

République Algérienne Démocratique et Populaire

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



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par :

Baghdadi ben attia Nadjat

Et

Bachkat Djamila

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité: Microbiologie Appliquée

THÈME

Activité antibactérienne des extraits *d'Ammi
visnaga* sur *Pseudomonas aeruginosa*

Soutenue publiquement le 09/07/2019

DEVANT LE JURY

Président :	Nebbache Salim	MCB	Université de Mostaganem
Examineur :	Tahri Miloude	MCB	Université de Mostaganem
Encadreur :	DJIBAOUI Rachid	Pr	Université de Mostaganem
Co-encadreur :	LATTAB Aicha	Dr	Université de Mostaganem

Thème réalisé au : Laboratoire de Microbiologie et biochimie

Année universitaire : 2018/ 2019

Remerciement

*Avant toute, nous remercions **Dieu** qui nous a guidé tout le long de ce chemin afin de réalisation ce modeste travail.*

*Nous remercions **Mlle Lattab Aicha** et **Mr. DJIBAOUI Rachid** qui ont contribué au succès de notre stage et qui nous ont aidées lors de la rédaction de ce mémoire.*

Nous remercions vivement les membres des jurys

*Merci à Mr **Nebbache Salim** de nous avoir fait l'honneur de présider le jury. et merci aussi à Mr **Tahri Miloude**, qu'a accepté d'examiner ce travail.*

*Nos remerciements vont également aux responsables des laboratoires Mr. **BENBOUZIANE Dj.** et Mme **Amourai**.*

*Nous remercions l'ingénieur du laboratoire de Microbiologie et Biologie végétal Mm **Amina***

Nous remercions tous nos enseignants qui nous ont suivis le long de nos études.

nous remercions également toute l'équipe pédagogique de l'université

nous remercions tout la promos de Microbiologie Appliquée 2019.

Enfin, nous remercions tous qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A mes très cher parent qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années
d'études.*

*A mes frères : Abd Elnacer, Touati, Ahmed et Aymen et mes sœurs Zohra et
Ahlem*

A ma famille, mes proches et à ceux qui me donne de l'amour et de la vivacité.

A mon très cher binôme Djamila

*A tous mes amis et mes collègues qui m'ont toujours encouragé, et à qui je
souhaite plus de succès.*

A tous ceux que j'aime.

Merci !

NADJET

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

*A mes très cher parent qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années
d'études.*

*A mes très chers frères : Ahmed, Idris, Soufiane, Moukhtar et khair Elddin et
mes très cheres sœurs, Houria, djamaia, houda, et Habiba*

ma grande mère et mes oncles.

A mes meilleurs amis, Ahlam, Houria

A mon très cher binom Nadjet

A ma famille, mes proches et à ceux qui me donne de l'amour et de la vivacité.

*A tous mes amis et mes collègues qui m'ont toujours encouragé, et à qui je
souhaite plus de succès.*

A tous ceux que j'aime.

Merci !

DJAMILA

الملخص

يعد *Pseudomonas aeruginosa* من البكتيريا الانتهازية التي تساهم في عدوى المستشفيات والتي يصعب علاجها بسبب مقاومتها المتعددة وقدرتها على تكوين البيوفيلم .

و نظرا لاستخدام الطب التقليدي في الوقت الحالي على نطاق واسع و اكتسابه لأهمية صحية واقتصادية. وجدنا أنه من الأهمية بما كان أن نجري هذه الدراسة لتحديد تأثير المستخلصات العضوية (مستخلص خلاص الإيثيل و مستخلص البوتانوليك) و الزيت الأساسي لنبات (النوخة) *Ammi visnaga* ضد بكتريا *P. aeruginosa* ATCC 27853 وسبع عزلات طيبة سريرية من نفس النوع.

تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن المستخلصات و الزيت الأساسي المختبرة أظهرت كلها تأثيرا فعالا ضد عزلات *P. aeruginosa*

كما بينت النتائج أيضا أن قيم كل من التركيز المثبط الأدنى والتركيز القاتل الأدنى لمستخلص البوتانوليك قدرت بحوالي 6.25 ملغم / مل و 12.5 ملغ / مل على التوالي. أما بالنسبة لمستخلص خلاص الإيثيل فإن قيمة التركيز المثبط الأدنى كانت مساوية لقيمة التركيز القاتل الأدنى و قدرت بحوالي 6.25 ملغم / مل.

كما وجدنا في هذا العمل أيضًا أن مستخلص خلاص الإيثيل لنبات *Ammi visnaga* مارس تأثيرًا مثبطًا على تكوين البيوفيلم لعزلات *P. aeruginosa* المدروسة.

الكلمات المفتاحية: *P. aeruginosa* - *Ammi visnaga* - المستخلصات العضوية - مقاومتها المتعددة - الزيت الأساسي - التركيز المثبط الأدنى - التركيز القاتل الأدنى.

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est un agent pathogène opportuniste impliqué dans de graves infections nosocomiales difficile à traiter, en raison de sa multirésistance, ainsi à sa capacité de former un biofilm.

Actuellement, l'usage de la médecine traditionnelle est très répandu et revêt une importance sanitaire et économique croissante. Pour cela nous avons établi une étude pour déterminer l'effet antibactérien et le pouvoir antibiofilm des extraits organiques (extrait d'acétate d'éthyle et extrait butanolique) et l'huile essentiel obtenus à partir de la plante *Ammi visnaga* contre *P. aeruginosa* ATCC 27853 et sept isolats cliniques de même espèce.

Les résultats obtenus indiquent que les extraits et l'HE ont présenté une action antibactérienne contre les isolats testés de *P. aeruginosa*.

D'après nos résultats, la CMI et la CMB pour l'extrait butanolique sont situées autour de 6,25mg/ml et 12,5mg/ml respectivement. Pour l'extrait d'acétate d'éthyle ou la CMI est égale à la CMB et leur valeur est autour de 6,25mg/ml.

Dans ce travail, nous avons constaté aussi que l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Ammi visnaga* a exercé un effet inhibiteur sur la formation des biofilms des isolats testés de *P. aeruginosa*.

Mots clé : *P. aeruginosa* - Multirésistance – Biofilm - *Ammi visnaga* - Extraits organiques - Huile essentielle – CMI - CMB.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen involved in severe nosocomial infections difficult to treat, because of its multi-resistance, and its ability to form biofilm. Currently, the use of traditional medicine is widespread and acquired of increasing health and economic importance. In the present work we established a study to determine the antibacterial and antibiofilm effects of ethyl acetate and butanolic extracts and the essential oil obtained from the plant *Ammi visnaga* against *P. aeruginosa* ATCC 27853 and seven clinical isolates of the same species.

The results obtained indicate that the extracts and the HE showed an antibacterial action against the tested *P. aeruginosa* isolates.

According to our results, the MIC and CMB for butanol extract are around 6.25 mg / ml and 12.5 mg / ml respectively. For ethyl acetate extract, where MIC is equal to MBC and both are around 6.25mg / ml.

In this work, we confirm that the ethyl acetate extract of *Ammi visnaga* showed an inhibitory effect on the biofilm formation of the *P. aeruginosa* tested isolates.

Key words: *P. aeruginosa* - Multi-resistance – Biofilm - *Ammi visnaga* – Organic extracts - Essential oil - MIC – MBC.

TABLE DES MATIERES

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

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : pouvoir pathogène de *Pseudomonas aeruginosa*

I-1-Définition de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
I-2- Caractères biochimiques.....	3
I-3-Génomme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
I-4- Infections à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
I-4-1- Infections aiguës.....	5
I-4-2- Infections chroniques.....	6
I-5- Facteurs de virulences chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
I-5-1- Facteurs de virulence cellulaires.....	6
I-5-1-1- Le flagelle.....	6
I-5-1-2- Les pili de type IV.....	7
I-5-1-3- Les lipopolysaccharides.....	7
I-5-1-4- La protéine OprF.....	8
I-5-1-5- Exopolysaccharide.....	8
I-5-1-6- Fimbriae.....	8
I-5-1-7- Les rhamnolipides.....	8
I-5-2- Facteur de virulence extracellulaire.....	9
I-5-2-1- Les léctines solubles.....	9
I-5-2-1-1- La léctine PA-IV.....	9
I-5-2-1-2- La léctine PA-IIV.....	9
I-5-2-2- Exotoxine A.....	10
I-5-2-3- Les élastases.....	10
I-5-2-4- Les phospholipases.....	10
I-5-2-5- Pyocyanine.....	11
I-5-2-6- Les sidérophores.....	11
I-6- Mécanisme du quorum sensing chez <i>P.aeruginosa</i>	11
I-7- Rôle de signalisation du quorum sensing dans la virulence et la formation de biofilm.....	13

Chapitre II: Multi résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

II-Multi résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques.....	14
II-1-Mécanisme de résistance au β -lactamines chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
II-1-1- Résistance naturelle.....	15
II-1-2- Résistance acquise.....	16
II-1-2-1- Résistance enzymatique.....	16
A-Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique de classe C.....	17
B-Oxacillinase.....	17
C-carbapénémases de classe B.....	17
D- β -lactamase à spectre étendu ou élargie.....	18
II-1-2-2- Résistance non enzymatique.....	19
A-Surexpression de système d'efflux.....	19
B-Perte de la porine OprD ₂	19

C- Modification des lipopolysaccharides membranaire.....	20
Résistance aux fluoroquinolones.....	20
Résistance aux aminoside	20
Résistance à colistine.....	20
D- La modification de la cible.....	21
Mutation.....	21
Méthylation d'ARN 16s.....	21
II -2-Le biofilm chez <i>P .aeruginosa</i>	22
II -2-1-La matrice de biofilm.....	22
II -2-1-1-L'alginate.....	23
II -2-1-2-Les polysaccharides PSL et PEL.....	23
II -2-1-3-L'ADN extracellulaire.....	23
II -2-Les étapes de formation du biofilm.....	24
II.2.3. Résistance du biofilm aux antibiotiques.....	25

Chapitre III : Description et caractéristiques d'*Ammi visnaga*

III-Description et caractéristiques d' <i>Ammi visnaga</i>	27
III-1- Les plantes en médecine.....	27
III-2- Description de la famille des <i>Apiacées</i>	27
III-3- L'espèce <i>Ammi visnaga</i>	28
III-3-1- Caractéristique botanique.....	28
III-3-2- Position taxonomique d' <i>Ammi visnaga</i>	29
III-3-3- Habitat et culture.....	30
III-3-4- Usages traditionnels.....	30
III-3-5- Etude phytochimique.....	30
III-3-5-1- Huile essentielle.....	32
III-3-6- Etude biologique.....	32
III-3-7-Intérêt thérapeutique.....	33
III-3-8-Activités antibactériennes	33
III-3-8-1- Activité antibactériennes des huiles essentielles.....	33
III-3-9-Activité antibiofilm.....	34

Partie expérimentale

Chapitre IV : Matérielles et méthodes

IV-1- Obtention de bactéries.....	35
IV-2- Identification des isolats.....	35
IV-2-1-Etude morphologique.....	35
a-Examen macroscopique.....	35
b-Examen microscopique.....	35
IV-2-2- Etude biochimique et physiologique.....	35
IV-2-2-1- Production des pigments.....	35
IV-2-2-2-Recherche de catalase.....	36
IV-2-2-3- Croissance à 4 °C et à 42 °C.....	36
IV-2-2-4- Test de RM.....	36
IV-2-2-5- Test de VP.....	36
IV-2-2-6- Recherche de nitrate réductase.....	37
IV-2-2-7- Test de citrate.....	37
IV-2-2-8- test de TSI (Triple sugariron).....	37
IV-2-2-9- Mobilité et fermentation du mannitol.....	37

IV-2-2-10- La galerie API 20 E.....	38
IV-2-2-11- Conservation des isolats.....	38
IV-3-1-La source des plants.....	39
IV-3- Matérielles végétales.....	39
IV-3-2- Préparation des extraits.....	39
IV-3-2-1-Extraction hydro-méthanolique.....	39
IV-3-2-2-Extraction de l'huile essentiel par hydrodistillation.....	42
IV-3-3-Détermination de l'activité antibactérienne de l'extrait d' <i>Ammi visnaga</i>	43
IV-3-3-1Activité antibactérienne selon la méthode de diffusion par disque.....	43
IV-3-3-2Détermination de La concentration minimale inhibitrice (CMI) La concentration minimal bactéricide (CMB).....	44
IV-3-4- Effet des extraits sur la formation du biofilm.....	45

Chapitre V : résultats et discussions

V-1-Identification des souches.....	47
V-1-1-L'étude macroscopique.....	47
V-1-2-L'étude microscopique.....	47
V-1-3-Croissance à 42°C et 4°C.....	48
V-1-4-Test de catalase.....	48
V-1-5-Caractère biochimique.....	48
V-1-5-1-Test TSI (Triple-Sugar-Iron).....	48
V-1-5-2-Galeries biochimique API 20 E.....	49
V-2- L'activité antibactérienne des extraits et l'huile essentiel d' <i>Ammi visnaga</i> sur <i>p .aeruginosa</i>	50
V-2-2-Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits et l'huile essentiel d' <i>Ammi visnaga</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
V-2-3- la Concentration Minimale Inhibitrice et Bactéricide.....	53
V-2-4-Evaluation de l'activité antibiofim des extraits d' <i>Ammi visnaga</i> contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58
Conclusion.....	60
Référence bibliographique.....	61

