

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE

Présenté par

M^{elle} LATTAB Aicha

Pour Obtenir

LE DIPLOME DE MAGISTER

Spécialité: Biologie

Option: Environnement et Santé

Intitulé

**Utilisation des extraits de quelques plantes locales pour lutter contre la
résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques.**

Laboratoire de Microbiologie et de Biologie végétale, Université de Mostaganem

La composition du jury de soutenance

Nom et Prénom	Grade	Qualité	Appartenance Administrative
MEKHALDI AEK	MCA	Président	UABM
KACEM Brahim	MCA	Examineur	UABM
HAMMADI Khéira	MCA	Examinatrice	UABM
DJIBAOUI Rachid	MCA	Encadreur	UABM
ETTALHI Mehdi	Praticien Spécialiste Principal	Co-encadreur	Hôpital de AIN TEDELES Mostaganem

Année Universitaire 2011-2012

Remerciement

J'exprime d'abord mes profonds remerciements à mon DIEU qui m'a donné le courage et la volonté d'achever ce modeste travail.

*Je remercie **Mr. DJIBAOUI Rachid** et **Mr. ETALHI Mehdi** d'avoir accepté de m'encadrer, pour leurs orientations pour élaborer ce modeste travail.*

*Je remercie le chef d'option **Mr. KACEM Brahim.***

Je remercie tous les enseignants de la faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie.

*Je tiens à remercier les techniciens du laboratoire de microbiologie **Mr. BENBOUZIANE Dj., Mme AMIR F.** et tous les personnes de Laboratoire de AIN-TEDELES*

*Je tiens à remercier **Mr ARABI Abed, M^{elle} ZERROUKI Kheira** et tous qui m'ont aidé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.*

Dédicaces

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

À mon cher grand père.

À mes chers frères et mes chères sœurs.

À mes très chers neveux: Mohamed Amine, AEK, Ishak Mohamed Yasmine, Hacem Ahmed Abdelmadjide, Chabane Mohamed Islem.

À toutes ma famille.

À tous mes collègues et mes amies.

À tous ceux que j'aime.

Picha

Résumé

La présente étude traite l'effet inhibiteur des différents extraits de trois plantes médicinales à savoir *Aloe vera*, *Allium sativum* et *Lawsonia inermis* contre quatre isolats cliniques et une souche de référence de *P. aeruginosa*. La CMI et CMB ont été déterminées pour les extraits présentant un effet antibactérien. Un test d'association a été réalisé pour évaluer l'interaction entre les extraits et la gentamycine.

Aussi, l'effet des extraits et l'Acide salicylique sur le développement de biofilm chez *P. aeruginosa* a été testé par l'analyse de violet cristal.

Les résultats montrent une activité antibactérienne significative contre les cinq isolats de *Pseudomonas aeruginosa* obtenu avec l'extrait brut d'*Allium sativum* et l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*.

L'association entre les extraits utilisés et la gentamycine a montré un effet positif avec l'extrait de *L. inermis* dont la zone d'inhibition a augmenté par rapport aux zones obtenues par la gentamycine seule.

L'utilisation de l'extrait brut de l'ail et l'extrait méthanolique de henné et l'acide salicylique indique un effet inhibiteur sur la quantité de biofilm formé par *P. aeruginosa* sur des supports en verre.

Mots clés : *P. aeruginosa*, *Aloe vera*, *Allium sativum*, *Lawsonia inermis*, CMI, CMB, l'activité antibactérienne, biofilm.

Abstract

This study examines the inhibitory effect of different extracts of three medicinal plants: *Aloe vera*, *Allium sativum* and *Lawsonia inermis* against four clinical isolates and a reference strain of *P. aeruginosa*. The MIC and MBC were determined for the extracts showing an antibacterial effect. A combination test was conducted to evaluate the interaction of extracts with gentamicin.

Also, the effect of extracts and salicylic acid on the development of biofilm in *P. aeruginosa* was tested by crystal violet analysis.

The results show a significant antibacterial activity against five isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. This effect was obtained with the crude extract of *Allium sativum* and the methanol extract of *Lawsonia inermis*.

The association between plant extracts and gentamicin showed a positive effect with the extract of *L. inermis* whose zone of inhibition increased with in port areas obtained by gentamicin alone.

The use of the crude extract of garlic and the methanol extract of henna and salicylic acid indicates an inhibitory effect on the amount of biofilm formed by *P. aeruginosa* on glass slides.

Key words: *P. aeruginosa*, *Aloe vera*, *Allium sativum*, *Lawsonia inermis*, MIC, MBC, antibacterial activity, biofilm.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى معرفة مدى تأثير مستخلصات ثلاثة نباتات طبية متمثلة في *Allium sativum*، *Aloe vera* و *Lawsonia inermis* في تثبيط نمو أربعة عزلات بكتيرية تابعة لـ *Pseudomonas aeruginosa* من مصادر طبية مختلفة و سلالة مرجعية (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) خارج جسم الكائن الحي مع تحديد كل من التركيز الأدنى للتثبيط والتركيز الأدنى القاتل للمستخلصات ذات فعالية على *Pseudomonas aeruginosa*.

أظهرت النتائج أن كل من المستخلص المائي لفصوص الثوم (*Allium sativum*) و المستخلص الميثانولي لأوراق الحناء (*Lawsonia inermis*) تثبط العزلات *P. aeruginosa*

اختبار تأثير تداخل المضاد الحيوي جنتاميسين مع مستخلص الثوم و مستخلص الحناء، اظهر أن مستخلص الثوم ذو تأثير سلبي على مدى فعالية جنتاميسين على *P. aeruginosa* في حين كان التأثير ايجابيا مع مستخلص الحناء بحيث تحصلنا على زيادة في منطقة التثبيط بالمقارنة مع المتحصل عليها في حالة الجنتاميسين لوحده.

دراسة تأثير كل من المستخلص المائي للثوم ، المستخلص الميثانولي للحناء و حامض الساليسيليك على كمية الفيلم البكتيري و هو الشكل الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية لهذه البكتيريا باستعمال تحليل الكريستال البنفسجي ، بينت النتائج المتحصل عليها التأثير الكابح لكل من المستخلصين و حامض ساليسيليك على كمية الفيلم البكتيري التي شكلتها *P. aeruginosa* على شرائح الزجاج.

SOMMAIRE

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

Partie bibliographique

CHAPITRE 1 : Infections et facteurs de virulence chez <i>P. aeruginosa</i>	3
I.1. Définition	3
I.2. Le génome de <i>P. aeruginosa</i>	4
I.3. Infections à <i>P. aeruginosa</i>	5
I.3.1. Infections chroniques	6
I.3.2. Infections aiguës.....	7
I.4. Les facteurs de virulence chez <i>P. aeruginosa</i>	7
I.4.1. Facteurs de virulence cellulaire.....	8
I.4.1.1. Le flagelle.....	8
I.4.1.2. Les pili de type IV.....	8
I.4.1.3. Fimbriae.....	8
I.4.1.4. Les rhamnolipides.....	9
I.4.1.5. Les lipopolysaccharides.....	9
I.4.1.6. Les alginates	9
I.4.1.7. Les polysaccharides Psl et Pel.....	10
I.4.2. Facteurs de virulence extracellulaire.....	11
I.4.2.1. Exotoxine A.....	11
I.4.2.2. Les élastases.....	11
I.4.2.3. Les phospholipases C (PLC).....	11
I.4.2.4. Les lectines solubles.....	12
I.4.2.4.1. La lectine PA-IL.....	12
I.4.2.4.2. La lectine PA-III.....	12
I.4.2.5. Les toxines du SST3.....	13
I.4.2.6. Pyoverdine.....	14
I.4.2.6. Pyocyanine.....	14
I.5. Régulation de l'expression des facteurs de virulence.....	15
I.5.1. Le Quorum Sensing chez <i>P. aeruginosa</i>	15

CHAPITRE II. Résistance aux antibiotiques chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	18
II.1. Diminution de l'accumulation	18
II.1.1. Efflux actif.....	18
II.1.2. Altération des porines	19
II.1.3. Modification des lipopolysaccharides membranaires (LPS).....	19

II.1.3.1. Résistance à la colistine	20
II.1.3.2. Résistance aux fluoroquinolones.....	20
II.1.3.3. Résistance aux aminosides.....	20
II.2. Enzyme inactivants.....	21
II.2.1. β -lactamases.....	21
II.2.2. Enzymes modifiant les aminoglycosides.....	21
II.3. Modification de la cible.....	22
II.3.1. Mutations.....	22
II.3.2. Méthylation de l'ARN 16S.....	23
II.4. Résistance aux antibiotiques inhérente au mode vie en biofilm.....	23
II.4.1. Présentation.....	23
II.4.2. Formation des biofilms.....	24
II.4.3. Mécanisme de résistance aux antibiotiques dans un biofilm.....	25
II.4.4. Le lien entre Quorum Sensing, biofilm et infection à <i>P. aeruginosa</i>	27
II.4.5. Rôle de signalisation de QS dans la résistance de biofilm aux antibiotiques.....	28
CHAPITRE III : Description et caractéristique des plantes étudiées	29
III.1. Aloès (<i>ALOE VERA</i>).....	29
III.1.1. Taxonomie.....	29
III.1.2. Aspect botanique	29
III.1.3. Répartition géographique.....	29
III.1.4. Composition phyto-chimique	30
III.1.4.1. Composition chimique d'exsudat d' <i>Aloe vera</i>	30
III.1.4.1.1. L'antraquinones.....	30
III.1.4.1.2. Anthrone.....	31
III.1.4.1.3. Chromones	32
III.1.4.2. Composition chimique du gel d' <i>Aloe vera</i>	32
III.1.4.2.1. Composition en glucides.....	32
III.1.4.2.2. Les glycoprotéines.....	33
III.1.4.2.3. Les polypeptides.....	33
III.1.4.2.4. Stérols et stéroïdes.....	33
III.1.4.2.5. Lipides	33
III.1.4.2.6. L'acide salicylique	33
III.1.4.2.7. Autre substances	33
III.1.5. Utilisation	34
III.1.6. Effets antibactériens	34
III. 2. L'ail (<i>ALLIUM SATIVUM</i>).....	35
III.2.1. Classification	35
III.2.2. Aspect botanique	35
III.2.3. Répartition géographique.....	36
III.2.4. Composition phytochimique	36
III.2.5. Propriétés pharmacologiques et emplois.....	39

III.2.5. Effets antibactériens	40
III.3. Le henné (<i>LAWSONIA INERMIS</i>).....	41
III.3.1. Taxonomie	41
III.3.2. Aspect botanique	41
III.3.3. Répartition géographique	41
III.3.4. Utilisation.....	42
III.3.5. Composition phytochimique	42
III.3.5.1. Dérivés de Naphthoquinone	42
III.3.5.2. Composants aliphatiques, triterpènes, et stérols	43
III.3.5.3. Dérivés phénoliques, coumarins, xanthones et flavonoïdes.....	44
III.3.5.4. D'autres constituants chimiques.....	44
III.3.6. Effets antimicrobiens	45

Partie expérimentale

CHAPITRE IV: Matériels et méthodes	46
IV.1. Obtention de bactéries.....	46
IV.2. Identification des isolats.....	46
IV.2.1. Etude macroscopique des colonies.....	46
IV.2.2. Etude microscopique.....	46
IV.2.3. Production des pigments.....	46
IV.2.4. Croissance à 4°C et à 42°C.....	47
IV.2.5. Production d'oxydase.....	47
IV.2.5. Production de catalase	47
IV.2.6. Caractères biochimiques	47
IV.2.6.1. Milieu TSI (Triple sugar iron).....	47
IV.2.6.1. La galerie API 20 E.....	47
IV.3. L'antibiogramme.....	48
IV.4. Matériel végétal.....	49
IV.5. Préparations des extraits végétaux.....	50
IV.5.1. Préparation d'extraits de l' <i>Aloe vera</i>	50
IV.5.2. Préparation d'extraits d' <i>Allium sativum</i>	51
IV.5.3. Préparation de l'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i>	52
IV.6. Activité antibactérienne des différents extraits préparés :.....	53
IV.6.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits de <i>Lawsonia inermis</i> et d' <i>Allium sativum</i> :	53
IV.6.1.1. En milieu solide.....	53
IV.6.1.2. En milieu liquide.....	54
IV.6.2. Concentration minimale bactéricide (CMB) des extraits de <i>Lawsonia inermis</i> et d' <i>Allium sativum</i>	55
IV.7. Combinaison de la gentamycine avec l'extrait de l' <i>Allium sativum</i> et l'extrait de <i>Lawsonia inermis</i>	55

IV.8. L'étude de l'effet d'extraits préparé et acide salicylique sur la formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
IV.8.1. Effet des extraits sur la formation du biofilm	56
IV.8.2. Effet de l'acide salicylique sur la formation du biofilm	57
CHAPITRE V: Résultats et Discussion	58
V.1. Identification des isolats obtenus.....	58
V.1.1. L'étude macroscopique.....	58
V.1.2. L'étude microscopique.....	58
V.1.3. Croissance à 4°C et à 42°C	59
V.1.4. Test de l'oxydase	59
V.1.5. Test de la catalase.....	59
V.1.6. Caractères biochimiques.....	59
V.1.6.1. Milieu TSI (Triple sugar iron).....	59
V.1.6.2. La galerie biochimique API 20 E	60
V.2. Etude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques.....	61
V.3. Résultats des tests antibactériens de quelques plantes	63
V.3.1. Aloès (<i>Aloe vera</i>).....	64
V.3.2. L'ail (<i>Allium sativum</i>).....	65
V.3.3. Henné (<i>Lawsonia inermis</i>).....	65
V.4. Détermination de la Concentrations Minimale Inhibitrice des extraits de <i>Allium sativum</i> et <i>Lawsonia inermis</i>	66
V.4.1. L'extrait brut de l' <i>Allium sativum</i>	66
V.4.1.1. En milieu solide.....	66
V.4.1.2. En milieu liquide.....	66
V.4.1.3. Concentrations Minimale Bactéricide (CMB) d'extrait brut d' <i>Allium sativum</i>	68
V.4.2. L'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i>	70
V.4.2.1. En milieu solide.....	70
V.4.2.2. En milieu liquide.....	71
V.4.2.3. Concentrations Minimale Bactéricide (CMB) d'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i>	72
V.5. Résultats de l'association de la gentamycine avec l'extrait brut (jus) de l' <i>Allium sativum</i> et l'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i>	74
V.6. L'effet de l'acide salicylique, l'extrait brut de l' <i>Allium sativum</i> et extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i> sur la formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853.....	76
V.6.1. L'effet de l'acide salicylique.....	76
V.6.2. L'effet de l'extrait brut de l' <i>Allium sativum</i> et l'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i>	76
Conclusion.....	79
Annexe	
Références bibliographiques.	

Liste des figures

Figure n° 1 :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : 1- colonies sur gélose KingB (Vincent, 2005), 2- coloration de Gram (x1000) (Salton et Kim , 1996).....	3
Figure n° 2 :	Le pangénome de <i>P. aeruginosa</i> (Mathee <i>et al.</i> , 2008).....	4
Figure n° 3 :	Les facteurs de virulence chez <i>P. aeruginosa</i> associés à la surface.....	10
Figure n° 4 :	Les rôles possibles de la lectine PA-III durant l'infection (Imberly <i>et al.</i> , 2004).....	13
Figure n° 5 :	Modèle de formation d'un biofilm par <i>P. aeruginosa</i> (Costerton <i>et al.</i> , 1999 ; Klinger <i>et al.</i> , 2005).....	25
Figure n° 6 :	Structure chimique d'Aloïne (Josias et Humman, 2008).	30
Figure n° 7 :	Structure chimique d'Aloe-emodine (Josias et Humman, 2008).....	31
Figure n° 8 :	Structure chimique d'Isobarbaloine (Josias et Humman, 2008).....	32
Figure n° 9 :	Structure chimique de principal composant de l'ail intact (Bruneton, 1999)	36
Figure n° 10 :	Transformation de l'alliine en allicine.....	37
Figure n° 11:	Structure chimique de quelques composés de l'huile essentielle de l'ail.....	37
Figure n° 12 :	Transformation de l'allicine en l'ajoènes.....	38
Figure n° 13 :	Structure chimique des vinylthiines (Bruneton, 1999).....	38
Figure n° 14 :	Structure chimique de Lawsone.....	42
Figure n° 15 :	Structure chimique de principaux composants aliphatiques, triterpènes, et stéroïdes.....	43
Figure n° 16 :	Structure chimique de constituants chimiques de <i>Lawsonia inermis</i>	45
Figure n° 17:	La galerie biochimique API 20 E.....	48
Figure n° 18 :	Photos des plantes utilisées dans cet étude.....	49
Figure n° 19 :	Gel d' <i>Aloe vera</i>	50
Figure n° 20 :	Les principales étapes réaliser dans la préparation de l'extrait d' <i>Allium sativum</i> selon la méthode décrite par Rasmussen en 2005.....	52
Figure n° 21 :	Soxhlet et Rotavapor utilisés dans cette étude.....	52
Figure n° 22 :	Aspect macroscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ensemencée : sur King A(1) et sur King B (2).....	58
Figure n° 23 :	Observation microscopique de <i>P. aeruginosa</i> après une coloration de Gram (x1000).....	58
Figure n° 24 :	Résultat de test de TSI pour les cinq isolats <i>P. aeruginosa</i>	59

Figure n° 25 :	La galerie biochimique API 20 E après un ensemencement et incubation de 24h.....	60
Figure n° 26 :	Résultats de d'antibiogramme de <i>P. aeruginosa</i> testés.....	61
Figure n° 27 :	Résultats de d'antibiogramme de cinq isolats de <i>P. aeruginosa</i> testés.....	62
Figure n° 28 :	Résultats des tests antibactériens des trois plantes étudiées contre <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	63
Figure n° 29 :	Activité antibactérienne de différents extraits testés d' <i>Aloe vera</i>	64
Figure n° 30 :	Activité antibactérienne de deux différents extraits testés d' <i>A. sativum</i> ...	65
Figure n° 31 :	Activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i> ...	65
Figure n° 32 :	les zones d'inhibition de déférente concentration de l'extrait brut de l' <i>Allium sativum</i> sur <i>P. aeruginosa</i>	66
Figure n° 33 :	Variation des zones d'inhibition de cinq isolats de <i>P. aeruginosa</i> en fonction de la concentration de l'extrait brut (jus) de l' <i>Allium sativum</i>	67
Figure n° 34 :	Variation de la turbidité due à la croissance de <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 en fonction de la concentration d'extrait brut d' <i>Allium sativum</i>	68
Figure n° 35 :	CMB d'extrait brut (jus) d' <i>Allium sativum</i>	69
Figure n° 36 :	les zones d'inhibition des concentrations de l'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i> sur <i>P. aeruginosa</i>	70
Figure n° 37 :	Variation des zones d'inhibition de cinq isolats de <i>P. aeruginosa</i> en fonction de la concentration d'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i> ..	71
Figure n° 38 :	Variation de la turbidité induite par la croissance de <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 en fonction de la concentration en extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i>	72
Figure n° 39 :	CMB d'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i>	73
Figure n° 40 :	Les zones d'inhibition de l'association de gentamycine avec l'extrait brut d' <i>Allium sativum</i> et l'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i>	74
Figure n° 41 :	Résultat combinaison de gentamycine avec extrait brut (jus) de l' <i>Allium sativum</i> et extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i>	75
Figure n° 42 :	Variation de la quantité de biofilm formé par <i>P. aeruginosa</i> en fonction de la variation de concentration de Acide salicylique, jus d' <i>Allium sativum</i> et l'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i>	78

Liste des tableaux

Tableau N° 01 :	Principaux systèmes d'efflux actif chez <i>P. aeruginosa</i>	19
Tableau N° 02 :	Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme.....	48
Tableau N° 03 :	les résultats des différents tests de la galerie biochimique API 20 E.....	60
Tableau N° 04:	Effet antibactérien de différentes extraits préparés a partir de <i>Aloe vera</i> , <i>Allium sativum</i> et <i>Lawsonia inermis</i> , sur MH.....	63
Tableau N° 05 :	Effet de différentes concentrations de l'extrait brut de l' <i>Allium sativum</i> contre les différents isolats de <i>P. aeruginosa</i> étudiés, sur MH.....	66
Tableau N° 06 :	Activité antibactérienne de différentes concentrations de l'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i> contre les différents isolats de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> étudiés, sur MH.....	70
Tableau N° 07 :	Résultat de combinaison de la gentamycine avec l'extrait brut de l' <i>Allium sativum</i> et l'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i>	75
Tableau N° 08 :	Résultat des effets de l'acide salicylique et l'extrait de l' <i>Allium sativum</i> et <i>Lawsonia inermis</i> sur la formation de Biofilm par <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	77

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide désoxy ribonucléique
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
ARN :	Acide ribonucléique
AS :	Acide salicylique
ATB :	Antibiotiques
ATCC :	American Type Culture Collection
ATP :	Adénosine triphosphate
BPCO :	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
°C :	Degré Celcius
CF :	Fibrose kystique
CFTR :	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CMB:	Concentration Minimale Bactéricide
CMI:	Concentration Minimale Inhibitrice
cm :	Centimètre
DDB :	Dilatation des bronches
DO :	Densité Optique
EPS :	Extra Polymeric Substance
ExoS, T, U et Y :	Exotoxine S, T, U et Y
GN	Gélose nutritive
h :	heure
IgA :	Immunoglobulines A
IgG :	Immunoglobulines G
IL-8 :	Interleukine 8
IPTG :	Isopropyl-beta-thio-galactoside (C ₉ H ₁₈ O ₅ S)
kDa	Kilo Daltons
LPS:	Lipopolysaccharides
mg :	milligramme
MH	Mueller Hinton
ml :	millilitre
µg :	microgramme
NF-κB :	Nuclear factor kappa B

nm :	Nanomètre
O2 :	L'Oxygène
OprD :	Outer membrane protein D
OprF :	Outer membrane protein F
PAI1 :	<i>Pseudomonas</i> autoinducer 1
<i>P. aeruginosa</i> :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PA-IL :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin I
PA-III :	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin II
PMN :	poly-MorphoNucléaires neutrophiles
PQS :	<i>Pseudomonas</i> Quinolone Signal
PAI2 :	<i>Pseudomonas</i> autoinducer 2
QS :	Quorum sensing
R. :	Résultats
RND :	Resistance Nodulation cell Division
s :	Seconde
SST3 :	Système de sécrétion de type 3
TLR :	Toll like Receptor
t/mn :	Tour par minute
UFC :	Unité Formant Colonie

Introduction Générale

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est un germe ubiquitaire largement opportuniste, reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez les personnes immunodéprimées, les grands brûlés, les patients en soins intensifs ou atteints de mucoviscidose (Pier et Ramphal, 2005). L'expression des gènes de virulence au site de l'infection joue un rôle important dans la physiopathologie de ces infections. La transcription de nombreux gènes de virulence de *P. aeruginosa* est sous le contrôle d'un mécanisme de régulation dépendant de la densité bactérienne, appelé quorum-sensing (QS). Chez *P. aeruginosa*, le QS est constitué de deux systèmes de signalisation repose sur la synthèse et la diffusion, de bactérie à bactérie, de petites molécules appelées acylhomosérines lactones (AHL). (Rumbaugh *et al.*, 2000).

P. aeruginosa a toujours été considéré comme une cible difficile en chimiothérapie anti-infectieuse. La séquence complète de son génome (Stover *et al.*, 2000) a permis de rationaliser cette observation car 0.3 % des gènes sont directement impliqués dans les mécanismes de résistance, comme il est capable d'acquérir des novo de mécanismes de résistance suite à l'exposition à des traitements antibiotiques (Woods, 2004 ; Kipnis *et al.*, 2006).

De plus, formant des biofilms (communauté de micro-organismes, adhérant entre eux et à une surface et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice), elle devient inaccessible aux antibiotiques et aux cellules du système immunitaire de l'hôte. Les biofilms sont à l'origine de nombreuses infections chroniques, notamment dans l'infection à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose où les biofilms se constituent dans les alvéoles pulmonaires.

La science moderne et les progrès technologiques accélèrent la découverte et le développement des substances naturel à base des plantes avec l'activité thérapeutique améliorée et des effets secondaires réduits. Bien que beaucoup de recherches aient été réalisées pour évaluer les propriétés antimicrobiennes des produits naturels contre les micro-organismes planctoniques, cependant, moins de travail a été fait sur les formes sessiles ou de biofilm.

Nous avons choisi pour notre étude trois plantes bien connues dans la médecine populaire : *Aloe vera* (Aloès), *Allium sativum* (Ail) et *Lawsonia inermis* (Henné).

Notre travail, dans une première partie, englobe une recherche bibliographique qui comporte trois chapitres:

Dans le premier chapitre, nous aborderons la présentation de *P. aeruginosa*, les infections, les facteurs de virulence et le rôle particulier du QS dans la régulation de ces facteurs de virulence.

Dans le deuxième chapitre on a développé les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa* dont la formation de biofilm.

Alors que le troisième chapitre présente une connaissance des différentes caractéristiques des trois plantes employées, leur classification, description, composition chimique, utilisation et leurs propriétés antibactériennes.

Dans la deuxième partie, nous avons procédé à une approche expérimentale qui s'adresse aux étapes suivantes :

- Obtention et confirmation de l'identification des isolats testés.
- Préparation des extraits végétaux des trois plantes étudiées.
- Etude de l'activité antibactérienne de différents extraits préparés.
- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) d'extraits présentant un effet inhibiteur sur les isolats de *P. aeruginosa*.
- Effet de combinaison de la gentamycine avec l'extrait de l'*Allium sativum* et l'extrait de *Lawsonia inermis*.
- L'étude de l'effet de l'extrait de l'*Allium sativum*, l'extrait de *Lawsonia inermis* et l'acide salicylique sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa*.

Partie bibliographique

CHAPITRE I

Infections et facteurs de virulence chez P. aeruginosa

I. *Pseudomonas aeruginosa* : Infections et facteurs de virulence**I.1. Définition :**

Pseudomonas aeruginosa est un bacille d'environ 1,5µm, à Gram négatif, aérobie, mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire (Bauman, 2006).

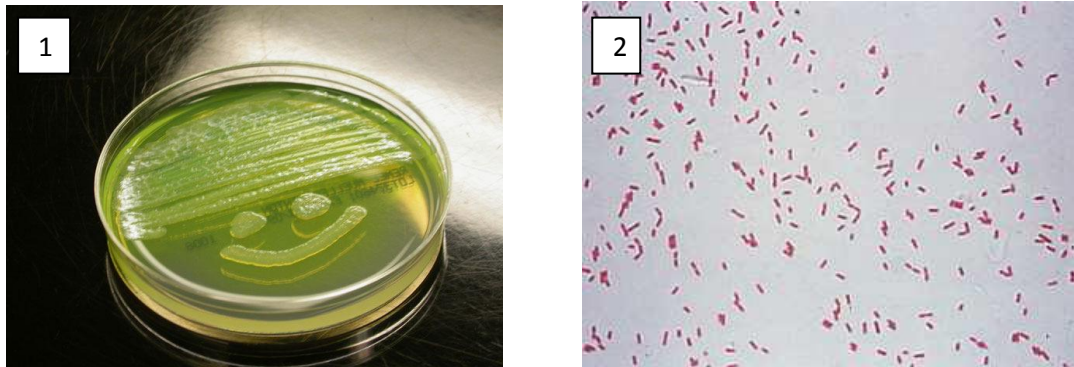


Figure n° 1: *Pseudomonas aeruginosa*: 1- colonies sur gélose KingB (Vincent, 2005),
2- coloration de Gram (x1000) (Salton et Kim, 1996).

Cette bactérie est capable de se développer dans un large spectre de température avec une température optimale de croissance est de 37°C. Bien que cette bactérie, ayant un métabolisme aérobie oxydatif, elle utilise l'O₂ comme accepteur d'électrons mais peut également prospérer dans des conditions d'épuisement partiel ou total de l'oxygène par utilisation de nitrate comme accepteur d'électrons. *P. aeruginosa* est catalase positive, oxydase positive et capable de métaboliser plus de 50 composés organiques ainsi que des composants inorganiques (Vasil, 1986).

La capacité de croissance de ce germe dans différentes conditions lui confère une large distribution dans notre environnement, opportuniste vivant normalement à l'état saprophyte dans l'eau, les sols humides et les végétaux, mais qui peut également vivre à l'état commensale sur la peau ou à l'intérieur du système digestif de l'homme et de divers animaux (Livermore, 2002).

I.2. Le génome de *P. aeruginosa* :

Depuis le séquençage du génome de la souche modèle PAO1 (Stover *et al.*, 2000), six autres souches ont été entièrement séquencées : PA14, PA7, LES, B58, C3719 et PA2192 (seules les trois premières souches sont complètement annotées) (Mathee *et al.*, 2008 ; Winstanley *et al.*, 2009). La taille de ces génomes varie entre 5 et 7 Mb.

La comparaison entre les différentes souches montre que le génome de *P. aeruginosa* peut être comparé à une « mosaïque » composée d'un squelette commun d'environ 5000 gènes (Le cercle doré), interrompus dans chaque souche par une combinaison de « blocs de gènes » spécifiques (dits accessoires) qui confèrent à chaque souche un répertoire génétique unique (Figure n° 2) (Mathee *et al.*, 2008 ; Qiu *et al.*, 2009).

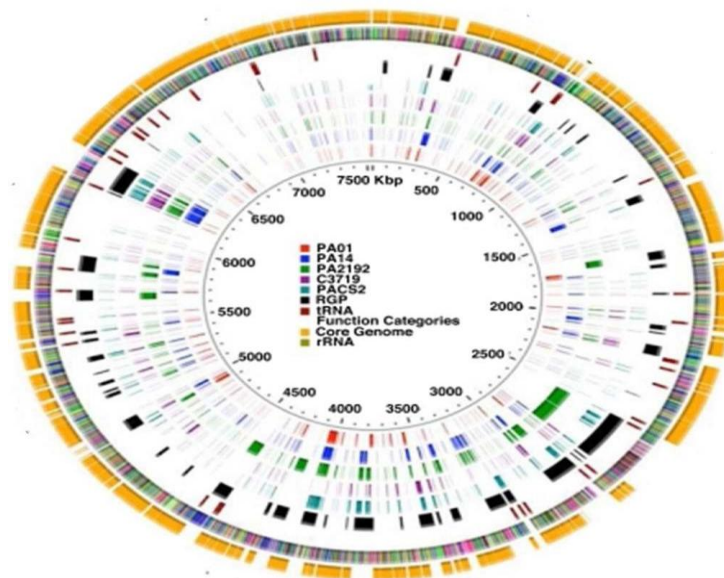


Figure n° 2: Le pangénome de *P. aeruginosa* (Mathee *et al.*, 2008).

Un pangénome est une compilation de tous les gènes de toutes les souches d'une espèce. Les gènes communs de la souche PA14 ont servi de matrice sur laquelle tous les gènes accessoires des souches PA2192, C3719, PAO1 et PACS2 (souche non entièrement séquencée) ont été intégrés.

