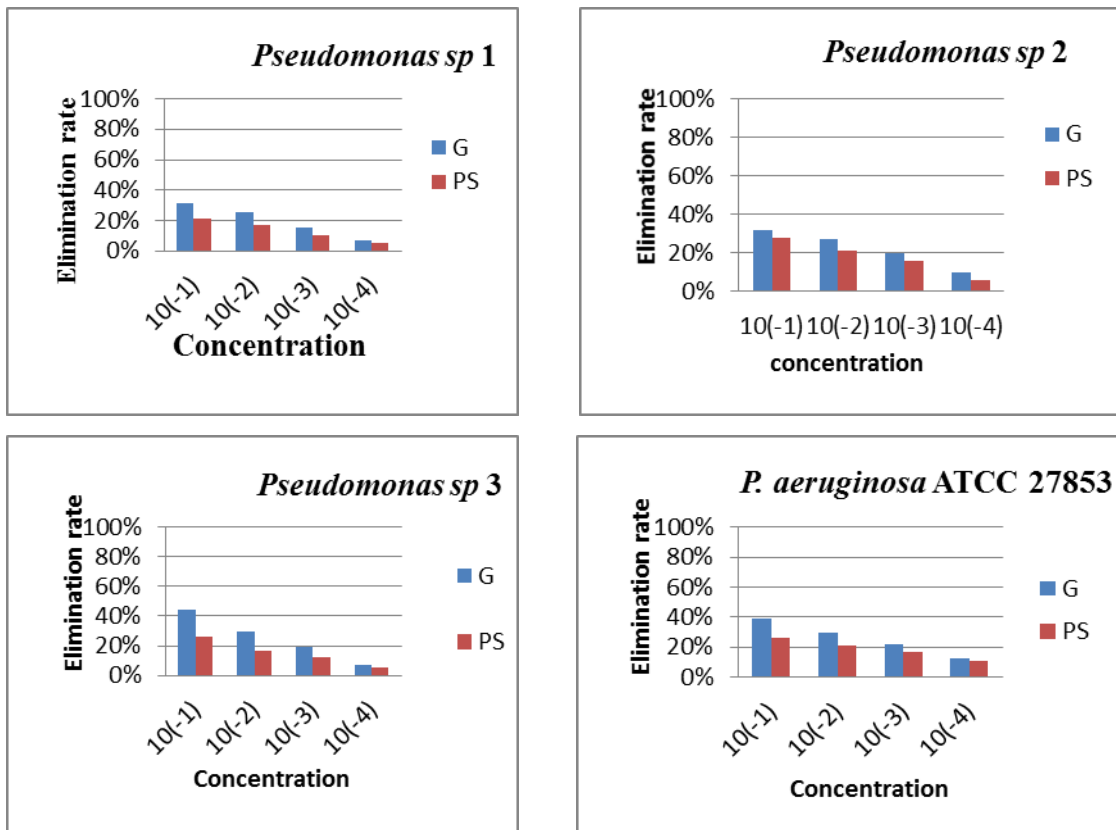


Figure 8: Effect of the hydrogen peroxide on the mature biofilm of three isolates of *Pseudomonas sp* and *P. aeruginosa* ATCC 27853 in BBM medium. (G: Glass, PS: Polystyrene).