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Relation existant entre certain facteur prédisposant sélectionné et différents infection à <i>Pseudomonas</i>	5
Tableau 2	Résultats de différents tests biochimiques de la galerie API 20 E.....	49
Tableau 3	L'activité antibactérienne de l'extraits d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique et l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i> contre les isolats de <i>p. aeruginosa</i>	51
Tableau 4	Les valeurs de la concentration minimales inhibitrice et la concentration minimale bactéricide de l'extrait d'acétate d'éthyle sur les isolats testés de <i>P. aeruginosa</i>	54
Tableau 5	Effet de l'extrait butanolique sur des isolats de <i>P.aeruginosa</i>	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Structure du lipopolysaccharide.....	7
Figure 2	Mécanisme moléculaire du Quorum sensing chez <i>P. aeruginosa</i>	12
Figure 3	Structure générale des β -lactamines	15
Figure 4	Les différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien.....	25
Figure 5	<i>Ammi visnaga</i> L (Khella, Noukha).....	29
Figure 6	Structure chimique de (a) : Quercetin et (b) : Kaempferol.....	31
Figure 7	Structures chimiques de khelline, visnagin et visnadin.....	31
Figure 8	La galerie biochimique API 20 E	38
Figure 9	<i>Ammi visnaga</i> (L).....	39
Figure 10	Rotavapeur utilisé pour l'extraction hydro-méthanolique de plant <i>Ammi visnaga</i>	40
Figure 11	Fractionnement de la phase aqueuse par les solvants organiques.....	41
Figure 12	Protocole de l'extraction par l'acétate d'éthyle et le butanol	41
Figure 13	Schéma de montage de l'hydrodistillation (Clevenger)	42
Figure 14	Les étapes de l'étude de l'effet des extraits sur la formation de biofilm	46
Figure 15	Aspect macroscopique de <i>p. aeruginosa</i> ensemencée sur King A(A) et sur King B (B).....	47
Figure 16	L'observation microscopique de <i>p. aeruginosa</i> G \times 100.....	47
Figure 17	Résultats de test catalase	48
Figure 18	Résultats de test TSI de quelques souches de <i>P. aeruginosa</i>	48
Figure 19	La galerie biochimique API 20 E après l'incubation à 37 pendant 24h.....	49
Figure 20	Résultats des zones d'inhibition de l'extrait d'acétate d'éthyle et butanol et l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i>	52
Figure 21	L'activité antibactérienne des extraits d'acétate d'éthyle et du butanol.....	52
Figure 22	L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d' <i>Ammi visnaga</i>	53
Figure 23	Résultats de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide de l'extrait acétate d'éthyle contre les isolats de <i>p. aeruginosa</i>	55

Figure 24	Résultats de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait d'acétate d'éthyle contre <i>P.aeruginosa</i>	55
Figure 25	Résultat de la CMB de l'extrait d'acétate d'éthyle d' <i>Ammi visnaga</i> .	56
Figure 26	Résultats de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide d'extrait butanolique contre des isolats de <i>P.aeruginosa</i>	57
Figure 27	Résultats de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait butanolique contre les isolats de <i>P.aeruginosa</i>	57
Figure 28	Résultats de la CMB de l'extrait butanolique d' <i>Ammi visnaga</i>	58
Figure 29	Résultats de l'effet d'extrait de l'acétate d'éthyle sur la formation de biofilm par les isolats testé de <i>P.aeruginosa</i>	59

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide désoxy ribonucléique
- AHL**: Acylhomosérine lactone
- Alg**: alginate
- APG**: Angiosperms phylogeny Group
- ARN** : Acide ribonucléique
- BMR** : Bactéries multi résistance
- CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice
- CMB** : Concentration Minimale Bactéricide
- DMSO** : diméthylsulfoxyde
- EDTA** : Ethylène diamine tetra-acétique
- FK** : Fibrose kystiques.
- GES**: Guyana extended spectrum
- GM** : Gentamycine
- HE** : Huile Essentielle
- IgA** : Immunoglobulines A
- IgG** : Immunoglobulines G
- IL-8** : Interleukine 8
- LPS** : lipopolysaccharides
- Mex**: Multidrug efflux systeme
- MPOC**: maladie pulmonaire obstructive
- OprD** : Outre membrane protéine D
- OprF** : Outre membrane protéine F
- PA-III** : *Pseudomonas aeruginosa* lectin II
- PA-II** : *Pseudomonas aeruginosa* lectin I
- PAMR** : *Pseudomonas aeruginosa* multi résistantes
- Pel** : PELlicle locus
- PMN**: poly-Morpho Nucléaires neutrophils
- Psl**: Polysaccharide synthesis locus

QS: quorum sensing

SHV: sulfhydryl variable

TEM: Temoneira

Introduction

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à coloration de Gram négative adaptable, largement répandue dans l'environnement, capable d'infecter un large éventail d'organismes, notamment des vertébrés, des invertébrés, eucaryotes et des plantes. Chez l'homme, il est responsable de la kératite, des infections des brûlures et respiratoires chroniques graves chez les patients atteints des maladies sous-jacentes telles que la fibrose kystique ou la bronchectasie. La nature omniprésente de *P. aeruginosa* et son éventail de maladies sont probablement dues en partie à la plasticité élevée du génome et à des nombreux facteurs de virulence produit par l'organisme (Timothy *et al.*, 2008 ; John *et al.*, 2015).

P. aeruginosa possède le plus large génome bactérien séquencé. Ce génome englobe 6,3 millions de pb chez la souche de référence PAO1 (Stover *et al.*, 2000), et code pour de nombreux gènes régulateurs impliqués dans la détection des signaux environnementaux, contrôlant l'expression des facteurs de virulence, le métabolisme et les mécanismes de résistance (Emmanuel *et al.*, 2018).

Le traitement des infections causées par *P. aeruginosa* est difficile en raison de sa résistance intrinsèque élevée contre la plupart des antibiotiques et de sa capacité à acquérir de nouveaux mécanismes de résistance suite à l'exposition aux antibiotiques pendant les traitements (Breidenstein *et al.*, 2011). En plus de sa résistance aux antibiotiques, *P. aeruginosa* se caractérise par sa capacité à former des biofilms.

P. aeruginosa est un organisme modèle pour les études de biofilms. Un biofilm est une communauté microbienne sessile caractérisée par des cellules attachées de manière irréversible à une surface biotique et abiotique, incorporés dans une matrice extracellulaire de substances polymériques (EPS) autoproduite, faite d'un mélange d'exopolysaccharides, d'ADN et de protéines (Joo et Otto, 2012). En suggérant que le biofilm serait le mode de vie majoritaire adopté par les cellules microbiennes dans la nature. Il a été estimé que 99 % de l'ensemble des bactéries dans un environnement naturel existe sous forme d'un biofilm (Costerton *et al.*, 1978). Les bactéries cultivées dans ce biofilm ont une résistance accrue aux antibiotiques et au système immunitaire de l'hôte par rapport aux bactéries planctoniques.

L'expression de nombreux facteurs de virulence et la formation des biofilms chez *P. aeruginosa* est contrôlée par un système de détection du quorum (QS). C'est un régulateur clé

de leur développement (De Kievit, 2008) et de leur résistance aux antibiotiques (Hoiby *et al.*, 2010).

La science moderne et les progrès technologiques accélèrent la découverte et le développement des substances naturel à base des plantes avec une activité thérapeutique améliorée et des effets secondaires réduits.

Ammi visnaga L. ” ou “cure-dents” (Apiaceae) est une plante vivace largement répandue dans la surface méditerranée (Khalfallah *et al.*, 2011). Cette plante a montré de nombreux effets antimicrobiens et antifongiques (Semyari *et al.*, 2011) grâce à son huile essentiel et sa composition phytochimique telle que des furanochromones dont la khelline et la visnagine ainsi que des pyranocoumarines dont la visnadine.

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer le pouvoir antibactérien et antibiofilm des extraits organiques (extrait d'acétate d'éthyle et extrait butanolique) et de l'huile essentielle de la plante étudiée (*Ammi visnaga*) contre une souche de référence (*P. aeruginosa* ATCC 27853) et sept isolats de la même espèce

Pour réaliser ce travail nous avons effectué un rappelle bibliographique qui porte les grands titres suivants :

- Pouvoir pathogène de *Pseudomonas aeruginosa*
- Multi-résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques
- Description et caractéristiques d'*Ammi visnaga*

La Partie expérimentale réalisée s'adresse aux étapes suivantes :

- Identification des isolats de *P. aeruginosa*.
- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits (extrait d'acétate d'éthyle et extrait butanolique) et de l'huile essentielle de l'*Ammi visnaga*.
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide des extraits organique.
- Effet des extraits d'*A. visnaga* contre la formation du biofilm à *P. aeruginosa*.

Rappelle Bibliographique

Chapitre I

Pouvoir pathogène de *Pseudomonas aeruginosa*

I-1 - Définition de *Pseudomonas aeruginosa*

Le genre *Pseudomonas* est découvert en 1894 par Migula, il appartient au phylum des *Proteobacteria*, classe des *Gammaproteobacteria*, famille des *Pseudomonadaceae*, ordre des *Pseudomonadales* (Moore *et al.*, 2006). Ce sont des bactéries ubiquistes particulièrement abondantes dans les sols, les eaux et souvent pathogènes des animaux et des végétaux.

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales graves, d'infections potentiellement mortelles chez les personnes immunodéprimées et d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose.

I-2- Caractères biochimiques

P. aeruginosa (ou bacille pyocyanique) est une bactérie à coloration de Gram négative, dépourvue de capsule, bâtonnets (0,5-1×1,5-5µm), aérobic stricte. Habituellement chimioorganohétérotrophes, très variés dans leur nutrition. Croissent souvent sur sels inorganiques, additionnés d'une source de carbone organique, certaines souches sont chimio lithoautotrophes. Catalase-positifs. Habituellement oxydase-positifs. Se trouvent dans le sol, les eaux et comme agents pathogènes chez l'homme, animaux et les plantes.

Comme la plupart des espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, l'espèce *P. aeruginosa* n'exige aucun facteur de croissance. C'est une bactérie hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique. Par conséquent, elle peut être isolée en culture sur des milieux ordinaires ou sur des milieux rendus sélectifs par addition d'inhibiteur, tel que le cétrimide. Elle est strictement aérobic et sa température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C. Les cultures de *P. aeruginosa* dégagent une odeur caractéristique, et produisent le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine (Christiane, 2013).

I-3- Génome de *Pseudomonas aeruginosa*

Le génome de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé en 2000. Il s'agit d'un des plus grands génomes bactériens connus avec 6,3 méga bases codant 5570 cadres de lecture 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) (Lee *et al.*, 2006; Mathee *et*

al., 2008; Winstanley et Fothergill, 2009). La taille de ces génomes varie entre 5 et 7 mégabases. Des études sur les génomes de plusieurs isolats cliniques et environnementaux de *P. aeruginosa* ont montré une forte conservation du contenu génomique. Particulièrement, les déterminants des facteurs de virulence sont fortement conservés (Wolfgang *et al.*, 2003). *P. aeruginosa* possède un nombre important de gènes impliqués dans des systèmes de régulation et des fonctions métaboliques.

I-4-Infections à *Pseudomonas aeruginosa*

Dans de nombreux hôpitaux, *P. aeruginosa* est devenu la bactérie à coloration de Gram négative commune associée à des infections nosocomiales graves, en particulier dans les unités de soins (Scott *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* est une bactérie adaptable et résiliente, largement répandue dans l'environnement, capable d'infecter un large éventail d'organismes, notamment des vertébrés, des invertébrés eucaryotes et des plantes (John *et al.*, 2015). *P. aeruginosa* est omniprésent, possède des mécanismes intrinsèques de résistance aux antibiotiques et est associé à des infections graves d'origine hospitalière et des infections des plaies et de brûlure. Cette bactérie est devenue une menace nosocomiale majeure (Siew *et al.*, 2019).

P. aeruginosa est l'un des agents pathogènes humains les plus difficiles à traiter qui pose un grave problème clinique en raison de la prévalence étendue d'isolats cliniques multi résistants. Armé de mécanismes de virulence abondante et de résistance aux antibiotiques, il constitue un agent étiologique majeur dans de nombreuses infections aiguës et chroniques (Deepak *et al.*, 2015).

P.aeruginosa ne provoque une maladie chez l'homme que lorsqu'il existe une défaillance locale ou systémique du système immunitaire. Le type de l'infection dépend aussi de l'efficacité du système immunitaire de l'hôte (Hichem, 2006). *P. aeruginosa* peut être responsable de nombreux processus néfastes liés à sa capacité à coloniser les surfaces sous forme de biofilm (Khalilzadeh, 2009).

Tableau 01:Relation existant entre certains facteurs prédisposant sélectionnés et différents infections à *Pseudomonas* (Marc *et al.*, 1999).

Facteur prédisposant	Type d'infection
1. Brèche Local Du Système Immunitaire : Mucoviscidose Traumatisme Toxicomanie(Iv) Opération Neurochirurgicales Opération Chirurgicales Trachéotomie Dispositifs Intraveineux Blessure De La Cornée Sondage Urinaire	Pneumonie, chronique, à répétition ostéomyélite Endocardite, arthrite septique, ostéomyélite Méningite Pneumonie Pneumonie Cellulite, thrombophlébites épurative Panophtalmie Infection urinaire Colonisation de tractus urinaire et infection urinaire
2. Atteinte systémique : Neutropénie Diabète Enfant prématurés et nouveau-nés	Septicémie, pneumonie, abcès otite externe maligne Septicémie, méningite, entérite
3. Atteinte systémique et local Brûlures	Surinfection de brûlures, septicémie

I-4-1-Infections aiguës

P. aeruginosa est capable de provoquer des infections aiguës des poumons, du système digestif, des voies urinaires et de la cornée (Lyczak *et al.*, 2002); Berthelot *et al.*, 2005).

Des facteurs de virulence sont impliqués dans les différentes étapes du processus d'infection et permettent ainsi à *P. aeruginosa* de coloniser son hôte. Dans les infections aiguës, l'invasion, la dissémination et les lésions tissulaires vastes prédominent (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* passe d'un agent pathogène virulent aigu d'infection précoce à un agent pathogène virulent chronique adapté à l'hôte de l'infection en phase terminale comme dans le cas de la Fibrose kystique (FK) du poumon (Hogardt et Heesemann, 2013).

I-4-2- Infections chroniques

P. aeruginosa est le principal agent pathogène causant une infection chronique chez les personnes atteintes de FK (Tim *et al.*, 2003) à l'âge adulte, 80% des patients sont infectés et l'infection chronique à *P. aeruginosa* est la principale cause d'augmentation de la morbidité et de la mortalité des patients FK (Pressler *et al.*, 2011). Infections chroniques à *P. aeruginosa* ont particulièrement fréquentes, et constituent la première des pneumonies communautaires dues à *P. aeruginosa*. Elles font suite à une colonisation précoce qui survient dès l'enfance et sont émaillées de poussées d'infections aiguës respiratoires. Une fois que les voies respiratoires du patient sont colonisées, *P. aeruginosa* met en jeu plusieurs mécanismes adaptatifs : formation du biofilm, échappement au système immunitaire de l'hôte puis production d'alginate. (Nyaledome, 2016).