Ces blocs de gènes ont été acquis par transfert horizontal d'autres gènes bactériens et/ou de bactériophages et ont été insérés dans des régions instables du génome appelées RPG pour «Region of Genomic Plasticity» en noir. Selon les souches, ces RGP peuvent être le site d'insertion de ces îlots génomiques ou encore de délétion de segments d'ADN (Mathee *et al.*, 2008 ; Qiu *et al.*, 2009). Les îlots génomiques contiennent aussi bien des gènes permettant d'améliorer l'aptitude de la bactérie à survivre, dans des niches environnementales spécifiques

que des gènes codant pour des traits de virulence (Qiu *et al.*, 2009). C'est le cas des îlots de pathogénicité qui portent des gènes codant pour des toxines et des protéines permettant l'assemblage des fimbriae et/ou des pili des souche-spécifiques, tels les gènes *cupD* dans la souche PA14 (Qiu *et al.*, 2006). Par exemple, le gène codant pour l'exotoxine U (ExoU) exportée par le SST3 se trouve au sein de l'îlot de pathogénicité PAPI-2 (He *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* possède un taux de gènes dévoués à la régulation (8,4%) élevé par rapport aux autres bactéries, ces gènes constituent respectivement 5.8% et 5.3% des génomes de *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Ceci lui confère une grande adaptabilité face à son environnement. Les autres gènes surreprésentés par rapport aux autres bactéries sont ceux codant pour les pompes d'efflux, les systèmes d'import de nutriments et les systèmes de chimiotactisme (Stover *et al.*, 2000).

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 et n'adhère pas à l'épithélium normal intact. Elle colonise les patients immunodéprimés, notamment les personnes atteintes du virus du SIDA, les grands brûlés ou les patients traités par des chimiothérapies neutropéniantes (Lyczak *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* infecte également des personnes hospitalisées suite à une intervention chirurgicale ou munis de cathéters pendant une longue durée (Lyczak *et al.*, 2000). Sa multirésistance est due à la relative imperméabilité de sa membrane, la synthèse de bêta-lactamases à large spectre et à la présence de nombreuses pompes d'efflux (Mao *et al.*, 2002 ; Germ *et al.*, 1999).

P. aeruginosa est le quatrième organisme pathogène le plus courant en milieu hospitalier, elle est à l'origine de 10% des maladies nosocomiales (Anonyme, 2007).

P. aeruginosa est aussi la cause de méningites, de dermatites, d'otites externes, de kératites ulcéreuses chez les porteurs de verres de contact, d'infections de la peau chez les grands brûlés, d'endocardites chez les patients abusant de drogues intraveineuses et d'infections nosocomiales du tractus urinaire (Bodey *et al.*, 1983). *P. aeruginosa* est aussi la cause majeure d'infections pulmonaires et de décès chez les patients atteints de mucoviscidose.

I.3.1. Infections chroniques :

P. aeruginosa est rencontré lors d'infections respiratoires chroniques telles que la mucoviscidose, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la dilatation des bronches (DDB).

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 chlorés (Cl⁻) à travers la membrane plasmique (Bertrand *et al.*, 2003). Il s'agit d'une maladie chronique du tractus respiratoire caractérisée par une obstruction des voies respiratoires et des infections récurrentes du poumon et du sinus paranasal dès le plus jeune âge. Le poumon mucoviscidosique est particulièrement susceptible aux infections occasionnées par *P. aeruginosa*. Cet organisme joue un rôle crucial dans le développement et la progression des maladies pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose (Wine, 1999).

L'inflammation du tractus respiratoire causée par une infection chronique à *P. aeruginosa* est la cause majeure de morbidité et de mortalité chez les patients mucoviscidosiques (Khan *et al.*, 1995). En effet, la stratégie consistant à utiliser une antibiothérapie agressive a permis le contrôle des infections respiratoires à *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* mais a abouti à la sélection de souches de *P. aeruginosa* résistantes aux antibiotiques s'adaptant à l'environnement des poumons mucoviscidosiques, riches en mucus, en devenant des variants monoïdes (Mashburn *et al.*, 2005). Le mucus présente un environnement propice à la croissance de *P. aeruginosa*, son hypersécrétion entraîne une augmentation de son épaisseur et la création d'un gradient d'O₂ qui va permettre la formation d'alginate par *P. aeruginosa* (Worlitzsch *et al.*, 2002).

La BPCO fait référence à un état décrit comme une bronchite chronique se traduisant par une inflammation chronique et un rétrécissement des voies aériennes. Chez les patients atteints de BPCO, la fréquence d'isolement de *P. aeruginosa* va de 3 à 18% en période d'exacerbation (Sethi, 2000). Le risque d'acquisition et de colonisation à *P. aeruginosa* chez ces patients est lié à quatre facteurs reconnus : la rencontre pathogène-bronches liés à l'environnement hospitalier (Robinson *et al.*, 2003), la sélection de *P. aeruginosa* dans la flore du patient suite aux antibiothérapies, les altérations de la muqueuse bronchique et de la clairance mucociliaire, et les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* favorisant la colonisation initiale (flagelle, pili de type IV) et la colonisation chronique (*quorum sensing*, biofilm).

La DDB 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. *P. aeruginosa* apparaît plus tardivement dans la maladie, huit ans après le diagnostic de la maladie (Benhamou *et al.*, 1996). La présence de *P. aeruginosa* est corrélée avec une altération de la qualité de vie (Wilson *et al.*, 1997) et une mortalité plus élevée (Ho *et al.*, 1998).

I.3.2. Infections aiguës :

P. aeruginosa peut être responsable d'infections aiguës telles que les pneumonies. Chez les patients immunodéprimés, particulièrement les patients transplantés, brûlés, atteints de cancers ou du SIDA, *P. aeruginosa* est à l'origine d'infections respiratoires (broncho-pulmonaires) graves. Les pneumonies aiguës associées à ce pathogène se compliquent fréquemment d'œdème pulmonaire majeur, de choc septique et de défaillance multiviscérale, accusant un taux de mortalité élevé, estimé de 50 à 70% selon les études, malgré une antibiothérapie adaptée (Faure *et al.*, 2006).

Le taux de mortalité des infections respiratoires à *P. aeruginosa* chez les patients sous assistance respiratoire par ventilation mécanique varie de 34 à 48%. Cette bactérie représente le pathogène le plus fréquemment identifié chez les patients nécessitant une trachéotomie pour une ventilation mécanique continue (Rello *et al.*, 2003). *P. aeruginosa* peut rarement causer des infections chez des personnes saines. Quand ces infections se produisent, elles sont dues à une longue exposition aux aérosols d'eaux contaminées, avec un taux de mortalité de 33% (Hatchette *et al.*, 2000).

I.4. Les facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* :

Le séquençage de la souche PAO1 a mis en évidence la présence de nombreux facteurs de virulence codés par le génome de *P. aeruginosa* ; ceux-ci lui permettent de survivre aussi bien dans les différents hôtes que dans l'environnement (Lazdunski, 2003).

I.4.1. Facteurs de virulence cellulaires :**I.4.1.1. Le flagelle :**

P. aeruginosa produit un flagelle monotriche polaire confère à la bactérie la capacité de se déplacer non seulement en milieu aqueux, mais également sur des surfaces semi-solides (swarming) (Kohler *et al.*, 2000). Il présente une forte homologie structurale avec le système de sécrétion de type III et se compose d'une partie enchâssée dans la membrane assurant la rotation par transport de protons et une partie libre. Celle-ci est constituée en partie de monomères de flagelline (FlicC) (Bardy et Jarrell, 2003).

Ils sont impliqués dans la reconnaissance et l'adhérence aux surfaces épithéliales (Simpson *et al.*, 1992) et abiotiques, ainsi qu'à la formation de microcolonies et au développement « normal » d'un biofilm (O'Toole et Kolter, 1998). La flagelline est ainsi capable d'interagir avec les glycolipides GM1, les asialo-GM1 (Feldman *et al.*, 1998) et les mucines (Lillehoj *et al.*, 2002) présentes à la surface de l'épithélium bronchique. Le flagelle participe également à la virulence en induisant une réponse inflammatoire dépendante de NFκB via les récepteurs Toll, TLR5 et TLR2, et une production d'IL-8 (Di Mango *et al.*, 1995 ; Adamo *et al.*, 2004).

I.4.1.2. Les pili de type IV :

Les pili de type IV sont des appendices de surfaces polaires présents en plusieurs copies sur la surface de la bactérie. Ils sont impliqués dans la motilité de type « twitching » qui permet le déplacement sur une surface solide grâce à l'extension puis à la rétraction du pili et la mobilité de type « swarming » (Asikyan *et al.*, 2008) (Figure n° 3).

Les pili de type IV interagissent avec les régions glycosylées des glycosphingolipides asialo-GM1 et asialo-GM2 à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Imundo *et al.*, 1995 ; De Bentzmann *et al.*, 1996 ; Bryan *et al.*, 1998).

I.4.1.3. Fimbriae :

Différents facteurs d'attachement de type fimbriae, appelés Cup (pour Chaperone Usher Pathway) sont également impliqués dans l'adhésion des bactéries sur une variété de surfaces biotiques et abiotiques. Ce sont des appendices de nature protéique composés de sous-unités de type piline. L'adhérence aux cellules est possible grâce à l'interaction entre une adhésine (retrouvée en surface du pili) et son récepteur spécifique sur la cellule (Vallet *et al.*, 2001 ; Kostakioti *et al.*, 2005 ; Ruer *et al.*, 2007).

I.4.1.4. Les rhamnolipides :

Se sont des glycolipides hémolytiques résistants à la chaleur capables d'inhiber la phagocytose et d'induire la nécrose des PMN (leucocytes PolyMorphoNucléaire) (Jensen *et al.*, 2007). Ces composés possèdent une activité détergente envers les phospholipides de la membrane eucaryote et participent aussi à l'architecture du biofilm (Kownatzki *et al.*, 1987 ; Filloux et Vallet, 2003) (Figure n° 3).

I.4.1.5. Les lipopolysaccharides :

Les LPS sont les constituants lipidiques majeurs situés à la face externe de la membrane. Ils s'agissent des composés amphiphiles constitués de trois parties : une partie hydrophobe, le lipide A, inséré dans la bi-couche phospholipidique membranaire, un noyau oligosaccharidique et un polysaccharide antigène-O caractéristique de la bactérie.

La fixation des LPS sur les récepteurs eucaryotes asialo-GM1 et TLR4 entraîne la stimulation de la réponse inflammatoire (Kipnis *et al.*, 2006). Le lipide A ou endotoxine est impliqué dans la stimulation excessive du système immunitaire et peut ainsi être à l'origine de chocs septiques (Ernst *et al.*, 2003).

La protéine CFTR pourrait également jouer le rôle de récepteur, induisant l'internalisation de la bactérie par les cellules épithéliales pulmonaires et activant ainsi la réponse inflammatoire. L'absence ou le dysfonctionnement de la CFTR chez les patients atteints de mucoviscidose, ainsi que les modifications de l'antigène O pourraient retarder ainsi la réponse immunitaire et l'élimination des bactéries, conduisant secondairement à leur installation (Goldberg et Pier 1996; Pier, 2002 ; Schroeder *et al.*, 2002).

La perte de l'antigène permet d'éviter la reconnaissance de la bactérie par le système immunitaire tandis que la présence d'aminoarabinose pourrait améliorer la résistance de *P. aeruginosa* à un antimicrobien, la colisine (Nguyen et Singh, 2006 ; Smith *et al.*, 2006 ; Ernst *et al.*, 2007).

I.4.1.6. Les alginates :

Les alginates sont des exopolysaccharides qui donnent à la bactérie un aspect dit mucosité, ils sont composés de polymères répétés d'acide D-mannuronique et d'acide L-glucuronique. (Shankar *et al.*, 1995). Durant son transfert périsplasmique, l'alginate subit une acétylation et une épimérisation pour conduire à trois types d'organisation, homopolymères de chaque acide ou des hétéropolymères (Remminghorst et Rehm, 2006). Ils sont impliqués dans l'attachement de la bactérie sur des surfaces biotiques et abiotiques et permettent la colonisation des cellules épithéliales respiratoires. Ils participent à l'architecture des biofilms, mais ne sont pas cruciaux au développement du biofilm (Hentzer *et al.*, 2001 ; Wozniak *et al.*, 2003). La surproduction d'alginates permettrait cependant de protéger la bactérie de la phagocytose et des antibiotiques ainsi que d'atténuer la réponse immunitaire (Hentzer *et al.*, 2001 ; Cobb *et al.*, 2004).

I.4.1.7. Les polysaccharides Psl et Pel :

Se sont des polysaccharides essentiels au développement du biofilm et sont des composants indispensables de l'EPS des souches non-mucosité (Ryder *et al.*, 2007). La structure des Psl vient d'être décrite, il s'agit d'un pentasaccharide répété de D-mannose, D-glucose et D-rhamnose (Byrd *et al.*, 2009). Les Pel sont des polysaccharides riches en glucose dont la structure exacte n'a pas encore été définie (Ryder *et al.*, 2007). Contrairement aux alginates, ces polysaccharides sont aussi produits par *P. aeruginosa* sous sa forme planctonique (Ryder *et al.*, 2007).

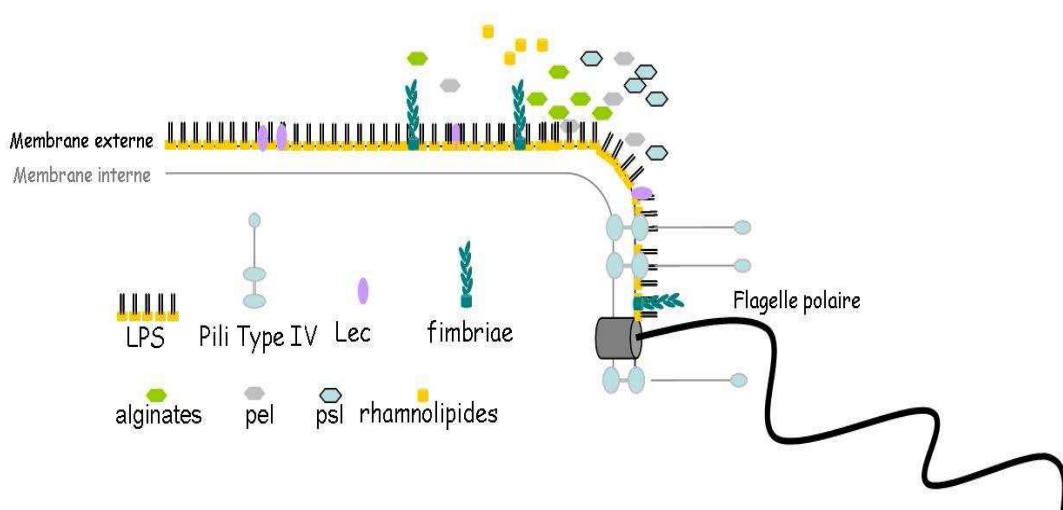


Figure n° 3: Les facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* associés à la surface.

I.4.2. Facteurs de virulence extracellulaire :

I.4.2.1. Exotoxine A :

L'exotoxine A est la protéine la plus cytotoxique qui est importante pour la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de fibrose kystique. Sécrétée sous forme de pro-toxine inactive via le système de sécrétion de type II, elle reconnue de façon spécifique par le LRP (LDL related protein) (Herz *et al.*, 1990). Cette interaction produit le clivage de la pro-toxine et une internalisation de la partie active qui cible le facteur d'élongation E2 perturbant ainsi la synthèse protéique et entraînant la mort cellulaire par nécrose (Wick *et al.*, 1990). Elle diminue également la réponse de l'hôte (Schultz *et al.*, 2001).

I.4.2.2. Les élastases :

L'élastase (LasB) est une métalloprotéinase à zinc codée par le gène *lasB* secrétée par le système de sécrétion de type II. Cette protéine exerce son effet toxique par dégradation de l'élastine, composant majeur de l'épithélium respiratoire. Ceci conduit à une perméabilisation de l'épithélium facilitant l'action d'autres facteurs (Azghani *et al.*, 2000).

Las B modifierait également la réponse immune en détruisant les surfactants A et D (Mariencheck *et al.*, 2003), en augmentant la production d'IL-8 (Kon *et al.*, 1999) et capable d'inactiver de nombreuses protéines comme les IgA, les IgG et des composants du complément (Heck *et al.*, 1990 ; Hong et Ghebrehiwet, 1992).

Las A (staphylosine) est une protéase codée par le gène *lasA* dont la transcription est régulée par le *quorum sensing* et est secrétée par le système de sécrétion de type II. Cette protéase agit en synergie avec l'élastase (Las B) pour la dégradation de l'élastine (Kessler *et al.*, 1997). Et considérée comme un facteur de virulence important lors des infections oculaires à *Pseudomonas aeruginosa* (Estrellas *et al.*, 2000).

I.4.2.3. Les phospholipases C (PLC) :

Les PLC sont des enzymes extracellulaires thermolabiles dont l'activité majeure est l'hydrolyse de la phosphatidylcholine (Lazdunski *et al.*, 1990). Par ailleurs, certaines présentent une activité hémolytique (PlcN et PlcH) et jouent un rôle dans la mobilité de type « twitching » (PlcB) (Barker *et al.*, 2004). Egalement sécrétées par le système de sécrétion de type II, elles présentent différentes spécificités de substrats (Stonehouse *et al.*, 2002), très abondante dans le surfactant pulmonaire ce qui favorise la colonisation bactérienne des poumons (Kipnis *et al.*, 2006).

I.4.2.4. Les lectines solubles :

Les lectines de *P. aeruginosa* sont des protéines ubiquitaires d'origine non-immune, qui reconnaissent spécifiquement et de façon réversible les sucres sans les modifier. Elles permettent de lire le glycode à la surface des cellules. L'arsenal de *P. aeruginosa* est composé de deux lectines solubles PA-IL (gène *lecA*) et PA-III (gène *lecB*) ayant une spécificité respectivement pour le D-galactose et le L-fucose (Imberty *et al.*, 2006). Ces lectines, principalement intracellulaires, ont été également identifiées sur la membrane externe des bactéries et seraient impliquées dans la reconnaissance de l'hôte, la virulence mais aussi dans la formation ou la maturation du biofilm (Tielker *et al.*, 2005 ; Diggle *et al.*, 2006).

I.4.2.4.1. La lectine PA-IL

PA-IL pourrait également être impliqué dans la formation et la stabilisation du biofilm. Des analyses statiques d'épaisseur de biofilm sur du polystyrène ont montré une réduction d'épaisseur après délétion du gène *lecA* et une augmentation lorsque celui-ci est surexprimé dans les souches PAO-P47. En outre, un biofilm formé pouvait être dispersé par l'addition d'IPTG (Diggle *et al.*, 2006).

D'autres études ont mis en évidence l'importance de PA-IL dans l'adhérence de *P. aeruginosa* sur les cellules épithéliales intestinales de souris mais aussi dans la perméabilité des cellules permettant ainsi aux exoproduits cytotoxiques, tel que l'exotoxine A, de traverser la barrière épithéliale (Laughlin *et al.*, 2000). D'autres études ont démontré la participation d'interactions de type lectine dans le processus d'adhésion de *P. aeruginosa* NK 125 502 à la fibronectine immobilisée. L'adhésion de *P. aeruginosa* est fortement réduite en présence de l'acide sialique du N-acetylglucosamine (GlcNAc), et du N-acetylgalactosamine (GalNAc) et de façon moindre en présence de glucosamine, de galactosamine, du fructose, du mannose, et du galactose, confirmant la participation de dérivés de galactose en tant que composants importants pour l'adhérence bactérienne (Rebiere-Huet *et al.*, 2004).

I.4.2.4.2. La lectine PA-III

La lectine PA-III est produite sous le contrôle du « *quorum sensing* » (Winzer *et al.*, 2000 ; Schuster *et al.*, 2003 ; Wagner *et al.*, 2003). Des travaux récents ont montré que des souches mutantes ne produisant plus la lectine PA-III devenaient inaptes à former du biofilm (Tielker *et al.*, 2005). Ces travaux montrent de plus que la lectine se localise sur la paroi extracellulaire de la bactérie en s'associant aux glycoconjugués présents sur la surface de celle-ci (Tielker *et al.*,

2005). La lectine pourrait être impliquée dans la reconnaissance et l'adhésion bactérie-hôte, bactérie-bactérie ou encore bactérie-biofilm (figure n° 4).

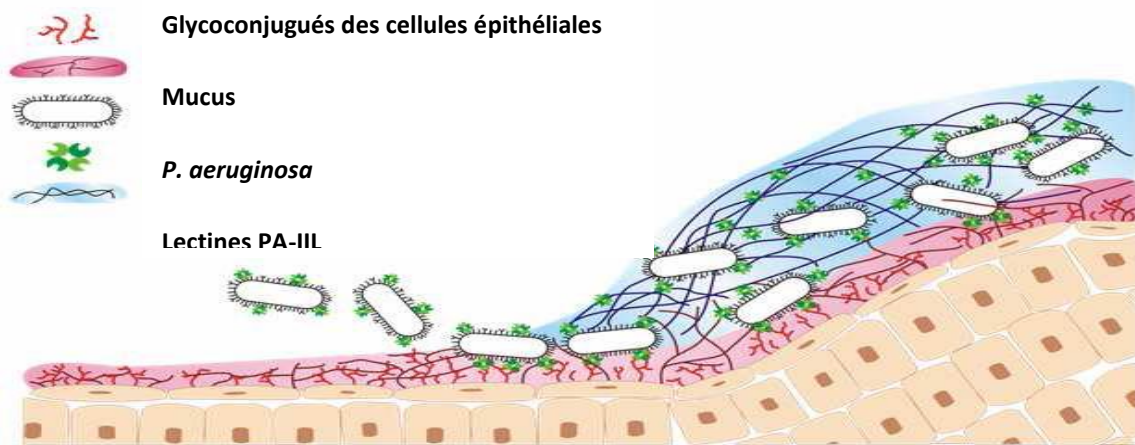


Figure n° 4: Les rôles possibles de la lectine PA-III durant l'infection (Imberty *et al.*, 2004).

I.4.2.5. Les toxines du SST3 :

Ce système est activé par le contact avec la cellule eucaryote cible, et dédié à l'injection de l'effecteurs directement du cytoplasme de la bactérie dans le cytosol de la cellule cible sans passage par le milieu extérieur. (Hueck, 1998 ; Shaver et Hauser, 2004 ; Vance *et al.*, 2005).

Lors d'infections aiguës, *P. aeruginosa* est considérée comme invasive et cytotoxique. Sa cytotoxicité est principalement due aux exotoxines transloquées par le SST3, qui participent à la dissémination de la bactérie dans l'organisme en perpétuant l'état lésé des cellules épithéliales (en inhibant la réparation des blessures cellulaires), ce qui entraîne une réaction inflammatoire forte 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 sécrète quatre exoenzymes à travers le système de sécrétion de type III : ExoY, ExoU, ExoT et ExoS. Ces quatre effecteurs requièrent un co facteur eucaryote pour être actifs (Engel et Balachandran, 2009).

La présence des gènes des toxines est différente selon les souches. 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.4.2.6. Pyoverdine :

La pyoverdine est un sidérophore important pour l'acquisition du fer dans le poumon et ainsi, favorise la croissance bactérienne. La ferri-pyoverdine (pyoverdine ayant capté du fer) présente dans le milieu extracellulaire est aussi un régulateur positif de la transcription d'autres facteurs de virulence. En fait, lors de la liaison de la ferri-pyoverdine à la protéine FpvA, située à la surface de la cellule bactérienne, il y a transmission d'un signal à la protéine FpvR. FpvR relâche donc les protéines PvdI et PvdS, leur permettant de se lier à l'ARN polymérase. L'ARN polymérase liée à PvdS est nécessaire pour la synthèse de la pyoverdine, de la protéase IV (endoprotéase PrlP) et de l'exotoxine A (Lamont *et al.*, 2002).

I.4.2.6. Pyocyanine :

La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par *P. aeruginosa* et impliqué dans de nombreux mécanismes de pathogénicité (Lau *et al.*, 2004). Elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte, induit l'apoptose des neutrophiles (Allen *et al.*, 2005) et induire une dysfonction des cellules épithéliales nasale chez les patients atteints de fibrose kystique (Ratledge et Dover, 2000).

Son importance dans la virulence de *P. aeruginosa* a été démontrée lors d'infections sur modèle animal (Lau *et al.*, 2004). Ses propriétés oxydoréductrices lui permettent d'oxyder la glutathione, d'inactiver la catalase des cellules épithéliales bronchiques et ainsi de participer aux lésions liées au stress oxydatif (O'Malley *et al.*, 2004).

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

La synthèse et la sécrétion de la plupart des facteurs de virulence décrits sont modulées en fonction du stade de croissance de la bactérie (phase exponentielle ou stationnaire), du mode de développement (planctonique ou biofilm) et des conditions environnementales dans lesquelles se trouve la bactérie.

P. aeruginosa adapte son expression protéique aux changements d'état et d'environnement par des nombreux systèmes de régulation à deux composants. Parmi ceux-ci le Quorum Sensing (QS).

I.5.1. Le Quorum Sensing chez *P. aeruginosa* :

Le Quorum Sensing est un système de communication dans une population bactérienne et de régulation primordial dans l'expression des facteurs de virulence, dans la formation du biofilm, et dans la persistance de la bactérie au niveau pulmonaire (Smith et Iglewski, 2003 ; Imamura *et al.*, 2005).

Chez *P. aeruginosa*, deux systèmes de QS basés sur les homosérines lactones ont été découverts, LasI/R et RhlI/R. LasI, appartenant à la famille des synthases de type LuxI, synthétise la 3-oxo-C12-HSL (*Pseudomonas* autoinducer 1: PAI1) qui se lie au régulateur LasR, homologue de LuxR (Gambello et Iglewski, 1991 ; Pearson *et al.*, 1994). Le couple LasR/PAI1 régule l'expression de nombreux gènes, dont notamment ceux correspondant à des facteurs de virulence comme LasA, LasB et l'exotoxine A. Par ailleurs, il régule positivement certains gènes impliqués dans l'appareil de sécrétion de type II, couplant ainsi l'expression et l'export de certaines toxines (Smith et Iglewski, 2003). La fixation de PAI1 sur LasR induit également une activation de *lasI* créant une boucle d'auto-induction (Seed *et al.*, 1995).

Le second système de régulation est codé par les gènes *rhlI* et *rhlR*. *RhlI* permet la synthèse de C4-HSL ou PAI2 (*Pseudomonas* autoinducer 2) (Ochsner *et* Reiser, 1995) qui se lie au régulateur RhlR. L'activation de ce dernier permet la régulation de nombreux gènes cibles comprenant l'opéron *rhlAB* qui active l'expression d'une série de gènes dont le gène de l'élastase B (*lasB*), de la protéase alcaline (*aprA*) et de la pyocyanine (*pyc*).

Ces deux systèmes interagissent, et il existe une hiérarchie dans cette interaction: LasI/R est requis pour l'induction de *rhlI/R* et certains promoteurs reconnus par RhlR peuvent aussi être reconnus par lasR (Fuqua et Greenberg, 2002). La transcription des gènes de virulence régulés par le QS peut être contrôlée exclusivement par un des autoinducteurs (le gène *LasA*, les gènes pour la production de pyocyanine) ou par les deux simultanément pour voir leur expression (l'opéron *xcp*). De plus, ces classes des gènes sont exprimées à des stades différents de

croissance bactérienne (Arevalo-Ferro *et al.*, 2003 ; Hentzer *et al.*, 2003 ; Schuster *et al.*, 2003 ; Wagner *et al.*, 2003 ; Wagner *et al.*, 2004).

Un troisième auto-inducteur chez *Pseudomonas aeruginosa* a été découvert en 1999 ; il s'agit du 2-heptyl-3-hydroxyquinolone ou PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal) qui appartient à la famille des 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQ) (Pesci *et al.*, 1999). La synthèse du PQS nécessite l'expression des protéines codées par les opérons *pqsABCDE*, *phnAB*, et *pqsH* (D'Argenio *et al.*, 2002 ; Gallagher *et al.*, 2002). La transcription de ces gènes nécessite la présence du régulateur PqsR (aussi nommé MvfR) (Gallagher *et al.*, 2002 ; Deziel *et al.*, 2005). Ce régulateur contrôle l'expression de nombreux gènes impliqué dans la virulence, incluant les élastases, les pyocyanines et la lectine LecA, et il affecte la formation de biofilm (Dubern et Diggle, 2008) et active aussi l'expression des opérons *phnAB*, et *pqsABCDE* (Deziel *et al.*, 2005).

En effet la synthèse du PQS est sous la dépendance des systèmes LasI/R et RhII/R qui contrôlent l'expression du gène *pqsR* (Wade *et al.*, 2005). Le complexe LasR-PAI1 a un effet positif sur la transcription de *pqsR* tandis que le couple RhIR-PAI2 a un effet négatif. L'expression de *PqsR* induit la production de PQS qui peut alors se lier à PqsR et facilite sa liaison au promoteur de l'opéron *pqsABCDE*. Cette boucle de rétroaction positive dans la production du PQS en fait un co-inducteur. Le complexe *pqsR*-PQS permet la transcription de *rhII*, formant cette fois une rétroaction négative. Cet effet n'est visible que chez les mutant *lasR* ce qui suggère que cela ce produit lorsque *lasR* n'est pas exprimé (Gallagher *et al.*, 2002).

Enfin, le rôle du facteur de transcription sigma alternatif RpoS, classiquement mis en jeu à l'entrée en phase stationnaire de croissance et lors de différents stress dont la chaleur, l'augmentation d'osmolarité, un pH bas ou la présence de peroxyde d'hydrogène. RpoS est activé par le complexe RhIR-C4-HSL et stimule en retour la transcription de *LasR* et de *rhIR* (Schuster *et al.*, 2004). RpoN est un autre facteur sigma alternatif semble être impliqué dans la régulation du QS. Ce régulateur est responsable de l'adaptation du métabolisme lors d'une carence en azote. Thompson *et al.* (2003) ont montré qu'une bactérie mutée dans le gène *rpoN* possède une transcription réduite de *rhII* ainsi qu'une production moins importante de C4-HSL et diminution de l'expression de certains systèmes contrôlé par le quorum sensing (production de pyocyanine, formation de biofilm) par rapport à la souche sauvage dans un milieu de culture pauvre en nutriments (Thompson *et al.*, 2003).

Le régulateur de réponse global GacA, appartenant au système à deux composants GasS/GasA. Ce système contrôle l'expression des trois gènes *lasR*, *rhIR* et *qscR* et la production de nombreux facteurs de virulence en fonction des signaux de l'environnement. Le circuit de

régulation dépendant de l'AMPc et de Vfr impliquent parallèlement que la régulation des gènes du QS est également sous la dépendance du statut énergétique et métabolique de la cellule (Bleves *et al.*, 2005).

Un autre régulateur, QscR, réprime l'expression des gènes QS dépendant en phase exponentielle de croissance (Chugani *et al.*, 2001) en formant des dimères avec LasR et RhlR (Ledgham *et al.*, 2003).

D'autres systèmes de régulation négatifs ont été observés, la protéine RsaL capable de se fixer sur le promoteur de *lasI* comme un compétiteur de complexe LasR-PAI1 (De Kievit *et al.*, 1999 ; Fagerlind *et al.*, 2003). Ce système de régulation intervient aussi dans la modification de la perméabilité des membranes bactériennes et à la sécrétion de lactonases capables de dégrader les AHLs (Köhler *et al.*, 2001 ; Fagerlind *et al.*, 2003 ; Aendekerk *et al.*, 2005).

CHAPITRE II

Résistance aux antibiotiques chez P. aeruginosa

II. Résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa* :

P. aeruginosa est caractérisé par sa grande capacité à acquérir de novo des mécanismes de résistance, en particulier suite à l'exposition à des traitements antibiotiques (résistances pouvant survenir en cours de traitement).