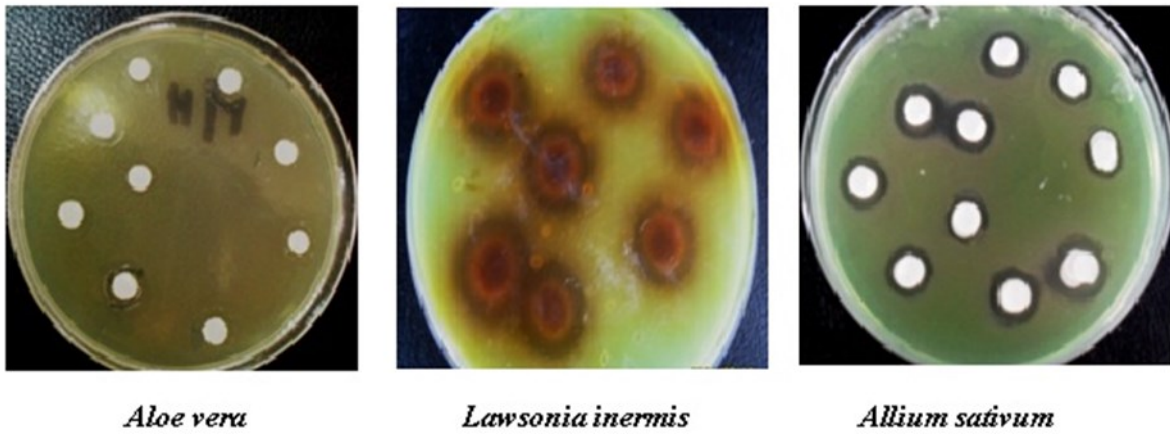


Figure 10: Antibacterial effect (inhibition zones) of the studied plant extracts against *P. aeruginosa* ATCC 27853.

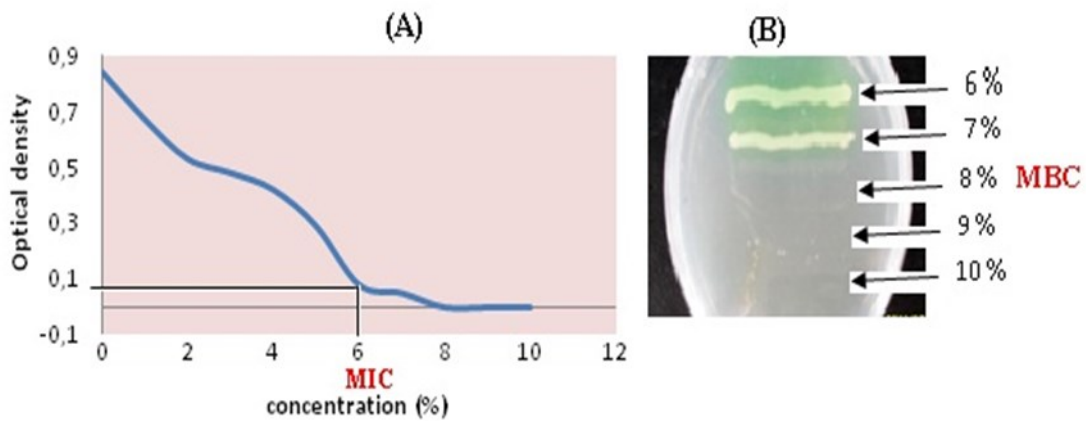


Figure 11: Variation of turbidity due to the growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853 according to the concentration of crude garlic extract (A) and Minimal Bactericidal Concentration (B).

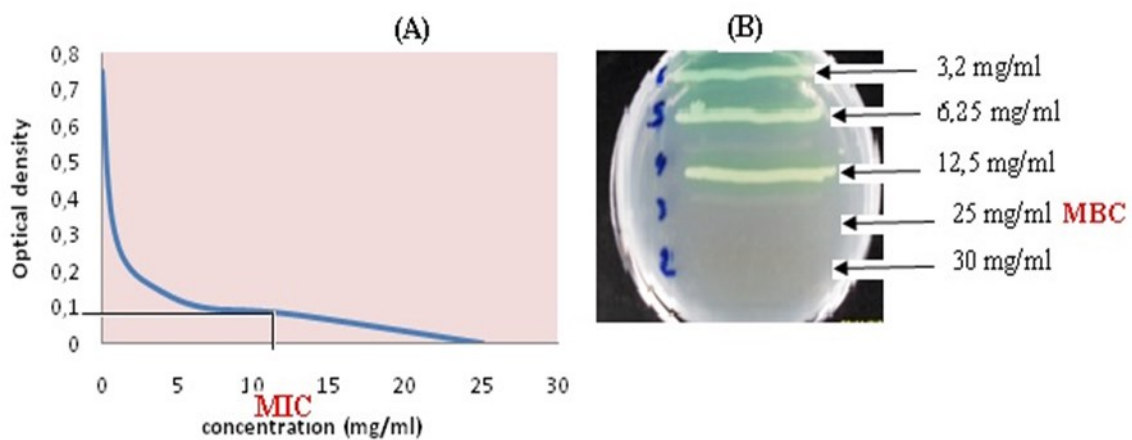


Figure 12: Variation of turbidity due to the growth of *P. aeruginosa* ATCC 27853 according to the concentration of methanol extract of *L. inermis* (A) and Minimal Bactericidal Concentration (B).