I-5-Facteurs de virulences chez *Pseudomonas aeruginosa*

La pathogénie de *P. aeruginosa* est attribuée à la production d'un vaste arsenal des facteurs de virulence (membranaires et extracellulaires) agissant à différents niveaux au cours de l'infection, lui permettant de survivre aussi bien dans différents hôtes que dans l'environnement. Ils comprennent notamment : des facteurs impliqués dans l'adhérence et la motilité de *P. aeruginosa* permettant la colonisation de l'hôte, et des toxines et protéases qui provoquent des lésions tissulaires facilitant aussi la multiplication et la dissémination bactérienne dans les tissus de l'hôte (Montalegre, 2016).

I-5-1- Facteurs de virulence cellulaires

I-5-1-1- Le flagelle

Le flagelle polaire confère à la bactérie la capacité de se déplacer non seulement en milieu aqueux, mais également sur des surfaces semi-solides (Swarming) (Kohler *et al.*, 2000).

Il présente une forte homologie structurale avec 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 al.*, 2003). Cette organelle est impliquée dans la reconnaissance et l'adhérence aux surfaces épithéliales (Simpson *et al.*, 1992) et abiotiques, ainsi qu'à la formation de micro colonies et au développement « normal » d'un biofilm (O'Toole et Kolter, 1998).

I-5-1-2- Les pili de type IV

Les pili de *P. aeruginosa* sont parmi les rares pili procaryotes impliqués dans la motilité bactérienne. Les pili de type IV, par leurs propriétés rétractiles, permettent à *P. aeruginosa* d'envahir les surfaces hydratées et de coloniser rapidement les voies respiratoires, facilite aussi l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales en se liant au récepteur Asialo-GM1 et est indispensable à la virulence de *P. aeruginosa* (Comolli *et al.*, 1999).

I-5-1-3- Les lipopolysaccharides

Le LPS est le constituant lipidique majeur situé à la face externe de la paroi. Il est constitué de trois parties : une partie hydrophobe, le lipide A, inséré dans la bicouche phospholipidique membranaire, un noyau oligosaccharidique et un polysaccharide antigène-O caractéristique de la bactérie. 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). Le LPS est également impliqué dans l'adhésion aux cellules via les asialo-GM1 (Gupta *et al.*, 1994) et la reconnaissance par le complexe TLR4/CD14 ou TLR4/MD-2 (Hajjar *et al.*, 2002 ; Backhed *et al.*, 2003).

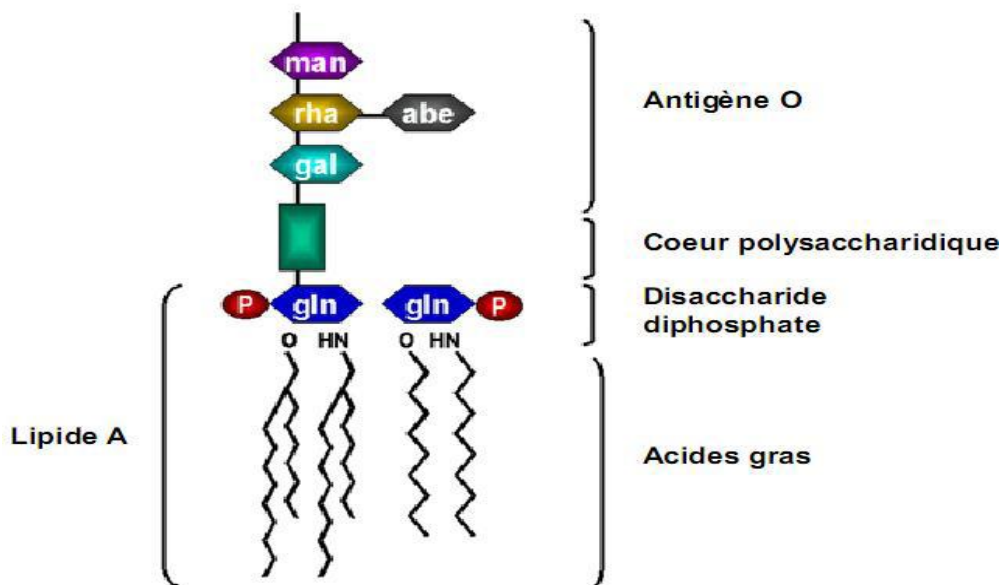


Figure01: Structure du lipopolysaccharide (Miller et Martin, 2005)

I-5-1-4- La protéine OprF

La protéine OprF de la membrane externe de *P. aeruginosa* est une porine majeure. Il s'agit d'une protéine bi fonctionnelle possédant une activité porine à travers son canal à eau et jouant le rôle de protéine de structure importante au maintien de l'intégrité bactérienne. Cette protéine forme un nombre limité de larges canaux au niveau de la membrane externe de *P. aeruginosa*. Le diamètre du canal OprF est de 2 nm et permet la diffusion de polysaccharides ayant un poids moléculaire compris entre 2000 et 3000 daltons (Nestorovich *et al.*, 2006).

L'OprF possède un rôle structural déterminant dans la morphologie bactérienne et dans la capacité des bactéries à croître dans un milieu à faible osmolarité. Il a été démontré également qu'OprF contribue à l'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales pulmonaires et facilite ainsi l'interaction de *P. aeruginosa* avec l'épithélium en favorisant la colonisation de l'épithélium respiratoire et l'initiation de l'infection pulmonaire (Azghani *et al.*, 2002)

I-5-1-5-Exopolysaccharides

Les exopolysaccharides sont des polymères à haut poids moléculaire qui sont constitués de résidus de sucre et sont sécrétés par *P. aeruginosa* dans le milieu environnement. *P. aeruginosa* synthétise un large spectre de polysaccharides multifonctionnel comprenant des polysaccharides intracellulaires, les polysaccharides structuraux et des polysaccharides extracellulaires ou exopolysaccharides. Leur principale fonction est la résistance à la phagocytose (Govan et Deretic, 1996).

I-5-1-6-Fimbriae

Un facteur d'attachement a été mis en évidence chez *P. aeruginosa*. Il s'agit de pili de type fimbriae qui sont assemblés par la voie (chaperonne/ usher/ pathway) (Cup). Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes Cup appelés CupA, CupB et CupC ont été identifiés, ces facteurs d'attachement sont essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques et dans la formation du biofilm (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011).

I-5-1-7- Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des glycolipides extracellulaires amphiphiles qui possèdent un pouvoir détergent sur les phospholipides du surfactant pulmonaire, ce qui les rend ainsi plus accessibles aux phospholipases bactériennes. De plus, ils inhibent la phagocytose. Ils

contribuent donc à l'invasion du tissu pulmonaire par *P. aeruginosa*, les rhamnolipides sont impliqués dans la mobilité de type "Swarming" et la formation de biofilms (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011).

I-5-2- Facteurs de virulence extracellulaire

I-5-2-1- Les lectines solubles

Parmi les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie *P. aeruginosa*, deux lectines solubles ont été identifiées (Khalilzadeh, 2009). Lectines solubles PA-IL (gène *lecA*) et PA-III (gène *lecB*) ayant une spécificité respectivement pour le D-galactose et le L-fructose (Imberty *et al.*, 2006). Dont l'activité est dépendante du calcium. Elles peuvent être détectées au niveau du cytoplasme ainsi qu'au niveau de la membrane externe de la bactérie (Khalilzadeh, 2009).

I-5-2-1-1- La lectine PA-IL

Le rôle de lectine PA-IL durant le processus infectieux serait multiple. Elle pourrait faciliter la formation d'agrégats ou de colonies bactériennes par l'intermédiaire des dérivés de galactose présents sur les LPS (Sadovskaya *et al.*, 1998), protégeant ainsi les bactéries des défenses immunitaires. De la même manière, elle serait impliquée dans la formation et la stabilisation du biofilm, comme le montre les expériences réalisées après délétion du gène *lecA* ou après addition d'IPTG (Isopropyl-bêta-Thio-galactoside) (Diggle *et al.*, 2006).

La lectine PA-IL est également impliquée dans l'adhérence de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales, dans la perméabilité des cellules aux exo produits cytotoxiques tel que l'exotoxine A (Laughlin *et al.*, 2000 ; Kirkeby *et al.*, 2007). Par ailleurs, la lectine PA-IL est directement cytotoxique pour les cellules épithéliales respiratoires et elle inhibe leur croissance (Bajolet-Laudinat *et al.*, 1994; Laughlin *et al.*, 2000; Chemani *et al.*, 2009).

I-5-2-1-2- 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). Elle inhibe le battement ciliaire des cellules pulmonaires (Adam *et al.*, 1997), et participe également à la formation du biofilm de *P. aeruginosa* (Tielker *et al.*, 2005). En s'associant aux glycoconjugués présents à la surface de la bactérie, elle participerait aux interactions bactérie-hôte ou bactérie-bactérie (Tielker *et al.*, 2005).

I-5-2-2-Exotoxine A

L'exotoxine A (ETA) est le composé protéique le plus toxique produit par *P. aeruginosa*. Elle est sécrétée sous la forme d'une pro-toxine inactive. Comme la toxine diphtérique, l'ETA est composée de deux domaines : le domaine A qui possède l'activité mono-ADP-ribosyltransférase et le domaine B qui interagit spécifiquement avec le récepteur présent à la surface de la cellule hôte et entraîne un arrêt de la synthèse protéique et provoque la mort de la cellule cible par nécrose (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011).

I-5-2-3- Les élastases

L'activité élastase de *P. aeruginosa* est médiée par l'action combinée de deux enzymes protéolytiques, LasA et LasB (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011).

L'élastase (lasB) est une métalloprotéinase à zinc sécrétée par *P. aeruginosa* à l'intérieur de l'espace cellulaire via le système de sécrétion de type II. Cette protéine exerce son rôle toxique par dégradation de l'élastine, composant majeur de l'épithélium respiratoire. Ceci conduit à une perméabilisation de l'épithélium facilitant l'action des autres facteurs (Azghani *et al.*, 2000). LasB 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 en inactivant d'autres protéines comme les IgA, les IgG et des composés du complément (Heck *et al.*, 1990; Hong et Ghebrehiwet, 1992).

L'élastase LasA (protéase staphylolytique ou staphylolysine) est une protéase à sérine qui agit en synergie avec LasB augmentant ainsi le pouvoir de dégradation. LasA coupe l'élastine, et la rend ainsi plus accessible à l'action des autres protéases comme LasB (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011).

I-5-2-4- Les phospholipases

P. aeruginosa produit différentes phospholipases qui hydrolysent les liaisons phosphodiester des glycérophospholipides. Selon la spécificité de l'activité enzymatique, les phospholipases produites par *P. aeruginosa* sont de quatre types : la phospholipase A (PLA), B (PLB), C (PLC) et D (PLD) (Hichem, 2006).

Les phospholipases sont importantes pour la virulence de la bactérie. Elles déstabilisent la membrane des cellules de l'hôte et sont à l'origine de la mort cellulaire (Vasil *et al.*, 2009).

I-5-2-5- Pyocyanine

La pyocyanine (PCN) est un métabolite secondaire à activité redox bleue produite par *P. aeruginosa*. Le PCN est facilement récupéré en grande quantité dans les expectorations de patients atteints de fibrose kystique infectés par *P. aeruginosa*. Malgré des études *in vitro* démontrant que la PCN interfère avec de multiples fonctions cellulaires, son importance au cours d'une infection clinique n'est bien éclaircée. De plus, peu de voies cellulaires affectées par le PCN sont connues (Lau *et al.*, 2004). Elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte, induit l'apoptose des neutrophiles et augmente la production d'interleukine IL-8 (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011).

I-5-2-6- Les sidérophores

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

I-6-Mécanismes du quorum-sensing chez *P. aeruginosa*

Le quorum sensing (QS) est un mécanisme d'adaptation et de régulation qui permet aux bactéries de prendre des décisions collectives pour la transcription, la production et/ou la sécrétion d'un ensemble spécifique de gènes (Kalia, 2013). Chez *P. aeruginosa*, le quorum-sensing est considéré comme le principal mécanisme de régulation de la pathogénicité et de l'adaptation écologique (Nyaledome, 2016).

Chez *P. aeruginosa*, deux systèmes de QS ont été découverts, le système *las* et le système *rhl*, contrôlant la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la virulence. Le système *las*, le premier a été décrit, comprend le gène *lasR* codant pour la protéine régulatrice LasR et le gène *lasI* codant pour une enzyme, auto-inducteur synthase, LasI, nécessaire à la synthèse d'un type d'AHL : *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C₁₂HSL) (Ruimy et Andremont, 2004). De même, le système *rhl* comprend l'activateur de transcription RhIR et la RhII AI synthase qui synthétise la *N*-butyrrhomosérine lactone (C₄-HSL) (Teresa

et al., 2001). Ce système active des gènes en commun avec le système las et propre comme le rhamnolipide. Le système las contrôle le système rhl. Le système las est contrôlé négativement par le produit du gène *rsaL* et positivement par GacA et Vfr. Récemment, 97 gènes dont la majorité a une fonction hypothétique viennent d'être impliqués dans le QS (Ruimy et Andremont, 2004).

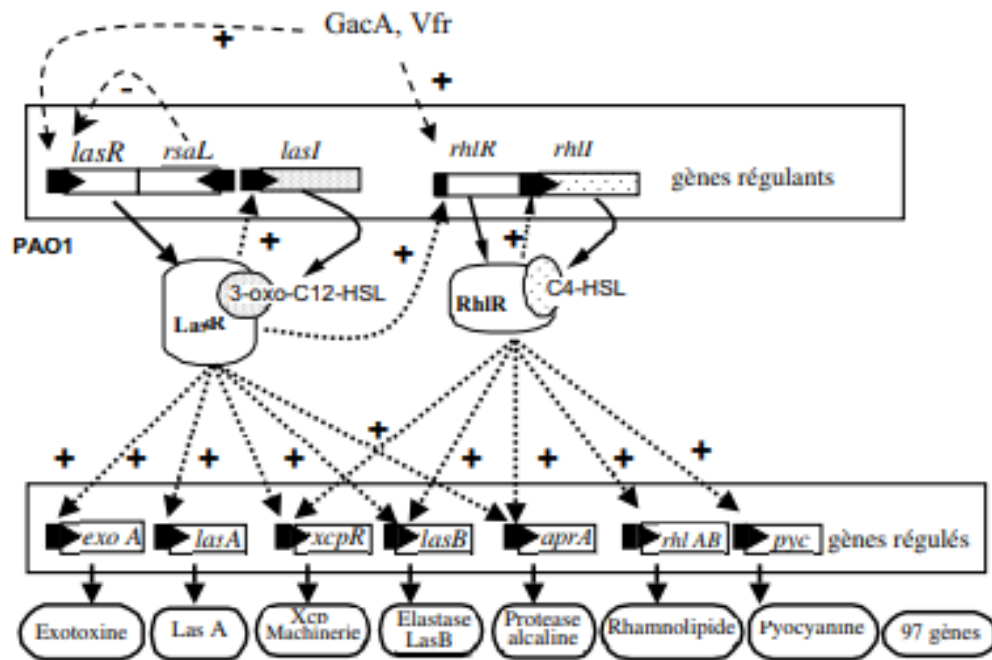


Figure02 : Mécanisme moléculaire du Quorum sensing chez *P. aeruginosa* (Ruimy et Andremont 2004).