Les mécanismes de résistances de *P. aeruginosa* aux antibiotiques sont nombreux, et sont résumés comme suit :

II.1. Diminution de l'accumulation :

II.1.1. Efflux actif :

Se sont des systèmes membranaires polyspécifiques capables de transporter activement, du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur, des substrats très différents sur le plan de leur structure chimique. Les systèmes d'efflux actif s'opposent ainsi à l'accumulation des antibiotiques, limitant alors leur interaction avec des cibles le plus souvent intracellulaires. Ce phénomène engendre généralement une résistance croisée, de bas niveau, à plusieurs familles d'agents antibactériens (β -lactamines, Aminoglycosides, Fluoroquinolones) (Poole, 2004). Les systèmes d'efflux sont répartis en 5 familles en fonction de leurs similitudes de séquences en acides aminés et de l'énergie requise pour le transport. En effet, l'efflux de diverses molécules vers le milieu extracellulaire est un processus dynamique utilisant, soit l'hydrolyse de l'ATP, soit le gradient électrochimique membranaire par le biais d'un antiport. Ainsi, les transporteurs de la famille ABC (*ATP Binding Casette*) utilisent l'ATP comme source d'énergie, les transporteurs de la famille MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) utilisent un antiport d'ions Na^+ , les transporteurs des familles MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance) et RND (Resistance Nodulation cell Division) utilisent un antiport d'ions H^+ . Chez les bactéries à coloration de Gram négative, les systèmes de la famille RND jouent un rôle particulier dans la résistance aux antibiotiques (Poole, 2004 ; Poole, 2005).

Chez *Pseudomonas aeruginosa*, neufs pompes RND ont déjà été identifiées et caractérisées comme mécanisme de résistance des formes planctoniques (Li *et al.*, 2003 ; Schweizer, 2003 ; Mima *et al.*, 2005). Chaque système, caractérisé par sa spécificité de substrats [Tableau n° 1].

Tableau n° 1: Principaux systèmes d'efflux actif chez *P. aeruginosa*.

Systèmes d'efflux	Principaux antibiotiques substrats	Références
MexAB-OprM	β -L, Tet, Tig, FQ, Chl, Ery, Tmp, Sul, Nov, Fus...	(Li <i>et al.</i> , 1994 ; Li <i>et al.</i> , 1995 ; Masuda <i>et al.</i> , 2000)
MexCD-OprJ	Tet, Tig, FQ, Ery Chl, Fep, Caz, Cpm...	(Poole <i>et al.</i> , 1996 ; Masuda <i>et al.</i> , 2000)
MexEF-OprN	Tet, FQ, Chl, Ery, Tmp...	(Köhler <i>et al.</i> , 1997;
MexJK/OprM	Tet, Ery	(Chuanchuen <i>et al.</i> , 2002)
MexGHI-OmpD	Tet, FQ	(Aendekerk <i>et al.</i> , 2002 ; Sekiya <i>et al.</i> , 2003)
MexMN/OprM	Chl	(Mima <i>et al.</i> , 2005)
MexPQ-OmpE	FQ, Ery	(Mima <i>et al.</i> , 2005)
MexXY/OprM	Tet, FQ, AG, Fep, Ery, Tig	(Aires <i>et al.</i> , 1999 ; Mine <i>et al.</i> , 1999 ; Westbrook-Wadman <i>et al.</i> , 1999 ; Masuda <i>et al.</i> , 2000 ; Dean <i>et al.</i> , 2003)
MexVW/ OprM	FQ, Ery, Tet, Chl	(Li <i>et al.</i> , 2003)

β -L, β -lactamines (sauf imipénème); Tet, Tétracycline ; Tig, Tigécycline ; FQ, Fluoroquinolones ; Chl, Chloramphénicol ; Ery, Erythromycine Tmp, Triméthoprime ; Sul, Sulfamides ; Nov, Novobiocine Fus, Acide fusidique ; Fep, Céfépime Caz, Ceftazidime ; Cpm, Cefpirome ; AG, Aminosides.

II.1.2. Altération des porines :

La diminution de l'accumulation peut résulter de la perte des porines qui sont le moyen nécessaire pour les quelles les antibiotiques franchit la membrane externe et atteints leurs cibles situées au niveau de la membrane interne (Nikaido, 2003).

Chez *P. aeruginosa*, La protéine OprF est la porine majeure non spécifique permettant la diffusion lente de divers solutés. La porine OprD1 permet la diffusion du glucose et de ses analogues structuraux ainsi qu'une diffusion relativement faible de l'imipénème. Par ailleurs, la porine OprD2 assure la diffusion d'acides aminés basiques et des carbapénèmes tels que l'imipénème et le mérépénème (Trias et Nikaido, 1990 ; Trias et Nikaido, 1990).

Les travaux de Zhanel *et al.* (1995) visant à comparer des mutants résistants à la ciprofloxacine obtenus *in vitro* avec la souche de départ révèlent des modifications dans les

protéines constituant la membrane externe. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine OprF a permis de mettre en évidence la perte de cette porine chez les bactéries résistantes.

D'autres travaux réalisés sur la porine OprD2 montre que l'absence ou le dysfonctionnement suite à de substitutions d'acides aminés de cette porine entraîne chez *P. aeruginosa* une résistance sélective aux carbapénèmes (Pai *et al.*, 2001 ; Evans et Segal, 2007 ; Giske *et al.*, 2008). Ce type de phénomène semble très fréquent chez les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose (Mérens *et al.*, 2009).

II.1.3. Modification des lipopolysaccharides membranaires (LPS) :

II.1.3.1. Résistance à la colistine :

La colistine, antibiotique appartenant à la famille des polymyxines, est un polypeptide cyclique, cationique, ciblant les membranes bactériennes. Bien qu'ayant une activité intrinsèque intéressante vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, cet antibiotique franchit la membrane externe puis s'insère dans la membrane cytoplasmique créant une fuite des composés cellulaires et un arrêt de la respiration cellulaire fatal pour la bactérie (Falagas et Kasiakou, 2005).

Depuis quelques années, on observe l'émergence de rares clones hautement résistants à cet antibiotique (CMI supérieure à 50 mg/L comparativement à la souche PAO1 pour laquelle la CMI est de 3mg/L) (Johansen *et al.*, 2008). Chez les isolats CF de *P. aeruginosa*, on trouve que cette résistance à la colistine, résulte d'une modification des LPS (Johansen *et al.*, 2008).

II.1.3.2. Résistance aux fluoroquinolones :

L'analyse de mutants résistants de *P. aeruginosa* obtenu par culture sur ciprofloxacine a révélé des modifications dans la composition de leur membrane externe notamment des altérations des LPS (Legakis *et al.*, 1989). Par ailleurs, la fixation sur les molécules de LPS de résidus 4-amino-arabinose, lors de la croissance en présence des polyamines (spermidine, putrescine...) peut conférer à *P. aeruginosa* une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones (CMI augmentées d'un facteur 2 à 8) (Kwon et Lu, 2006).

II.1.3.3. Résistance aux aminosides :

Ce mécanisme peut être aussi à l'origine d'une résistance de bas niveau aux aminosides. En effet, chez les mutants FE49, dérivant de la souche PAO1, les molécules de LPS sont privées de leur partie polysaccharidique et d'une partie du core ce qui tend à diminuer les charges électro-négatives avec lesquelles les aminosides interagissent pour franchir la membrane externe

(El'Garch *et al.*, 2007). Il en résulte alors une augmentation du niveau de résistance aux aminosides d'un facteur de 2 comparativement à la souche PAO1 (El'Garch *et al.*, 2007).

II.2. Enzyme inactivants :

II.2.1. β -lactamases :

Les β -lactamases dites a spectre élargi (BLSE), qui confèrent une résistance a toutes les β -lactames antipseudomonale sauf les carbapénèmes, et les carbapénémases sont maintenant repandues (Aubron *et al.*, 2005 ; Masterton *et al.*, 2006).

A. La céphalosporinase *AmpC*

Presque la totalité des souches de *P. aeruginosa* synthétise une céphalosporinase de classe I nommée AmpC, codé par un gène chromosomique dont l'expression est inductible. La production de cette enzyme contribue fortement à la résistance naturelle de la bactérie à l'ampicilline, à l'amoxicilline, aux céphalosporines de première et de deuxième génération (C1G et C2G), ainsi qu'au céfotaxime et à la ceftriaxone (Livermore, 1995). La surproduction de cette enzyme est remarqués surtout chez les souches isolées dans des situations où la pression de sélection antibiotique est forte comme par exemple chez les patients de réanimation ou ceux atteints de mucoviscidose (Livermore, 1995 ; Bert et Lambert-Zechovsky, 1996).

B. Oxacillinase

Cette enzyme nommée PoxB ou encore Oxa-50 codée par un gène chromosomique a aussi bien été détectée chez des souches environnementales que chez des isolats cliniques CF et non-CF ; elle confère à *P. aeruginosa* une résistance très modeste au méropénème et autre pénèmes (Girlich *et al.*, 2004 ; Kong *et al.*, 2005).

C. Pénicillinase

De très nombreuses pénicillinases ont été identifiées chez *P. aeruginosa*, dont le déterminant génétique peut être porté par un plasmide ou un élément transposable de localisation chromosomique. Les souches productrices de cette enzyme sont résistantes à la ticarcilline, à un moindre niveau à la pipéracilline, et de manière variable selon le type de pénicillinase et le niveau de production, à la cefsulodine, au céfépime et à la cefpirome. La ceftazidime, l'imipénème et à moindre titre l'aztréonam restent actifs (Livermore, 2002).

II.2.2. Enzymes modifiant les aminoglycosides :

De par leur spectre d'activité étendu et leur caractère rapidement bactéricide, les aminosides (aminoglycosides) occupent une place importante dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*, chroniques ou aiguës. Chimiquement, les aminosides sont des polycations

hydrophiles composés, dans la majorité des cas, de plusieurs cycles glycosidiques et d'un cycle aminocyclitol (2-déoxystreptamine) (Magnet et Blanchard, 2005). Leur action antibactérienne, cible essentiellement le ribosome, où la liaison irréversible de certaines aminosides avec la sous-unité 30S perturbe la reconnaissance codon-anticodon et conduit à la production de peptides aberrants non fonctionnels (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999).

Les aminosides se fixent sur le ribosome par leurs fonctions –OH et –NH₂. La modification enzymatique de certaines de ces fonctions par la bactérie peut donc réduire fortement l'affinité de l'antibiotique pour sa cible, créant un état d'insensibilité. Chez *P. aeruginosa*, trois catégories d'enzymes modificatrices ont été décrites.

Les amino-acétyl-transférases (AAC) qui neutralisent par une réaction d'acétylation les fonctions –NH₂

Les phospho-transférases (APH) qui catalysent les réactions de phosphorylation.

Les nucléotidyl-transférases (ANT) qui neutralisent par une réaction de nucléotidylation les fonctions –OH

Etant donné que ces enzymes sont stéréo-spécifiques et que la nature et la localisation des fonctions modifiables varient d'un aminoside à l'autre. S'il y a des enzymes produites naturellement par les espèces comme le cas de la résistance à la Kanamycine et à la néomycine (APH(3')IIb), les autres aminoglycosides sont acquises de façon aléatoire via des éléments génétiques (plasmides, transposons). Elles confèrent aux souches une résistance de haut niveau à plusieurs aminosides (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999 ; Zeng *et al.*, 2003 ; Henrichfreise *et al.*, 2007).

II.3. Modification de la cible :

II.3.1. Mutations :

Des mutations dans les *Quinolone Résistance-Determining Region* (QRDR) des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et/ou *parE* affectent la liaison des fluoroquinolones sur cibles (Yoshida *et al.*, 1990). Chez les souches cliniques résistantes de *P. aeruginosa*. L'altération des QRDR des sous-unités GyrB et ParC est peu fréquente (Hooper, 2001). Elle conduit à la résistance modérée aux fluoroquinolones (CMI de ciprofloxacine égale à 2mg/L comparativement à la CMI de PAO1, 0,125 mg/L) (Mouneimne *et al.*, 1999 ; Akasaka *et al.*, 2001). Plus communes, les situations dans le gène *gyrA* sont responsables d'une augmentation plus forte des CMI de 1 à 64 mg/L (Akasaka *et al.*, 2001). Celles dans *parC* sont rares (Jalal et Wretling, 1998), toutefois l'association de mutations dans *gyrA* et *parC* conduit à de très hauts niveaux de résistance (CMI

128 mg/L) (Akasaka *et al.*, 2001). Chez les souches isolées des patients atteints de mucoviscidose, les mutations affectent essentiellement la sous-unité GyrA (Thr83→Ile et Asp87→Asn) et sont associées à des niveaux de résistance à la ciprofloxaciline allant de 2 à 8 mg/L (Jalal *et al.*, 2000).

II.3.2. Méthylation de l'ARN 16S :

La Méthylation ribosomale, un mécanisme de protection développé par les organismes producteurs d'aminosides chez les actinomycètes, elle s'effectue sur le résidu G en position 1404 de l'ARN16S au niveau de site A (Galimand *et al.*, 2003). Décrit dans un premier temps chez les entérobactéries (Galimand *et al.*, 2003). La méthylation de l'ARN16S est un mécanisme qui confère à *Pseudomonas aeruginosa* une résistance à toutes les 2-desoxystreptamine bisubstituées en 4,6 mais qui n'affecte pas l'activité de néomycine (Yokoyama *et al.*, 2003). A ce jour, plusieurs gènes codant des méthylases de ce type ont été identifiés chez *P. aeruginosa*. Le premier cas de résistance par méthylation de l'ARN16S a été décrit chez des souches cliniques isolées au Japon. Ces souches notamment résistantes à la tobramycine, l'amikacine, la gentamicine et à l'arbécacine possèdent un gène *rmtA* codant une méthylase homologue à celle produite par les actinomycètes. Il semble que le gène *rmtA*, porté par un transposon situé sur un plasmide conjugatif, ait diffusé à partir des actinomycètes (Yokoyama *et al.*, 2003).

II.4. Résistance aux antibiotiques inhérente au mode vie en biofilm :

Ce mode de vie est d'un grand intérêt pour la bactérie puisqu'il lui confère une résistance à différentes sources de stress (exposition aux UV, dessiccation, modification du pH, phagocytose) ainsi qu'à différentes classes d'antibiotiques tels que les aminosides, les β -lactamines et les fluoroquinolones (Costerton *et al.*, 1999 ; Drenkard, 2003).

II.4.1. Présentation :

Un biofilm est une communauté hétérogène de bactéries agrégées en microcolonies, entourées par une matrice adhérentes à une surface inerte ou biologique (Drenkard *et al.*, 2003). Cette structure représente le mode de vie normal d'une bactérie (Klinger *et al.*, 2005). On s'accorde aujourd'hui pour affirmer que plus de 90% de l'activité microbiologique dans un écosystème (environnement aquatique, sol, corps humain,..) provient en majeure partie d'une flore sédentaire adhérent aux surfaces dans une structure de type biofilm. La présence de biofilms est de plus en plus souvent identifiée comme la source récurrente de problèmes à la fois de santé publique, industriels et sociétaux.

Ces biofilms sont ainsi impliqués dans plus de la moitié des infections bactériennes chez l'homme et dans la grande majorité des infections nosocomiales. Ils sont en particulier directement responsables de toutes les infections prothétiques. *P. aeruginosa* est la bactérie à Gram négatif la plus fréquemment rencontrée dans les infections prothétiques, les biofilms à *P. aeruginosa* sont responsables des bronchites chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose.

II.4.2. Formation de biofilm :

La formation et le développement d'un biofilm nécessite plusieurs étapes et dépend de signaux environnementaux et bactériens

- Une phase d'attachement initial de la bactérie sur un support solide. Cette fixation, polaire et réversible, fait intervenir les flagelles, les fimbriae et les pili de type IV.
- Une phase d'adhésion irréversible avec une perte de flagelle et synthèse d'une matrice exopolysaccharidique. A ce stade, la structure est monocouche.
- Une 1^{ère} phase de maturation durant laquelle on observe une stratification de la structure grâce à la production d'adhésines permettant des interactions cellules/cellules.
- Une seconde phase de maturation dans laquelle le biofilm adopte une structure complexe en forme de champignon.
- Enfin, lorsque la source de carbone diminue, les bactéries présentes à la surface de la structure vont se disperser. Cette étape, qui est rendue possible grâce à la production de nouveaux flagelles, permet aux bactéries de coloniser d'autre milieux (Sauer *et al.*, 2004).

A chacune de ces étapes correspond l'expression de phénotypes particuliers, différant entre eux par l'expression d'au moins 500 protéines.

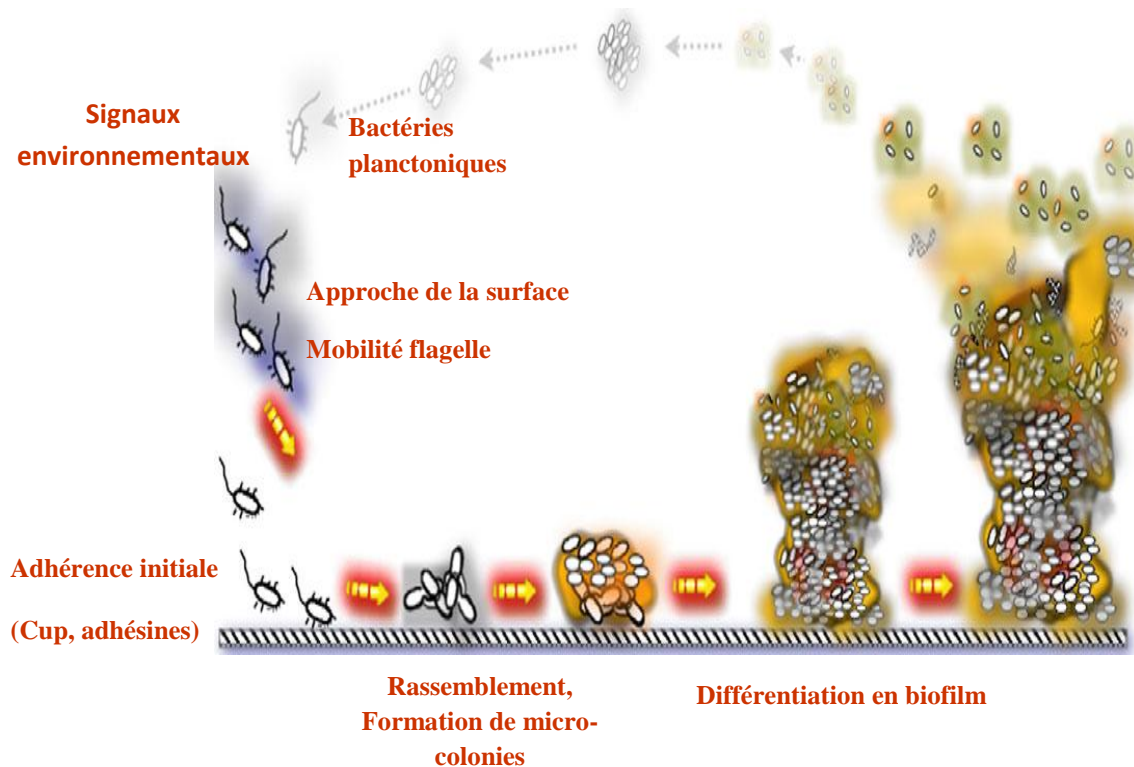


Figure n° 5: Modèle de formation d'un biofilm par *P. aeruginosa* (Costerton *et al.*, 1999 ; Klinger *et al.*, 2005).

II.4.3. Mécanisme de résistance aux antibiotiques dans un biofilm :

Ces résistances sont dues à différents mécanismes aussi bien physiologiques que génétiques. La matrice exopolysaccharidique retrouvée dans la structure du biofilm constitue une véritable barrière limitant, à la fois, la diffusion de l'oxygène et des nutriments mais, également, la diffusion des antibiotiques (Walters *et al.*, 2003). Lorsque le biofilm atteint la seconde phase de maturation, il forme des structures complexes au sein desquelles les quantités de nutriments et d'oxygène peuvent varier. Un modèle artificiel de biofilm, réalisé dans des tubes capillaires, a pu mettre en évidence que l'oxygène ne diffuse que dans la partie superficielle du biofilm (Werner *et al.*, 2004). Créant alors un gradient d'oxygène. Les cellules situées en surface s'orienteront vers un métabolisme aérobie et seront en phase "active" de croissance alors que les bactéries situées en profondeur mèneront un métabolisme anaérobie. Par ailleurs, la diffusion limitée des nutriments dans les zones plus profondes du biofilm entraîne un ralentissement de la croissance comme celui observé au cours de la phase stationnaire (Walters *et al.*, 2003).

En plus, la matrice exopolysaccharidique s'oppose également à la pénétration des antibiotiques. La nature anionique de cette matrice séquestrerait les antibiotiques chargés

positivement tels que les aminosides, limitant leur pénétration et leur diffusion et diminuant leur pouvoir bactéricide (Govan et Deretic, 1996 ; Shigeta *et al.*, 1997 ; Walters *et al.*, 2003). Pendant la pénétration, les antibiotiques n'exercent leur activité que sur une zone située en surface de la structure, et au niveau de laquelle il y a de l'oxygène (Walters *et al.*, 2003). La résistance aux antibiotiques pourrait donc s'expliquer par une diffusion limitée au sein de la biomasse et par le mode de vie qu'impose le biofilm, à savoir une croissance lente et un métabolisme microaérophile, voire anaérobie, notamment au centre de la structure où la tension en oxygène est très faible (Walters *et al.*, 2003 ; Borriello *et al.*, 2004).

Une nouvelle explication a été avancée avec l'identification du gène *ndvB* (Mah *et al.*, 2003). Ce gène, uniquement exprimé chez les bactéries vivant sous forme de biofilm, code une glycosyl-transférase impliquée dans la production de polymères cycliques de glucose (β -(1,3)-glucanes cycliques). Accumulés dans l'espace périplasmique ou libérés dans le milieu extracellulaire, ces glycanes cycliques limitent la pénétration intracellulaire des molécules d'antibiotiques en la séquestrant. A l'inverse, le biofilm formé par un mutant *ndvB*⁻ devient 8 à 16 fois plus sensible à la tobramycine et à la gentamicine que celui formé par la souche parentale (Mah *et al.*, 2003).

En ce qui concerne les mécanismes génétiques, ils sont souvent liés à un phénomène de changement d'expression des gènes. (Mah *et al.*, 2003). L'analyse transcriptomique révèle tout d'abord, une modification de l'expression de certains gènes impliqués dans la résistance aux aminosides via des mécanismes d'imperméabilité membranaire comme, par exemple, celui médié par le gène *tolA*. La surexpression de *tolA* affecte la structure des LPS et provoque une diminution de l'affinité des aminosides pour la membrane externe (Whiteley *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'expression réduite des gènes codant les sous-unités de cytochrome *c* oxydase, accepteur terminal d'électrons dans le métabolisme aérobie, tend à réduire le transport actif des aminosides à travers la membrane cytoplasmique (Taber *et al.*, 1987 ; Whiteley *et al.*, 2001). Des mécanismes de régulation globale peuvent être activés ou réprimés lorsque la bactérie vit en biofilm. Ainsi, un mutant invalidé dans le gène *rpoS* produit d'avantage de biofilm et résiste d'avantage à l'effet bactéricide de la tobramycine comparativement à la souche sauvage parentale PAO1. Confirmant cette observation, l'analyse par microarray met en évidence que le gène *rpoS* est sous-exprimé lors de la croissance en biofilm (Whiteley *et al.*, 2001).

Enfin, Whiteley *et al.* ont indiqué que l'expression de certains gènes chez des bactéries se développant sous forme de biofilm pouvait varier suite à une exposition à la tobramycine (Whiteley *et al.*, 2001).

II.4.4. Le lien entre Quorum Sensing, biofilm et infection à *P. aeruginosa* :

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

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

Les auteurs ont observé que l'expression de *lasI* est plus importante dans les étapes de maturation du biofilm. Le mutant *lasI* présente une matrice exopolysaccharidique nettement différente de celle observée chez la souche sauvage: EPS essentiellement en surface des cellules, ne remplissant pas les espaces interstitiels du biofilm.

L'étude récente de Davey *et al.* (2003) confirme et apporte des explications à ces observations. Elle semble démontrer que la différenciation du biofilm en une forme mature "vascularisée" grâce à la formation de canaux aqueux serait due à la sécrétion de rhamnolipide (biosurfactant) par *P. aeruginosa*. Le rhamnolipide ne serait pas nécessaire à la formation de canaux, en revanche il empêcherait la colonisation de ces canaux par les cellules en phase planctonique et pourrait avoir un rôle dans le détachement de micro-colonies du biofilm. L'expression du gène codant pour le rhamnolipide étant régulée par les systèmes RhII-RhIR et LasI-LasR, ces observations permettent d'expliquer les études précédentes (Espinosa-Urgel, 2003).

II.4.5. Rôle de signalisation de QS dans la résistance de biofilm aux antibiotiques :

Une étude réalisée sur le biofilm de *P. aeruginosa* révèle que le blocage de la signalisation QS permettrait de réduire la formation de biofilm et de diminuer la résistance de *P. aeruginosa* à la tobramycine. Cela permettrait également de rendre *P. aeruginosa* plus sensible au peroxyde d'hydrogène et à la phagocytose par les leucocytes polynucléaires (PMN) (Bjarnsholt *et al.*, 2004).

Pour réaliser cette étude, une souche sauvage, et des souches mutées de *P. aeruginosa* lasR rhlR, déficientes en signalisation QS, ont été utilisées. Tout d'abord, ces souches ont été chacune inoculées dans un biofilm et ceux-ci ont été soumis à différentes concentrations de tobramycine. Dans le cas de la souche mutante, le biofilm a presque été éliminé alors que celui de la souche sauvage n'a pas vraiment été affecté. Des travaux antérieurs avaient montré des résultats similaires, mais avec l'utilisation d'inhibiteurs de QS (C-30 et C-56) sur des souches de *P. aeruginosa* non mutées (Hentzer *et al.*, 2003). Bjarnsholt *et al.* (2004) ont également démontré l'augmentation de sensibilité du biofilm au peroxyde d'hydrogène chez les souches déficientes en signalisation QS.

P. aeruginosa semblant interférer avec le système immunitaire de l'hôte via le QS, l'activité des poly-MorphoNucléaires neutrophiles (PMN) a été testée chez le mutant lasR rhlR en comparaison avec la souche sauvage, chez la souche mutante les PMN pénètrent dans le biofilm et éliminent une partie des bactéries. Chez la souche sauvage le biofilm reste intact. Le biofilm sauvage ne permet pas l'activation des PMN contrairement au biofilm mutant. Un test similaire mais avec l'inhibiteur de QS C-30 sur un biofilm de souche sauvage a montré les mêmes résultats qu'avec la souche mutée.

Des expériences supplémentaires ont permis de montrer que les molécules signal 3OC12-HSL et C4-HSL étaient directement impliquées dans le blocage des PMN.

Des souris ont également été utilisées afin de voir plus globalement l'effet entre une souche de *P. aeruginosa* sauvage et une souche mutée. La mortalité est moins élevée chez les souris inoculées par la souche mutée, et les bactéries sont plus rapidement éliminées. Des coupes histologiques de poumon ont également montré une inflammation plus élevée chez les souris inoculées par la souche mutée.

Cette étude montre que *P. aeruginosa* utilise la signalisation QS pour former un biofilm et manipuler la réponse immunitaire de l'hôte. L'utilisation d'inhibiteur de QS permet de rendre le biofilm de *P. aeruginosa* plus sensible aux antibiotiques tels que la tobramycine.

CHAPITRE III

Description et caractéristique des plantes étudiées

III. Description et caractéristique des plantes étudiées :

III.1. Aloès (*ALOE VERA*) :

III.1.1. Taxonomie :

Son nom est dérivé du mot arabe «alloeh» qui signifie «amer», correspondant au goût du liquide contenu dans les feuilles (Dagne *et al.*, 2000). Sa taxonomie est configurée dans l'hierarchie suivante :

Règne :	Plantae
Sous-règne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Liliopsida
Sous-classe :	Lilidae
Ordre :	Asparagales
Famille :	Asphodelaceae
Genre :	<i>Aloe</i>
Espèce :	<i>Aloe vera</i> (Adams <i>et al.</i> , 2000).

III.1.2. Aspect botanique :

L'*Aloe vera* ressemblant à un cactus qui pousse dans les climats chauds et secs. C'est une plante arborescente d'environ 80cm de haut, les feuilles sont épaisses et charnues, les tiges soutenant principalement les fleurs (Van Wyk et Gericke, 2000).

La plante présente un intérêt économique remarquable parce qu'elle rapporte deux produits qui apprécient l'application répandue dans les industries alimentaire, cosmétiques et médicales (Van Wyk et Wink 2004; Wynn, 2005).

III.1.3. Répartition géographique :

La plante d'*Aloe vera* est originaire de l'Afrique du Nord. Actuellement, elle est largement distribuée en Afrique méridionale et orientale (Dagne *et al.*, 2000). Internationalement, la plante est intensivement cultivée commercialement en Amérique Centrale, les Etats-Unis et le Texas méridionaux (Van Wyk et Wink, 2004).

III.1.4. Composition phyto-chimique :

Différents composants ont été isolés à partir du tissu central de parenchyme des feuilles (Gel) et dans l'exsudat qui s'écoule à côté des paquets vasculaires. Chez l'*Aloe vera*, l'eau constitue plus de 99% avec un pH voisin à celui de la peau normale chez l'homme (Vazquez *et al.*, 1996).

III.1.4.1. Composition chimique d'exsudat d'*Aloe vera* :

L'écorce verte externe de la feuille d'*Aloe vera* contient l'exsudat jaune amer, ce dernier renferme plusieurs composants parmi lesquels on cite :

III.1.4.1.1. L'antraquinones:

Elles agissent en tant que laxatifs naturels, antidouleur, analgésiques, auraient une action purgative, anti-inflammatoire, antiparasitaire et antioxydant. Ainsi qu'elles augmentent la motricité digestive et sont utilisées pour traiter la constipation (Reynolds, 2004).

Parmi les anthraquinones libres existant dans l'*Aloe vera* on trouve :

- L'Aloïne

Le constituant principal de l'*Aloe vera* est connu aussi sous les noms de Barbaloïne, Auraloïne ou Curacaloïne. L'Aloïne est un produit commercialisé, utilisé sous une forme brute non purifiée, a une composition très différente selon les producteurs (Josias et Humman, 2008).

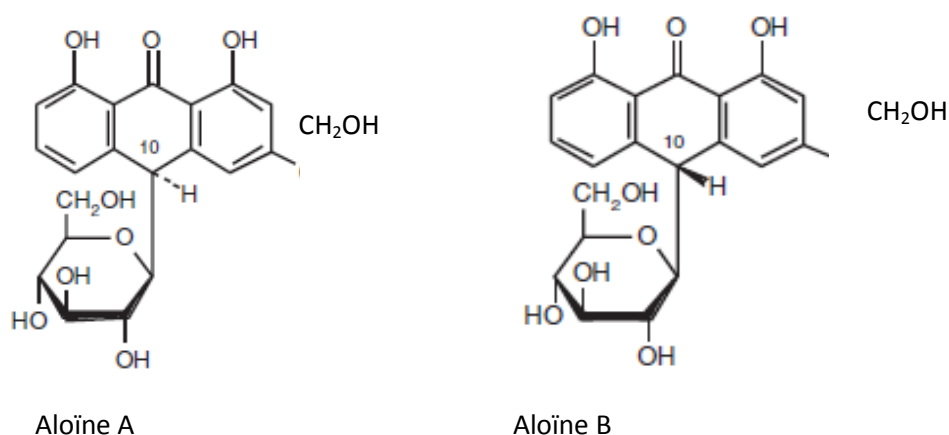


Figure n° 6: Structure chimique d'Aloïne (Josias et Humman, 2008).

- L'Aloe- emodine

L'Aloe-emodine (ou aloe-emodin-9-anthrone) est un hydroxy-anthraquinone trouvé dans l'Aloes, comme dans les feuilles et les racines d'autres plantes, habituellement en combinaison avec ses glycosides ou sous une forme réduite par anthrones. Il est formé par une oxydation de la Barbaloïne, a également montré des effets anti-tumoraux (empêche la prolifération endothéliale de cellules et empêche également la prolifération de cellules tumorales) (Pecere *et al.*, 2000).