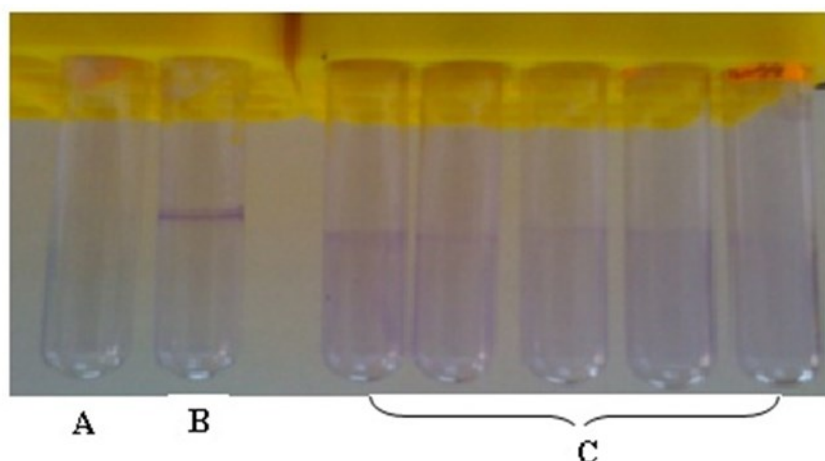


Figure 13: Effect of the extracts on the biofilm formation by *P. aeruginosa* ATCC 27853, A: negative control (tube not inoculated), B: positive control (biofilm not treated by garlic extract) C: the biofilm treated by garlic extract.

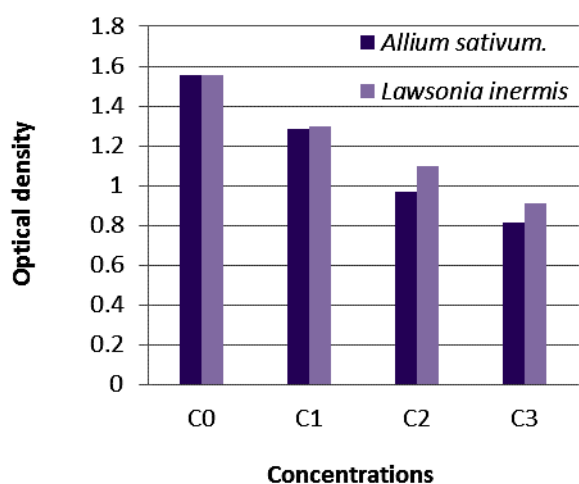


Figure 14: Variation of the quantity of biofilm formed by *P. aeruginosa* ATCC 27853 according to the variation of concentration of crude extract of *A. sativum* (C₀ = Control, C₁ = 1,25%, C₂ = 2,5%, C₃ = 5 %) (v/v) and methanol extract of *L. inermis* (C₀ = Control, C₁ = 2,5 mg/ml, C₂ = 5 mg/ml, C₃ = 10 mg/ml).

derivatives were employed successfully against *P. aeruginosa* resistant to several antibiotics (Tsao and Yin, 2001; Iwalokun et al., 2004; Bakri and Douglas, 2005). This antibacterial capacity of garlic can be due to the presence of several active biological substances like the allicine and others absorbent derivatives (Grun-Thomas, 1998).

The inhibiting activity of the methanol extract of *L. inermis* against *P. aeruginosa* confirming the antibacterial potential previously described by several authors (Sudharameshwari and Radhika, 2007; Saadabi, 2007; Arun et al., 2010; Devi et al., 2010).

The presence of many free hydroxyls which have the possibility of combining with carbohydrates and proteins in the bacterial cell wall, as they can attach to the active sites of enzymes have been proposed to explain this antimicrobial activity (Harborne and et er Baxter, 1995). Moreover, Lawsonone, a bioactive component of *L. inermis*, is known

for its antibacterial activity (Shivananda et al., 2007; Mostefa-Kara et al., 2010).