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

Un troisième auto-inducteur dont la structure est très différente des deux autres homosérines lactones a été découvert pour la première fois par Pesci *et al.* (1999). Il s'agit du 2-heptyl-3-hydroxy-quinolone et désigné le *Pseudomonas quinolone signal* (PQS). La synthèse et la bioactivité du PQS sont en réalité sous la dépendance des systèmes LasI/R

(effet positif) et RhlI/R (effet négatif) qui contrôlent l'expression du gène *pqsR* (Wade *et al.*, 2005).

I-7- Rôle de signalisation de quorum sensing dans la virulence et la formation de biofilm

Différents travaux ont mis en évidence le lien entre le QS et la pathologie liée à *P. aeruginosa*. Lors d'une étude sur des souris C57BL/6 instillées par un inoculum de *P. aeruginosa* inclut dans des billes d'agarose, Pierre *et al.* (2008) ont étudié la cinétique d'expression de trois gènes de virulence de *P. aeruginosa* appartenant à des systèmes de régulation différents (*exoS*, *lasI* et *algD*) durant les 7 premiers jours de l'infection. Les auteurs ont observé une diminution progressive de l'expression du gène *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.

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).

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

Chapitre II

Multi résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

II-Multi résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

Les infections contractées en milieu hospitalier, dites infections nosocomiales, constituent un problème de santé publique. L'émergence de la multi résistance chez les bactéries limite le choix thérapeutique et entraîne une augmentation du taux de mortalité, de morbidité, une durée prolongée de séjour hospitalier et un coût élevé (Nabila *et al.*, 2006).

La multi-résistance chez *P. aeruginosa* est habituellement décrite comme la résistance ou la diminution de la sensibilité à au moins trois classes d'antibiotiques actifs sur les souches sauvages : β -lactamines hors carbapénèmes (pénicillines, céphalosporines et monobactames) ; carbapénèmes ; fluoroquinolones et aminosides (Aloush *et al.*, 2006 ; Giske *et al.*, 2008; Shorr, 2009).

La résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques est liée à l'existence ou l'apparition de différents mécanismes : production de β -lactamases, sélectivité ou modification des porines, pompes d'efflux notamment dans sa forme biofilm, expulsant activement les composants antimicrobiens (De Kievit *et al.*, 2001; Poole, 2001 ; Aeschlimann, 2003). Environ 800 β -lactamases ont été décrites chez les bacilles Gram négatif et au moins 120 ont été retrouvées chez les souches de *P. aeruginosa* (Zhao *et Hu*, 2010).

La définition de multi-résistance pour une souche de *P. aeruginosa* reste variable selon les auteurs, certains considèrent *P. aeruginosa* comme une BMR s'il est résistant à la ceftazidime, d'autres s'il est résistant à la ceftazidime et aux carbapénèmes et enfin d'autres seulement s'il est résistant à tous les antibiotiques couramment utilisés en thérapeutique (bêta-lactamines, aminosides et quinolones (Montalegre, 2016).

II-1-Mécanisme de résistance au β -lactamines chez *Pseudomonas aeruginosa*

Les antibiotiques de la classe des β -lactamines constituent une vaste famille de molécules qui regroupe les pénicillines, les céphalosporines, les pénèmes et les monobactames. Ces antibiotiques, caractérisés par la présence d'un noyau β -lactame (Figure03), sont actuellement les plus utilisés en thérapeutique en raison de leur large spectre d'activité et de leur action bactéricide rapide sur les bactéries sensibles (Pascal, 2010).

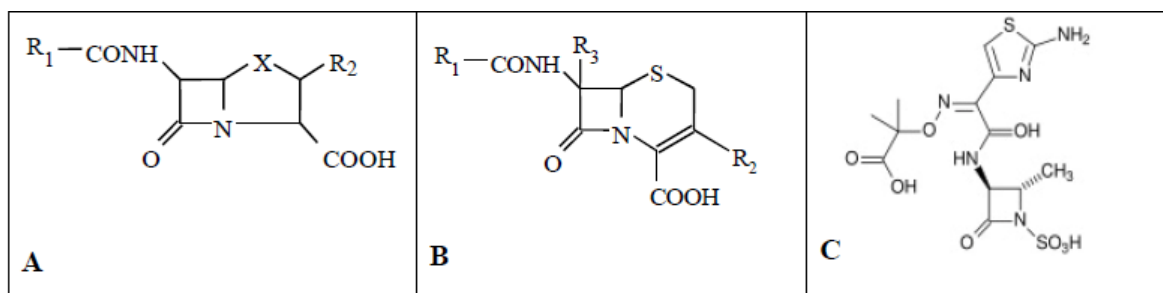


Figure 03 : Structure générale des β -lactamines : (A) Pénames, X=S ; X=C, (B) Céphèmes, R3=H, (C) Aztréonam (Monobactame) (Pascal, 2010).

Les bêta-lactamines en se fixant aux protéines liant les pénicillines, inhibe le remaniement et la synthèse de la paroi bactérienne. La sensibilité aux bêta-lactamines de *P. aeruginosa* est assez variable d'une molécule à l'autre et varie selon de nombreux paramètres. La multiplicité des mécanismes de résistances (enzymatiques, efflux, imperméabilité), leurs variabilités d'expression ainsi que leurs associations confèrent à *P. aeruginosa* un large éventail de phénotypes de résistance, rendant la détection de ces mécanismes *in vitro*, pour une souche d'intérêt clinique, parfois difficile (Montalegre, 2016).

II-1-1- Résistance naturelle

Les mécanismes responsables de la résistance naturelle de *P. aeruginosa* sont les suivants: pompes à efflux, ampC- β -lactamases, perte de la porine de OprD et mutations des gènes de la topoisomérase II et IV.

Le phénotype sauvage de *P. aeruginosa* découle de l'expression simultanée et à faible niveau de mécanismes de résistances enzymatiques et non enzymatiques (efflux et imperméabilité) à l'origine des résistances dites « naturelles » de *P. aeruginosa* (Montalegre, 2016).

P. aeruginosa produit naturellement deux bêta-lactamases : une oxacilline (OXA-50) de spectre étroit dont la contribution au phénotype de résistance naturelle n'est pas significative et une céphalosporine (AmpC) inductible, produite à un faible niveau, qui contribue majoritairement à la résistance naturelle aux bêta-lactamines de cette espèce (Girlich *et al.*, 2004).

Des mécanismes de résistance intrinsèque sont également à l'origine d'une résistance aux antibiotiques (Stover *et al.*, 2000). Ces mécanismes résultent d'une synergie entre une faible perméabilité de la membrane externe et la formation de pompes d'efflux spécifique s'appelées Mex (multidrug efflux systems) incluant MexAB-OprM et MexXY-OprM. En plus de cette résistance intrinsèque, il existe trois autres systèmes MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexJK-OprM qui sont à l'origine d'une multi résistance acquise (Nakamura *et al.*, 2008; Lister *et al.*, 2009; Vettoretti *et al.*, 2009). Cette dernière résulte de mutations causant une hyperactivation des gènes qui codent pour les systèmes d'efflux (Maeda *et al.*, 2008; Rodriguez-Martinez *et al.*, 2009 ; Barbier et Wolff, 2010). L'hyper-expression acquise des systèmes naturels d'efflux est un mécanisme majeur de multirésistance chez *P. aeruginosa* (Lister *et al.*, 2009).

II-1-2-Résistance acquise

Les β -lactamases acquises retrouvées chez *P. aeruginosa* peuvent être classés en trois différents groupes: des enzymes à spectre étroit qui dégradent efficacement les pénicillines et les céfopérazones, les β -lactamases à spectre étendu (BLSEs) qui dégradent également les céphèmes et monobactame; les métallo- β -lactamases (MBLs) qui dégradent toutes les β -lactamines sauf l'aztréonam (Endimiani *et al.*, 2006). Dans la dernière décennie, un grand nombre de β -lactamases de classes A, B et D ont été détectées chez les souches de *P. aeruginosa* (Zhao et Hu, 2010).

Parmi les β -lactamases de classes A, les pénicillinases, dont les enzymes PSE (*Pseudomonas* Spécifique Enzyme) confèrent une résistance aux carboxypénicillines et aux uréidopénicillines, mais pas à la ceftazidime et carbapénèmes (Bert *et al.*, 2002). Quatre enzymes PSE ont été rapportées chez *P. aeruginosa*: PSE-1 (CARB-2), PSE-4 (CARB-1), CARB-3 et CARB-4 (Bert *et al.*, 2002).

II-1-2-1-Résistance enzymatique

Les β -lactamines incluant les pénicillines, les céphalosporines, les monoactâmes et les carbapénèmes constituent la famille d'antibiotiques la plus fréquemment utilisée dans le traitement des infections à bactéries à Gram négatif, notamment *P. aeruginosa*. Les bactéries se sont progressivement adaptées à ces antibiotiques par différents mécanismes de résistance, le plus souvent, par production d'enzymes β -lactamases, qui catalysent de

manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β -lactame de ces antibiotiques (Philippon *et al.*, 1998).

A-Hyperproduction de céphalosporinase chromosomique de classe C

P. aeruginosa produit une céphalosporinase chromosomique naturelle, dite AmpC qui est faiblement exprimée chez les bactéries sauvages. L'expression du gène *ampC* étant inductible, l'enzyme inactive la plupart des pénicillines et des céphalosporines. Cependant, diverses mutations peuvent entraîner la dérégulation permanente et stable du gène *ampC*. Ces mutations peuvent toucher le gène *ampC* lui-même ou les gènes qui rentrent dans sa régulation (Nordmann, 2003), en induisant une résistance à toutes les β -lactamines, à l'exception des carbapénèmes. Les céphalosporines de 4^{ème} génération (céfépime, cefpirome), bien que théoriquement plus stables vis-à-vis de l'hydrolyse par céphalosporinases, sont rarement efficaces sur des souches surexprimant le gène *ampC*, car l'association d'un certain niveau de résistance naturelle au céfépime/cefpirome associée à l'hyper-expression de *AmpC* compromet totalement l'efficacité de ces molécules (Livermore, 2002; Rossolini et Mantengoli, 2005).

B-Oxacillinase

Les BLSEs de classe D sont actives sur l'ensemble des β -lactamines à l'exception des carbapénèmes. A l'exception d'OXA-18, l'activité de ces enzymes n'est pas affectée par les inhibiteurs de β -lactamases. La plupart des oxacillinases à spectre étendu sont codées par des gènes présents sur des plasmides ou des intégrons (Naas et Nordmann, 1999).

Des oxacillinases, peu sensibles aux inhibiteurs, plasmidiques le plus souvent. Ce groupe comporte des pénicillinases qui hydrolysent les pénicillines A, M et les carboxypénicillines, des BLSE qui hydrolysent en plus certaines céphalosporines et des carbapénémases (de type OXA) qui hydrolysent les carbapénèmes à un degré variable ainsi que les autres β -lactamines à un degré tout aussi variable (Montalegre, 2016).

C-Carbapénémases de classe B

Ce sont des métalloprotéines chromosomiques ou plasmidiques conférant une résistance aux carboxypénicillines, aux céphalosporines et à l'aztréonam, ainsi qu'un bas niveau de résistance à l'imipénème. Les carbapénémases sont redoutables car elles

induisent une résistance de haut niveau à toutes les bêta-lactamines (Nordmann et Guibert, 1998).

Les Carbapénémases de type Métallo- β -lactamases (MBLs) sont des enzymes appartenant à la classe B d'Amblar (métallo-enzymes). Depuis l'apparition des enzymes IMP et VIM dans les années 90 (Watanabe *et al.*, 1991; Lauretti *et al.*, 1999), les MBLs sont devenues les Carbapénémases les plus répandues et les plus significatives chez *P. aeruginosa*. Ces enzymes possèdent dans leur site actif un cation indispensable à leur activité qui est invariablement le Zinc. En outre, l'activité de ces enzymes est inhibée par l'addition de chélateur d'ions bivalents (EDTA). Ce sont des métalloprotéines, chromosomiques ou plasmidiques, qui ont une activité catalytique beaucoup plus forte que les autres β -lactamases et hydrolysent toutes les β -lactamines sauf l'Aztréonam (Nordmann et Poirel, 2002). Ces Carbapénémases acquises constituent actuellement sept groupes décrits chez *P. aeruginosa*: IMP (active sur l'IMiPenem), VIM (Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase), SPM (Sao-Paulo Metallo- β -lactamase), AIM (Australia IMipenemase), GIM (German IMipenemase) et, plus récemment NDM-1 (New Delhi Metallo- β -lactamase) et FIM-1 (Cornaglia *et al.*, 2011). Les types IMP et VIM demeurent les MBLs les plus rapportées dans le bassin méditerranéen chez *P. aeruginosa* (Sefraoui, 2015).

D- β -lactamase à spectre étendu ou élargie

Les β -lactamases à spectre étendu (BLSEs) appartiennent aux classes A ou D d'Amblar. Elles sont spécifiquement définies comme des β -lactamases capables d'hydrolyser les carboxypenicillines et les uréidopénicillines, mais aussi les céphalosporines à spectre étendu (ceftazidime, céfépime, cefpirome) et l'aztréonam et sont inhibées par l'inhibiteur des β -lactamases, l'acide clavulanique (Weldhagen *et al.*, 2003).

De nombreuses bêta-lactamases de classes A à spectre étendu (TEM, SHV, CTXM, GES par exemple), celles-ci ont une grande variabilité et un spectre étendu aux C3G telle que la ceftazidime ainsi qu'aux C4G comme le céfépime. Associée aux mécanismes de résistances naturels déjà importants de *P. aeruginosa*, elles entraînent une résistance de *P. aeruginosa* à la totalité des bêta-lactamines en dehors des carbapénèmes (Montalegre, 2016).