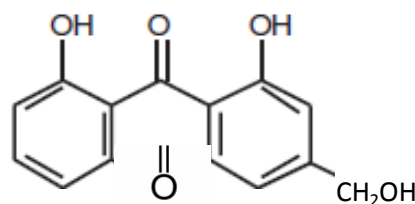


Figure n° 7: Structure chimique d'Aloe-emodine (Josias et Humman, 2008).

- Autres anthraquinones

L'isoaléoérésine D et l'aloérésine E, ont été récemment isolés dans l'*Aloe barbadensis* (*Aloe vera*), leur concentration est plus importante dans la feuille et diminue avec l'âge de la feuille.

En plus l'acide Aloétique, l'antranol, les esters d'acide cinnamique (dérivés de la cannelle), acide chrysophanique, ulcine d'aloès, ces composés phénoliques sont jusqu'à 3 fois plus importants dans la couche épidermique de la feuille que le gel (Mijatovic *et al.*, 2005).

III.1.4.1.2. Anthrone :

Plusieurs anthrones sont trouvés dans l'espèce d'*Aloe vera*, parmi les quels : Le 7-hydroxyaloin A et B (Isobarbaloine A et B), 10-hydroxyaloin A et B (Josias et Humman, 2008).

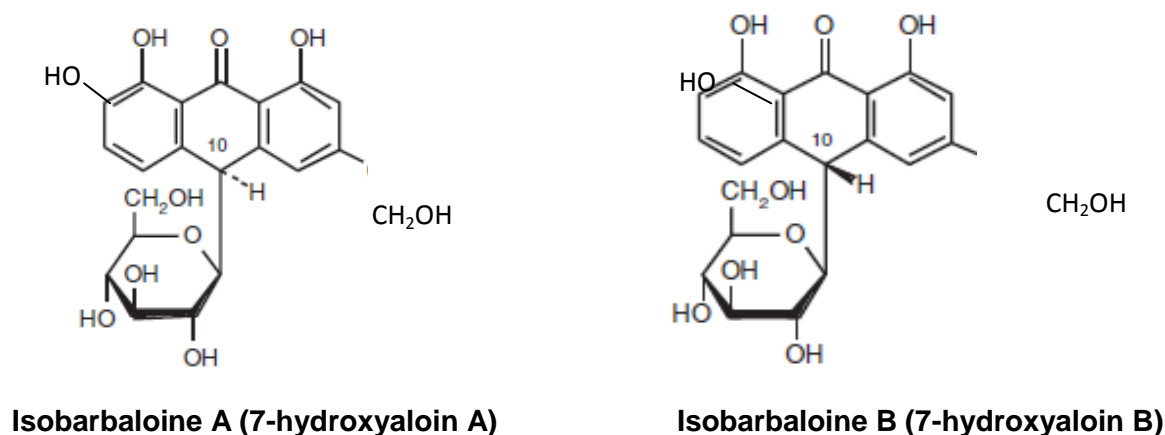


Figure n° 8: Structure chimique d'Isobarbaloin (Josias et Humman, 2008).

III.1.4.1.3. Chromones :

La plupart des chromones décrits dans l'exudat des feuilles d'Aloes sont des dérivés de 8-C-glucosyl-7-hydroxy-5-méthyle-2-propyl-4-chromone, la variation résulte du degré d'oxydation dans la chaîne latérale propylique, une méthylation du groupe d'hydroxyle sur C7 et une estérification de la partie de glucose.

III.1.4.2. Composition chimique du gel d'*Aloe vera* :

Le gel d'*Aloe vera* (le tissu de parenchyme ou la pulpe) est sans couleur, composé d'un mucilage clair se trouvant au cœur des grosses feuilles, a des propriétés fortement émoullientes et constitue une substance largement utilisée en cosmétologie et en dermatologie.

III.1.4.2.1. Composition en glucides :

Une analyse globale d'hydrate de carbone a prouvé que le gel d'*Aloe vera* contient à la fois des monosaccharides, tels que le glucose et le fructose et des polysaccharides, dont les principaux sont :

Les pectines, hemicelluloses, glucomannan, acemannan et mannose (Femenia *et al.*, 1999 ; Choi et Chung, 2003), en plus, des polysaccharides présente par des petites quantités comme le cas de l'aloeride, le polyuronide et l'aloeferon (Ni et Tizard, 2004).

III.1.4.2.2. Les glycoprotéines :

La fraction de glycoprotéine d'*Aloe vera* a un poids moléculaire de 29 KDa, elle est composée de deux sous-unités où chaque fraction active est composée de 82% protéine et 11% d'hydrate de carbone. Ce composé favorise la multiplication des cellules (fibroblastes, kératinocytes) avec augmentation de la vitesse de la cicatrisation de la peau (Moreira et Filho, 2008).

III.1.4.2.3. Les polypeptides :

Chez l'*Aloe vera*, 12 polypeptides ont été déterminée par l'électrophorèse avec des poids moléculaires varié entre 46-78 kDa, où le gel a rapporté 2,9% de protéine (Talmadge *et al.*, 2004).

III.1.4.2.4. Stérols et stéroïdes :

Les stérols comme le cholestérol, lupeol, béta-sitostérol sont des agents anti-inflammatoires importants. Ces substances ont des vertus antiseptiques, analgésiques et aussi des vertus antidouleurs similaires à l'aspérine (Wittiam et Hopkins, 2003).

III.1.4.2.5. Lipides :

L'extrait entier d'*Aloe vera* a rapporté 0,7% de lipide non polaire, dont les composants principaux étaient le stigmastérol et son stéarate, avec peu de quantités de l'oléate méthylique, la trioléine et l'acide oléique.

Les lipides polaires (0,9%) contiennent principalement l'acide phosphatidique, avec certaine diglycéride, la phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine (Esua et Rauwald, 2006).

III.1.4.2.6. L'acide salicylique :

L'acide salicylique (SA) (précurseur de l'aspirine) est synthétisé dans la plante en réponse à l'attaque de divers pathogènes et constitue un élément clef pour l'établissement de la résistance locale et la SAR (systemic acquired resistance) (Loake et Grant, 2007). Il est impliqué dans plusieurs réponses aux stress biotiques (infection par les pathogènes) et abiotiques (excès de radiation UV, des niveaux d'ozone accrus)

III.1.4.2.7. Autre substances :

En plus de ces composés, l'*Aloe vera* contient des vitamines comme la vitamine A, B, B12, C, E, β -carotène, choline et acide folique (Yagi *et al.*, 1997). Les enzymes dont les

principaux sont: les Peroxydases, Aliases, Catalases, Lipases, Cellulases, Amylases et Phosphatases Alcalines. Les sels Minéraux comme le calcium, magnésium, potassium, sodium, aluminium, fer et zinc. Les Acides aminés. La lignine. Saponines. Gibbérilline et auxine (Yagi *et al.*, 1997) et les tanins (Wittiam et Hopkins, 2003).

III.1.5. Utilisation :

Les feuilles surtout, car elles constituent un tissu de réserve qui contient un exsudat important appelé: le jus d'Aloès. Ce jus d'Aloès comprend en réalité deux substances : le suc d'Aloès et le gel d'Aloès (Bruneton, 1993).

L'utilisation de gel d'*Aloe vera* est largement répandue dans l'industrie de produits cosmétiques où elle est employée pour ses propriétés curatives de blessure, de brûlure (van Wyk et Gericke, 2000) et également comme un ingrédient dans l'industrie des boissons et d'autres produits alimentaire (van Wyk et Wink, 2004). D'autres activités biologiques incluent les anti-inflammatoire, antiulcer, antidiabète et propriétés d'antihypertensif, perfectionnement d'immunité, fonction de foie et prévention améliorées d'asthme (Reynolds et Dweck, 1999 ; Langmead *et al.*, 2004). L'activité biologique d'*Aloe vera* a été attribuée à différents composants qui incluent l'aloin, polysaccharides complexes, sucres, pectines, composés minéral et glycoprotéines (van Wyk et Wink, 2004 ; Wynn, 2005).

III.1.6. Effets antibactériens :

Une étude comparative des activités antimicrobiennes du gel et de la feuille d'*Aloe vera* ont été examinées. Le résultat a prouvé que le gel et la feuille ont empêché la croissance de *Staphylococcus aureus*. Seulement le gel a empêché la croissance des *Trichophyton mentagrophytes*, alors que la feuille possède des effets inhibiteurs sur *Pseudomonas aeruginosa* et les *Candida albicans* (Agarry *et al.*, 2005).

Les extraits d'éthanol, de méthanol et d'acétone du gel d'*Aloe vera* ont été étudiés pour leur activité antimicrobienne contre quatre bactéries à coloration de gram positive (*Staphylococcus aureus* (MTCC 2943), *Streptococcus pyogenes* (MTCC 442), *Bacillus subtilis* (MTCC 441), *Bacillus cereus* (MTCC 1272)) et quatre bactéries à coloration de gram négative (*Escherichia coli* (MTCC 1687), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 1688), *Salmonella typhi* (MTCC 531) et *Klebsiella pneumoniae* (MTCC 530)) en utilisant la méthode de diffusion d'agar. Les extraits d'éthanol et de méthanol ont montrés une activité plus élevé tandis que l'extrait acétonique, n'a montré aucune activité contre la plupart de microbes pathogènes testés (Rubina *et al.*, 2009).

III. 2. L'ail (*ALLIUM SATIVUM*)

III.2.1. Classification :

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 :	Liliiana
Ordre :	Amaryllidales
Famille :	Alliaceae
Subfamily :	Allioideae
Tribu :	Allieae
Genre :	<i>Allium</i>
Espèce :	<i>Allium sativum</i> (Takhtajan 1997).

III.2.2. 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'acclimate 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, 2008).

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

III.2.3. Répartition géographique :

Allium sativum a son origine en Asie centrale (Renaud, 2003), cependant, il est actuellement cultivé dans la plupart des régions du monde, principalement pour ses applications alimentaires, y compris le Mexique, l'Amérique du Sud, au Moyen-Orient, en Inde et la Chine.

III.2.4. Composition phytochimique :

Le bulbe d'ail renferme des polysaccharides (cellulose et fructanes), des saponosides (hétérosides de furostanols: sativosides, proto-éruboside-B etc.) (Bruneton, 1999). En plus, L'ail est caractérisé par sa forte teneur en composés organo-soufrés et en flavonoïdes.

Le composant principal de l'ail frais non contusé est l'alliine ou sulfoxyde de S-allyl-L-(+)-cystéine (Figure n° 9). 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 % (WICHTL et ANTON, 2003) et jusqu'à 1,8%.

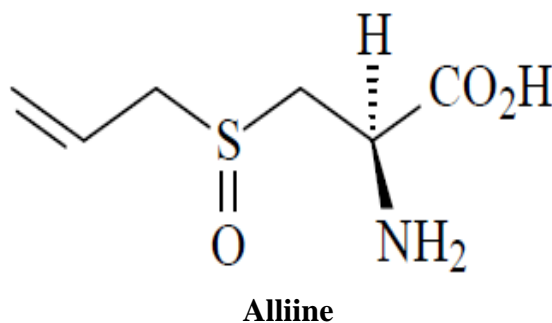


Figure n° 9: Structure chimique de principal composant de l'ail intact (Bruneton, 1999).

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-propènesulfénique, qui sera immédiatement transformé en allicine (0,3 % de la masse fraîche) (GRUN-THOMAS, 1998 ; GIRRE, 2001) (figure n° 10). L'allicine (ou allyl-2 propèthiosulfate) 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: CH₂=CH-CH₂-S(O)-S-CH₂-CH=CH₂. 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 (WICHTL et ANTON, 2003).

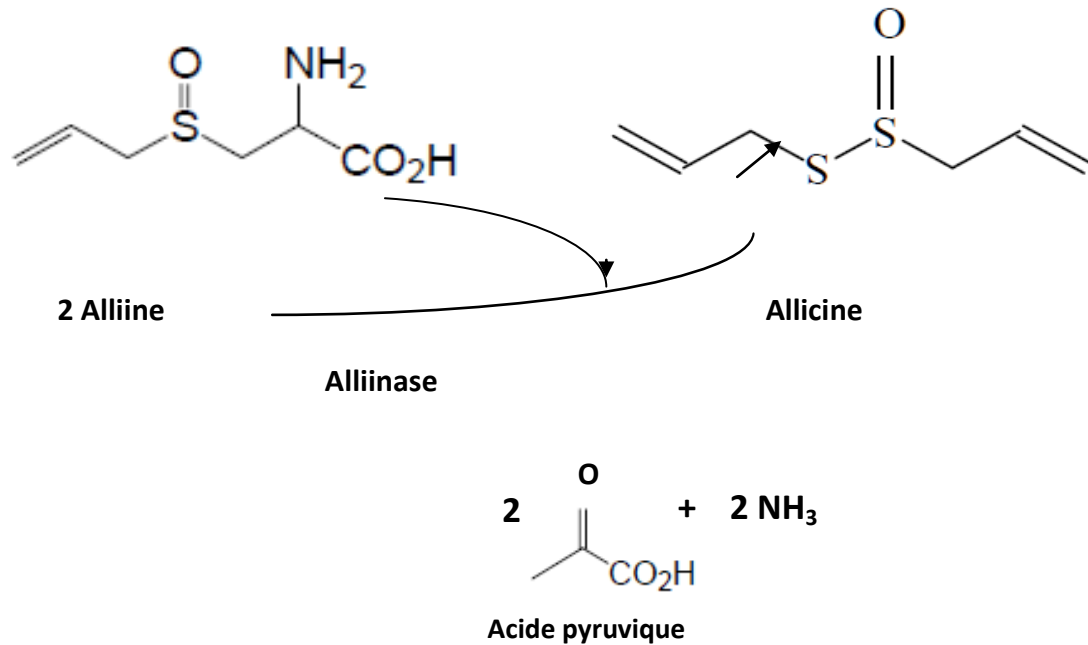


Figure n° 10: Transformation de l'alliine en allicine.

L'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur et sous pression, contient une variété de sulfures: diallyl disulfure (DADS), diallyl trisulfure (DATS)... (Amagase *et al.*, 2001).

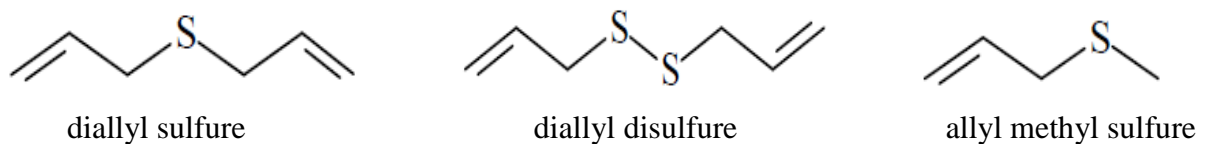


Figure n° 11: Structure chimique de quelques composés de l'huile essentielle de l'ail.

Durant le processus de la fabrication l'huile macérée de l'ail (macération de l'ail dans une huile végétale), peu d'alliine est converti en allicine. Mais puisque cette dernière est instable, et se décompose facilement (Weber *et al.*, 1992) en: vinylthiines, composés majeurs des préparations à l'huile de l'ail (Ohta *et al.*, 1999), ajoènes (formé par condensation de 3 molécules d'allicine) (Figure n° 12) (Ohta *et al.*, 1999 ; Amagase *et al.*, 2001), diallyl disulfure (Dwivedi *et al.*, 1998) et différents d'autre composé, qui sont liposolubles (Amagase *et al.*, 2001).

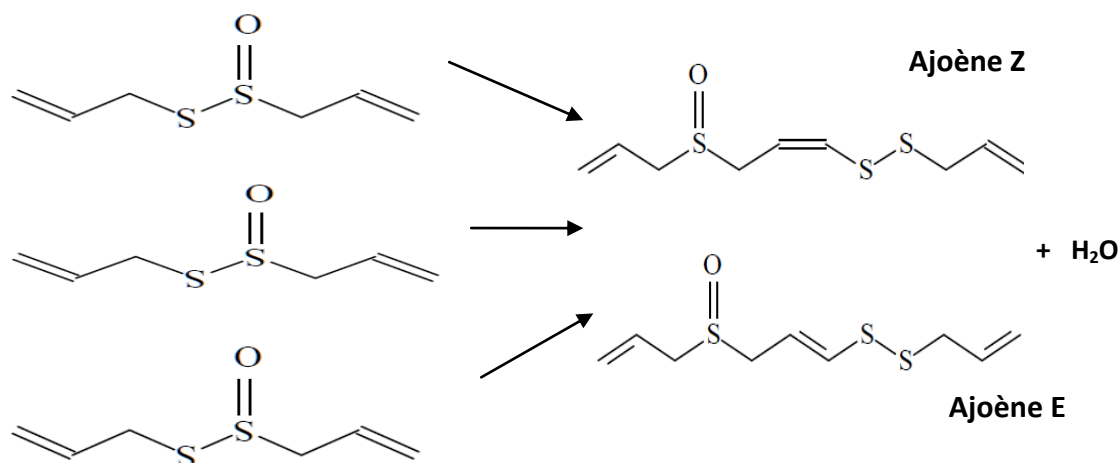


Figure n° 12: Transformation de l'allicine en l'ajoènes.

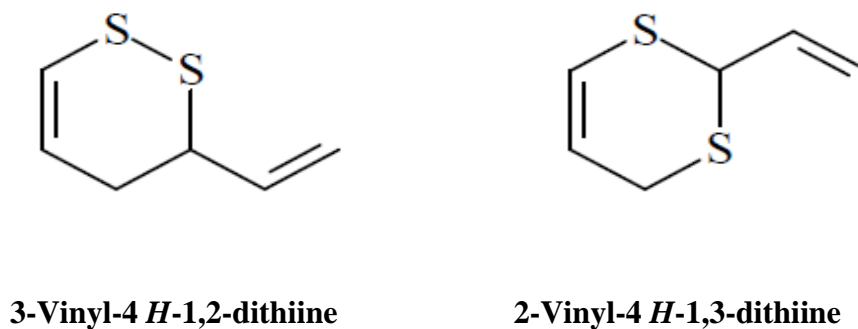


Figure n° 13: Structure chimique des vinylthiines (Bruneton, 1999).

De plus, l'ail contient également des biocatalyseurs : hormones sexuelles mâles et femelles, des lectines, des prostaglandines, oxydases, peroxydases (tyrosinase, catalase), des vitamines (vitamine A, vitamines BI, B2, B6, vitamine P et vitamine C), des acides gras, des glycolipides, des phospholipides, des anthocyanines, des flavonoïdes, de l'acide phénolique et des acides aminés essentiels (BRUNETON, 1987).

III.2.5. Propriétés pharmacologiques et emplois :

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.

Durant la Première Guerre mondiale, l'ail a été utilisé pour combattre le typhus et la dysenterie, ainsi que comme désinfectant pour les plaies. On utilisait même le jus d'ail cru dilué afin d'éviter la gangrène. Durant la Seconde Guerre mondiale, les Russes, à court d'antibiotiques, utilisaient massivement l'ail, qui fut alors appelé « pénicilline russe ».

Et de manière générale, on attribue à l'ail des qualités: antibactériennes, antibiotiques, anticancéreuses, hypolipémiantes, hypotensives, inhibitrices de l'agrégation plaquettaire, expectorante et immunostimulante. C'est pour ces différentes raisons qu'il serait prescrit lors d'hypertension, d'hypercholestérolémie, de bronchite, de maux de gorge ou lors de calculs urinaires (Jean-Michel, 2001 ; Xavier, 2009).

Utilisé par les Egyptiens pour éviter les maladies (Richard et Loo, 1992). Le naturaliste romain, Pline l'ancien a inscrit plusieurs usages de l'ail: pour éloigner les scorpions, désinfecter les morsures de chiens, guérir la lèpre, asthme et épilepsie (Shaath *et al.*, 1995).

Les Irlandais, les Danois et les Russes utilisaient l'ail, il y a des centaines d'années pour traiter la toux et le froid (Shaath *et al.*, 1995).

Du fait que l'ail est riche en fructosanes jusqu'à 75% du poids sec, il est diurétique. C'est un hypotenseur dont l'effet est connu depuis longtemps chez l'homme, et a été confirmé chez l'animal. Egalement un antiathéromateux capable de faire diminuer triglycérides et cholestérol sanguins et d'augmenter le taux des HDL. Une alimentation suffisamment riche en ail diminue l'agrégation plaquettaire et augmente l'activité fibrinolytique, d'où l'intérêt de la plante dans la prévention des thromboses (Bezanger-Beauquesne *et al.*, 1990).

C'est aussi un hypoglycémiant (Bezanger-Beauquesne *et al.*, 1990), antiviral (Weber *et al.*, 1992), prévient de certains cancers et dont plusieurs études sur le cancer de l'estomac (Jonkers *et al.*, 1999 ; Ohta *et al.*, 1999 ; O'gara *et al.*, 2000).

Ses propriétés antiseptiques ont été mises à profit depuis des siècles contre des maladies telles que la peste ou le choléra (Amagase *et al.*, 2001). Louis Pasteur, en 1858, était le premier à avoir constaté que l'ail tue les bactéries. Les docteurs Russes traitaient leurs malades avec de l'ail à défaut de Pénicilline (Shaath *et al.*, 1995). Ces activités antibactériennes et même antifongiques de l'ail ont été mis en évidence *in vitro* (Bruneton *et al.*, 1999 ; Cowan, 1999 ; Jonkers *et al.*, 1999 ; Ohta *et al.*, 1999 ; O'gara *et al.*, 2000 ; Ross *et al.*, 2001 ; Tsao *et al.*, 2001).

Les composés soufrés volatils spécialement: allicine, diallyl disulfure, diallyl trisulfure, ajoènes, vinylthiines, sont généralement considérés responsables de la plupart des activités pharmacologiques (Yoshida *et al.*, 1999 ; O'gara *et al.*, 2000 ; Ross *et al.*, 2001 ; Tsao *et al.*, 2001 ; Amagase *et al.*, 2001).

III.2.5. Effets antibactériens :

Des études récentes montrent l'activité antimicrobienne de l'huile macérée de l'ail contre, des bactéries à coloration de gram positive et négative, des levures et même peut inhiber la croissance de la bactérie *Helicobacter pylori* responsable de l'ulcère et du cancer de l'estomac (Ohta *et al.*, 1999 ; Yoshida *et al.*, 1999).

En 2004, une étude prouvé que l'extrait aqueux d'ail (ÂGE) exerce un effet antimicrobiens contre 133 isolats bactériens multi-résistant à coloration de gram positive et négative, incluant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella sp.*, *Proteus sp.* et contre 10 *Candida sp.* (Iwalokun *et al.*, 2004).

L'évaluation de l'effet de l'extrait d'ail sur les bactéries pathogènes communes de coloration de gram positive et négative isolés à partir des enfants avec une septicémie hospitalisée à l'hôpital d'Iran. Le résultat obtenu montre l'activité antimicrobienne de l'extrait d'ail contre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (Barak *et al.*, 2007).

Une étude *in vitro* montre l'effet antibactérien d'ail (*Alium sativum*) sur *Staphylococcus aureus* réalisé par Deresse en 2009.

III.3. Le henné (*LAWSONIA INERMIS*)

III.3.1. Taxonomie :

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

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

III.3.2. Aspect botanique :

Henné (*Lawsonia inermis*) est un arbuste odoriférant de 2 à 6 mètres. C'est 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 1.3-3.2 par 0.6-1.6 centimètre, elliptique ou largement lancéolée, aigu ou obtus. Les fleurs sont nombreuses de couleur variable, 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.3.3. Répartition géographique :

Largement cultivée dans les régions tempérées de l'Afrique, au Moyen Orient et surtout en Inde comme une plante ornementale et de colorant (Grieve, 2005).

III.3.4. Utilisation :

Le henné (*Lawsonia inermis*) a été employé de manière esthétique et médicinale pendant plus de 9.000 années. *Lawsonia inermis* est un agent populaire de coloration de peau et de cheveux dans beaucoup de régions du monde. Sa racine est considérée une médecine efficace pour 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). *Lawsonia inermis* est employés en tant qu'antirheumatic et agent antineuralgic (Marc *et al.*, 2008), et également comme un potentiel antidiabétique (Gbolade, 2009). En outre, le traitement avec l'extrait hydroalcoolique de *Lawsonia inermis* (*in vivo*) a été prouvé et les niveaux d'enzymes antioxydantes cellulaires ont augmenter telles que la glutathion réductase, superoxide dismutase et catalase (Dasgupta *et al.*, 2003).

III.3.5. Composition phytochimique :

III.3.5.1. Dérivés de Naphthoquinone :

Le henné (*Lawsonia inermis*) contient le lawsone (2-hydroxy-1,4- naphthoquinone) (Figure n° 14), comme le principal ingrédient bio-actif, ce qui est présent dans des feuilles sèches dans une concentration de 1.0-1.4 %. Le composé a été extrait à partir des feuilles et la préparation de divers dérivés de lawsone a été rapportée (Didry *et al.*, 1968). La résolution de la chlorophylle, lawsone, 1,3dihydroxy naphtalène, 1,4-naphthoquinone et du 1,2-dihydroxy-4-glucosyloxynaphthalene a été isolée dans l'extrait insoluble dans l'eau des feuilles de henné. Un isoplumpagin dérivé de nouveau naphthoquinone a été isolé dans l'écorce de tige du henné (Gupta *et al.*, 1993).

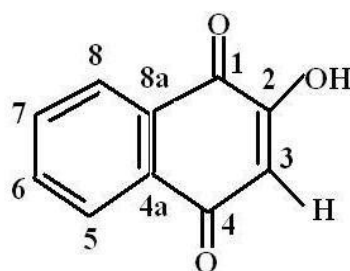


Figure n° 14: Structure chimique de Lawsone

III.3.5.2. Composants aliphatiques, triterpènes et stérols :

La structure de nouveaux glycosides, lawsoniaside et lalioside phénoliques d'isolement dans les feuilles a été établie comme 1,2,4-trihydroxynaphthalene 1.4-di- β -D-glucopyranoside et 2,3,4,6-tetrahydroxyacetoxy-2 - β - D-glucopyranoside (Takeda, 1988). Un aliphatique ester de n-tricontyl, n-tridecanoate, β -sitostérol, lupeol, 30-norlupan-3 β -ol-20-one, betulin et acide betulinique ont été isolés dans l'écorce de *L. inermis* (Chakraborty *et al.*, 1977).

Un glucoside de β -sitostérol a été rapporté des feuilles (Ahmoud *et al.*, 1980). L'extrait méthanolique des feuilles du henné a également rapporté le β -sitostérol et le stigmastérol (Afzal *et al.*, 1984) (Figure n° 15). Les graines de la plante contiennent 5.8% d'une huile fixe composée d'acide arachidonique, d'acides, stéarique, palmitique, oléique et linoléique en plus d'une huile essentielle composée principalement d'ionone (Sarita, 1991). De l'écorce de tige, un constituant aliphatique 3-méthyl-nonacosan-1-ol (Gupta *et al.*, 1992) et de stérols à savoir le lawsaritol (Gupta *et al.*, 1992) et le lawsaritol A (Gupta *et al.*, 1994) ont été rapportés. L'essai biologique a guidé le fractionnement de l'extrait méthanolique de la graine dégraissée menée à l'isolement de deux nouveaux triterpénoïdes, d'acide de lawnermis et de son ester méthylique (Handa *et al.*, 1997).

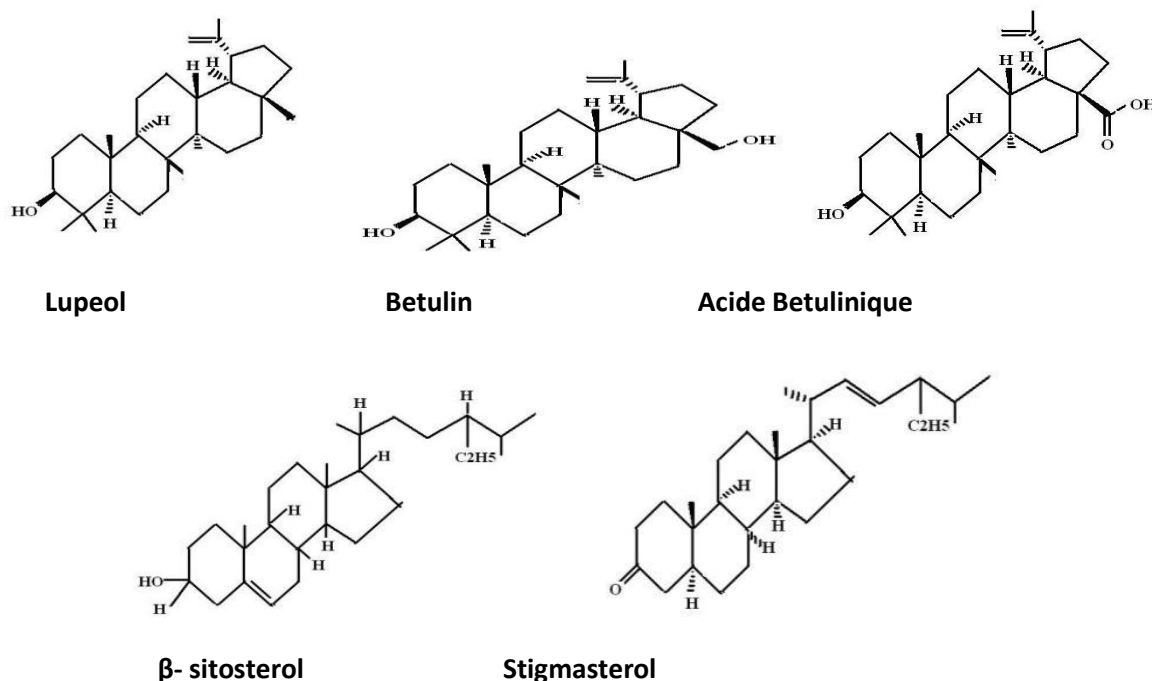


Figure n° 15: Structure chimique de principaux composants aliphatiques, triterpène et stérols.

III.3.5.3. Dérivés phénoliques , coumarins, xanthones et flavonoïdes :

L'extrait éthanolique de la totalité des parties aériennes de henné est avéré exempt des tannins (Atal *et al.*, 1978). L'acide d'ail a été rapporté dans les feuilles. La structure des coumarins, lacoumarin d'isolement dans toute la plante, a été établie comme 5-allyoxy-7-hydroxycoumarines (Bharadwaj *et al.*, 1976). Trois nouveaux laxanthes, à savoir laxanthes 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, respectivement ont été rapportés (Bharadwaj *et al.*, 1977 ; Bharadwaj *et al.*, 1978). Apigenin-7-glucoside, apigenin-4-glycoside, luteolin-7-glucoside et luteolin-3-glucoside étaient les flavonoïdes d'isolement dans le henné (Afzel *et al.*, 1980). La lutéoline, les luteolin-7-O-glucoside et les acacetin-7-O-glucoside ont été isolés dans les feuilles.

III.3.5.4. D'autres constituants chimiques :

L'acide gallique est présent jusqu'au degré de 5-6 %. La composition en acides aminés du henné a été rapportée (Khan *et al.*, 1997). La présence du mannitol dans la tige, les fleurs et les racines de henné a été étudiée. Un lectin inhibitable d'albumine a été obtenu à partir du henné. Les oligoéléments dans la poudre de henné étaient Cu, Ni, Mo, V, Mn, Sr, Ba, Fe et Al comprenant les substances minérales comme Na_2O , CaO et K_2O . L'huile essentielle des fleurs du henné contient α -ionone et β -ionone comme constituants en chef. Le fractionnement essai-guidé immunomodulateur de l'extrait méthanolique des feuilles de henné a eu comme conséquence l'isolement de sept composés; trois ont été isolés pour la première fois dans le genre, à savoir acide *p*-coumarique, 2-methoxy-3-methyl-1,4-naphthoquinone et apiin, apigénine, lutéoline et cosmosiin (Muhammad et Muhammad, 2005) (Figure n° 16).