Garlic extract has shown to be a quorum sensing inhibitor (QSI) in *P. aeruginosa* biofilm formation (Rasmussen et al., 2005). Since, quorum sensing is the cell to cell communication that is required for the differentiation of the individual cell to the mature biofilm (Davies et al., 1998). In another study, Bjarnsholt et al. (2005) indicated the effect of the extract of garlic on *P. aeruginosa* responsible for the pulmonary infections in mice. The analysis of the active compounds identified a certain number of new compounds which have an antibacterial properties, like 3-Vinyl-4 H-1,2-dithiine and 2-Vinyl-4 H-1,3-dithiine showed the capacity to modulate the QS in LuxR systems without microbicide activity (Persson et al., 2005).

4. Conclusion

We have showed that microbial adhesion of the three isolates of *Pseudomonas sp* and the *P. aeruginosa* ATCC 27853 depend on the nature of the culture medium. The rate of adherent bacteria is more significant in TSB medium and also of the matter of the support on which the isolate is adhered where polystyrene is more favorable to adhesion of the bacteria compared to glass. Within the framework of the fight against the development of the biofilms on solid surfaces, we studied the effectiveness of three types of disinfectants sodium hypochlorite hydrogen peroxide, and effect of temperature (80°C) on the mature biofilm of three isolates of *Pseudomonas sp* and *P. aeruginosa* ATCC 27853 adhered on two type of supports and in two culture media (MBB and TSB). An eradicative activity was shown on the formed biofilms, where the sodium hypochlorite made it possible to reach good levels of disinfection of the biofilm adhered on the two types of matter of support used

compared with hydrogen peroxide and temperature. Our study showed that the crude extract of *A. sativum* and methanol extract of *L. inermis* inhibit both bacterial growth and biofilm formation in *P. aeruginosa* ATCC 27853 and no activity was detected for *Aloe vera* extract.