II-1-2-2-Résistance non enzymatique

De nombreux antibiotiques sont exclus de *P. aeruginosa*. Cette exclusion a été longtemps attribuée à l'imperméabilité de la membrane externe jusqu'à la découverte des systèmes d'efflux. Ce sont des systèmes complexes à trois composants qui permettent le rejet des molécules depuis l'espace périplasmique vers le milieu extérieur (Piddock, 2006). En plus de leur rôle dans la résistance naturelle, les pompes d'efflux MexAB-OprM et MexXY-OprM peuvent contribuer, lorsqu'elles sont surproduites, à accroître la résistance de la bactérie à plusieurs familles d'antibiotiques. Ce phénomène est lié à la survenue de mutations spontanées dans les gènes régulateurs de ces systèmes (Sefraoui, 2015). MexAB-OprM, MexCD-OprJ, et MexXY-OprM confèrent une résistance aux β -lactamines (Poole, 2011).

A-Surexpression de système d'efflux

L'hyper expression acquise des systèmes naturels d'efflux transmembranaire est un mécanisme majeur de multirésistance chez *P. aeruginosa* (Lister *et al.*, 2009). Ces systèmes, multiples, déterminent certaines résistances naturelles de l'espèce. Les mutations activatrices portant sur l'opéron *MexAB-oprM* (expression constitutive faible) sont les plus fréquemment impliquées dans l'émergence de résistances aux β -lactamines. Ce système associe une pompe (MexB), une lipoprotéine de liaison à la membrane (MexA), et la porine (oprM) par laquelle l'antibiotique est expulsé de la cellule. L'hyper expression de MexAB-oprM confère une diminution de la sensibilité, voire une résistance, à la ticarcilline, à l'aztréonam et au méropénème, l'imipénème n'étant pas un substrat de la pompe MexB. L'hyperexpression du système MexCD-oprJ, plus rare, peut réduire la sensibilité au céfépime (François et Michel, 2010).

B- Perte de la porine OprD2

La porine OprD est une porine spécifique qui se lie à des acides aminés basiques tels que l'histidine, la lysine et l'arginine, des dipeptides contenant un résidu basique, l'imipénème et gluconate (Huang *et al.*, 1995). En effet, la résistance aux carbapénèmes résultant de la perte de la porine OprD nécessite la présence d'AmpC inductible ou déréprimée de manière stable (Livermore, 1992).

C-Modification des lipopolysaccharides membranaire

- **Résistance aux fluoroquinolones**

La résistance acquise aux fluoroquinolones elle est en progression actuellement, et peut survenir selon 3 mécanismes :

- ✓ Modification d'affinité de la cible : Des mutations des sous-unités A et B de l'ADN-gyrase ou de la sous-unité C de la topo-isomérase IV, sont responsable d'une augmentation des CMI, d'intensité variable selon les mutants.
- ✓ Troubles de la perméabilité : par modification des porines ou du LPS.
- ✓ Efflux actif : Comme nous l'avons vu précédemment, il existe une résistance croisée de bas niveau aux fluoroquinolones avec la résistance aux β -lactamines par efflux. Ainsi de faibles concentrations de fluoroquinolones peuvent sélectionner des mutants résistants aux 2 familles d'antibiotiques

Plusieurs mécanismes coexistent la plupart du temps (notamment l'association de la mutation de gyrase A et d'un efflux), pouvant être responsables d'une résistance de haut niveau aux fluoroquinolones (Khodursky et Cozzarelli, 1998)

- **Résistance aux aminosides**

La résistance aux aminosides concerne par ordre de fréquence décroissante : la gentamicine, la tobramycine, la nétilmicine, et l'amikacine. La corésistance avec les β -lactamines et les fluoroquinolones est fréquente, surtout pour le sérotype O12 (Poole, 2005). L'action des aminosides repose principalement sur la capacité à inhiber la synthèse protéique en bloquant l'action ribosomale aux différents stades de la traduction, ou encore en introduisant des erreurs dans la synthèse peptidique (Vakulenkol et Mobashery, 2003).

- **Résistance à colistine**

La colistine, antibiotique appartenant à la famille des poly myxines, est un polypeptide cyclique, cationique, ciblant les membranes bactériennes (Falagas et kasiakou, 2005). Les poly myxines sont des antimicrobiens synthétisés par la bactérie à coloration de Gram positive, *Bacillus polymyxa*. L'effet bactéricide des poly myxines est obtenu par action au niveau de la membrane cytoplasmique (Lee *et al.*, 2014).

L'émergence et la propagation de souches de *P. aeruginosa* multi résistantes aux antibiotiques a conduit à la résurgence de l'utilisation des antibiotiques poly myxines telles que la poly myxine B et la colistine comme agents thérapeutiques (Nation et Li, 2009). Les bacilles pyocyaniques sont parvenus à modifier la composition de leur membrane externe de façon à la rendre imperméable à ces deux agents par une modification déterminée de la composante lipidique A du LPS (Moskowitz *et al.*, 2004).

D. La modification de la cible

- **Mutation**

L'utilisation généralisée de fluoroquinolones a été suivie par l'émergence de résistances, dues principalement à des mutations chromosomiques dans les gènes codant pour les sous-unités des enzymes cibles des médicaments, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, et dans les gènes qui affectent l'expression des canaux de diffusion dans les cellules (David, 2001). Chez *P. aeruginosa*, les mécanismes de résistance aux fluoroquinolones sont la modification de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV, une diminution de la perméabilité de la paroi cellulaire et des systèmes d'efflux de plusieurs médicaments (Drlica *et al.*, 1997 ; Hancock, 1998). Les cibles des quinolones sont considérées comme les topoisomérases de type II (ADN gyrase et topoisomérase IV), qui sont des enzymes essentielles responsables du contrôle de l'état topologique de l'ADN lors de sa réplication et de sa transcription (Takaaki *et al.*, 2001). L'ADN gyrase, un hétérotétramère, est composé de deux sous-unités A et B, codées par les gènes *gyrA* et *gyrB*, respectivement. La topoisomérase IV est homologue de l'ADN gyrase et est également composée de deux sous-unités, ParC et ParE, codées par les gènes *parC* et *parE* respectivement (Kato *et al.*, 1990).

Elle émerge par mutations des gènes des topoisomérases II (*gyrA*) et IV (*parC*) et/ou de ceux régulant l'expression des systèmes d'efflux. Les mutations de *gyrA* semblent pouvoir induire seules une résistance de haut niveau (François et Michel, 2010)

- **Méthylation d'ARN16s**

Les bactéries développent une résistance aux aminoglycosides en produisant des enzymes modifiant l'agent aminoside telles que l'acétyltransférase, la phosphorylase et l'adényltransférase (Yokoyama, 2003). La production d'une ARNr méthylase 16S est

apparue comme un mécanisme de résistance élevée à tous les aminoglycosides désoxystreptamine 4,6 disubstitués, tels que l'amikacine, la tobramycine et la gentamicine (Galimand *et al.*, 2005 ; Kunikazu, *et al.*, 2005).

La coproduction d'une métallo- β -lactamase et d'une ARNr méthylase 16S peut entraîner un profil de résistance aux antimicrobiens extrêmement important (Yohei, 2007). Une série de méthylase spéciales protégeant l'ARNr 16S microbien, principale cible des aminosides, a été identifiée dans plusieurs agents pathogènes nosocomiaux, notamment *P. aeruginosa* (Yokoyama *et al.*, 2003).

II-2-Le biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

II-2-1-La matrice du biofilm

En milieu naturel, 90% des espèces bactériennes ne vivent pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces, autrement dit le mode de vie dominant des bactéries est probablement en biofilm (Ana Cecilia, 2016). Les biofilms sont des communautés de micro-organismes dans lesquels les cellules se collent les unes aux autres et adhèrent souvent à une surface. Ces cellules adhérentes sont généralement incluses dans une matrice auto-produite de substance polymère extracellulaire (EPS). Les opérons Pel, Psl et Alg présents chez *P. aeruginosa* sont responsables de la biosynthèse du polysaccharide extracellulaire qui joue un rôle important dans les interactions de surfaces cellulaires lors de la formation des biofilms (Sinosh, 2018). Les bactéries dans un biofilm sont moins sensibles aux agents antimicrobiens et sont protégées de la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui entraîne des infections chroniques notoirement difficiles à éradiquer (Ma *et al.*, 2009 ; Niels, 2010).

La composition de la matrice dépend des conditions environnementales, de l'âge du biofilm et de la souche impliquée (Hichem, 2006). Les polysaccharides extracellulaires bactériens sont un constituant clé de la matrice extracellulaire des biofilms. *P. aeruginosa* est un organisme modèle pour les études de biofilms et produit trois polysaccharides extracellulaires qui ont été impliqués dans le développement de biofilms, alginate, Psl et Pel. Les exopolysaccharides exercent une grande variété de fonctions impliquant des interactions surface / cellule, ainsi que la protection contre les antimicrobiens et les défenses de l'hôte (Kelly *et al.*, 2011). *P. aeruginosa* utilise la mort cellulaire programmée et l'autolyse pour dégrader la matrice de Psl au centre de la microcolonie afin de libérer

«les germes de biofilm» en vue de leur dispersion future. *P. aeruginosa* produit un ADN extracellulaire qui fonctionne comme un composant matriciel interconnectant de cellule à cellule dans les biofilms (Allesen-Holm, 2006). Les bactéries présentes dans les biofilms sont liées soit à un substrat, soit à une matrice de substance polymère extracellulaire (PSE), qui peut être constituée de protéines, de polysaccharides, d'acides nucléiques ou de combinaisons de ces macromolécules (Kara *et al.*, 2004). Des protéines telles que CdrA agissent comme des «espars» entre les cellules de la matrice. Composants, en renforçant l'échafaudage structural (Eve et Martin, 2017).

II-2-1-1-L'alginate

Les alginates ont été largement considérés comme les exopolysaccharides majeurs de la matrice du biofilm (Wozniak *et al.*, 2003; Stapper *et al.*, 2004). L'alginate, produit de façon chronique chez *P. aeruginosa*, est un polysaccharide produit au cours des étapes initiales de la formation d'un biofilm (Michael, 2013). Ces exopolysaccharides sont traditionnellement considérés comme le principal EPS des biofilms de *P. aeruginosa* au cours de la pathogenèse de la mucoviscidose. Initialement, le poumon à FK est colonisé par des souches de *P. aeruginosa* non mucoïdes, mais en raison de pressions sélectives mal comprises, ces souches se transforment en un phénotype mucoïde caractéristique. Le phénotype mucoïde est dû à la surproduction d'alginate, un copolymère linéaire d'acide mannuronique et d'acide guluronique liés par des liaisons β 1-4 (Kara *et al.*, 2004).

II-2-1-2- Les polysaccharide PSL et PEL

D'autres composés matriciels riches en glucose et mannose (PSL et PEL) ont été mis en évidence par Friedman et Kolter (2004). Le Psl, riche en mannose et galactose, est impliqué dans l'attachement et la maturation du biofilm (Ma *et al.*, 2009). Alors que Pel, riche en glucose, agit comme un polymère de cellulose en formant une pellicule à l'interface air-liquide et a été identifié comme étant un composé pilier dans l'échafaudage de la structure du biofilm (Friedman et Kolter, 2004; Kelly *et al.*, 2011).

II-2-1-3-L'ADN extracellulaire

La matrice de biofilm est composée de diverses macromolécules, notamment des protéines, de l'ADN extracellulaire (ADNe) et des lipides (Nicole *et al.*, 2013). L'ADNe s'avère être un composant essentiel de la matrice de biofilm (Morten *et al.*, 2010). L'ADNe

est présent dans la matrice, fournissant plus de rigidité structurelle. Dans les biofilms à flux continu, les colonies finissent par se développer en forme de champignon en saillie structures. Cependant, lorsque les conditions l'exigent, les cellules de la périphérie de la structure sont capables de revenir à un phénotype planctonique où ils commencent à produire des enzymes qui clivent les composants de la matrice, permettant ainsi aux cellules de se disséminer dans l'environnement et coloniser de nouvelles niches (Fazli *et al.*, 2014).

II-2-2- Les étapes de formation du biofilm

Les biofilms de *P. aeruginosa* se développent au cours d'un cycle multicellulaire en cinq étapes, initiés par la fixation de cellules libres (planctoniques) à une surface, puis par la formation de microcolonies et enfin par la dispersion, permettant aux cellules de microcolonies de nager pour occuper une nouvelle surface (Ma *et al.*, 2009).

1. La phase de transport et d'attachement des cellules vers un substrat, ainsi que la création de ce qu'on appelle un film de conditionnement.
2. L'adhésion des cellules de façon réversible avec la production d'EPS.
3. Le début de la croissance microbienne et de l'évolution de l'architecture du biofilm avec le développement des micro-colonies primaires.
4. La maturation du biofilm avec le développement des colonies.
5. L'essaimage et dispersion du biofilm. Lorsque l'épaisseur du biofilm atteint sa taille maximale, les microorganismes se sont dispersés à nouveau dans le milieu environnant, ou ils peuvent coloniser de nouvelles niches écologiques et par conséquent la formation des autres biofilms (Stoodley *et al.*, 2002)

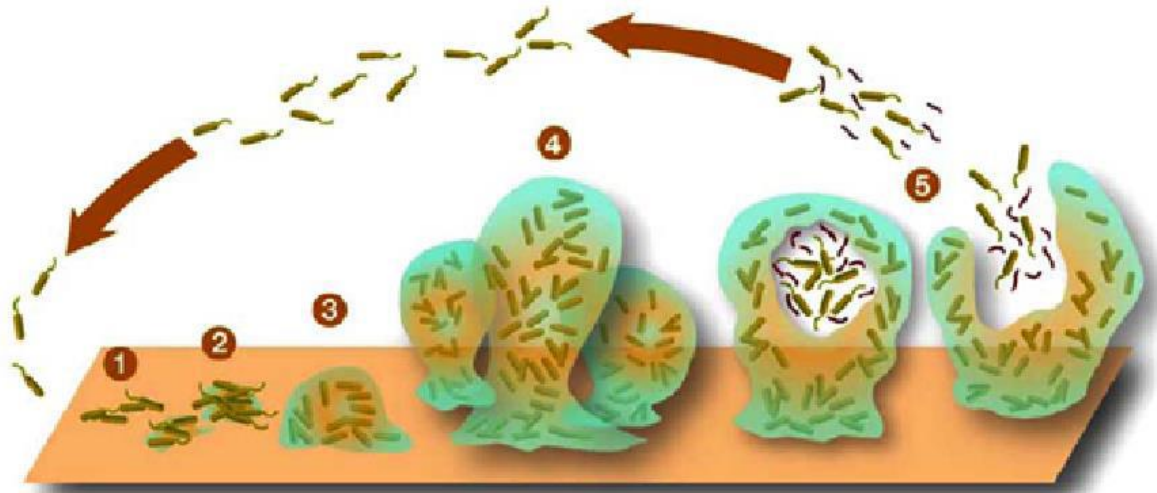


Figure 04 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Stoodley *et al.*, 2002).