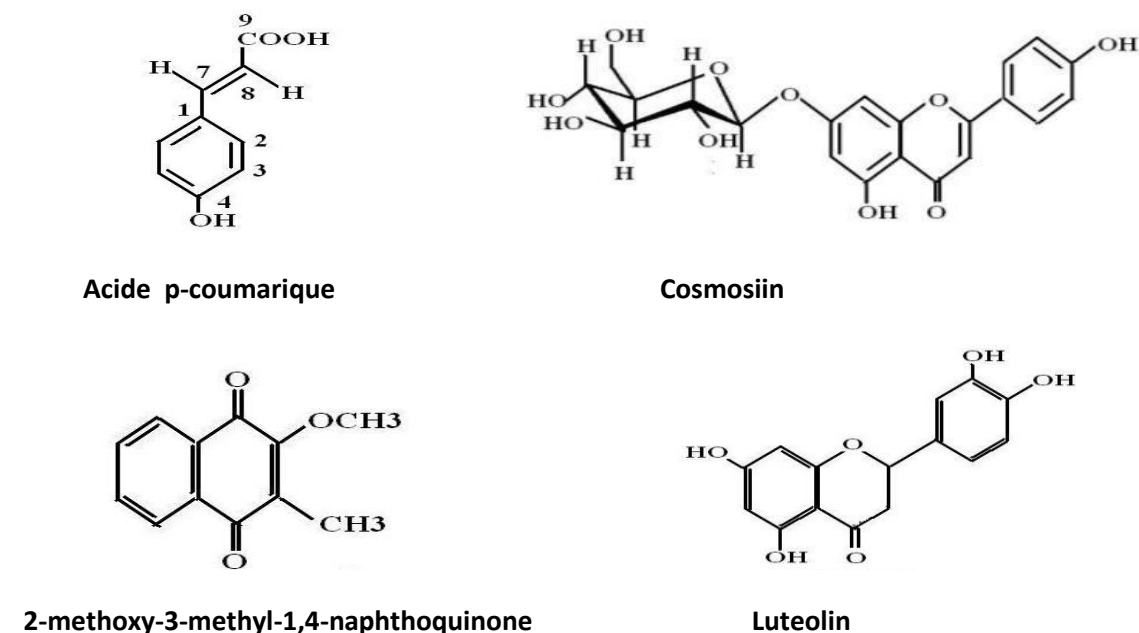


Figure n° 16: Structure chimique de constituants chimiques de *Lawsonia inermis*.

III.3.6. Effets antimicrobiens:

Des extraits d'éthanol de 20 espèces des plantes employées par les guérisseurs traditionnels de Yemene pour traiter les maladies infectieuses ont été examinés pour leur activité antibactérienne contre les bactéries de coloration de gram positives et négatives. L'extrait d'acétate éthylique de *L. inermis* s'est avéré le plus en activité contre toutes les bactéries dans le système d'essai. (Ali *et al.*, 2001).

L'extrait de chloroforme des feuilles a une activité antibactérienne prometteuse contre *Shigella* et *Vibrio cholera* (Ahmed *et al.*, 2003).

Les extraits bruts aqueux, de méthanol et de chloroforme de la feuille ont montré que l'activité antimicrobienne *in vitro* empêchait la croissance de 6 mycètes pathogènes humains et de 4 types de bactéries (Habbal *et al.*, 2005; Saadabi, 2007).

En Inde, l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* a été mis en évidence par la méthode de diffusion de puits d'agar vis-à-vis *Staphylococcus aureus* (MTCC 087), *Escherichia coli* (MTCC 729), *Klebsiella pneumoniae* (MTCC 432), *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 1688) et *Proteus mirabilis* (MTCC 425) (Arun *et al.*, 2010).

Partie expérimentale

CHAPITRE IV

Matériel et méthodes

IV. Matériel et méthodes :

IV.1. Obtention de bactéries :

Cinq isolats ont été employés dans cet étude y compris :

- Une souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Quatre isolats cliniques (**P₁**, **P₂**, **P₃** et **P₄**) obtenus à partir des produits pathologiques différents :

P₁ : isolé à partir des seles.

P₂, **P₃** : isolé à partir de 2 prélèvements de pus.

P₄ : isolé à partir d'un prélèvement bronchique,

Les quatre isolats cliniques (P₁, P₂, P₃ et P₄) ont été fournis par le service de Bactériologie de Laboratoire de l'hôpital de «Ain Tedeles», Mostaganem.

IV.2. Identification des isolats :

L'identification des souches de *Pseudomonas aeruginosa* est basée sur l'étude de leurs caractères morphologiques, culturels et biochimiques.

IV.2.1. Etude macroscopique des colonies :

On a pris en considération les caractères suivants: la forme, l'aspect et la couleur des colonies.

IV.2.2. Etude microscopique :

Cet étude est réalisée par une coloration de Gram qui permet de connaître le type de Gram de la bactérie (positif ou négatif) ainsi que leur morphologie (bâtonnet ou cocci). Les bactéries qui apparaissent en violet sont dites "Gram positif" et celles qui présentent une couleur rose sont appelées "Gram négatif".

IV.2.3. Production des pigments :

La présence des pigments fluorescents (pyoverdines) est testée sur le milieu King B, la production du pigment bleu (pyocyanine) est vérifiée sur milieu King A respectivement par la méthode de stries simple.

L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 heures. La présence de pigment diffusible se traduit par l'apparition d'une couleur jaune-verdâtre pour la pyoverdine ou bleu-vert pour la pyocyanine qui peut diffuser sur toute la boîte.

IV.2.4. Croissance à 4 °C et à 42 °C :

Les cinq isolats de *P. aeruginosa* sont ensemencées dans des boîtes de pétri contenant le milieu GN, ensuite elles sont incubées dans des incubateurs maintenu à 4°C et 42°C pendant 48 heures.

IV.2.5. Production d'oxydase :

Ce test est basé sur la détection de la production de l'enzyme cytochrome oxydase par des bactéries à coloration de Gram négative.

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

IV.2.5. Production de catalase :

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

IV.2.7. Caractères biochimiques :**IV.2.7.1. Milieu TSI (Triple sugar iron) :**

Ce test examine la fermentation du glucose, le lactose et de saccharose par la bactérie et vérifie si le gaz et le sulfure d'hydrogène (H₂S) sont produits dans le processus.

A partir d'une suspension de la culture, la pente est ensemencée par des stries longitudinales, plus une piquête centrale réalisée par une pipette de pasteur.

IV.2.7.1. La galerie API 20 E :

Les cinq isolats ont fait l'objet d'une identification biochimique avec le système API 20E. (Jacoby *et al.* 2004).

La galerie biochimique API 20 E, est un système miniaturisé, prêt à l'emploi et standardisé. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tubes sont ensemencés avec une suspension bactérienne effectuée en eau physiologique. Les réactions produites au cours de la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (TDA, IND et VP).

La galerie API 20 E permet d'effectuer les tests suivants: ONPG, ADH, LDC, ODC, citrate de Simmons (CIT), production d'hydrogène sulfuré par réduction du thiosulfate (H₂S), synthèse d'une uréase (URE), recherche d'une tryptophane désaminase (TDA), recherche du pouvoir indologène (IND), production d'acétoïne (VP), synthèse d'une gélatinase (GEL), recherche de l'acidification de neuf "glucides": glucose (GLU), mannitol (MAN), inositol (INO), sorbitol (SOR), rhamnose (RHA), saccharose (SAC), mélibiose (MEL), amygdaline (AMY) et arabinose (ARA).



Figure n°17 : La galerie biochimique API 20 E

IV.3. L'antibiogramme :

Un antibiogramme comportant 13 antibiotiques (Tableau n° 2) a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu Mueller Hinton (Galani *et al.* 2002).

Tableau n° 2 : Les antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme

Classes d'antibiotiques	Les antibiotiques testés
Les β-lactamines	Pénicilline (P) (6μg) Oxacilline (OX) (5μg) Augmentin (amoxicilline + acide clavulanique) (AMC) (20/10)
Les céphalosporines	
de première génération (C1G) :	Céfazoline (CZ) (30μg)
de troisième génération (C3G) :	Ceftriaxone (CRO) (30μg)
Les aminoglycosides	Gentamycine (GN)
Les fluoroquinolones	Norfloxacin (NOR) (5μg)
Les macrolides	Erytromycine (E) (15μg)
Les cyclines	Doxycycline (DO) (30μg) Tétracycline (TE) (30μg)
Les Streptogramines	Pristinamycine (PT) (15μg)
Les rifamycines	Rifampicine (RA) (30μg)
Les sulfamides	Le triméthoprime sulfaméthaxazol (SXT) (15μg)

IV.4. Matériel végétal :

Les plantes ayant fait l'objet de l'expérimentation sont les suivantes :

L'aloès (*Aloe vera*)

Les feuilles fraîches d'*Aloe vera* ont été récoltées des espaces verts de l'université de Mostaganem.

L'ail (*Allium sativum*)

L'ail (*Allium sativum*) à l'état frais ou sous forme sèche (bulbes) a été acheté du marché de Mostaganem.

Le henné (*Lawsonia inermis*)

La matière végétale de *Lawsonia inermis* a été obtenue du marché sous forme de feuilles séchées, c'est le henné connu pour l'usage domestique. Une quantité de henné a subi ensuite un broyage et un tamisage pour l'obtention d'une poudre fine et homogène.



Aloe vera (feuille)



Allium sativum (bulbes)



Lawsonia inermis (feuille)

Figure n° 18: Photos des plantes utilisées dans cet étude.

IV.5. Préparations des extraits :

IV.5.1. Préparation d'extraits de l'*Aloe vera* :

a. L'extrait brut d'*Aloe vera* (1) :

On choisi des feuille mures, fraîches, saines et épaisses d'*Aloe vera*, ayant une longueur approximativement de 25–30 cm. On lave ces feuilles avec l'eau de robinet et sur une plaque de verre stérile on la dépose longitudinalement.

A l'aide d'une spatule stérilisé, On érafle doucement le tissu parenchymateux sans couleur (gel). Ensuite on le liquéfie dans un mélangeur pour enlever les fibres et on filtre à l'aide d'un tissu mousseline.



Figure n° 19: Gel d'*Aloe vera*.

b. L'extrait éthanolique d'*Aloe vera* :

- Selon la méthode décrite par Alkhail (2) :

Dont les principales étapes sont résumées comme suite :

- Une prise d'échantillon de gel d'*Aloe vera* d'environ 50 g a été introduite dans un erlenmeyer et macérée dans 100 ml d'éthanol (95%) pendant 48 h.
- Le produit est ensuite filtrés a l'aide du tissu mousseline stérile suivi d'une filtration par un papier filtre Whattman N°1.
- Puis le filtrat obtenu a été concentré au rotavapor sous vide à la température de 50°C jusqu'à l'élimination complète de l'éthanol. (Alkhail, 2005).

- **Selon la méthode décrite par Pawar *et al.*, (3) :**

Le gel frais de feuille a été séché dans un four à 80°C pendant 48h. Par la suite, les opérations de broyage, tamisage sont réalisées, 20 g de cette poudre ont été introduite dans un erlenmeyer et macérée dans 200 ml d'éthanol pendant 24h et le contenu est ensuite filtré à l'aide du papier filtre Whattman N°1.

Puis le filtrat obtenu a été concentré au rotavapor sous vide à 50°C. L'extrait obtenu a été dessout dans l'eau distillé stérile (Pawar *et al.*, 2005).

IV.5.2. Préparation d'extraits d'*Allium sativum* :

- **Extrait brut d'*Allium sativum* (jus frais de l'ail) (1) :**

Le jus ou eau métabolique d'une plante, représente toute la partie liquide extraite de la plante (les ampoules fraîches), en ne laissant comme résidus que les fibres cellulosiques (Bernadet, 2000).

L'extrait brut de l'ail est préparé le jour même des expériences – au maximum une heure avant – à cause de son instabilité.

- **Extrait d'*Allium sativum* selon la méthode décrite par Rasmussen *et al.* (2) :**

Les ampoules fraîches d'ail ont été épluchées et coupé en petits morceaux, 150 g de l'Ail coupé a été submergé en 150 ml de toluène et porté à l'agitation (180 t/mn) à la température ambiante pour 24h.

Puis, le mélange a été filtré à travers un papier filtre de Whattman N°1, le totale de 150 ml de l'eau distillé a été ajouté dans le filtrat obtenu précédemment, le mélange a été remit encore pendant 24 h à la température ambiante sur le dispositif agité. La phase aqueuse a été séparée de la phase organique par l'utilisation d'ampoule de décantation. Après l'obtention de deux phases, la phase aqueuse à été séparé par décantation et stérilisé par un filtre millipore GS 0,22 µm (Rasmussen *et al.*, 2005).



Figure n° 20: Les principales étapes réalisées dans la préparation de l'extrait d'*Allium sativum* selon la méthode décrite par Rasmussen *et al.* (2005).

IV.5.3. Préparation de l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* :

Pour *Lawsonia inermis*, l'extraction par percolation type Soxhlet a été la méthode choisie (Negrette *et al.*, 1987), 150 g de poudre repartis dans 3 cartouches ont été extraits avec 300 ml de méthanol sous réfrigérant à reflux jusqu'à épuisement. L'extrait recueilli dans un ballon a été concentré à l'aide du rotavapor. Après concentration, l'extrait a été recueilli dans un flacon (Harborne, 1998).



Figure n° 21: Soxhlet et Rotavapor utilisés dans cette étude.

IV.6. Activité antibactérienne des différents extraits préparés :

L'activité antimicrobienne des différents extraits préparés a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton (milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens (Sacchetti *et al.*, 2005 ; Celiktas *et al.*, 2007).

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées. Les colonies ont servi à préparer l'inoculum.

Une colonie bien isolée a été transférée à l'aide d'une anse de platine stérile dans un tube contenant de l'eau physiologie stérile afin d'avoir une suspension microbienne homogène (10^6 UFC/ml). Par la suite la surface entière de la gélose Mueller Hinton a été étalée par cette suspension microbienne (Anonyme, 2009).

Des disques en papier Whatman de 6mm de diamètre, ont été d'abord stérilisés par l'autoclavage, puis ont été imprégnés durant 15-20 minutes dans les différents extraits de trois plantes étudiées. Après ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose.

Les boîtes ont été incubées 24 h à 37°C (Anonyme, 1996) et l'activité antimicrobienne a été traduite par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques.

IV.6.1. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) des extraits de *Lawsonia inermis* et d'*Allium sativum* :

IV.6.1.1. En milieu solide:

Les extraits présentant un effet inhibiteur sur les isolats de *Pseudomonas aeruginosa*, sont sélectionnés pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB).

Les mêmes étapes réalisées dans la détermination de l'activité antibactérienne avec l'utilisation des concentrations différentes.

Des disques en papier Whatman de 6 mm de diamètre, ont été d'abord stérilisés par l'autoclavage, puis imprégnés durant 15-20 minutes dans des concentrations croissantes

d'extraits des deux plantes étudiées. Les disques ont été déposés stérilement sur la surface de la gélose. Les boîtes ont été incubées pendant 24 h à 37°C.

L'activité antimicrobienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

IV.6.1.2. En milieu liquide :

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration d'antibactérienne capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Ici sa détermination s'est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance des germes étudiés. La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. Par conséquent c'est le premier tube où la valeur d_i est égale à d_f ($d_i = d_f$) (d_i et d_f correspondant à la valeur de la D.O du tube expérimental avant et après l'incubation) (Moroh *et al.*, 2008).

La préparation de l'inoculum se fait à partir des colonies jeunes de 18 à 24 heures. Une colonie isolée de *P. aeruginosa* ATCC 27853 a été prélevée à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisée dans 10 ml de BN puis porté à incubation pendant 3 heures à 37°C pour avoir une suspension bactérienne réalisée évaluée à environ 10^6 UFC/ml.

Pour l'*Allium sativum* une série de 10 dilutions réalisées dans du bouillon nutritif à 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% et 10%.

Pour *Lawsonia inermis*, une gamme de concentrations a été préparée dans des tubes à essais contenant du bouillon nutritif par la méthode d'une dilution selon une progression géométrique de raison 2 avec des concentrations allant de 0,0245 mg/ml à 30,00 mg/ml.

Ensuite, chaque tube de l'une des séries estensemencé avec 0,5 ml de l'inoculum tandis que les tubes de l'autre série reçoivent 0,5 ml de milieu de culture stérile. On incube ensuite tous les tubes à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures.

IV.6.2. Concentration minimale bactéricide (CMB) des extraits de *Lawsonia inermis* et d'*Allium sativum* :

La concentration minimale bactéricide (CMB), est la concentration de l'antimicrobien qui laisse au plus 0.01% de germes survivants. Pour sa détermination, la gélose nutritive coulée dans des boîtes de pétri estensemencée en stries par les contenus des tubes ayant une concentration \geq CMI dans la série de dilution précédente. La CMB est déterminée après une incubation de 24 heures à 37°C. (Biyiti *et al.*, 2004).

IV.7. Combinaison de la gentamycine avec l'extrait de l'*Allium sativum* et l'extrait de *Lawsonia inermis* :

L'activité antibactérienne de l'association entre la gentamycine (parmi les antibiotiques les plus utilisés pour le traitement des infections à *P. aeruginosa*) et les deux extraits qui présentent une activité antibactérienne importante vis-à-vis les isolats testés, a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton.

Les étapes réalisées pour cette étude sont les mêmes étapes réalisées dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits préparés.

IV.8. L'étude de l'effet d'extraits préparés et acide salicylique sur la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* :

IV.8.1. Effet des extraits sur la formation du biofilm :

Une colonie de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 cultivée sur gélose nutritive a été transférée dans 10 ml de bouillon nutritif et incubé pendant 24h pour préparer un inoculum. A partir de cet inoculum 0,5 ml a été transféré dans chacune des 10 fioles en verre stériles avec des couvercles contenant 50 ml de bouillon nutritif. Une fiole non inoculée avec *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 a servi de témoin dans cette étude.

Ensuite, les fioles ont été incubées à 37°C pour 24 heures.

Les surfaces d'essai étaient en verre (4,5cm x 3cm), ces lames ont été lavés avec un détergent, rincés par l'eau distillé stérile bouillant et sécher à l'air avant d'être placé dans un four d'air chaud à 75°C pour 30 min.

Après 24 heures d'incubation de la culture, on ajoute les extrait des plantes, trois concentrations pour chaque extrait [l'extrait brut d'ail (06%, 08%, 25%), *Lawsonia inermis* (12,5mg/ml, 16mg/ml, 25mg/ml)] ont été testé et 4 lames de verre ont été aseptiquement mises dans chaque fiole. Toutes les fioles ont été incubées à la température ambiante de 28°C pour 48 heures. À la fin de période d'incubation, les lames ont été aseptiquement enlevées de la culture pour la quantification de biofilms en utilisant l'analyse de violet cristal décrite par Stepanovic *et al.* (2004). Chaque lame a été lavée 3 fois avec 5 ml d'eau distillée stérile. Les bactéries adhérentes restantes ont été fixées avec 2.5 ml de méthanol par lame. La lame a été colorée avec 2 ml de violet cristal (Fisher scientifiques, Etats-Unis) pendant 15 minutes et puis la tache est excessivement lavée sous l'eau du robinet. Après que la lame ait été sécher à l'air sec, le colorant lié aux cellules adhérentes était solubilisé avec 2.5 ml d'acide acétique glaciaire de 33% (Fisher scientifiques, Etats-Unis) pour chaque lame, le liquide résolubilisé a été versé dans une cuvette. L'absorbance (densité optique) de chaque liquide a été mesurée par rapport à la densité optique du milieu non inoculé à une longueur d'onde de 570 nm (Pawar *et al.*, 2005).

IV.8.2. 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 sur la formation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Deux concentrations de l'acide salicylique (1mg/ml, 2mg/ml) ont été testées

CHAPITRE V

Résultats et discussion

V. Résultats et Discussion:

V.1. Identification des isolats obtenus:

V.1.1.L'étude macroscopique:

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

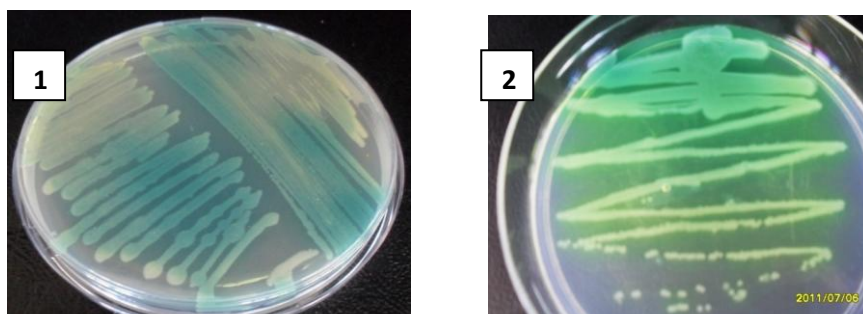


Figure n° 22: Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* ensemencée :
sur King A(1) et sur King B (2).

V.1.2. L'étude microscopique:

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

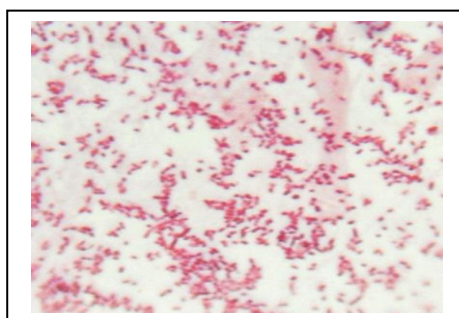


Figure n° 23: Observation microscopique de *P. aeruginosa* après une coloration de Gram (x1000).

V.1.3. Croissance à 4°C et à 42°C :

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

V.1.4. Test de l'oxydase :

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

V.1.4. Test de la catalase :

L'apparition des bulles de gaz après l'addition de H₂O₂, révèle une réaction positive et tous les isolats sont dites oxydase positives.

V.1.5. Caractères biochimiques :

V.1.5.1. Milieu TSI (Triple sugar iron) :

Les tubes de TSI ensemencés par les isolats présentent un culot et une pente rouge, ce qui signifie que les bactéries sont des non fermentatifs de sucres (lactose, glucose et saccharose), l'absence de bulles d'air et des précipités noirs révèle l'absence de gaz et de H₂S.



Figure n° 24: Résultat de test de TSI pour les cinq isolats de *P. aeruginosa*.

V.1.5.1.2. Galerie biochimique API 20 E :

Les résultats obtenus (Tableau n°3 et Figure n° 25) de tous les isolats testés sont compatibles avec les caractères biochimiques de *P. aeruginosa* (MacFaddin, 2000).

Tableau n°3: les résultats des différents tests de la galerie biochimique API 20 E

Teste	résultat
ONPG (orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside)	-
ADH (arginine dihydrolase)	+
LDC (lysine décarboxylase)	-
ODC (ornithine décarboxylase)	-
CIT (Assimilation du citrate)	+
H2S (Production d'hydrogène sulfuré)	-
URE (uréase)	-
TDA (Tryptophane désaminase)	-
IND (Production d'indole)	-
VP (Production d'acétoïne)	-
GEL (Synthèse d'une gélatinase)	+
GLU (Glucose)	-
MAN (Mannitol)	-
INO (Inositol)	-
SOR (Sorbitol)	-
RHA (Rhamnose)	-
SAC (Saccharose)	-
MEL (Mélibiose)	-
AMY (Amygdaline)	-
ARA (Arabinose)	-

- : Test négative

+ : Test positive



Figure n° 25: La galerie biochimique API 20 E après un ensemencement et incubation de 24h.

V.2. Etude de la sensibilité des isolats aux antibiotiques :

Les résultats d'étude de la sensibilité des cinq isolats de *P. aeruginosa* aux 13 différents antibiotiques montre une résistance élevée de *P. aeruginosa* à la majorité des antibiotiques testés, ces résultats sont compatibles avec plusieurs recherches qui ont mentionnés la multirésistance de *P. aeruginosa* aux nombreux antibiotiques. La résistance de cette bactérie aux antibiotiques est due à sa grande capacité à acquérir de novo des mécanismes de résistance. (Figure n° 26 et 27).

La résistance de *P. aeruginosa* aux Pénicilline (P), Oxacilline (OX) et l'association amoxicilline + acide clavulanique (AMC) est peut être due au changement de perméabilité de la membrane cellulaire et/ou à la production d'enzyme inactivant (Les β -Lactamases) (Masterton *et al.*, 2006), la résistance à la céfazoline (CZ) est due peut être à la production de céphalosporinase *AmpC* (Livermore, 1995), la résistance aux Erytromycine (E), doxycycline (DO), Tétracycline (TE) et Triméthoprim sulfaméthazol (SXT) est due à des systèmes d'efflux actif selon Masuda *et al.* (2000) et Li *et al.* (2003).

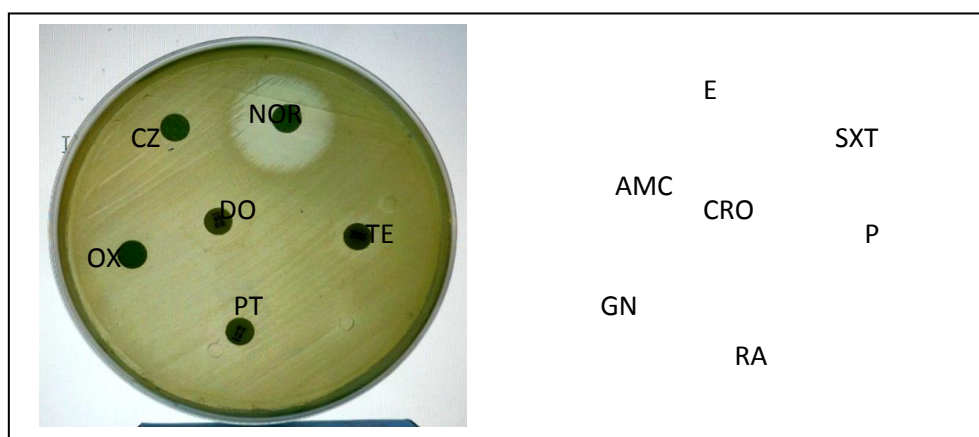


Figure n° 26: Résultats d'antibiogramme de *P. aeruginosa*.

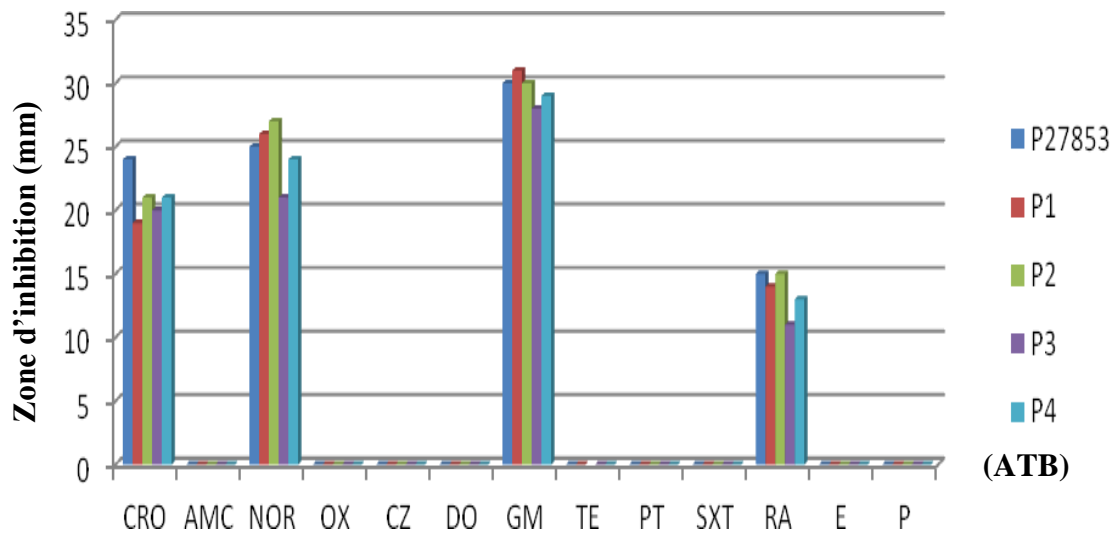


Figure n° 27: Résultats de l'antibiogramme de cinq isolats de *P. aeruginosa* testés aux CRO: Ceftriaxone, AMC: Augmentin (amoxiciline/acide clavulanique), NOR: Norfloxacine, OX: Oxacilline, CZ: Cefazoline, DO: Doxycycline, GM: Gentamicine, TE : Tetracycline, PT: Pristinamycine, SXT: Trimethoprimé , RA: Rifampicine, E: Erythromycine , P: Pénicilline.

V.3. Résultats des tests antibactériens des plantes étudiées:

L'activité antibactérienne de différents extraits préparés à partir des trois plantes *Aloe vera*, *Allium sativum* et *Lawsonia inermis* contre les cinq isolats de *P. aeruginosa* est présentée dans le tableau n° 4 et la figure n° 28.

Tableau n° 4: Effet antibactérien de différents extraits préparés à partir d'*Aloe vera*, *Allium sativum* et *Lawsonia inermis*, sur MH.

Souches	<i>Aloe vera</i>			<i>Allium sativum</i>		<i>Lawsonia inermis</i> 0,20g/ml
	(1) 100%	(2) 100%	(3) 0,10g/ml	(1) 100%	(2) 100%	
<i>P. aeruginosa</i> 27853	-	-	+	++	+	++
<i>P. aeruginosa</i> 1	-	-	+	++	+	++
<i>P. aeruginosa</i> 2	-	-	+	++	+	++
<i>P. aeruginosa</i> 3	-	-	+	++	+	++
<i>P. aeruginosa</i> 4	-	-	+	++	+	++

(1) : L'extrait brut d'*Aloe vera*

(2) : L'extrait éthanolique d'*Aloe vera* selon la méthode décrite par Alkhail en 2005.

(3) : L'extrait éthanolique d'*Aloe vera* selon la méthode décrite par Pawar *et al.* en 2005.

(1) : Extrait brut d'*Allium sativum*

(2) : Extrait d'*Allium sativum* selon la méthode décrite par Rasmussen *et al.* en 2005.

- : Diamètre d'inhibition nul.

+ : Diamètre d'inhibition entre 7 et 10 millimètres.

++ : Diamètre d'inhibition supérieur à 10 millimètres.

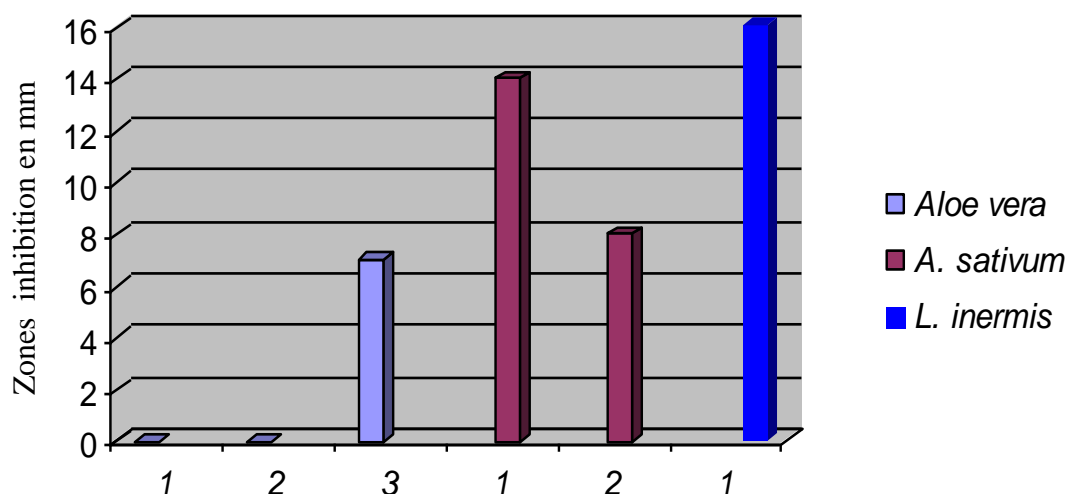


Figure n° 28: Résultats des tests antibactériens des trois plantes étudiées contre *P. aeruginosa* ATCC 27853.