References

- An YH, Friedman RJ (1998) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Material Research* 43(3): 338-348.
- Bakri IM, Douglas CWI (2005) Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Archives of Oral Biology* 50: 645-651.
- Arun P, Purushotham KG, Johnsy jayarani J, Dr.vasantha kumari (2010) In vitro Antibacterial activity and Flavonoid contents of *Lawsonia inermis* (Henna). *International Journal of PharmTech Research* 2: 1178-1181.
- Bjarnsholt T, Jensen PO, Rasmussen TB, Christophersen L, Calum H, Hentzer M, Hougen HP, Rygaard J, Moser C, Eberl L, Hoiby N, Givskov K (2005) Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology* 151: 3873-80.
- Bos R, Van der Mei HC, Busscher HJ (1999) Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiological Reviews* 23: 179-230.
- Bruinsma GM, Rustema-Abbing M, van der Mei HC, Busscher HJ (2001) Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiological Methods* 45: 95-101.
- Chae MS, Schraft H (2000) Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology* 62: 103-111.
- Celiktas OY, Hames Kocabas EE, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser KHC (2007) Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry* 100: 553-559.
- Chen G, Strevett KA (2001) Impact of surface thermodynamics on bacterial transport. *Environmental Microbiology* 3(4):237-245.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-298.
- Dequeiroz GA, Day DF (2007) Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *Journal of Applied Microbiology* 103 (4): 794-802.
- Devi K, Karthikai Devi G, Thirumaran G, Arumugam R, Anantharaman P (2010) Antibacterial Activity of Selected Medicinal Plants from Parangipettai Coastal Regions; Southeast Coast of India. *Academic Journal of Plant Sciences* 3 (3): 122-125.
- Djordjevic D, Wiedmann M, Mclandsborough LA (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2950-2958.
- Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8: 881-890.
- Harborne SB, Baxter A (1995) *Phytochemical Dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants.* Tylor and Francis. London.
- Grun-Thomas P (1998) Etude de trois plantes médicinales et condimentaires: l'ail, le safran, le romarin Th. : Pharm. : Nancy 1 : 63. 137.
- Ikeno T, Fukuda K, Ogawa M, Honda M, Tanabe T, Taniguchi H (2007) Small and rough colony *Pseudomonas aeruginosa* with elevated biofilm formation ability isolated in hospitalized patients. *Microbiology and Immunology* 51: 929-938.
- Iwalokun BA, Ogunledun A, Ogbolu DO, Bamiro B, Jimi-Omojola J (2004) *In Vitro* Antimicrobial Properties of Aqueous Garlic Extract Against Multidrug-Resistant Bacteria and *Candida* Species from Nigeria. *Journal of Medicinal Food* 7 (3): 327-333.
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et Maladies Infectieuses* 36: 78-91.
- Liaqat I, Sabri AN (2008) Effect of biocides on biofilm bacteria from dental unit water lines. *Current Microbiology* 56 (6): 619-24.
- Martinez LR, Casadevall A, (2007) *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 4592- 4601.
- McEldowney S, Fletcher M (1986) Variability of the influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 460-465.
- Moroh JLA, Bahi C, Dje K, Loukou YG, Guede-Guina F (2008) Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (*rubiaceae*) acetatique extract (ACE) on *in-vitro* growth of *Escherichia coli* strains. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 77: 44 – 61.
- Mostefa-Kara B, Ziani-Cherif C, Benabdallah M, Rahmoun NM, Villemin D, Choukchou-Braham N, Boucherit K (2010) New chemical tools for the assessment of hemolytic anemia induced by naphthoquinones. *Der Pharma Chemica* 2: 14-21
- Negrette R, Backhouse N, Bravo B (1987) Some flavonoïdes of centauray flocosa. *Medicinal Plants and phytotherapy* 21: 168-172.
- Nejadnik MR, van der Mei HC, Busscher HJ, Norde W (2008) Determination of the shear force at the balance between bacterial attachment and detachment in weak-adherence systems, using a flow displacement chamber. *Applied and Environmental Microbiology* 74(3): 916-919.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR (2002) Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research* 66: 86-92.
- Palmer J, Flint S, Brooks J (2007) Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34: 577-588.
- Pécastaings S (2010) Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse Doctorat, Université de Toulouse.
- Peeters E, Nelis HJ, Coenye T (2008) Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* biofilms.

Journal of Hospital Infection 70 (4): 361-8.

Persson T, Hansen TH, Rasmussen TB, Skinderso ME, Givskov M, Nielsen J (2005) Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Organic & Biomolecular Chemistry* 3: 253-262.

Piette JP, Idziak ES (1992) A model study of factors involved in adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to meat. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2783-2791.

Presterl E, Suchomel M, Eder M, Reichmann S, Lassnigg A, Granger W, Rotter M (2007) Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60 (2): 417-20.

Rasmussen TB, Bjarsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M, Kristoffersen P, Kote M, Nielsen J, Eberl L, Givskov M (2005) Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *Journal of Bacteriology* 187: 1799-1814.

Saadabi MAA (2007) Evaluation of *Lawsonia inermis* L. (Sudanese Henna) Leaf extracts as an antimicrobial agent. *Research Journal of Biological Sciences* 2(4): 419-423.

Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91: 621-632.

Saulou C (2009) Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma, Thèse de doctorat en Ingénieries Microbienne et Enzymatique. L'Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse 312p.

Shivananda NB, Isitor G, Davis EM, Pillai GK (2007) The evidence based wound healing activity of *Lawsonia inermis* Linn. *Phytotherapy Research* 21: 827-831

Spormann AM (2008) Physiology of microbes in biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 322: 17- 36.

Sudharameshwari K, Radhika J (2007) Antibacterial Screening of *Aegle marmelos*, *Lawsonia inermis* and *Albizia libbeck*. *AJTCAM* 4 (2): 199-204.

Tote K, Vanden Berghe D, Levecque S, Benere E, Maes L, Cos P (2009) Evaluation of hydrogen peroxide-based disinfectants in a new resazurin microplate method for rapid efficacy testing of biocides. *Journal of Applied Microbiology* 107 (2): 606-15.

Tsao SM, Yin MC (2001) In-vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47: 667-670.

Woods DE (2004) Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends in Microbiology* 12: 437-439.