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

II.2.3. Résistance du biofilm aux antibiotiques

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

La production d'une matrice d'exopolysaccharides, lors du développement des micro-colonies, a souvent été considérée comme une barrière physique difficile à franchir induisant une limitation du transport des antibiotiques au sein du biofilm (Costerton, 2001). La présence d'alginate dans le biofilm de *P. aeruginosa* permet aussi d'inactiver les antibiotiques de la famille des aminosides (Walters *et al.*, 2003). De même, l'ADNe est un composant majeur de la matrice du biofilm de *P. aeruginosa* aussi capable d'interagir avec les aminosides (Wen-Chi *et al.*, 2013). un gradient en nutriments et en oxygène se développe du sommet à la base du biofilm et affecte la vitesse de croissance et l'activité métabolique des bactéries. Comme la plupart des antibiotiques ciblent principalement des cellules métaboliquement actives, il a été suggéré que l'hétérogénéité métabolique des bactéries dans le biofilm mène à des différences de susceptibilité aux agents antimicrobiens (Aaron *et al.*, 2002 ; Parsek et Tolker-Nielsen, 2008). L'augmentation de stress oxydatif dans les biofilms, provoqué par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de facteurs de défense antioxydants

est une cause d'augmentation de la mutabilité dans les biofilms. Le stress oxydatif endogène dans les biofilms favorise la résistance aux agents antimicrobiens (Boles et Singh, 2008 ; Hoiby *et al.*, 2010b ; Paraje, 2011).

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

Chapitre III

Description et caractéristiques *d'Ammi visnaga*

III- Description et caractéristiques d'*Ammi visnaga*

III-1- Les plantes en médecine

Au cours de la dernière décennie, il y a eu un intérêt accru aux produits naturels. La large variété des constitutions chimiques des espèces végétales correspondue à une diversité d'activités biologiques, telles que les activités antibactériennes, cytotoxique, antifongique antitumorigénique et propriétés antioxydants (Jeeb *et al.*, 2016).

Les plantes ont été utilisées comme médicament depuis des milliers d'années (Al-Snafi, 2013). Les plantes Médicinales sont le cadeau de notre dieu pour aider l'homme à suivre une vie saine et sans maladie. Les plantes médicinales et aromatiques sont utilisées à grande échelle en médecine contre les bactéries résistantes aux médicaments des systèmes chimiques. Les plantes médicinales constituent la principale source de nouveaux médicaments et peuvent constituer une alternative aux médicaments habituels (Al-Mariri et Safi, 2014). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les plantes médicinales seraient la meilleure source pour obtenir une variété de médicaments et composés actifs (Al Akeel *et al.*, 2014). On estime que 35 000 à 70 000 espèces de plantes ont des vertus médicinales dans le monde (Hashim *et al.*, 2014).

Les plantes synthétisent plus de 100000 petites molécules dont la majorité possède une activité contre des bactéries Gram-positives, Gram-négatives et les levures. L'effet antimicrobien des plantes repose sur l'exploitation des parties les plus riches en métabolites secondaires, y compris la totalité de la partie aérienne de la plante (tel que les feuilles, les fruits, les fleurs), ainsi que les graines et les racines. Un nombre important de ces composés sont utilisés en médecine moderne dont une majorité selon leur usage traditionnel (Bodas *et al.*, 2008).

III-2- Description de la famille des *Apiacées*

La famille des *Apiacées* (*Apiaceae*) est constituée de plantes dicotylédones caractérisées notamment par leur inflorescence typique, l'ombelle, d'où leur appellation d'Ombellifères (*Umbelliferae*, nom alternatif). Cette famille relativement homogène, à répartition cosmopolite comprend près de 3 500 espèces réparties en 463 genres (Anthony *et al.*, 2010)

La famille des *Apiaceae* occupe une place importante dans la flore algérienne où elle est représentée par 56 genres, 130 espèces et 26 sous espèces. De nombreuses espèces contiennent des furocoumarines, ces dernières ayant une action de stimulation de la pigmentation de la peau, Les coumarines responsables de ce type d'action sont dérivées du psoralène et de l'angélicine (Djarri, 2011).

La majorité des Apiacées sont des plantes aromatiques grâce à leurs sécrétions d'huile essentielle (Paloma, 2012). Le genre *Ammi* comprend 3 espèces parmi la flore Algérienne.

III-3-L'espèce *Ammi visnaga*

Le khella, ou **Noukha** dans le Maghreb, également nommée *Ammi visnaga*, est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle de la famille des *Apiaceae*. *Ammi visnaga* est une plante vivace, très fréquente dans le bassin méditerranéen (Khalfallah *et al.*, 2011).

Les espèces d'*Ammi visnaga* appartiennent à la famille *Apiaceae*(Ombellifères), qui fournissent une multitude de composés bioactifs (principalement les coumarines et les flavonoïdes) (Thukaa *et al.*, 2010). *A. visnaga* (L.) Lam. (khella) est une plante médicinale aromatique et commerciale au goût amer principalement connue au Maghreb alors qu'elle pousse spontanément dans tout le bassin méditerranéen. C'est une plante spontanée très abondante, principalement dans la région du nord. Elle est utilisée dans la médecine traditionnelle (Badr *et al.*, 2004).

III-3-1- Caractéristique botanique

Ammi visnaga L. est connu sous plusieurs noms communs, y compris bisnaga, cure-dents et khella. C'est un membre de la famille des *Apiaceae* (*Ombelliferae*), largement distribués en Europe, en Asie et en Afrique du Nord et également dans le monde entier (Hashim *et al.*, 2014). *A. visnaga* est une plante herbacée bisannuelle ou annuelle, qui pousse généralement au printemps (Jaradat *et al.*, 2015).

Elle possède des feuilles alternes et basales, sessiles (dans les pousses supérieures) et courtes en pétioles (vers le bas) (Bishr *et al.*, 2014). Elles sont variables, fréquentes généralement en forme ovale à triangulaire, à une teinte vert grisâtre (Bishr *et al.*, 2014 ; Hashim *et al.*, 2014). Ses tiges sont rameuses, entièrement couvertes d'un feuillage (Bishr *et al.*, 2014).

L'inflorescence est une ombelle d'ombellules très denses composées de très nombreux rayons épaissis et connivents après la floraison qui s'insèrent sur un réceptacle dilaté en disque à maturité. Les fleurs sont blanches. L'involucre comporte des folioles divisés en lanières linéaires-filiformes (Geoff *et al.*, 2005). En outre, *A. visnaga* porte des fruits ovoïdes, contracté par deux méricarpes (d'environ 3 mm de longueur), ces dernier privilégiés par une couleur brun-vert avec une nuance violette et portent des graines ovales minuscules (environ 2 mm de long) (Bishr *et al.*, 2014 ; Hashim *et al.*, 2014; Meepagala *et al.*, 2016) .



Figure 05: *Ammi visnaga* L (Khella, Noukha) (photo personnelle)

III-3-2- Position taxonomique d'*Ammi visnaga*

Selon bock benit (2011), l'*Ammi visnaga* appartient au :

Règne :	Plantae
Embranchement :	<i>Magnoliophyta</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	Apiales
Famille :	Apiaceae
Genre :	<i>Ammi</i>
Espèce :	<i>Visnaga</i>

III-3-3- Habitat et culture

Ammi visnaga est distribué en Afrique du Nord, en Europe, Région de la Méditerranée orientale, Asie du Sud-Ouest, Amérique du Nord, Argentine, Chili, Mexique et Îles Atlantiques (Al-Snafi, 2013). Originaire d'Afrique du Nord, l'*A. visnaga* pousse à l'état sauvage au Moyen-Orient et dans les autres pays méditerranéens (Belkacem *et al.*, 2016). C'est aussi une plante indigène en Asie occidentale et une grande partie de l'Europe comme espèce naturalisée (Hashim *et al.*, 2014).

III-3-4- Usages traditionnels

Les fruits d'*Ammi visnaga* étaient utilisés dans le traitement des symptômes angineux légers, comme traitement de soutien de l'obstruction légère des voies respiratoires dans l'asthme bronchique ou bronchite spastique. Dans ce traitement des crampes gastro-intestinales et menstruation douloureuse. En interne en tant que emménagogue pour réguler la menstruation et pour le traitement des vertiges, du diabète et calculs rénaux (Al-Snafi, 2013). La décoction de graines d'*A. visnaga* est réputée avoir plusieurs propriétés curatives. Les graines décoctées sont fréquemment prescrits par les médecins locaux comme diurétiques et antispasmodiques aux patients atteints de pierres urétriques (Dirar *et al.*, 2014).

III-3-5-Etude phytochimique

Des études sur la phytochimie d'*A. visnaga* ont révélé la présence de divers groupes de constituants chimiques tels que les pyrones, saponines et flavonoïdes (Ammor *et al.*, 2017). Les principaux constituants d'*A. visnaga* les γ -pyrones (dérivés de furanochromone) sont exprimés en khelline (0,3–1,2%) et visnagin (0,05-0,30%), visnaginone, ammiol, khellinol, khellol, visammiol, la khellinine, la khellinone. Un autre groupe important de constituants majeurs sont les coumarines (0,2–0,5%) comme la visnadine pyranocoumarine (0,3%), l'ammoïdine, les visnagans, la samidine, la dihydrosamidine et la xanthotoxine (Al-Snafi, 2013 ; Jaradat *et al.*, 2015). Le dépistage phytochimique de l'extrait aqueux d'*A. visnaga* a révélé la présence de deux flavonoïdes à savoir la quercétine et le kaempférol (Figure06) (Dirar *et al.*, 2014). Parmi les flavonoïdes aglycones, l'un était la quercétine hydroxylée et trois méthoxylées (rhamnazine, rhamnetin et isorhamnetin). Les monoglycosides ont été effectivement modifiés rhamnetin, isorhamnetin et rhamnazine avec 3-O-glucosides et un

isorhamnetin-7-O-glucoside. Les deux diglycosides étaient la quercétine-3-O-rutine et l'isorhamnetin-3-O-rutine (Jaradat *et al.*, 2015).

Les différences dans les constituants chimiques essentiels d'*A. visnaga* et leurs quantités respectives en pourcentage peuvent être expliquée par les différences de biotypes et des origines géographiques (Hashim *et al.*, 2014).

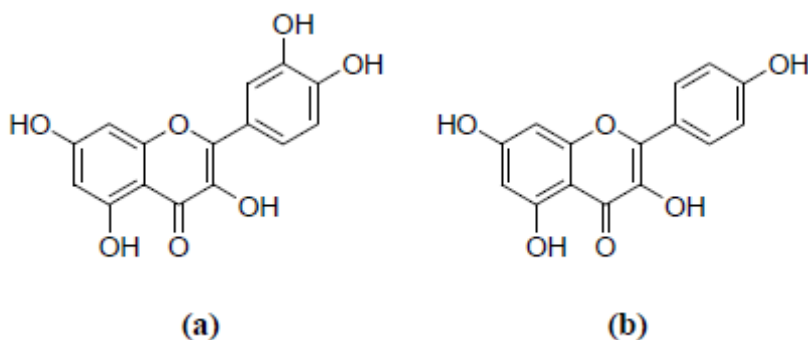


Figure 06 : Structure chimique de (a) : Quercetin et (b) : Kaempferol (Dirar *et al.*, 2014).

La khiline, la visnagine et la visnadine sont les principaux actifs des fruits d'*A. visnaga* (Figure 07), elles sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique. La teneur en composés dans les fruits secs varie considérablement en fonction des facteurs génétiques et des conditions environnementales (Ammor *et al.*, 2017). *Ammi visnaga* contient également des huiles fixes (jusqu'à 18%) (Al-Snafi, 2013).

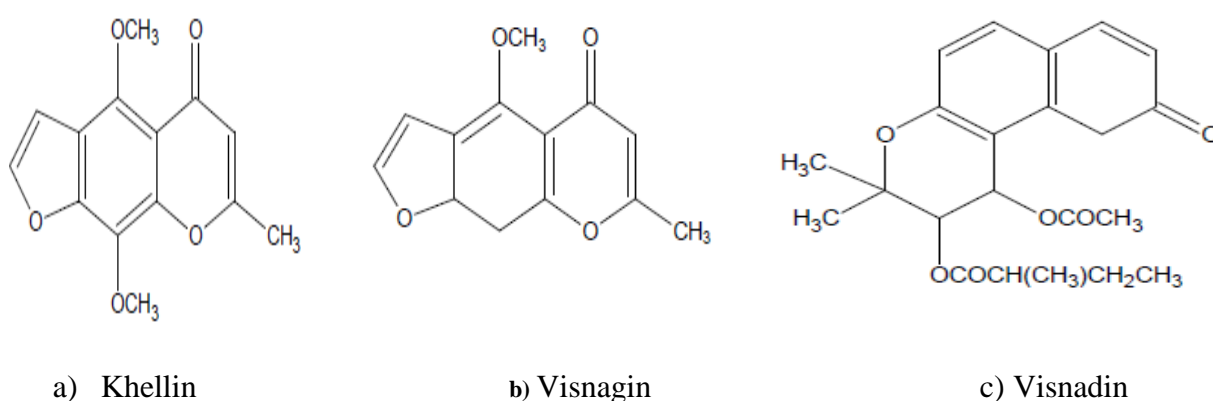


Figure 07 : Structures chimiques de khelline, visnagin et visnadin (Hashim *et al.*, 2014).

III-3-5-1-Huiles essentielles

Les huiles essentielles, sont des extraits volatiles et odorants que l'on extrait de certains végétaux par distillation à la vapeur d'eau ou incision des végétaux qui les contiennent. Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs, de brindilles, d'herbes, d'écorces, de bois, de racines ou de fruits (Burt, 2004). Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont des composés liquides très complexes. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie ; l'aromathérapie (Cimanga *et al.*, 2002).