V.3.1. L'aloès (*Aloe vera*) :

D'après les résultats (tableau n°4 et figure n°29), on constate qu'aucune activité antibactérienne n'a été détectée pour le gel d'*Aloe vera* et son extrait éthanolique selon la méthode décrite par Alkhail (2005).

Dans une étude réalisé par Agarry *et al.* (2005), les résultats ne montrent aucune activité antibactérienne pour le gel d'*Aloe vera*. L'eau constitue plus de 99% chez l'*Aloe vera* et les composés actifs sont présents en faibles concentrations qui n'atteignent pas la CMI de *Pseudomonas aeruginosa*.

Une activité antibactérienne a été observée pour l'extrait éthanolique par la méthode décrite par Pawar *et al.* (2005), cette propriété antibactérienne de l'extrait éthanolique sur *Pseudomonas aeruginosa* a été obtenue aussi par Rubina *et al.* (2009).

La différence marquée entre les deux différents extraits éthanoliques est dû à la différence de concentration des composés actifs dans les deux extraits. L'extrait éthanolique préparé selon la méthode décrite par Pawar (2005) utilise une grande quantité de gel d'*Aloe vera* (20 g de poudre obtenus à partir de 4 Kg de gel frais). L'extrait préparé par la méthode de Alkhail (2005) n'utilise que 50 g de gel frais ce qui explique la différence de concentrations entre les deux extraits.

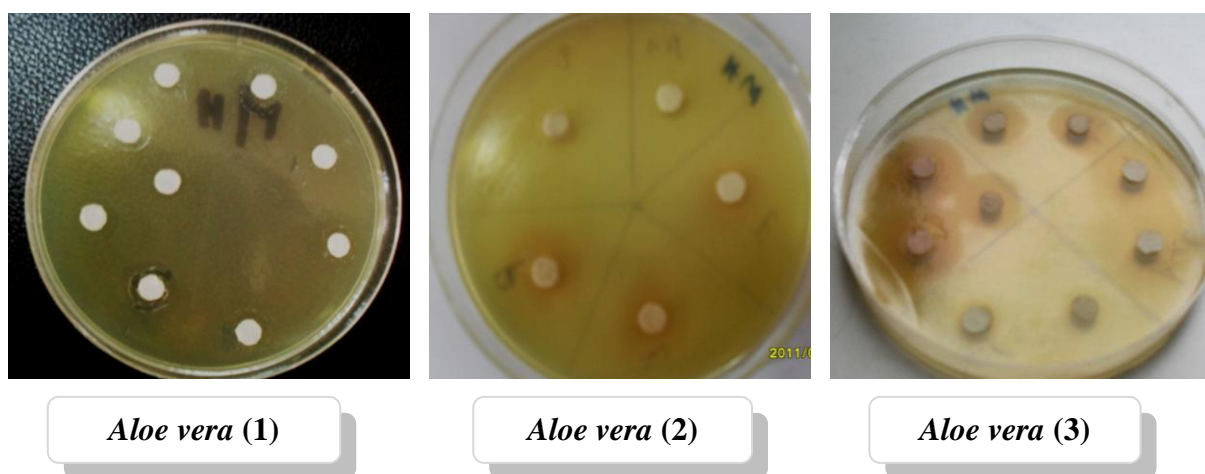


Figure n° 29: Activité antibactérienne de différents extraits testés d'*Aloe vera*.

V.3.2. L'ail (*Allium sativum*) :

Les résultats obtenus (tableau n° 4 et figure n° 30) montrent que l'ail a un effet antibactérien contre les cinq isolats étudiés par les deux extraits testés avec une différence marquée entre les deux. L'extrait brut montre une activité antibactérienne plus efficace que celui obtenu par extrait organique préparé suivant la méthode décrite par Rasmussen (2005). Ce ci confirme les résultats obtenus par Roy *et al.* (2006) et Jaber et Al Mossawi (2007).



Jus d'*A. sativum* (1)

Extrait d'*A. sativum* (2)

Figure n° 30: Activité antibactérienne de deux différents extraits testés d'*A. sativum*.

V.3.3. Le henné (*Lawsonia inermis*) :

L'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* (tableau n° 4 et figure n° 31) montrent une activité antibactérienne significative contre les cinq isolats testés de *P. aeruginosa* comparativement aux extraits de l'*Aloe vera* et de l'*Allium sativum* testés dans cette étude.



Figure n° 31: Activité antibactérienne de l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*.

V.4. Détermination de la Concentrations Minimale Inhibitrice des extrait d'*Allium sativum* et *Lawsonia inermis* :

V.4.1. L'extrait brut de l'*Allium sativum*

V.4.1.1. En milieu solide:

Le tableau n° 5 et les figures n° 32 et 33 montrent l'effet de différentes concentrations d'*Allium sativum* sur cinq isolats de *P. aeruginosa*.

Les résultats de l'activité antibactérienne de différentes concentrations de l'extrait brut de l'ail contre les isolats de *P. aeruginosa* testées en milieu solide confirme les résultats obtenus par Iwalokun *et al.* (2004), Naïrouz (2005) et Abubakar (2009).

Tableau n° 5 : Effet de différentes concentrations de l'extrait brut de l'*Allium sativum* contre les différents isolats de *P. aeruginosa* étudiés, sur MH.

Isolats	Zone d'inhibition en mm												
	Concentrations de l'extrait brut de l' <i>Allium sativum</i>												
	100%	60%	50%	40%	30%	20%	10%	9%	8%	7%	6%	5%	4%
<i>P. a. 27853</i>	15,0	13	12	10,0	9,5	8,5	8,0	7,7	7,5	7,0	0,0	0,0	0,0
P₁	12,5	11,5	11,0	10,5	10,0	9,5	8,7	8,5	8,0	7,5	0,0	0,0	0,0
P₂	13,0	12,5	11,0	10	9,75	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0	0,0	0,0	0,0
P₃	12,5	11,0	10,0	9,75	9,0	8,5	8,0	7,5	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0
P₄	14,0	13,0	12,0	11,5	11,0	10,0	9,0	8,0	7,5	7,0	0,0	0,0	0,0

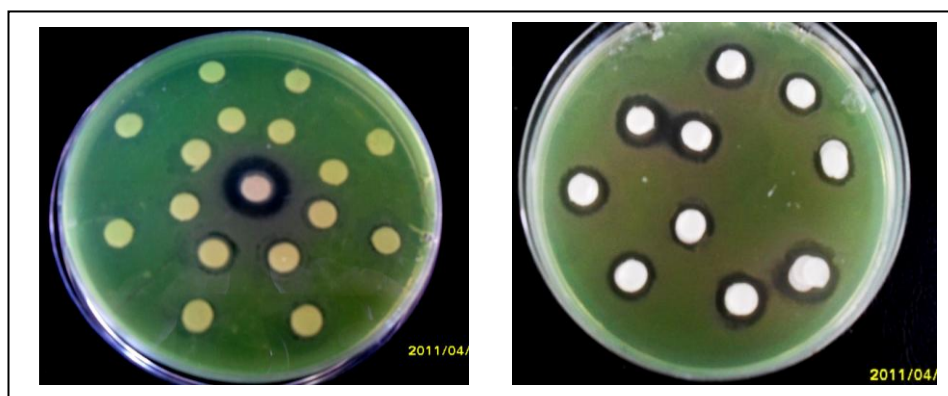


Figure n° 32: les zones d'inhibition de différentes concentrations de l'extrait brut de l'*Allium sativum* sur *P. aeruginosa*.

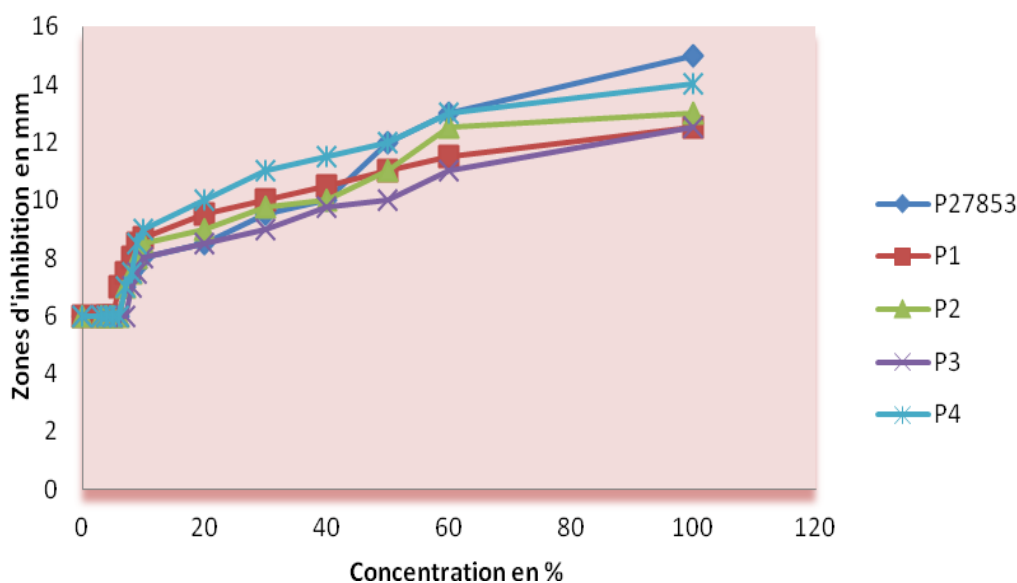


Figure n° 33: Variation des zones d'inhibition de cinq isolats de *P. aeruginosa* en fonction de la concentration de l'extrait brut de l'*Allium sativum*.

V.4.1.2. En milieu liquide :

Les différentes valeurs de la turbidité dues à la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sont présentées dans la figure n° 34. Cette turbidité liée à la quantité de germes présents dans les tubes expérimentaux est mesurée après l'incubation. On note que les concentrations croissantes en extrait brut d'ail (1% ; 2% ; 3% ; 4% ; 5% ; 6% ; 7% ; 8% ; 9% et 10%) provoquent une diminution progressive et dose-dépendante de la turbidité liée à la croissance des souches, où la courbe présente une allure décroissante et s'annule à la concentration de 8%.

L'analyse des données expérimentales montre que comparativement aux témoins de contrôle, il y a une diminution du nombre des germes dans les tubes expérimentaux au fur et à mesure que la concentration de l'extrait augmente.

Nous avons noté une absence de la croissance témoignée par la valeur $df = di$ à la concentration de 6%, cette concentration correspond à la concentration minimale inhibitrice de l'extrait brut de l'ail sur *P. aeruginosa* testé.

En milieu solide, les disques de concentration inférieurs ou égale à 6 % ne produisent aucune zone d'inhibition sur les cultures bactériennes, car un gradient de concentration est obtenu par

diffusion de l'extrait à partir de la zone source (les disques imprégnés), aucune inhibition n'est alors observé dans les zones où la concentration d'extrait est inférieure à la CMI. Par contre en milieu liquide ces concentrations (de 1% à 6%) montrent un effet sur la croissance de la bactérie où il est détecté par la diminution de turbidité.

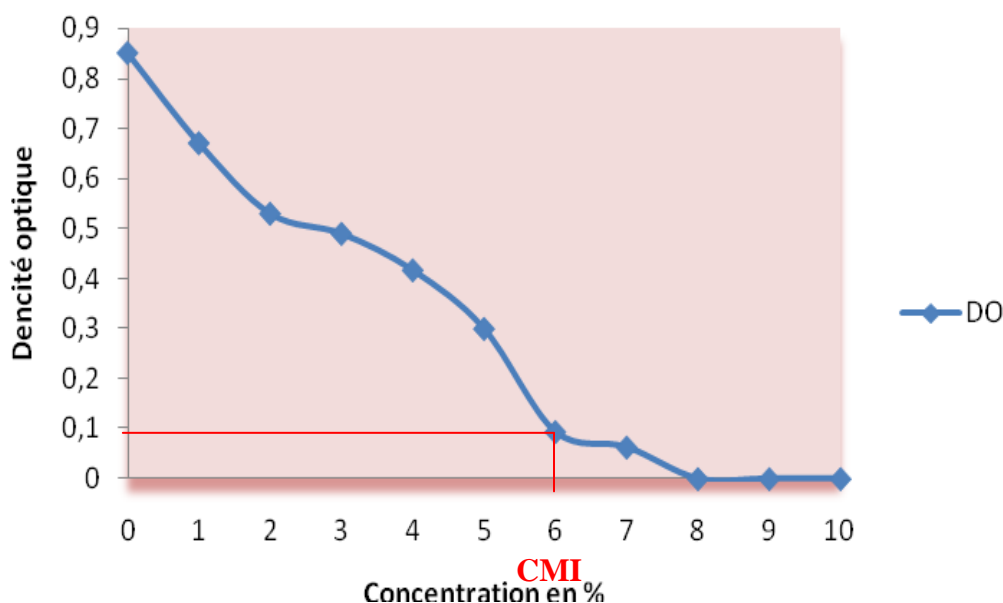


Figure n° 34: Variation de la turbidité due à la croissance de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en fonction de la concentration d'extrait brut d'*Allium sativum*.

V.4.1.3. Concentrations Minimale Bactéricide (CMB) d'extrait brut d'*Allium sativum*:

Par la méthode de dilution en milieu liquide couplé avec un ensemencement sur milieu gélosé, l'extrait brut d'ail a montré un pouvoir bactéricide contre *P. aeruginosa* ATCC 27853, à la concentration de 8%.

Plusieurs études *in vitro* ont montré que l'extrait d'ail et ses dérivés ont été employés avec succès contre *P. aeruginosa* résistant à plusieurs antibiotiques (Tsao et Yin, 2001 ; Iwalokun *et al.*, 2004 ; Bakri et Douglas, 2005).

Ce pouvoir antibactérien de l'ail est peut être dû à la présence de plusieurs substances biologiques actives comme l'allicine et d'autres dérivés hydrophiles (GRUN-THOMAS, 1998).

Les effets antimicrobiens principaux d'allicine sont dus à son interaction avec les groupements thiol des enzymes des synthèses. Il exerce également un effet antimicrobien primaire par l'inhibition de la synthèse d'ARN par l'intermédiaire de l'inhibition de l'ARN polymérase comme chez *E. coli*. La synthèse de protéine est également empêché par l'allicine chez *S. typhimarium* (Feldberg *et al.*, 1988 ; Ozolin et Kaxazolova, 1990 ; Sharref, 1998).

La différence marquée entre les deux extraits d'ail a été confirmée par d'autres études qui démontrent que les extraits organiques de l'ail présente moins d'activité antibactérienne par rapport à leur extrait brut, cette différence est due probablement à l'instabilité des constituants actifs de l'ail, comme dans le cas de l'allicine où il se décompose en composés volatiles dans quelques conditions du milieu et de température (WICHTL et ANTON, 2003).

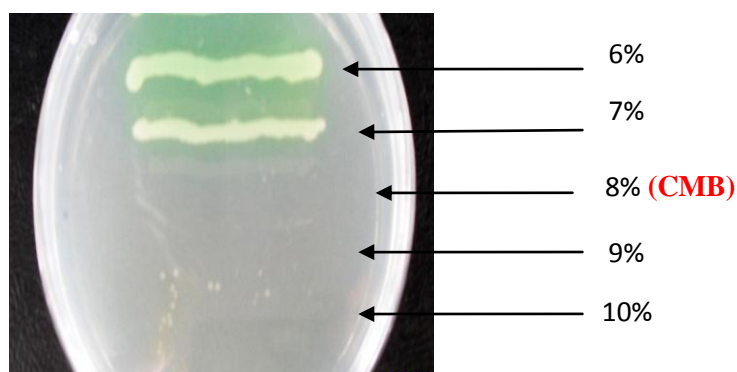


Figure n° 35: CMB d'extrait brut d'*Allium sativum*.

V.4.2. L'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* :

V.4.2.1. En milieu solide:

Les résultats montrés dans le tableau n° 6 et les figures n° 36 et 37 indiquent que cette plante exerce une activité inhibitrice sur les cinq isolats de *P. aeruginosa* testés.

Tableau n° 6: Activité antibactérienne de différentes concentrations de l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* contre les différents isolats de *P. aeruginosa* étudiés, sur MH.

Isolats	Zone d'inhibition (mm)							
	Concentration d'extrait méthanolique de <i>Lawsonia inermis</i> en mg/ml							
	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563
<i>P. a.</i> 27853	14,0	11,0	9,0	8,0	7,0	0,0	0,0	0,0
P₁	13,0	11,5	10,0	9,0	8,0	7,0	0,0	0,0
P₂	13,0	11,0	10,0	8,0	7,0	0,0	0,0	0,0
P₃	13,5	12,0	11,0	9,0	8,0	0,0	0,0	0,0
P₄	17,0	15,0	10,0	9,0	8,5	7,0	0,0	0,0

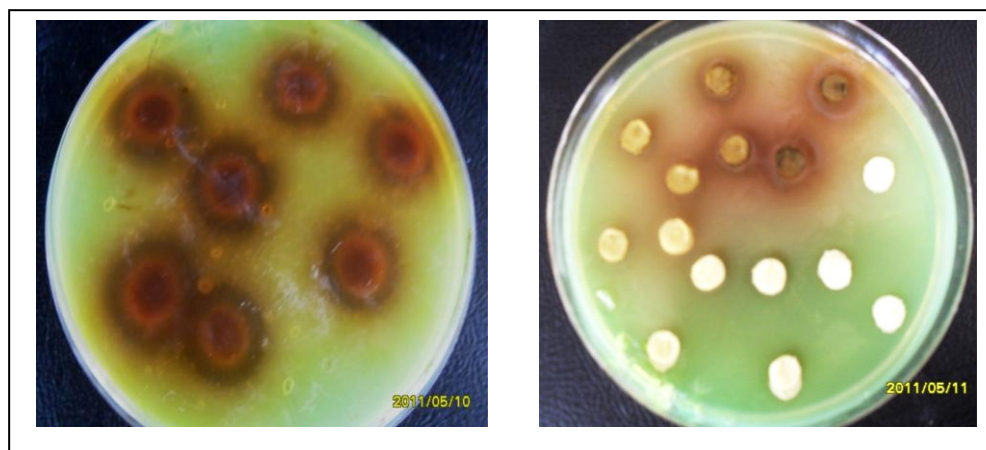


Figure n° 36: les zones d'inhibition des concentrations de l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* sur *P. aeruginosa*.

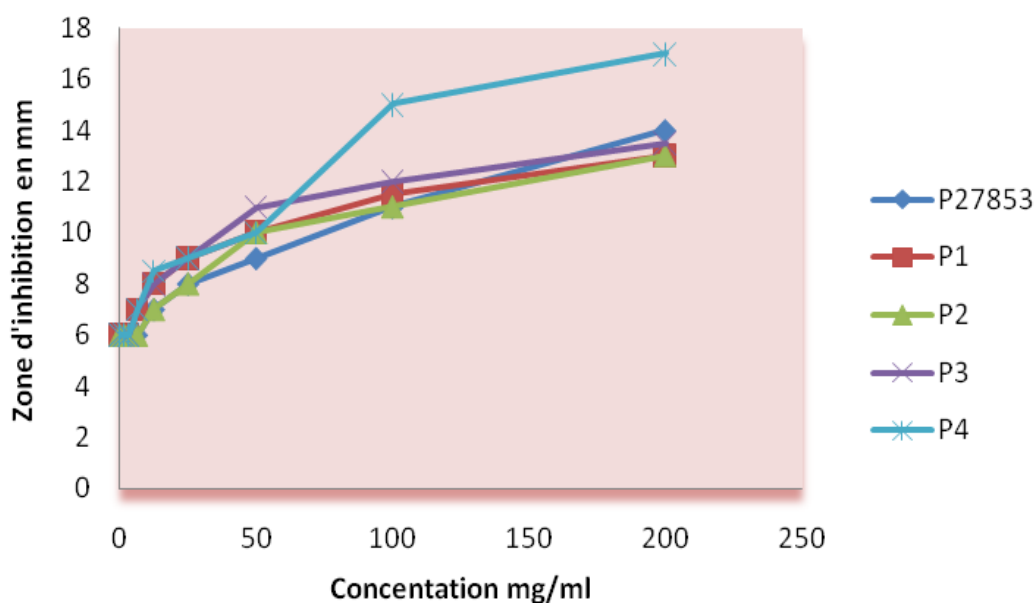


Figure n° 37: Variation des zones d'inhibition de cinq isolats de *P. aeruginosa* en fonction de la concentration d'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*.

V.4.2.2. En milieu liquide :

Les tubes expérimentaux numérotés de C1 à C12 contiennent à la fois *P. aeruginosa* et l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*. Dans ces tubes, on note que les concentrations croissantes en extrait végétal (0,0245 ; 0,0489 ; 0,0977 ; 0,1951 ; 0,3907, 0,7813 ; 1,5625 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,50 ; 25,00 et 50,00 mg/ml) provoquent une diminution progressive et dose-dépendante de la turbidité liée à la croissance de *P. aeruginosa*.

Les différentes valeurs de densité optique due à la croissance *P. aeruginosa* sont présentées dans la figure n° 38. Cette turbidité liée à la quantité de germes présents dans le tube.

La diminution de la turbidité remarquée par l'augmentation de la concentration de l'extrait a été due à l'effet de l'extrait sur la bactérie.

Nous avons noté une absence de la croissance où la valeur $df = di$ à la concentration de 12.5mg/ml, cette concentration correspond à la concentration minimale inhibitrice de l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* sur *P. aeruginosa* testé.

En milieu solide, les disques imprégné par les concentrations inférieur ou égale à 6,25 mg/ml ne produisent aucune zone d'inhibition sur les cultures bactériennes par la majorité des isolats testé de *P. aeruginosa*, puisque un gradient de concentration est obtenu par diffusion de l'extrait à partir de la zone source, aucune inhibition n'est alors observé dans les zones où la concentration d'extrait est inférieur à la CMI, mais ces concentrations (de 0,0489 à 6mg/ml) en milieu liquide montrent un effet sur la croissance de la bactérie où il est détecté par la diminution de turbidité comparativement au témoin.

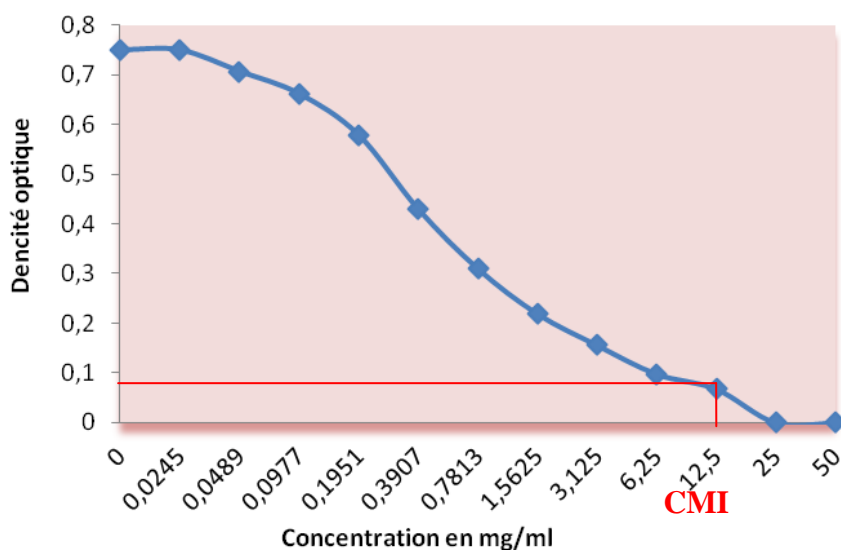


Figure n° 38: Variation de la turbidité induite par la croissance de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en fonction de la concentration en extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*.

V.4.2.3. Concentrations Minimale Bactéricide (CMB) d'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* :

L'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* a montré un pouvoir bactéricide contre *P. aeruginosa* ATCC 27853, à la concentration de 25 mg/ml.

Ce résultat a été confirmé par plusieurs études récentes. (Sudharameshwari *et* Radhika, 2007; Saadabi, 2007; Arun *et al.*, 2010 ; Devi *et al.*, 2010) Dans ces travaux l'activité inhibitrice de

l'extrait méthanolique de henné contre *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres bactéries à coloration de Gram négatif et a coloration de Gram positif a été confirmée.

Cette activité antibactérienne peut être due à la présence de nombreux hydroxyles libres qui ont la possibilité de combiner avec des hydrates de carbone et les protéines dans la paroi bactérienne des cellules, comme ils peuvent s'attacher aux sites actifs d'enzymes et rendre ces dernières inactives (Harborne *et al.*, 1995). Le Lawsonone, le principal constituant bioactif dans *L. inermis*, est connu pour son activité antibactérienne (Shivananda *et al.*, 2007 ; Mostefa-Kara *et al.*, 2010).

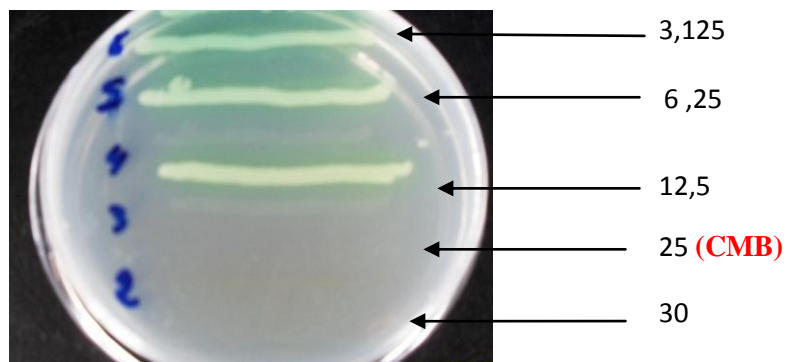


Figure n° 39: CMB d'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*.

V.5. Résultats de l'association de la gentamicine avec l'extrait brut de l'*Allium sativum* et l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* :

Les résultats obtenus (figure n°40, 41 et tableau n°7) montrent que l'association de l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* avec la gentamicine renforce l'activité antimicrobienne de ce dernier contre les cinq isolats de *P. aeruginosa* testés, cette interaction synergique de l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* avec la gentamicine confirme les rapports précédents ce qui prouve que quelques extraits naturels peuvent augmenter l'activité des antibiotiques contre les bactéries comme *Staphylococcus aureus* (Ghaleb *et al.*, 2009).

Contrairement aux résultats précédents la combinaison de l'extrait brut d'*Allium sativum* avec la gentamicine diminue l'activité antibactérienne de ce dernier contre les cinq isolats de *P. aeruginosa* testés. Dans une expérience de Tsao et Yin (2001) les résultats montrent que l'extrait d'ail a un effet synergique en combinaison avec les antibiotiques: Cefotaxime, Gentamicine, Imipénème et Meropénème et ceci contre *P. aeruginosa*.

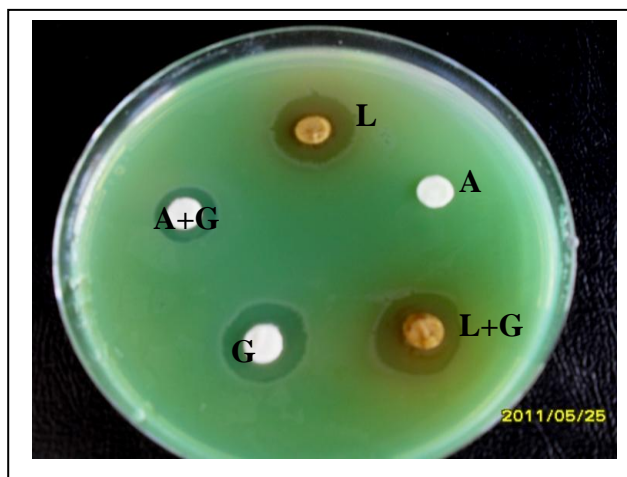


Figure n° 40: Les zones d'inhibition de l'association de gentamicine avec l'extrait brut d'*Allium sativum* et l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*.

Tableau n° 7: Résultat de combinaison de la gentamycine avec l'extrait brut de l'*Allium sativum* et l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*.

La souche	Zone d'inhibition (mm)				
	G 0,20mg/ml	A 10%	L 50mg/ml	G + A	G + L
P ₂₇₈₅₃	13,60 ± 0,42*	07,50 ± 0,54	13,83 ± 0,23	11,75 ± 0,35	14,00 ± 0,70
P ₁	13,60 ± 0,33	07,66 ± 0,62	11,83 ± 0,23	11,66 ± 0,31	13,00 ± 0,81
P ₂	15,90 ± 0,77	07,50 ± 0,40	16,50 ± 0,90	13,00 ± 0,73	17,00 ± 0,70
P ₃	15,54 ± 1,04	07,50 ± 0,40	16,00 ± 0,81	12,00 ± 0,54	17,00 ± 1,00
P ₄	13,12 ± 0,66	07,66 ± 0,47	15,00 ± 1,08	12,50 ± 0,40	15,50 ± 0,73

G : Gentamycine.

A: L'extrait brut de l'*Allium sativum*.

L : L'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*.

* : Ecart type.

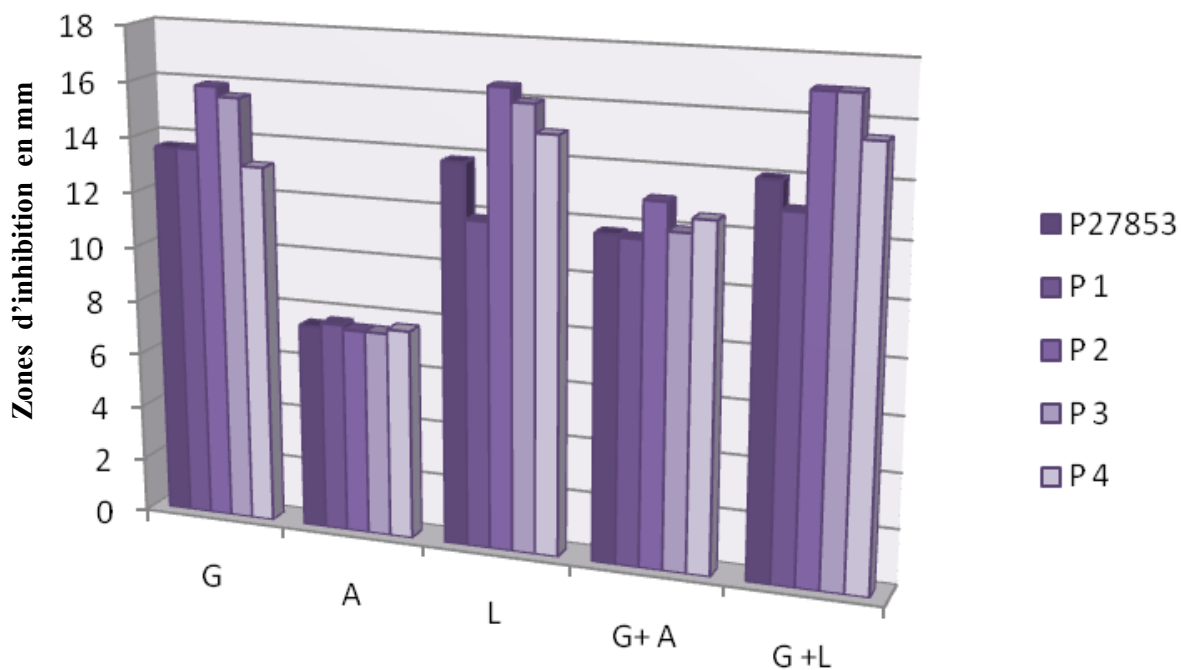


Figure n° 41: Résultat d'association de gentamycine avec extrait brut (jus) de l'*Allium sativum* et extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*. (G : Gentamicine, A : *Allium sativum*, L : *Lawsonia inermis*, G+A: Combinaison de Gentamicine et *Allium sativum*, G+L : Combinaison de Gentamicine et *Lawsonia inermis*).

V.6. L'effet de l'acide salicylique, l'extrait brut de l'*Allium sativum* et l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa* ATCC 27853 :

Les résultats de l'effet de l'acide salicylique, l'extrait brut de l'*Allium sativum* et l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa* ATCC27853 sont montrés dans le tableau n° 8.

V.6.1. L'effet de l'acide salicylique

La densité décroissante de biofilm avec l'augmentation de la concentration de l'acide salicylique est due à l'effet de ce dernier sur sa formation. Cette activité a été démontrée aussi par Mei *et al.* (2010).

La signalisation QS chez *P. aeruginosa* contrôle beaucoup de facteurs de virulence et donc pourrait réguler la formation de son biofilm. Une étude réalisée sur le biofilm de *P. aeruginosa* révèle que le blocage de la signalisation QS permettrait de réduire la formation de biofilm et de diminuer la résistance aux antibiotiques (Adonizio *et al.*, 2008).

D'autres études ont également indiqué que l'acide salicylique (AS) perturbe chacun des trois systèmes de QS (*las*, *rhl*, et *pqs*) de *P. aeruginosa* (Yang *et al.*, 2009). En outre, il a été observé que l'AS change la structure et la composition d'un mutant *lasR* de *P. aeruginosa*. (abrupt par une insertion de Tn à *lasR*) (Yang *et al.*, 2009).

V.6.2. L'effet de l'extrait brut de l'*Allium sativum* et l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis* :

Le but de cette étude est d'étudier l'effet de l'extrait brut d'ail et extrait méthanolique de henné à réduire la formation de biofilm, L'acide salicylique est utilisé comme un témoin positif. Les valeurs ont été déterminées par spectrophotométrie.

Les résultats obtenus prouvent que la quantité de biofilm formé a été diminuée avec l'augmentation de concentration d'extrait de l'*Allium sativum* et d'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*. La comparaison avec le témoin (sans extrait d'ail ou de henné) révèle que les deux extraits testés exercent un effet inhibiteur sur la formation de biofilm.

L'extrait d'ail a montré un effet sur le quorum sensing (quorum sensing inhibiteur : QSI) dans la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* (Rasmussen *et al.*, 2005). Les travaux de Bjarnsholt *et al.* (2005) indique l'effet de l'extrait de l'ail sur *P. aeruginosa* responsable des infections pulmonaires chez les souris de laboratoire. Dans une autre étude, les extraits d'ail ont prouvé leur effet actif contre le biofilm fongique produit par la levure pathogène *Candida albicans* (Shuford *et al.*, 2005). L'analyse des composés actifs responsables des activités antibactérienne a identifié un certain nombre de nouveaux composés qui possèdent des propriétés antibactériennes, alors que deux composés particuliers (le 3-Vinyl-4 H-1,2-dithiine et le 2-Vinyl-4 H-1,3-dithiine) ont montré la capacité de moduler le QS dans des systèmes LuxR sans activité microbicide (Persson *et al.*, 2005).

Cet effet est due peut être a l'action biophysique ou a une répression des gènes entrainant la formation de biofilm en dehors d'une action sur les gènes du QS (Davies *et al.*, 1998 ; Hentzer *et al.*, 2002).

Tableau n° 8: Résultat des effets de l'acide salicylique et l'extrait de l'*Allium sativum* et *Lawsonia inermis* sur la formation de Biofilm par *P. aeruginosa* ATCC 27853.

	T	Acide salicylique		<i>Allium sativum</i>			<i>Lawsonia inermis</i>		
		C1	C2	C1	C2	C3	C1	C2	C3
		1mg/ml	2mg/ml	06%	08%	25%	12,5mg/ml	16mg/ml	25mg/ml
R1	1,718*	1,200	0,645	1,012	1,162	0,908	1,406	0,822	0,722
R2	1,300	1,192	0,932	1,600	0,705	0,824	1,356	0,991	0,991
R3	1,700	1,150	0,980	1,500	1,048	0,814	1,224	1,374	0,874
R4	1,490	1,334	0,619	0,958	0,980	0,708	1,390	1,216	1,053
M	1,552	1,219	0,794	1,282	0,971	0,813	1,396	1,100	0,910
x	±0,170	±0,069	±0,163	±0,285	±0,168	±0,071	±0,088	±0,210	±0,126

* : Densité optique.

x : Ecart type.

M : Moyenne.

R : Répétition.

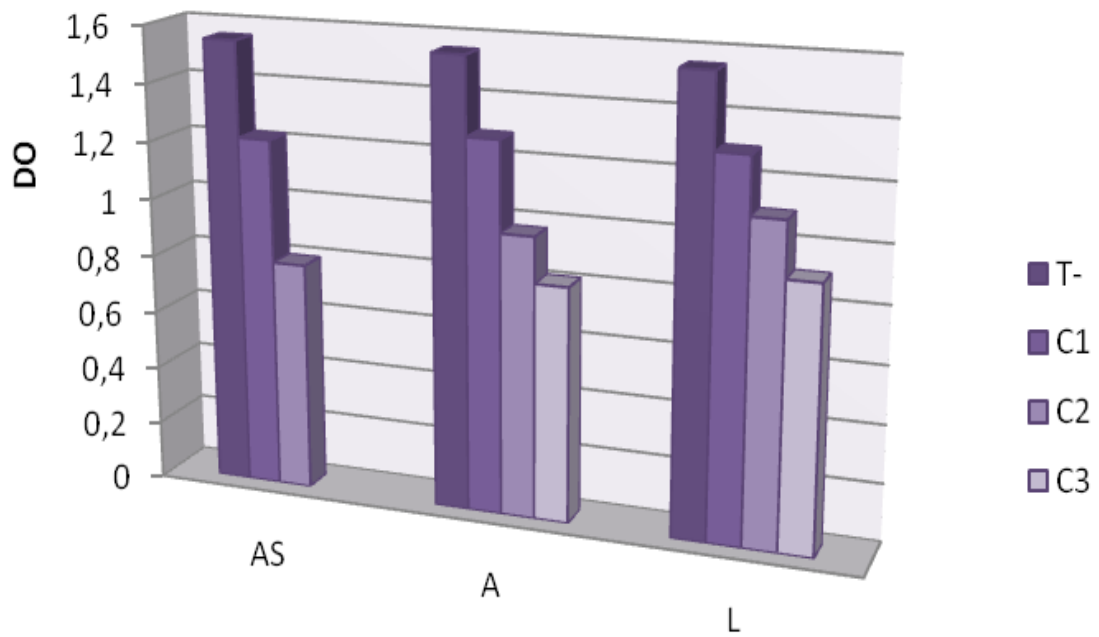


Figure n° 42: Variation de la quantité de biofilm formé par *P. aeruginosa* en fonction de la variation de concentration de AS : Acide salicylique, A : jus d'*Allium sativum* et L : l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*.

Conclusion

Conclusion

P. aeruginosa est invasif, toxigène et considéré comme une cible difficile en chimiothérapie anti-infectieuse, en raison de sa capacité d'acquiescer des nouveaux mécanismes de résistance suite à l'exposition à des traitements antibiotiques, notamment la formation de biofilm et son implication pathologique où elle devient inaccessible aux antibiotiques et aux cellules du système immunitaire.

Nous avons étudié l'effet de trois plantes sur la *P. aeruginosa* et sur sa formation de biofilm. Ces trois plantes, *Aloe vera*, *Allium sativum* et *Lawsonia inermis*, ont été choisies pour cette étude par leur utilisation dans les différentes infections, tant bien chez l'homme que chez l'animal.

Dans cette étude, il ressort que nos extraits de trois plantes ont présenté une action antibactérienne variable contre les isolats de *P. aeruginosa*.

Cet effet antibactérien est faible pour l'extrait éthanolique de l'*Aloe vera* par la méthode décrite par Pawar *et al.* en 2005 et nulle pour le gel pur et l'extrait éthanolique selon la méthode décrite par Alkhail en 2005. Cette activité on la trouve élevée avec le jus d'ail mais faible pour son extrait organique.

On a remarqué aussi que l'ail à l'état frais beaucoup plus actif que l'ail sous forme sèche (bulbes).

Le henné a montré un effet élevé sur les souches de *P. aeruginosa*.

D'après nos résultats, la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide sont situées autour de 6% et 8% respectivement pour l'extrait brut de l'*Allium sativum* et 12,5mg/ml et 25mg/ml respectivement pour l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*.

L'association entre les extraits utilisés et la gentamycine a montré un effet positif avec l'extrait de *Lawsonia inermis*, dont les zones d'inhibition ont augmenté par rapport aux zones obtenues par la gentamycine seule. Cette étude suggère probablement la possibilité d'une utilité concourante de l'extrait de henné et gentamycine en association dans le traitement des infections provoquées par *P. aeruginosa* où elle ne peut altérer l'activité antibactérienne de cet antibiotique.

Les résultats obtenus indiquent que l'effet le plus remarquable des extraits utilisés est celui de leur inhibition de la formation de biofilm.

Dans ce travail, on a prouvé que le jus d'ail et l'extrait méthanolique de henné et l'acide salicylique possèdent un effet inhibiteur sur la quantité de biofilm formé par *P. aeruginosa*, en plus de l'effet sur sa croissance.

En perspectives, les recommandations suivantes sont suggérées:

Etablir des études chimiques des extraits des plantes pour pouvoir connaître leur composition et comprendre leur mode d'action.

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

Les résultats sur l'activité d'antibiofilm restent préliminaires et donc nécessite des tests plus avancés *in vitro* mais aussi *in vivo* pour plus de confirmation.

Annexe

Annexe

Les milieux de culture

Gélose nutritive (GN):

Peptone :.....	6g
Extrait de viande:	1g
Extrait de levure :.....	2g
NaCl:	5g
Agar:	20g
Eau distillée :.....	1000mL
pH :.....	7,2

King B solide

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

King A solide

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

Bouillon nutritif

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

Milieu Mueller Hinton liquide

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

Références bibliographiques

Référence bibliographique

- **Abubakar, EL-m.M.** (2009). Efficacy of crude extracts of garlic (*Allium sativum* Linn.) against nosocomial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Medicinal Plants Research*, **3**(4): 179-185.
- **Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M.I. and Prince, A.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **30**: 627-634.
- **Adams, S.P., Leitch, I.J., Bennett, M.D., Chase, M.W. and Leitch, A.R.** (2000). Ribosomal DNA evolution and phylogeny in *Aloe* (Asphodelaceae). *American Journal of Botany*, **87**: p 1578-1583.
- **Adonizio, A., Kong, K. and Mathee, K.** (2008). Inhibition of quorum-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plants extracts. *Antimicrob Agents Chemother.* **52** (1): 198-203.
- **Aendekerk, S., Diggle, S.P., Song, Z., Høiby, N., Cornelis, P., Williams, P., Cámara, M.** (2005). The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiol.* **151** (4): 1113-1125.
- **Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P. and Baysse, C.** (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* **148** (Pt 8): 2371-81.
- **Afzal M , G Al-oriquat , IM Al- Hassan , N Muhammad ,** (1980). *Heterocycles.* **14**, 1973.
- **Afzal M, IM Al-Hassan , N Muhammad .** (1984). *Heterocycles*, **22**. 813.
- **Agarry O.O., Olaleye M.T. and Bello-Michael, C.O.** (2005). Comparative antimicrobial activities of *aloe vera* gel and leaf *African Journal of Biotechnology* Vol. **4** (12), pp. 1413-1414, December.
- **Ahmed I, Aquil F and Shafiullah R.A.K .** (2003). Antibacterial and antifungal properties of crude alcoholic extract and fractions of *Lawsonia inermis*, proceedings of first national interactive meet on medicinal & aromatic plants, IMAP, Lucknow, UP, India, 364-369.
- **Ahmoud Z,NA Salam ,SM Khafegy ,** (1980). *Fitoterapia*, **153**.
- **Aires, J. R., Köhler, T., Nikaido, H. and Plesiat, P.** (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **34** (11): 2624-8.

- **Akasaka, T., Tanaka, M., Yamaguchi, A. and Sato, K.** (2001). Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **45** (8): 2263-8.
- **Ali NAA, Julich WD, Kusnick C, Lindequist U.** (2001). Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *J Ethnopharmacol.*; **74** (2):173-179.
- **Alkhail AA.** (2005). Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi. *Pak. J. Biol. Sci.*, P 413-417.
- **Allen, L., Dockrell, D.H., Pattery, T., Lee, D.G., Cornelis, P., Hellewell, P.G. and Whyte, M.K.** (2005). Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol.* **174**: 3643-3649.
- **Amagase H, Petesch BL, Matsuura H, Kasuga S and Itakura Y.** (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *Journal of Nutrition.* **131**: 955s-962s.
- **ANONYME.** (2009). Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie (SFM), recommandations.
- **ANONYME.** (2007). Institut national de veille sanitaire, enquête national de prévalence des infections nosocomiales, juin 2006. Rapport de janvier 2007. 1-45.
- **ANONYME.** (1996). Pharmacopiea of India (The Indian Pharmacopiea), 3rd edition, Govt. of India, New Delhi, Ministry of Health and Family Welfare.
- **Arevalo-Ferro, C., Hentzer,M., Reil,G., Gorg,A., Kjelleberg,S., Givskov,M., Riedel,K., and Eberl,L.** (2003). Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics *Environ Microbiol.* **5**: 1350-1369.
- **Arun P., K.G.Purushotham, Johnsy jayarani J and Dr.vasantha kumari** (2010). In vitro Antibacterial activity and Flavonoid contents of *Lawsonia inermis* (Henna) Vol.2, No.2, pp 1178-1181.
- **Asikyan, M.L., Kus, J. V. and Burrows, L. L.** (2008). Novel proteins that modulate type IV pilus retraction dynamics in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **190**: 7022-7034.
- **Atal CK, JB Srivastava , BK Wali , RB Chakraborty , BN Dhawan ,RP Rastogi , Ind. J.** (1978). *Exp.Biol.* 330.
- **Aubron C, Poirel L, Fortineau N, Nicolas P, Collet L, Nordmann P.** (2005). Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the metallo-beta-

lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. *Microb Drug Resist.* **11**: 254-259.

- **Azghani, A.O., Miller, E.J., Peterson, B.T.** (2000). Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung.* **178**: 261-269.
- **BACHMANN, Janet** (2008). *Garlic Organic Production*, National Center for Appropriate Technology, une publication d'ATTRA, États-Unis. [En ligne] www.attra.ncat.org.
- **Bakri IM, Douglas CWI.** (2005). Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Arch Oral Biol.* **50**: 645-651.
- **Barak M., Ettehad G.H., Arab R., Derakhshani F., Habibzadeh S.H., Mohammadnia H., Dailami P., Daryani A. and Zarei M.** (2007). Evaluation of Garlic Extract's (*Allium sativum*) Effect on Common Pathogenic Research Journal of Biological Sciences **2** (3): 236-238.
- **Bardy, S.L., Ng, S.Y., Jarrell, K.F.** (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiol.* **149** (2): 295–304.
- **Barker, A. P., Vasil, A. L., Filloux, A., Ball, G. Wilderman, P.J. and Vasil, M. L.** (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis *Mol. Microbiol.* **53**: 1089-1098.
- **Bauman, R.W.** (2006). *Microbiology*. Alternate edition. Pearson Benjamin Cummings Inc, San Francisco.
- **Benhamou, D.** (1996). [Combined spinal and epidural anesthesia or epidural anesthesia in obstetrics?]. *Cah. Anesthesiol.* **44**: 157-158.
- **Bernadet M.** (2000). *Phyto-aromathérapie pratique, plantes médicinales et huiles essentielles*, Editions Dangles.
- **Bert, F. and Lambert-Zechovsky, N.** (1996). Comparative distribution of resistance patterns and serotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care units and other wards. *J Antimicrob Chemother* **37**(4): 809-13.
- **Berthelot, P., Grattard, F., Mallaval, F.O., Ros, A., Lucht, F. and Pozzetto, B.** (2005). [Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*]. *Pathol Biol (Paris)*. **53**: 341-348.
- **Bertrand, C. A. and R. A. Frizzell.** (2003). The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **285**: C1-18.
- **Bezanger-Beauquesne L, Pinkas M, Torck M et Troutin F.** (1990). *Plantes médicinales des régions tempérées*. Maloine édition.

- **Bhardwaj DK, Murari R, Seshadri TR, Singh R.** (1976). Lacoumarin fro *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*. **15**: 1789.
- **Bhardwaj DK, Seshadri TR, Singh R.** (1977). Xanthones from *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*. **16**: 1616-1617.
- **Bhardwaj DK, Jain RK, Jain BC, Mehta CK.** (1978). 1-hydroxy-3, 7- dimethoxy-6-acetoxy xanthone a new xanthone from *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*. **17**: 1440-1441.
- **Biyiti L.F., Meko'o DJ.L, Tamzc v., Amvam Zollo P.H.** (2004). Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharm. Méd. Trad. Afr.* Vol.**13**, pp.11-20.
- **Bjarnsholt, T., Jensen, P. O., Rasmussen, T. B., Christophersen, L., Calum, H., Hentzer, M., Hougen, H. P., 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.
- **Bjarnsholt, T., P. Ostrup Jensen, M. Burnotte, M. Hentzer, J.A.J. Haagensen, H. P. Hougen, H. Calum, K. G. Madsen, C. Moser, S. Molin, N. Hoiby, and M. Givskov.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology* **151**: 373-83.
- **Bleves, S., Soscia, C., Nogueira-Orlandi, P., Lazdunski, A., Filloux, A.** (2005). Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* **187**(11): 3898-3902.
- **Block E.** (1992). The organosulfur chemistry of the genus *Allium*. Implications for the organic chemistry of sulphur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **31** (9): 1135-1178.
- **Bodey, G. P., R. Bolivar, V. Fainstein, and L. Jadeja.** (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* **5**: 279-313.
- **Borriello, G., Werner, E., Roe, F., Kim, A. M., Ehrlich, G. D. and Stewart, P.S.,** (2004). Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of in biofilms. **48** (7): 2659-64.
- **BRUNETON, Jean .** (1987). *Eléments de phytochimie et de pharmacognosie* Paris: Technique et Documentation-Lavoisier, 585 p.
- **Bruneton. J.** (1993). *Pharmacognosie – Phytochimie et plantes médicinales*. 2ème édition Lavoisier–Paris. pp 363-364-467-474.
- **BRUNETON, Jean.** (1999). *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales* Paris: Tec & Doc; Cachan: EM inter, 1120 p.

- **Bryan, R., Kube, D., Perez, A., Davis, P. and Prince, A.** (1998). Overproduction of the CFTR R domain leads to increased levels of asialoGM1 and increased *Pseudomonas aeruginosa* binding by epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **19**: 269-277.
- **Byrd, M.S., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Lu, H., Sprinkle, A.B., Richardson, S.H., et al** (2009). Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol Microbiol.* **73**: 622-638.
- **Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C.** (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.*, **100**: 553-559.
- **Chakraborty T, Podder G, Deshmukh SK.** (1977). Triterpenoids and other constituents of *Lawsonia inermis*. Indian Journal of Chemistry Section B Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry. **15**: 96-97.
- **Choi, S.; Chung, M-H.** (2003). A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects. *Semin. Integr. Med.* **1**: 53-62.
- **Chuanchuen, R., Narasaki, C. T. and Schweizer, H. P.** (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not efflux of triclosan. *J Bacteriol* **184** (18): 5036-44.
- **Chugani, S.A., Whiteley, M., Lee, K.M., D'Argenio, D., Manoil, C., Greenberg, E.P.** (2001). QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98** (5): 2752-2757.
- **Cobb, L.M., Mychaleckyj, J.C., Wozniak, D.J. and Lopez-Boado, Y.S.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. *J Immunol.* **173**: 5659-5670.
- **CORZO-MARTÍNEZ, M., CORZO, N. & VILLAMIEL, M.** (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, **18**: 609–625.
- **Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P.** (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- **Cowan MM.** (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews.* **12**: 564-582.
- **Dagne, E; Bisrat, D; Viljoen, A.; Van Wyk, B-E.** (2000). Chemistry of Aloe species. *Curr. Org. Chem.***4**: 1055-1078.

- **D'Argenio, D.A. Calfee, M.W., Reiney, P.B., and Pesci, E.C.** (2002). Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants *J. Bacteriol.* **184**: 6481-6489.
- **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. *Mol Cell Biochem* **245**: 11–22.
- **Davey, M.E., Caiazza, N.C., O'Toole, G.A.** (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* **185** (3): 1027-1036.
- **Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and Greenberg, E.P.** (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* **280**: 295-298.
- **Dean, C. R., Visalli, M. A., Projan, S. J., Sum, P. E. and Pradford, P. A.** (2003). Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* **47** (3): 972-8.
- **De Bentzmann, S., Roger, P., Dupuit, F., Bajolet-Laudinat, O., Fuchey, C., Plotkowski, M.C. and Puchelle, E.** (1996). Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect Immun.* **64**: 1582-1588.
- **De Kievit, T., Seed, P.C., Nezezon, J., Passador, L., Iglewski, B.H.** (1999). RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **181** (7): 2175-2184.
- **Deresse Daka.** (2009). Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: An *in vitro* study African Journal of Biotechnology Vol. **10** (4): pp. 666-669.
- **Devi, K., G. Karthikai Devi, G. Thirumaran, R. Arumugam and P. Anantharaman.** (2010). Antibacterial Activity of Selected Medicinal Plants from Parangipettai Coastal Regions; Southeast Coast of India Academic Journal of Plant Sciences **3** (3): 122-125.
- **Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lépine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Xiao, G., Rahme, L.G.** (2005). The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing regulated genes are modulated without affecting *lasRI*, *rhlRI* or the production of Nacyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol.* **55** (4): 998-1014.
- **Didry N, Pinkas M, Dubreil L.** (1968). Activite antibacterienne de naphthoquinones d'origine vegetale. *Ann. Pharmaceut. Franc.* **44**: 73-78.

- **Di Mango, E., Zar, H.J., Bryan, R., Prince, A.** (1995). Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest.* **96**: 2204–2210
- **Diggle, S.P., Stacey, R.E., Dodd, C., Camara, M., Williams, P. and Winzer, K.** (2006). The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol.* **8**: 1095-1104.
- **Drenkard, E.** (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbe Infect* **5** (13): 1213-9.
- **Dubern, J.F. and Diggle, S.P.** (2008). Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst.* **4**: 882-888.
- **Dwivedi C, John LM, Schmidt DS and Engineer FN** (1998). Effects of oil-soluble organosulfur compounds from garlic on doxorubicin-induced lipid peroxidation. *Anti-Cancer Drugs.* **9**: 291-294.
- **El’Garch, F., Jeannot, K., Hocquet, D., Llanes-Barakat, C. and Plesiat, P.** (2007). Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(3): 1016-21.
- **Engel, J. and Balachandran, P.** (2009). Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol.* **12**: 61-66.
- **Ernst, R.K., Hajjar, A.M., Tsai, J.H., Moskowitz, S.M., Wilson, C.B., Miller, S.I.** (2003). *Pseudomonas aeruginosa* lipid diversity and its recognition by toll like receptor 4. *J Endotoxin Res.* **9**: 395-400.
- **Ernst, R.K., Moskowitz, S.M., Emerson, J.C., Kraig, G.M., Adams, K.N., Harvey, M.D., et al.** (2007). Unique lipid modifications in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from the airways of patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* **196**: 1088-1092.
- **Espinosa-Urgel, M.** (2003). Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. *J Bacteriol.* **185** (3): 699-700.
- **Estrellas, P. S., Jr., L. G. Alionte, and J. A. Hobden.** (2000). A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a contact lens-induced acute red eye (CLARE) is protease-deficient. *Curr. Eye Res.* **20**:157-165.
- **Esua, M. F., Rauwald, J. W.,** (2006). Novel bioactive maloyl glucans from Aloe vera gel: isolation, structure elucidation and in vitro bioassays. *Carbohydr. Res.* **341**: P 355-364.

- **Evans, J. C. and Segal, H.** (2007). A novel insertion sequence, ISPA26, in *oprD* of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with carbapenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(10): 3776-7.
- **Fagerlind, M.G., Rice, S.A., Nilsson, P., Harlén, M., James, S., Charlton, T., Kjelleberg, S.** (2003). The role of regulators in the expression of quorum-sensing signals in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **6** (2): 88-100.
- **Falagas, M. E. and kasiakou, S. K.** (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* **40** (9): 1333-41.
- **Faure, K., R. Leberre, and B. Guery.** (2006). [*Pseudomonas aeruginosa* and Surfactant associated Proteins A and D]. *Med. Mal Infect.* **36**: 63-71.
- **Feldberg, R.S., Chang, S. C., Kotik, A. N., Nadler, M., Neuwirth, Z., Sundstrom, D.C. & Thompson, N.H.,** (1988). In vitro mechanism of inhibition of bacteria cell growth by allicin. *Antimicrobials Agents Chemotherapy*, **32**: 1763-1768.
- **Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H. and Prince, A.** (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun.* **66**: 43-51.
- **Femenia, A.; Sanchez, E.S.; Simal, S.; Rosello, C.** (1999). Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydr. Polym.*, **39**: 109-117.
- **Filloux, A. and Vallet, I.** (2003). [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci (Paris).* **19**: 77-83.
- **Fuqua C. & Greenberg, E.P.** (2002). Listening in on bacteria: acylhomoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell. Biol.* **3**: 685-695.
- **Galani I., Xirouchaki E., Kanellakopoulou K., Petrikkos G and Giamarellon H.** (2002). Transferable plasmid mediating resistance to multiple antimicrobiol agents in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Greece. *Clin Microbiol Infect* **8**: 579-588.
- **Galimand, M., Courvalin, P. and Lambert, T.** (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(8): 2565-71.
- **Gallagher, L. M., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C. and Manoil, C.** (2002). Function required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa* *J. Bacteriol.* **184**: 6472-6480.

- **Gambello, M.J. & Iglewski, B.H.** (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol.* **173** (9): 3000-3009.
- **Gbolade AA.** (2009). Inventory of antidiabetic plants in selected districts of Lagos State, Nigeria. *J Ethnopharmacol* **121**: 135–139.
- **Germ, M., Yoshihara, E., Yoneyama, H. and Nakae, T.** (1999). Interplay between the efflux pump and the outer membrane permeability barrier in fluorescent dye accumulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun.* **261**: 452-455.
- **Ghaleb Mohamma Adwan, Bassam Ali Abu-shanab and Kamel Mohammad Adwan.** (2009). *In vitro* activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections African Journal of Biotechnology Vol. **8** (17): pp. 4239-4241.
- **Girlich, D., Naas, T. and Nordmann, P.** (2004). Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrob Agents Chemother **48** (6): 2043-8.
- **GIRRE, Loïc.** (2001). Les plantes et les médicaments: l'origine végétale de nos médicaments Paris: Delachaux et Niestlé, 253 p.
- **Giske, C. G., Buaro, L., undsfjord, A. and Wretlind, B.** (2008). Alterations of porin, pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Microb Drug Resist **14** (1): 23-30.
- **Goldberg, J. B., Pier, G. B.** (1996). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis. *Trends Microbiol.* **4**: 490-494.
- **Govan J. R. W. & Deretic V.** (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* **60**: 539-574.
- **Grieve M.,** (2005). www.botanical.com/botanical/mgmh/h/henna-24.html.
- **GRUN-THOMA.** (1998). Stéphanie Etude de trois plantes médicinales et condimentaires : l'ail, le safran, le romarin Th. : Pharm. : Nancy 1 : 63. 137 f.
- **Guan, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M. and Miller, S. I.** (1998). PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol* **27**(6): 1171-82.
- **Gupta S, Ali M, Alam MS.** (1993). A naphthoquinone from *Lawsonia inermis* stem bark. *Phytochemistry.* **33**: 723-724.

- **Gupta S, Ali M, Alam MS, Sakae T, Niwa M.** (1992). A new aliphatic hydrocarbon from *Lawsonia inermis* bark. Indian Journal of Chemistry Section B Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry. **31**:705-707.
- **Gupta S, M Ali, MS Alam, M Niwa, T Sakai.** (1994). Natl. Prod. Lett. **4**, 195.
- **Habbal OA, Ai-Jabri AA, El-Hag AH, Al-Mahrooqi ZH, Al- Hashmi NA.** (2005). *In-vitro* antimicrobial activity of *Lawsonia inermis* Linn (henna) - A pilot study on the Omani henna. Saudi Medical Journal. **26**:69-72.
- **Handa G, Kapil A, Sharma S, Singh J.** (1997). Lawnermis acid a new anticomplementary tri-terpenoids from *Lawsonia inermis* seeds. Indian J Chem Sect B. **36**(3):252-256.
- **Harborne, J.B.** (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. 3rd edition. Chapman & Hall Pub. London, UK.
- **Harborne, S.B., Baxter, A.** (1995). *Phytochemical Dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants*. Tylor and Francis. London.
- **Hatchette, T. F., R. Gupta, and T. J. Marrie.** (2000). *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia in previously healthy adults: case report and review of the literature. Clin. Infect. Dis. **31**:1349-1356.
- **He, J., Baldini, R.L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., et al.** (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**: 2530-2535.
- **Heck, L.W., Alarcon, P.G., Kulhavy, R.M., Morihara, K., Russell, M.W., Mestecky, J.F.** (1990). Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J Immunol*. **144**: 2253-2257.
- **Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W. and Wiedemann, B.** (2007). Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(11): 4062-70.
- **Hentzer, M., K. Reidel, T. B. Rasmussen, A. Heydorn, J. B. Anderson, M. R. Parsek, S. A. Rice, L. Ebert, S. Molin, N. Hoiby, S. Kjelleberg and M. Givskow.** (2002). Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated fuanone compound. *Microbiology* **148**: 87 102.
- **Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. and Parsek, M.R.** (2001). Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol*. **183**: 5395-5401.

- **Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., Manefield, M., Costerton, J.W., Molin, S., Eberl, L., Steinberg, P., Kjelleberg, S., Hoiby, N., Givskov, M.** (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* **22** (15): 3803-3815.
- **Herz, J., Kowal,R.C., Goldstein,J.I., and Brown,M.S.** (1990). Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment *EMBO J.* **9**: 1769-1776.
- **Ho, P. L., W. M. Tang, K. S. Lo, and K. Y. Yuen.** (1998). Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* following an injury inflicted by a stingray. *Scand. J. Infect. Dis.* **30**: 192-193.
- **Hong, Y.Q., Ghebrehiwet, B.** (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol.* **62**: 133-138.
- **Hooper, D. C.** (2001). Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg Infect Dis* **7** (2): 337-41.
- **Hueck, C. J.** (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants *Microbiol.Mol.Biol.Rev* **62**: 379-433.
- **Imamura, Y., Yanagihara, K., Tomono, K., Ohno, H., Higashiyama, Y., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mizuta, Y., Kadota, J., Tsukamoto, K., Kohno, S.** (2005). Role of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems in a mouse model of chronicrespiratory infection. *J Med Microbiol.* **54** (6): 515-518.
- **Imberty, A., wimmerova, M., Mitchell, E.P. and Gilboa-Garber, N.** (2004). Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect,* **6**: 221-228.
- **Imberty, A., Wimmerova, M., Sabin, C., and Mitchell, E. P.** (2006). Structures and Roles of *Pseudomonas aeruginosa* Lectins. In: Bewley, C. (ed). *Protein-Carbohydrate Interactions in Infectious Diseases*, Royal Society of Chemistry.
- **Imundo, L., Barasch, J., Prince, A. and Al-Awqati, Q.** (1995). Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 3019-3023.
- **Iwalokun B.A., Ogunledun A.,Ogbolu D.O., Bamiro S.B.,and Jimi-Omojola J.** (2004). *In Vitro* Antimicrobial Properties of Aqueous Garlic Extract Against Multidrug-Resistant Bacteria and *Candida* Species from Nigeria *J Med Food* **7** (3): 327-333.
- **Jaber MA, Al-Mossawi A.** (2007). Susceptibility of some multiple resistant bacteria to garlic extract. *Afr. J. Biotechnol.* **6** (6): 771-776.