Selon l'étude qui a été réalisée par Badr et al. au Maroc (2004), Des échantillons d'*Ammi visnaga* fournissent une teneur de 0.27% en huiles essentielles. L'isobutyrate d'amyle (environ 16%), le linalol (22,7%), le méthyl-2-butyrate d'isoamyle (environ 27,7%) et le valérate d'amyle (environ 10%), sont les constituants majoritaires de ces huiles essentielles. Ensemble ces constituants représentent plus des trois quarts des produits détectés dans les huiles essentielles (Badr *et al.*, 2004) . Les huiles essentielles de *A. visnaga* sont reconnues pour son efficacité contre les maladies coronariennes et asthme bronchique (Hashim *et al.*, 2014).

III-3-6-Etude biologique

Les extraits secs ou liquides standardisés d'*Ammi visnaga* ainsi que les principes actifs purs (khelline) sont utilisés dans l'industrie pharmaceutique pour la fabrication de nombreux produits pharmaceutiques (Mokhtar *et al.*, 2014). *A. Visnaga* contient des composés bioactifs (principalement les coumarines et les flavonoïdes) d'importantes activités biologiques (Al-Snafi, 2013). Il y a des siècles, les Arabes ont découvert que les graines d'*A. visnaga* pourraient soulager un certain nombre de maux, tels que la douleur aiguë causée par une réduction du débit sanguin au cœur. En outre, *A. visnaga* est considéré comme antiasthmatique, diurétique, vasodilatateur et un relaxant musculaire efficace (Hashim *et al.*, 2014). Khelline le constituant le plus actif, est approuvé cliniquement pour traiter l'insuffisance coronaire et l'angine de poitrine. En outre, il a été constaté que la khelline se détendait des effets secondaires mais indésirables ont empêché son utilisation dans le traitement de l'asthme (Dirar *et al.*, 2014).

III-3-7-Intérêt thérapeutique

Ammi visnaga a fait l'objet de plusieurs études grâce à des principes actifs: la khelline, la visnadine et la visnagine dont les vertus thérapeutiques ont été prouvées (Badr *et al.*, 2004), ces constituants ayant une activité pharmacologique connue (Akshaya *et al.*, 2015). *Ammi visnaga* est utilisé comme traitement d'appoint dans les affections respiratoires telles que la toux, la bronchite, l'asthme et la coqueluche, et il est utilisé dans le traitement des maladies cardiovasculaires, l'insuffisance cardiaque congestive, l'hypertension, arythmies cardiaques, hypercholestérolémie et athérosclérose (Jaradat *et al.*, 2015). Les graines de l'*A. visnaga* contiennent de la khelline, le constituant chimique considéré comme un vasodilatateur coronaire sélectif et aussi utilisé dans le traitement de l'asthme. En outre, à la fois l'extrait et les constituants d'*A. visnaga* ont une action antispasmodique et dilate les vaisseaux bronchiques, urinaires et sanguins sans affecter la pression artérielle (Hashim *et al.*, 2014). L'*A. visnaga* est utilisé sur la peau pour traiter le vitiligo, le psoriasis, la perte de cheveux par endroits, dans la cicatrisation des plaies, les états inflammatoires et les morsures empoisonnées (Akshaya *et al.*, 2015).

III-3-8-Activité antimicrobienne des extraits

Ammi visnaga est considéré comme une espèce ayant des activités antimicrobiennes. Généralement, ses activités antimicrobiennes d'*A. visnaga* ont été associées à la khelline et à la visnagine. Ces deux constituants ont été considérés comme des agents antibactériens, antifongiques et antiviraux (Hashim *et al.*, 2014). L'extrait aqueux et hydroalcoolique de graines et de tige d'*Ammi visnaga* ont montré une bonne activité antibactérienne contre le *Streptocoque mutans*, *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus sanguinis* agents pathogènes buccaux (Al-Snafi, 2013). Une étude réalisée par Ghareeb *et al* (2011) sur un extrait éthanolique et un extrait aqueux obtenus d'*Ammi visnagaa* montrés une activité antibactérienne contre certains microorganismes (*Staphylococcus aureus*, *leuconostique Mésontroïde*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida tropicalis* et *C. albicans*).

III-3-8-1- Activité antibactériennes des huiles essentielles

La première mise en évidence de l'action des huiles essentielles contre les bactéries a été réalisée en 1881 par Delacroix (Boyle, 1995). L'extraction des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* a été mise au point à partir des ombelles de la plante. Une première ébauche sur

l'étude de la bioactivité de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a mis en exergue son effet inhibiteur sur une seule mycobactérie. Cette activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*A. visnaga* est principalement liée à son profil phytochimique (Badr *et al.*, 2004). Les huiles essentielles de *A. visnaga* étaient testées contre *E. coli* et différentes autres bactéries. Une meilleure activité antibactérienne a été montrée contre *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *P. aeruginosa* (Hashim *et al.*, 2014).

III-3-9-Activité antibiofilm

L'extrait méthanolique d'*A. visnaga* (L) collecté au printemps dans la région de Sidi Lakhdar (Mostaganem, Algérie), a un effet puissant contre la formation de biofilms de *Bacillus cereus* en raison de leur teneur en composés phénoliques totaux (Belkacem *et al.*, 2016).

Partie expérimentale

Chapitre IV

Matériel et méthodes

IV- Matériel et méthodes

IV-1- Obtention de bactérie

Les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* incluent dans cette étude ont été fournis par le Laboratoire de Microbiologie et Biologie végétale de l'Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

IV-2- Identification des isolats

L'identification phénotypique des isolats de *Pseudomonas aeruginosa* a portée sur l'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

IV-2-1- Etude morphologique

a- Examen macroscopique

L'étude macroscopique des colonies a été effectuée sur des cultures jeunes de 24h d'incubation. Cette étude consiste à l'étude de la taille, la forme, l'aspect de la surface, l'opacité et la couleur des colonies et la production des pigments produits par *Pseudomonas aeruginosa*.

b- Examen microscopique

L'observation microscopique, permet d'étudier l'aspect morphologique des cellules microbiennes. Cet examen a été réalisé après une coloration de Gram (annexes).

Le principe de cette examen sert à déterminer le type de Gram de la bactérie (positif ou négatif), et aussi pour définir le type morphologique des cellules (bâtonné ou cocci) et le mode de groupements.

IV-2-2- Etude biochimique et physiologique

IV-2-2-1- Production des pigments

Le milieu King A et King B sont utilisés pour la recherche de la production de la Pyocyanine (pigment bleu-vert), et la Pyoverdine (jaune-verdâtre) respectivement. Après une incubation à 37°C pendant 24h le résultat positif se traduit par l'apparition des pigments qui peuvent diffuser sur toute la boîte.

IV-2-2-2-recherche de la catalase

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme respiratoire présente chez les bactéries à métabolisme oxydatif, cette enzyme permet d'empêcher l'accumulation d'eau oxygéné.

Il s'agit de mettre en contact une colonie bactérienne avec une goutte d'eau oxygénée. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un dégagement gazeux sous forme de mousse ou de bulles d'oxygène, due à la dégradation de l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène.

IV-2-2-3- Croissance à 4°C et à 42°C

Les huit isolats de *P. aeruginosa* sont ensemencés en stries simple sur le milieu gélose nutritive, ensuite elles sont incubées pendant 48h à 4°C et à 42°C. La lecture de résultat est basée sur la présence ou l'absence de croissance.

IV-2-2-4- Test de RM

Le test de rouge de méthyle (RM) est une réaction utilisée pour mettre en évidence la voie fermentative des acides mixtes. A partir de la culture jeune on prend une colonie par l'anse de platine stérile et on l'ensemence dans un tube contenant le milieu Clark et Lubs et puis incuber pendant 24h à 37°C. La lecture est faite après l'addition de 2 à 3 gouttes du rouge de méthyle.

Le test positif se traduit par l'apparition d'une couleur rouge si la couleur reste jaune le test est considéré négatif.

IV-2-2-5- Test de VP

La réaction de Voges Proskauer (VP) consiste à mettre en évidence la production d'acétone par une réaction colorée. On ensemence une colonie jeune dans un tube Clark et Lubs et on incube à 37°C pendant 24h. Après l'incubation on ajoute des gouttes de VP1 et même volume de VP2. La présence d'acétone (VP positive) se traduit par une coloration rose.

IV-2-2-6- Recherche de Nitrate Réductase

La Nitrate réductase est une enzyme qui est capable de catalyser la réaction de réduction des nitrates (NO_3^-) jusqu'au stade de l'azote atmosphérique N_2 .

Ce test consiste en premier lieu à mettre en évidence la présence ou non des nitrites dans le milieu de culture. On ensemence une colonie jeune dans un bouillon nitraté et on incube à 37°C pendant 24h. Pour la lecture du résultat on ajoute 3 gouttes de l'acide sulfanilique puis 3 gouttes de alpha naphthylamine, le résultat positif se traduit par l'apparition de couleur rouge (NR+), si le milieu reste inchangé on ajoute alors de la poudre de zinc qui joue le même rôle que la nitrate réductase, si elle donne une couleur rouge donc il y a une transformation des nitrates en nitrite par le zinc. Dans ce cas la bactérie est nitrate réductase négative.

IV-2-2-7- Test de citrate

Le milieu au citrate de Simmons contient le citrate de sodium comme une seule source de carbone. La croissance sur ce milieu s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage au bleu du bleu de bromothymol. On ensemence une culture jeune à l'aide de l'anse de platine par une strie simple sur une gélose inclinée, puis incubée à 37°C pendant 24h. Le résultat positif traduit par l'apparition d'une coloration bleu (réactive positive), si le milieu reste de couleur vert la bactérie est citrate négative.

IV-2-2-8- Test de TSI (Triple Sugar Iron)

Le principe de ce test est la vérification de la fermentation du glucose, le lactose et de saccharose par la bactérie et la production de gaz et d' H_2S (gaz qui est produit à partir d'un acide aminé : la cystéine). À partir d'une culture jeune le milieu TSI est ensemencé par des stries à la surface de la pente et par piqure centrale dans le culot.

IV-2-2-9- Mannitol-Mobilité

Le Mannitol-Mobilité est un milieu de culture caractérisé par l'utilisation de mannitol et permet la mise en évidence (ou non) de la mobilité bactérienne.

Un tube de milieu mannitol mobilité est ensemencé par piqure centrale jusqu'au fond du tube et incubé pendant 24h à 37°C si le milieu devient jaune la bactérie est mannitol (+). Si la diffusion de la croissance de la bactérie fait troubler le milieu la bactérie est mobile.

IV-2-2-10- La galerie API 20 E

La galerie API 20 E est composée de 20 micro-tube (surmontés de cupules) contenant des milieux et des substrats déshydratés, qui permettent de réaliser 20 tests biochimiques du métabolisme respiratoire, glucidique et protéique. Pour la préparation de la suspension bactérienne prendre une colonie à partir d'une culture pure et jeune de 20 h et ensemencée dans un tube contenant l'eau physiologies stériles. L'inoculation de la galerie se fait suivant le mode opératoire du fabricant, en notant que :

- ✚ Pour les tests CIT, VP, GEL, les tubes et les cupules doivent être remplis avec la suspension bactérienne.
- ✚ Pour les tests ADH, LDC, ODC, H₂S et URE, les cupules sont remplies d'huile de paraffine afin d'obtenir une anaérobiose.

Après l'incubation de la galerie à 37°C pendant 24- 48 h, la lecture du résultat se traduit par le virage de couleur au cours de la période d'incubation ou révélés par l'addition de réactifs (TDA, IND et VP).



Figure 08: La galerie biochimique API 20 E

IV-2-2-11- Conservation des isolats

Les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* ont été conservés dans des tubes à essai contenant le milieu GN incliné à une température de 4°C.

IV-3- Matérielles végétales

IV-3-1-La source du plante

La plante a été récoltée durant la période du mois d'Avril 2018, dans la région de Mostaganem « forêt de Ain yaakub à Safsaf ».

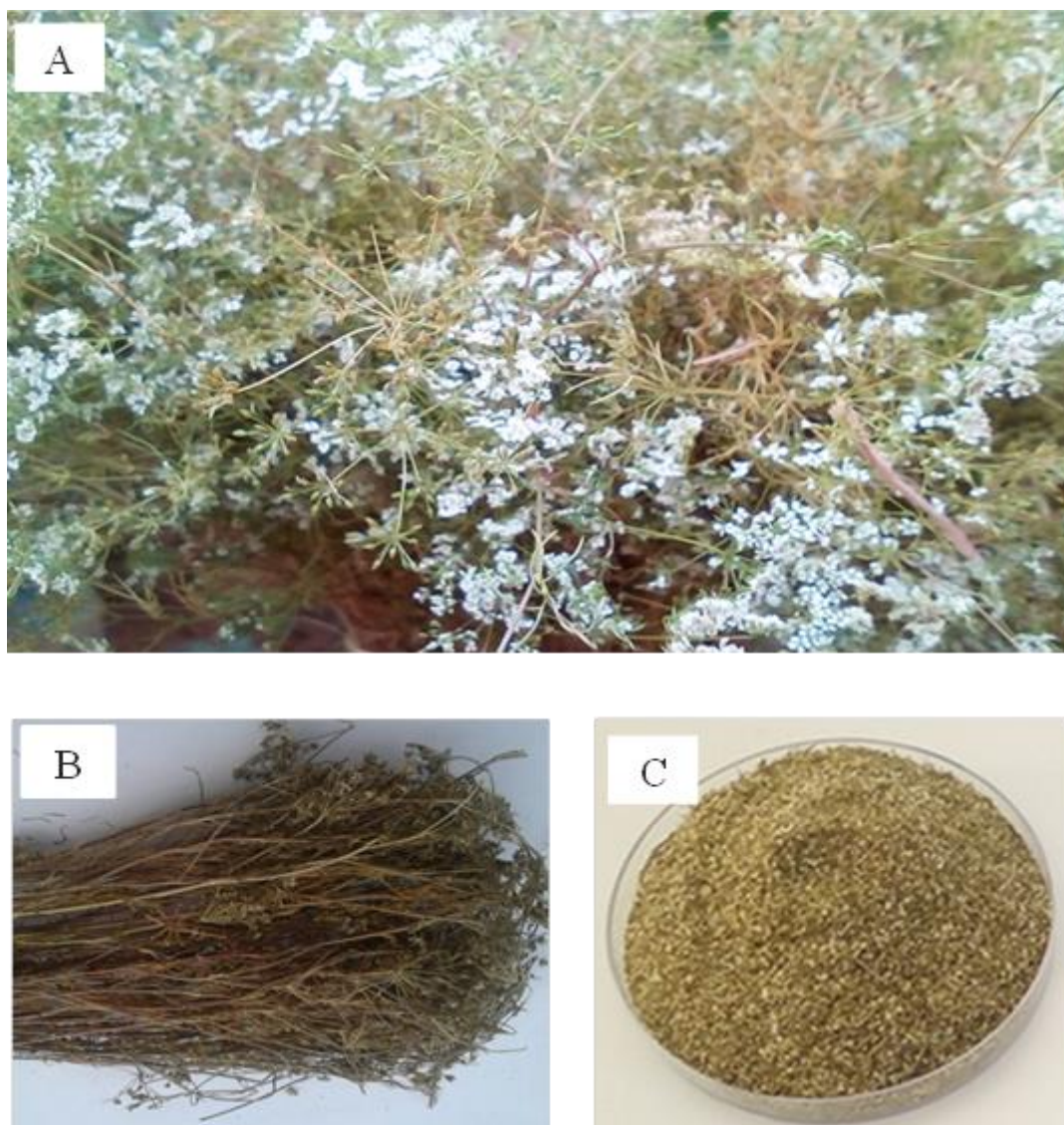


Figure 09: *Ammi visnaga* (L.), A : En période de floraison ; B : sèche et C : poudre

IV-3-2- Préparation des extraits

IV-3-2-1-Extraction hydro-méthanolique

L'extraction a été réalisée par macération de 50 g de la poudre de l'*Ammi visnaga* dans 1000ml d'un mélange Méthanol-Eau (700/300, V/V) (Fathiazad *et al.*, 2011). Le mélange a été agité par un agitateur magnétique pendant 48 heures à température ambiante. Les

suspensions sont ensuite filtrées à travers un papier filtre, la phase hydro-méthanolique résultant a été évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif (Modèle : Buchi Switzer land, Type : 201) à 50°C pour éliminer le méthanol.