- **Jacoby George A., Mills Debra M and Chow N.** (2004). Role of β -lactams and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrobiol Chemother* **51**: 3203-3206.
- **Jalal, S., Ciofu, O., Hoiby, N., Gotoh, N. and Wretlind, B.** (2000). Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **44** (3): 710-2.
- **Jalal, S. and Wretlind, B.** (1998). Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb of Drug Resist* **4** (4): 257-61.
- **Jean-Michel Hurtel** (2001). L'ail allium savitum. *Plantes et médecine*. [web] Accès : <http://www.phytomania.com/ail.htm>
- **Jensen, P.O., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T.B., Calum, H., Christoffersen, L., et al.** (2007). Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum sensing- controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. **153**: 1329-1338.
- **Johansen, H. K., Moskowitz, S. M., Ciofu, O., Pressler, T. and Hoiby, N.** (2008). Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* **7** (5): 391-397.
- **Jonkers D, Van Den Broek E, Van Dooren I, Thijs C, Dorant E, Hageman G and Stobberingh E.** (1999). Antibacterial effect of garlic and omeprazole on *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **43**: 837-839.
- **Josias H., Humman.** (2008). Composition and Application of *Aloe vera* leaf gel.
- **Kessler, E., M. Safrin, W. R. Abrams, J. Rosenbloom, and D. E. Ohman.** (1997). Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J. Biol. Chem.* **272**: 9884-9889.
- **Khan MM, N Singh, KN Dhavan,** (1997). *Chem. Abstr.* 126.
- **Khan, T. Z., J. S. Wagener, T. Bost, J. Martinez, F. J. Accurso, and D. W. Riches.** (1995). Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **151**:1075-1082.
- **Kipnis, E., Sawa, T. and Wiener-Kronish, J.** (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect.* **36**: 78-91.
- **Klinger. C, Filloux. A. and Lazdunski.A.** (2005). Les biofilms, forteresses bactériennes. *La recherche* **389**: 42-46.
- **Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L. K. and Pechere, J. C.** (1997). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol-Microbiol* **23** (2): 345-54.

- **Köhler, T., Van Delden, C., Curty, L.K., Hamzehpour, M.M., Pechere, J.C.** (2001). Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **183** (18): 5213-5222.
- **Kohler, T., L. K. Curty, F. Barja, D. C. van, and J. C. Pechere.** (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* **182**: 5990-5996.
- **Kon, Y., Tsukada, H., Hasegawa, T., Igarashi, K., Wada, K., Suzuki, E., Arakawa, M., Gejyo, F.** (1999). The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **25**: 313-321.
- **Kong, K. F., Jayawardena, S. R., Del Puerto, A., Wiehlmann, L., Laabs, U., Tummler, B. and Mathee, K.** (2005). Characterization of *poxB*, chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinae. *Gene* **358**: 82-92.
- **Kostakioti, M., Newman, C.L., Thanassi, D.G. and Stathopoulos, C.** (2005). Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J Bacteriol.* **187**: 4306-4314.
- **Kownatzki, R., Tummler, B. and Doring, G.** (1987). Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet.* **1**: 1026-1027.
- **Kumar S., Singh Y. V., & 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](#). pp. 11–12. [OCLC 124036118](#).
- **Kwon, D. H. and Lu, C. D.** (2006). Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (5): 1615-22.
- **Lamont I.L., Beare P.A., Ochsner U., Vasil A.I. et Vasil M.L.** (2002). Siderophore mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad sci USA* ; **99** (10): 7072-7.
- **LANGMEAD, L., MAKINS, R.J. & RAMPTON, D.S.** (2004). Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* gel in human colorectal mucosa *in vitro*. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, 521–527.
- **Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., Kong, F.** (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med.* **10**: 599-606.
- **Laughlin, R.S., Musch, M.W., Hollbrook, C.J., Rocha, F.M., Chang, E.B. and Alverdy, J.C.** (2000). The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis. *Ann Surg*, **232**: 133-142.

- **Lazdunski, A.** (2003). [*Pseudomonas aeruginosa*: a model of choice for the study of opportunistic pathogen]. *Ann Fr Anesth Reanim.* **22**: 523-526.
- **Lazdunski, A., Guzzo, J., Filloux, A., Bally, M. and Murgier, M.** (1990). Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.* **72**: 147-156.
- **Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J.N., Lazdunski, A.;** (2003). Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol.* **48**(1): 199-210.
- **Legakis, N. J., Tzouveleakis, L. S., Makris, A. and Kotsifaki, H.** (1989). Outer membrane alterations in multiresistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* selected by ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **33**(1): 124-7.
- **Leva E, Amarb Z.** (2008). "Fossils" of practical medical knowledge from medieval Cairo. *J Ethnopharmacol* **119**: 24–40.
- **Li, X. Z., Ma, D., Livermore, D. M. and Nikaido, H.** (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **38**(8): 1742-52.
- **Li, X. Z., Nikaido, H. and Poole, K.** (1995). Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(9): 1948-53.
- **Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T.** (2003). A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **52**(4): 572-5.
- **Lillehoj, E.P., Kim, B.T., Kim, K.C.** (2002). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **282**: 751-756.
- **Livermore, D. M.** (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**(4): 557-84.
- **Livermore, D.M.** (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*, **34**: 634-640.
- **Loake, G., Grant, M.** (2007). Salicylic acid in plant defence—the players and protagonists. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**: 466–472.
- **Lyczak, J.B., Cannon, C.L. and Pier, G.B.** (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* **2**: 1051-1060.
- **MacFaddin, J. F.** (2000) . *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. 2nd ed. William and Wilkins Comp. Baltimore.

- **Magnet, S. and Blanchard, J. S.** (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* **105**(2): 477-98.
- **Mah.T.F, Betsey.P, Pellock.B, Walker.G.C, Stewart.P.S, and O'Toole.G.A.** (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426**: 306-310.
- **Mao, W., Warren, M.S., Black, D.S., Satou, T., Murata, T., Nishino, T., et al.** (2002). On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition. *Mol Microbiol.* **46**: 889-901.
- **Marc EB, Nelly A, Annick DD, Frederic D.** (2008). Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *J Ethnopharmacol* **120**: 315–34
- **Mariencheck, W.I., Alcorn, J.F., Palmer, S.M., Wright, J.R.** (2003). *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **28**(4): 528-537.
- **Mashburn, L. M., A. M. Jett, D. R. Akins, and M. Whiteley.** (2005). Staphylococcus aureus serves as an iron source for Pseudomonas aeruginosa during in vivo coculture. *J. Bacteriol.* **187**:554-566.
- **Masterton RG, Turner PJ.** (2006). Trends in antimicrobial susceptibility in UK centres: the MYSTIC Programme (1997-2002). *Int J Antimicrob Agents.*; **27**: 69-72.
- **Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H. and Nishino, T.** (2000). Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(9): 2242-6.
- **Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J.M., Koehrsen, M., et al** (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**: 3100-3105.
- **Mei Lin Da, Aron K. Heroux, Zahra Pakzad, and Karl F.E.S.** (2010). *Schiffmacher Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* Vol **14**: 69-73.
- **Mérens, A., Llanes, C., Pourcel, C., Roussel-Delvallez, M., Vergnaud, G., Cavallo, J. D. and Plésiat, P.** (2009). Resistance and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients: a French multi-centre study. *ECCMID Poster* 1505.
- **Mijatovic, S., Maksimovic-Ivanic, D., Radovic, J., Miljkovic, D., Harhaji, L., Vuckovic, O., Stosic-Grujicic, S., Mostarica Stojkovic, M. and Trajkovic, V.** (2005). Anti-glioma action of aloe emodin : the role of ERK inhibition. *Cell. Mol. Life Sci* **62**, P589-598.

- **Mima, T., Sekiya, H., Mizushim, T., Kuroda, T. and Tsuchiya, T.** (2005). Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps Mex PQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa* *Microbiol immunol* **49**(11): 999-1002.
- **Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T. and Tsuchiya, T.** (1999). Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(2): 4157.
- **Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y. and Tulkens, P. M.** (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(4): 415-7.
- **Moreira, L.R.S., Filho, E.X.F.** (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl. Microbiol. Biotechno*, **79**: P 165-178.
- **Moroh J. L. A., Bahi C, Dje K., Loukou Y. G., Guede-Guina A F.** (2008). Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance in vitro des souches d'*Escherichia coli* ; P 44-61.
- **Mostefa-Kara, B., C. Ziani-Cherif, M. Benabdallah, N. M. Rahmoun, D. Villemin, N.Choukchou-Braham and K. Boucherit.** (2010). *Der Pharma Chemica*, 2, 14.
- **Mouneimne, H., Robert, J., Jarlier, V. and Cambau, E.** (1999). Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(1): 62-6.
- **Muhammad HS, Muhammad S.** (2005). The use of *Lawsonia inermis* Linn. (henna) in the management of burn wound infections. *African Journal of Biotechnology*.; **4**: 934-937.
- **Nairouz Benzeggouta.** (2005). Etude de l'Activité Antibactérienne des Huiles Infusées de Quatre Plantes Médicinales Connues Comme Aliments.
- **NEGRETTE. R – BACKHOUSE.N – BRAVO.B.** (1987).Quelques flavonoïdes de centaurée flocosa *Plantes médicinales et phytothérapie* tome **21** n° 2 PP 168-172.
- **Nguyen, D. and Singh, P.K.** (2006). Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 8305-8306.
- **Nikaido, H.** (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(4): 593-656.
- **Ni, Y.; Tizard, I.R.** (2004). Analytical methodology: the gelanalysis of aloe pulp and its derivatives. Reynolds, T., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 111-126.

- **Ochsner, U.A. & Reiser, J.** (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**(14): 6424-6428.
- **O'gara EA, Hill DJ and Maslin DJ.** (2000). Activities of garlic oil, garlic powder and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 2269-227.
- **Ohta R, Yamada N, Kaneko H, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino, T. and Suzuki A.** (1999). *In vitro* inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-macerated garlic constituents. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*. **43**: 1811-1812.
- **O'Malley, Y.Q., Reszka, K.J., Spitz, D.R., Denning, G.M., Britigan, B.E.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **287**(1): 94-103.
- **O'Toole, G.A. & Kolter, R.;** (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*. **30**(2): 295-304.
- **Ozolin ON, and Kazazolova SG.** (1990). Specific modification of the alpha-subunit of *Escherichia coli* RNAs polymerase by monomeric derivative of fluorescein mercuric acetate. *Molecular Biol. J. (MOSK)*, **24**: 1057-1066.
- **Pai, H., Kim, J., Lee, J. H., Choe, K. W. and Gotoh, N.** (2001). Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **45**(2): 480-4.
- **Pawar, D., M. Rossman and J. Chen,** (2005). Role of curli fimbriae in mediating the cell of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to attach to abiotic surfaces. *J. Appl. Microbiol.*, **99**: 418-425.
- **Pawar, V.C.; Bagatharia, S.B.; Thaker, V.S.** (2005). Antibacterial activity of *Aloe vera* leaf gel extracts against *Staphylococcus aureus*. *Indian J. Microbiol*. **45**(3): 227-229.
- **Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P.** (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**(1):197-201.
- **Pecere, T., Gazzola, M. V., Mucignat, C., Parolin, C., Vecchia, F. D., Cavaggioni, A., Basso, G., Diaspro, A., Salvato, B., Garli, M. and Palu, G.** (2000). Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res* **60**: P 2800-2804.
- **Persson, T., Hansen, T. H., Rasmussen, T. B., Skinderso, M. E., Givskov, M., Nielsen, J.** (2005). Rational design and synthesis of new quorum-sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org. Biomol. Chem.* **3**: 253-62.

- **Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., Iglewski, B.H.** (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci*. **96**: 11229–11234.
- **Pier, G. and Ramphal R.** (2005). *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandell G, Bennett J and Dolin R eds) pp 2587-2615, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.
- **Pier, G. B.** (2002). CFTR mutation and host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* lung infection *Curr. Opin Microbiol.* **5**: 81.86.
- **Pierre, M., Le Berre, R., Tiesset, H., Faure, K., Guery, B., Desseyn, J.L., Galabert, C., Béghin, L., Beermann, C., Gottrand, F., Husson, M.O.** (2008). Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* virulence gene expression during chronic lung infection in the murine model. *Med Mal Infect.* **38**(6): 318-323.
- **Poole, K.** (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**(1): 12-26.
- **Poole, K.** (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(2): 479-87.
- **Poole, K. Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X. Z., Nishino, T.** (1996). Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **21**(4): 713-24.
- **Qiu, X., Gurkar, A.U. and Lory, S.** (2006). Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 19830-19835.
- **Qiu, X., Kulasekara, B.R. and Lory, S.** (2009). Role of Horizontal Gene Transfer in the Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Genome Dyn.* **6**: 126-139.
- **Rasmussen, T. B., Bjarnsholt, T., Skindersoe, M. E., 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. *J Bacteriol* **187**: 1799-814.
- **Rebiere-Huet, J., Di Martino, P. and Hulen, C.** (2004). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to fibronectin by PA-IL and monosaccharides: involvement of a lectin-like process. *Can J Microbiol*, **50**, 303-312.
- **Rello, J., C. Lorente, E. Diaz, M. Bodi, C. Boque, A. Sandiumenge, and J. M. Santamaria.** (2003). Incidence, etiology, and outcome of nosocomial pneumonia in ICU patients requiring percutaneous tracheotomy for mechanical ventilation. *Chest* **124**: 2239-2243.

- **Remminghorst, U. & Rehm, B.H.A.** (2006). *In vitro* alginate polymerisation and functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 298-305.
- **RENAUD V.** (2003). Tous les légumes courants, rares ou méconnus, cultivables sous nos climats Les éditions Eugen Ulmer Paris p 224.
- **REYNOLDS. T. & DWECK, A.C.** (1999). *Aloe vera* leaf gel: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, **68**:3–37.
- **Reynolds Tom.** (2004). Aloes, the genus *Aloe*. Medicinal and aromatic plants-industrial profiles ; V.35.
- **Richard H, Loo A.** (1992). Nature, origine et propriétés des épices et aromates bruts. In Richard H (coordonnateur) *Epice et Aromates*. Tec et Doc - Lavoisier, apria.
- **Robinson, P., R. Carzino, D. Armstrong, and A. Olinsky.** (2003). *Pseudomonas* cross-infection from cystic fibrosis patients to non-cystic fibrosis patients: implications for inpatient care of respiratory patients. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5741.
- **Ross ZM, O'gara EA, Hill DJ, Sleightholme HV and Maslin DJ** (2001). Antimicrobial Properties of garlic oil against Human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**, 475-480.
- **Roy, J., Shakaya, D. M., Callery, P. S., Thomas, J.G.** (2006). Chemical constituents and antimicrobial activity of a traditional herbal medicine containing garlic and black cumen. *Afr. J. Trad. CAM* **3** (20): 1-7.
- **Rubina Lawrence, Priyanka Tripathi, Ebenezer Jeyakumar.** (2009). Isolation, purification and evaluation of antibacterial agent from *ALOE VERA*. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**: 906-915.
- **Ruer, S., Stender, S., Filloux, A. and de Bentzmann, S.** (2007). Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone usher machineries. *J Bacteriol.* **189**: 3547-3555.
- **Rumbaugh, K.P., Griswold, J.A., Hamood, A.N.** (2000). The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect Rev.* **2**(14): 1721-1731.
- **Ryder, C., Byrd, M. and Wozniak, D.J.** (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol.* **10**: 644-648.
- **Saadabi MAA.** (2007). Evaluation of *Lawsonia inermis* L. (Sudanese Henna) Leaf extracts as an antimicrobial agent. *Res J Bio Sci.* **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 Chem.* **91**: 621-632.
- **Salton, M.J.R., Kim, K.S.** (1996). Structure. *Baron's Med.Microbiol.*(Baron S et al, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.
- **SARITA.G. – MOHD.A .- SARWAR.A.** (1991). Ethycholest 4 en 3 b ol from the roots of *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*, vol 31 n° 7 PP 2558-2560.
- **Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., et al** (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *Embo J.* **22**: 2959-2969.
- **Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A., Davies, D. G. and Gilbert, P.** (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* **186**(21): 7312-26.
- **Schroeder, T.H., Lee, M.M., Yacono, P.W., Cannon, C.L., Gerceker, A.A., Golan, D.E., Pier, G.B.** (2002). CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation . *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:6907-6912.
- **Schultz, M.J., Rijneveld, A.W., Florquin, S., Speelman, P., Van Deventer, S.J., Van derPoll, T.** (2001). Impairment of host defence by exotoxin a in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice. *J Med Microbiol.* **50**: 822–827.
- **Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T. and Greenberg, E.P.** (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.*, **185**: 2066-2079.
- **Schuster, M., Urbanowski, M.L., Greenberg, E.P.** (2004). Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**(45): 15833-15839.
- **Schweizer, H. P.** (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* **2**(1): 48-62.
- **Seed, P.C., Passador, L., Iglewski, B.H.** (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J. Bacteriol.* **177**(3): 654-659.
- **Sekiya, H., Mima, T., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsushiya, T.** (2003). Functionl cloning and characterization of multidrug efflux pump, *mexHI-opmD*, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(9): 2990-2.

- **Sethi, S.** (2000). Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest* 117:286S-291S.
- **Shaath NA, Flores FB, Osman M, Abd-El Aal M.** (1995). The essential oil of *Allium sativum* L., Liliaceae (Garlic). In Charalambous G (Ed.), *Food Flavors: Generation, Analysis and Processinfluence*. Elsevier Science.
- **Shankar, S., Ye, R.W., Schlichtman, D. and Chakrabarty, A.M.** (1995). Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: enzymology and regulation of gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* **70**: 221-255.
- **Sharref AY.** (1998). The molecular effect of some plant extract on the growth and metabolism of some gram positive and gram negative bacteria. Ph.D. Thesis, college of Science, Univ. of Mousl, Iraq.
- **Shaver, C.M. and Hauser, A.R.** (2004). Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun.* **72**: 6969-6977.
- **Shigeta, M., Tanaka, G., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H. and Usui T.** (1997). Permeation of antimicrobial agent through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy* **43**(5): 340-5.
- **Shivananda N.B., Isitor G., Davis E.M. and G.K. Pillai.** (2007). *Phytotherapy Research.* 21: 827.
- **Shuford, J. A., Steckelberg, J. M., Patel, R.** (2005). Effects of fresh garlic extract on *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 473-73.
- **Simpson, D.A., Ramphal, R., Lory, S.** (1992). Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* adherence: distinct genetic loci control attachment to epithelial cells and mucins. *Infect Immun.* **60**(9): 3771-3779.
- **Singh M, Jindal SK, Kavia ZD, Jangid BL.** (2005). Khem Chand. Traditional Methods of Cultivation and Processing of Henna. *Henna, Cultivation, Improvement and Trade*: 21-14. Jodhpur, India: Central Arid Zone Research Institute.
- **Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., et al.** (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**: 8487-8492.
- **Smith, R.S. & Iglewski, B.H.** (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol.* **6**(1): 56-60.
- **Stepanovic, C.S., M.L. Cirkoric, L. Ranin and A.L. Svabicviahocic.** (2004). Biofilm formation by *Salmonella spp* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Appl. Microbiol.,* **28**: 326-432.

- **Stonehouse, M.J., Cota-Gomez, A., Parker, S.K., Martin, W.A., Hankin, J.A., Murphy, R.C. Chen, W., Hackett, M., Vasil, A.I., Vasil, M.L.** (2002). A Novel Class of Phosphocholine-specific Phospholipases C Molec. *Microbiol.* **46**: 661-676.
- **Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., et al.** (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* **406**: 959-964.
- **Sudharameshwari, K.; Radhika, J.** (2007). Antibacterial Screening of *Aegle marmelos*, *Lawsonia inermis* and *Albizia libbeck*. *AJTCAM* . **4**(2), 199-204.
- **Sundin, C., Hallberg, B. and Forsberg, A.** (2004). ADP-ribosylation by exoenzyme T of *Pseudomonas aeruginosa* induces an irreversible effect on the host cell cytoskeleton *in vivo*. *FEMS Microbiol Lett.* **234**: 87-91.
- **Taber, H. W., Mueller, J.P., Miller, P. F. and Arrow, A. S.,** (1987). Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev* **51**(4): 439-57.
- **TAKEDA.Y-** (1988). New phenolic glucosides from *Lawsonia inermis* Jou. Of.Mat. Prod. Vol 51 n° 4 pp 725-729.
- **TAKHTAJAN A.,** (1997). Diversity and Classification of Flowering Plants. New York, Columbia University Press: 643.
- **Talmadge, J., Chavez, J., Jacobs, L., Munger, C., Chinnah, T., Chow, J.T., Williamson, D., Yates, K.** (2004). Fractionation of Aloe vera L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. *Int. Immunopharmacol.* **4**, P 1757-1773.
- **Thompson, L.S., Webb, J.S., Rice, S.A., Kjelleberg, S.** (2003). The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing gene *rhII* in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* **220**(2): 187-195.
- **Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F. and Jaeger, K.E.** (2005). *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*, **151**: 1313-1323.
- **Trias, J. and Nikaido, H.** (1990). Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**(1): 52-7.
- **Trias, J. and Nikaido, H.** (1990). Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem* **265**(26): 15680-4.
- **Tsao SM and 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.

- **Vallet, I., Olson, J.W., Lory, S., Lazdunski, A. and Filloux, A.** (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 6911-6916.
- **VAN WYK, B.E. & GERICKE, N.** (2000). *People's plants: A guide to useful plants of Southern Africa*. 1st edition. Briza publications, South Africa.
- **VAN WYK, B.E. & WINK, M.** (2004). *Medicinal plants of the world*, 1st edition. Briza publications, South Africa.
- **Vance, R. E., Rietsch, A. and Mekalanos** (2005). Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *in vivo* infect. *Immune* **73**: 1706-1713.
- **Vasil, M.L.** (1986). *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J Pediatr.* **108**: 800-805.
- **Vazquez, B., Avila, G., Segura, D., Escalante, B.** (1996). Antiinflammatory activity of extracts from Aloe vera gel. *J. Ethnopharmacol.* **55**: P 69-75.
- **Vincent CATTOIR**, (2005). Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène.
- **Wade, D.S., Calfee, M.W., Rocha, E.R., Ling, E.A., Engstrom, E., Coleman, J.P., Pesci, E.C.** (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **187** (13): 4372-4380.
- **Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., Iglewski, B.H.,** (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol.* **185**: 2080-2095.
- **Wagner, V.E., Gillis, R.J., Iglewski, B.H.,** (2004). Transcriptome analysis of quorum sensing regulation and virulence factor expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine.* **22** (1): 15-20
- **Walters, M. C., 3rd, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. and Stewart, P. S.,** (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): 317-23.
- **Weber ND, Andersen DO, North JA, Murray BK, Lawson LD and Hughes BG.** (1992). *In vitro* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Medica.* **58**: 417- 423.
- **Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., Heydorn, A., Molin, S., Pitts, B. and Stewart, P. S.** (2004). Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **70** (10): 6188-96.

- **Westbrock-Wadman, S., Sherman, D. R., Hickey, M. J., Coulter, S. N., Zhu, Y. Q., Warrenner, P., Nguyen, L. Y., Shawar, R. M., Folger, K. R. and Stover, C. K.** (1999). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother* **43** (12): 2975-83.
- **Whiteley, M., Banger, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P.** (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*. **413** (6858): 860-864.
- **WICHTL Max, ANTON Robert.** (2003). *Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique - 2^{ème} édition* Paris: Ed. Tee & doc-Lavoisier; Cachan: Ed. médicales internationales, 692 p.
- **Wick, M.J., Frank, D.G., Storey, D.G., Iglewski, B.H.** (1990). Structure, function, and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Annu Rev Microbiol.* **44**: 335-363.
- **Wilson, C. B., P. W. Jones, C. J. O'Leary, D. M. Hansell, P. J. Cole, and R. Wilson.** (1997). Effect of sputum bacteriology on the quality of life of patients with bronchiectasis. *Eur. Respir. J.* **10**: 1754-1760.
- **Winstanley, C., Langille, M.G., Fothergill, J.L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrin, F., et al.** (2009). Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of *in vivo* competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.* **19**: 12-23.
- **Wine, J. J.** (1999). The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest* **103**: 309-312.
- **Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., Camara, M. and Williams, P.** (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol*, **182**: 6401-6411.
- **Wittiam ; G., Hopkins.** (2003). *Physiologie végétale*; 2eme edition ; P 269-280.
- **WONG.K.C- TENG Y.E** (1995) Volatile component of *Lawsonia inermis* L. Fowers. *Jou- Essent – Oil- Res- vol 7* pp 425-428.
- **Woods DE.** (2004). Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Trends Microbiol.*; **12**: 437-439.
- **Worlitzsch, D., R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K. C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J. R. Yankaskas, S. Randell, R. C. Boucher, and G. Doring.** (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest* **109**:317-325.
- **Wozniak, D.J., Wyckoff, T.J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G.A. and Parsek, M.R.** (2003). Alginate is not a significant component of the extracellular

polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 7907-7912.

- **WYNN, R.L.** (2005). *Aloe vera* gel: update for dentistry. *Pharmacology Today*, 6–9.
- **Xavier Gruffat**, pharmacien. (2009). Ail – Ail blanc, plantes médicinales. *Créapharama, La réponse à toutes vos questions de santé.* [web] Accès: <http://www.creapharma.ch/ail.htm>.
- **Yagi A., Egusa T., Arase M., Tsuji H.** (1997). Isolation and characterization of glycoprotein formation with a proliferation-promoting activity on human and hamster cells *in vitro* from *Aloe vera* gel. *Planta Med* **63**: P 18-21.
- **Yang, L., M. T. Rybtke, T. H. Jakobsen, M. Hentzer, T. Bjarnsholt, M. Givskov, and T. Tolker-Nielsen.** (2009). Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2432-2443. doi: 10.1128/AAC.01283-08.
- **Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yogi, T., Kato, H. and Arakawa, Y.** (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* **362**(9399): 1888-93.
- **Yoshida H, Katsuzaki H, Ohta R, Ishikawa K, Fukuda H, Fujino T and Suzuki A** (1999). Antimicrobial activity of the thiosulfinates isolated from oil-macerated garlic extract. *Biosci.Biotechnol. Biochem.* **63**(3): 591-594.
- **Yoshida, H., Nakamura, M., Bogaki, M. and Nakamura, S.** (1990). Proportion of AND gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **34** (6): 1273-5.
- **Zeng, L. and Jin, S.** (2003). *aph(3')*-IIb, a gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, is under the positive control of surrogate regulator HpaA. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(12): 3867-76.
- **Zhanel, G. G., Karlowsky, J. A., Saunders, M. H., Davidson, R. J., Hoban, D. J., Hancock, R. E., McLean, I. and Nicolle, L. E.** (1995). Development of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* after serial exposure to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **39** (2):489-95.

Résumé

La présente étude traite l'effet inhibiteur des différents extraits de trois plantes médicinales à savoir *Aloe vera*, *Allium sativum* et *Lawsonia inermis* contre quatre isolats cliniques et une souche de référence de *P. aeruginosa*. La CMI et CMB ont été déterminées pour les extraits présentant un effet antibactérien. Un test d'association a été réalisé pour évaluer l'interaction entre les extraits et la gentamycine.

Aussi, l'effet des extraits et l'Acide salicylique sur le développement de biofilm chez *P. aeruginosa* a été testé par l'analyse de violet cristal.

Les résultats montrent une activité antibactérienne significative contre les cinq isolats de *Pseudomonas aeruginosa* obtenu avec l'extrait brut d'*Allium sativum* et l'extrait méthanolique de *Lawsonia inermis*.

L'association entre les extraits utilisés et la gentamycine a montré un effet positif avec l'extrait de *L. inermis* dont la zone d'inhibition a augmenté par rapport aux zones obtenues par la gentamycine seule.

L'utilisation de l'extrait brut de l'ail et l'extrait méthanolique de henné et l'acide salicylique indique un effet inhibiteur sur la quantité de biofilm formé par *P. aeruginosa* sur des supports en verre.

Mots clés : *P. aeruginosa*, *Aloe vera*, *Allium sativum*, *Lawsonia inermis*, CMI, CMB, l'activité antibactérienne, biofilm.

Abstract

This study examines the inhibitory effect of different extracts of three medicinal plants: *Aloe vera*, *Allium sativum* and *Lawsonia inermis* against four clinical isolates and a reference strain of *P. aeruginosa*. The MIC and MBC were determined for the extracts showing an antibacterial effect. A combination test was conducted to evaluate the interaction of extracts with gentamicin.

Also, the effect of extracts and salicylic acid on the development of biofilm in *P. aeruginosa* was tested by crystal violet analysis.

The results show a significant antibacterial activity against five isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. This effect was obtained with the crude extract of *Allium sativum* and the methanol extract of *Lawsonia inermis*.

The association between plant extracts and gentamicin showed a positive effect with the extract of *L. inermis* whose zone of inhibition increased with in port areas obtained by gentamicin alone.

The use of the crude extract of garlic and the methanol extract of henna and salicylic acid indicates an inhibitory effect on the amount of biofilm formed by *P. aeruginosa* on glass slides.

Key words: *P. aeruginosa*, *Aloe vera*, *Allium sativum*, *Lawsonia inermis*, MIC, MBC, antibacterial activity, biofilm.

ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى معرفة مدى تأثير مستخلصات ثلاثة نباتات طبية متمثلة في *Aloe vera*، *Allium sativum* و *inermis* *Lawsonia* في تثبيط نمو أربعة عزلات بكتيرية تابعة لـ *Pseudomonas aeruginosa* من مصادر طبية مختلفة وسلالة مرجعية (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853) خارج جسم الكائن الحي مع تحديد كل من التركيز الأدنى للتثبيط والتركيز الأدنى القاتل للمستخلصات ذات فعالية على *Pseudomonas aeruginosa*.

أظهرت النتائج أن كل من المستخلص المائي لفصوص الثوم (*Allium sativum*) و المستخلص الميثانولي لأوراق الحناء (*Lawsonia inermis*) تثبط العزلات *P. aeruginosa*.

اختبار تأثير تداخل المضاد الحيوي جنتاميسين مع مستخلص الثوم ومستخلص الحناء، أظهر أن مستخلص الثوم ذو تأثير سلبي على مدى فعالية جنتاميسين على *P. aeruginosa* في حين كان التأثير ايجابيا مع مستخلص الحناء بحيث تحصلنا على زيادة في منطقة التثبيط بالمقارنة مع المتحصل عليها في حالة الجنتاميسين لوحده.

دراسة تأثير كل من المستخلص المائي للثوم، المستخلص الميثانولي للحناء وحامض الساليسيليك على كمية الفيلم البكتيري و هو الشكل الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية لهذه البكتريا باستعمال تحليل الكريستال البنفسجي، بينت النتائج المتحصل عليها التأثير الكابح لكل من المستخلصين وحامض الساليسيليك على كمية الفيلم البكتيري التي شكلتها *P. aeruginosa* على شرائح الزجاج.