➤ **Fractionnement de la phase aqueuse**

La solution aqueuse (phase aqueuse) ainsi obtenue a subi une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter avec deux solvants organiques, acétate d'éthyle (AcOEt) et n-Butanol. La solution aqueuse est extraite jusqu'à l'épuisement avec chaque solvant, chaque portion de solvant organique (phase organique) reste en contact avec la phase aqueuse sous agitation manuelle pendant quelques secondes, puis elles sont laissées reposer jusqu'à la séparation des deux phases. Après décantation, les portions de chaque phase organique sont réunies et évaporées à sec, sous pression réduite à 40°C pour l'évaporation de l'acétate d'éthyle et à 60°C pour l'évaporation de n-butanol. Les deux extraits issus du fractionnement sont conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation (figure12).

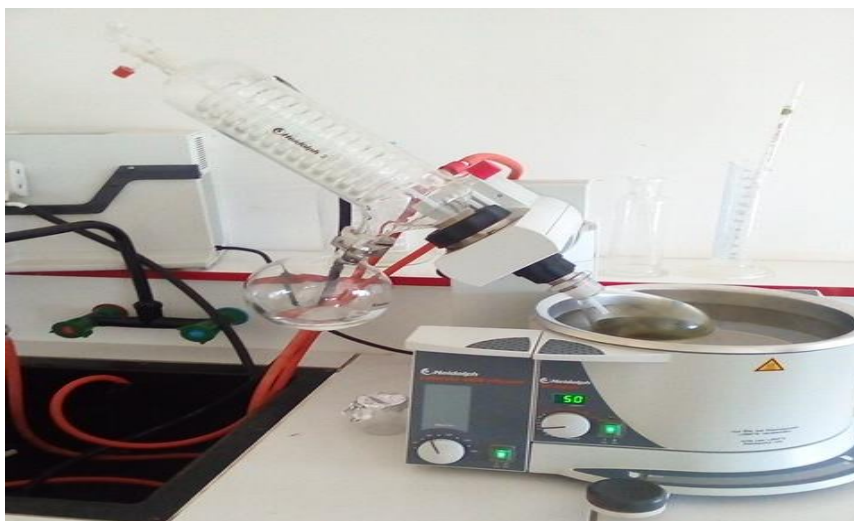


Figure10: Rotavapeur utilisé pour l'extraction hydro-méthanolique de plante

Ammi visnaga.

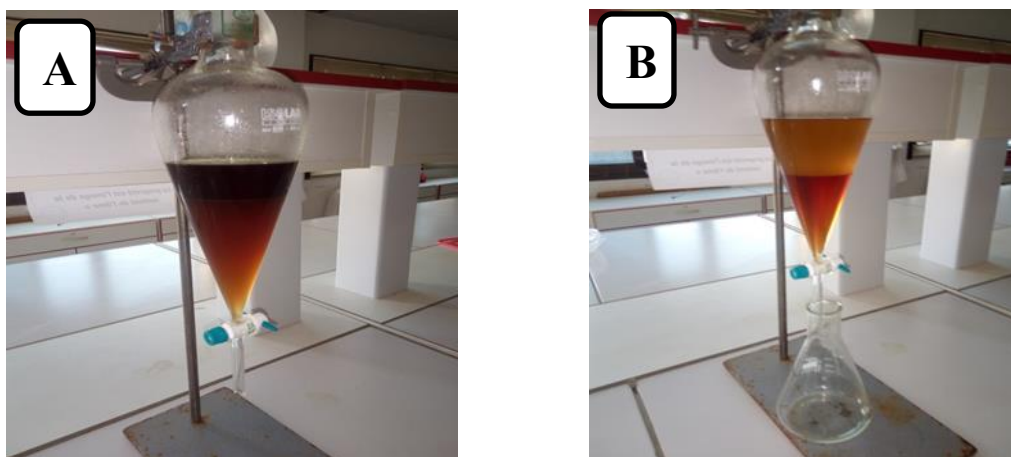


Figure 11 : Fractionnement de la phase aqueuse par les solvants organiques

A : l'acétate d'éthyle ; **B** : n-butanol

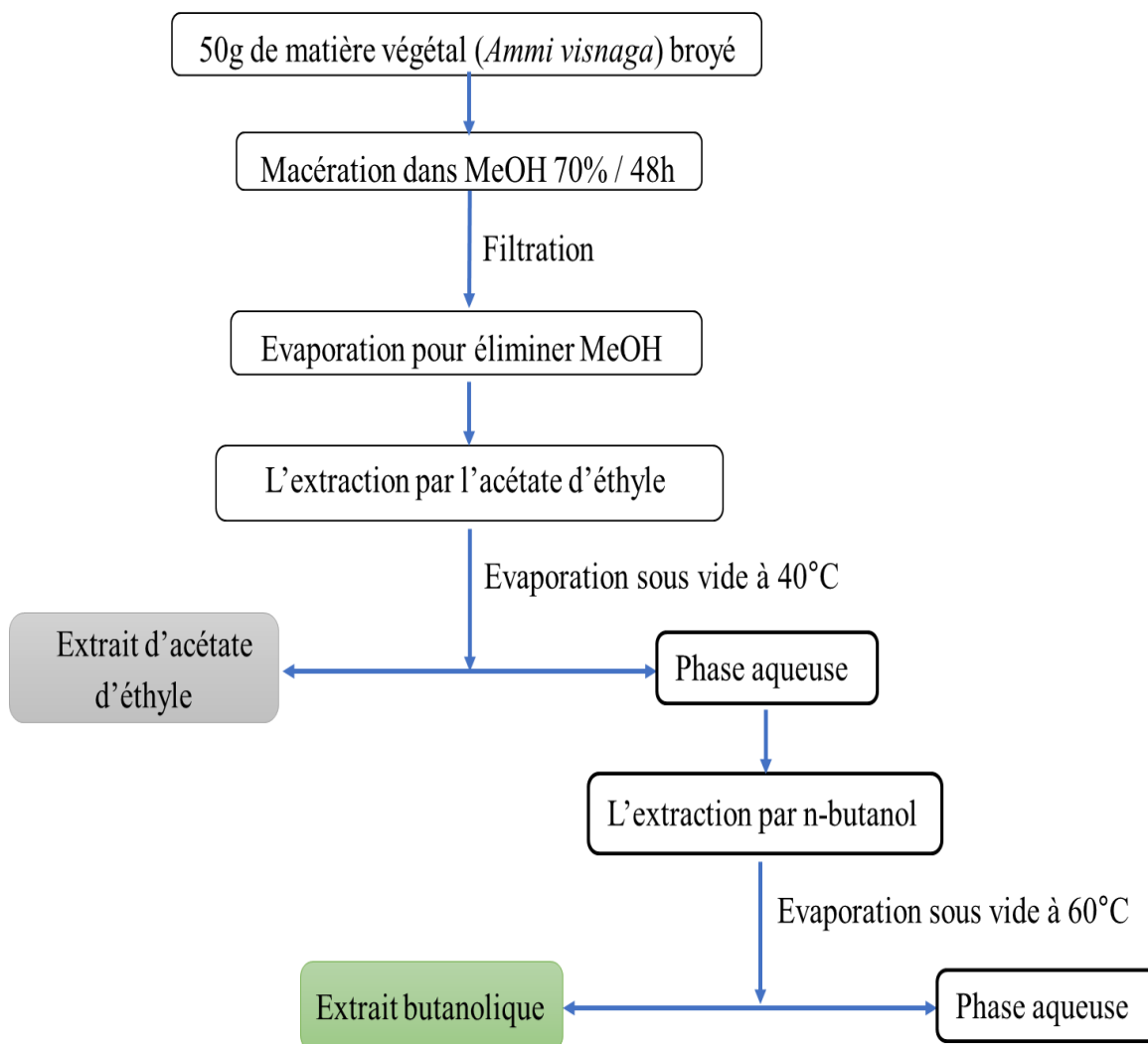


Figure 12 : Protocole de l'extraction par l'acétate d'éthyle et le butanol.

IV-3-2-2-Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation

La poudre de plant *d'Ammi visnaga* a été soumise à une hydrodistillation en se servant d'un dispositif d'extraction type Clevenger. L'opération consiste à immerger une quantité de la masse végétale (175g) dans un ballon en verre (de 1 litre) contenant 200 ml d'eau distillée. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées de l'huile essentielle passent à travers le réfrigérant où aura lieu la condensation. Les gouttelettes d'huile ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli au préalable d'eau distillée. En raison de la différence de densité, l'huile surnage à la surface de l'eau et elle est récupérée. L'hydrodistillation dure de 4 heures. Les huiles essentielles obtenues sont conservées à une température de 4 C° dans des flacons inactiniques à l'abri de la lumière (Bouderdara, 2013).

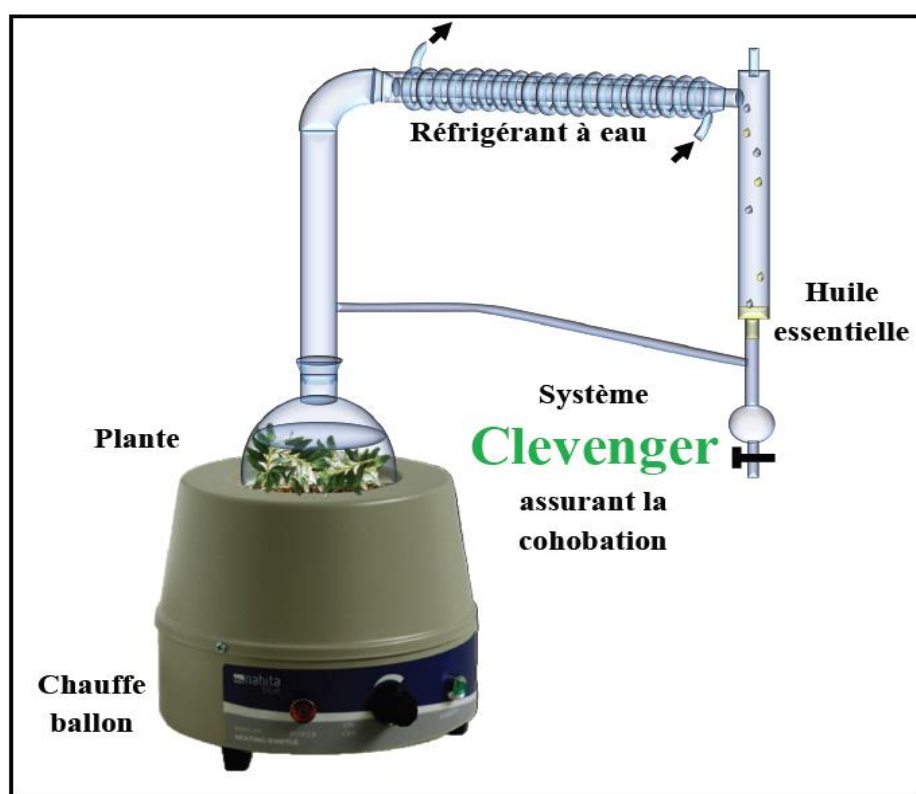


Figure 13 : Schéma du montage d'hydrodistillation (Clevenger) (Mengal et Mompon, 1994).

IV-3-3-Détermination de l'activité antibactérienne des extraits d'*Ammi visnaga*

L'activité antibactérienne des deux différents extraits issus du fractionnement par extraction liquide-liquide (Extrait d'acétate d'éthyle et extrait butanolique) d'extrait hydrométhanolique et de l'huile essentielle a été réalisée par deux méthodes:

- Par la méthode de diffusion sur milieu solide.
- Dans la deuxième étape, par la méthode de dilution en milieu liquide, afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ainsi que les concentrations minimales bactéricides (CMB) des extraits actifs (Bouchouka, 2016).

IV-3-3-1- Activité antibactérienne selon la méthode de diffusion par disque

L'activité antibactérienne a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton (Al Akeel, 2014). Elle permet de déterminer l'activité inhibitrice de la croissance bactérienne par la mesure du diamètre d'inhibition (Sharififar *et al.*, 2007).

Les deux extraits de la plante d'*Ammi visnaga* (extrait d'acétate d'éthyle et extrait butanolique) ont été dissoutes dans l'eau distillée stérile (EDS) (0,25g/ml) et homogénéiser, puis ajoute les disques en papier Whattman stérile de 6mm de diamètre ont été laissé en contact avec ces extraits pendant 20 min.

Les différentes isolats de *P. aeruginosa* ont étéensemencée dans des boites contenant la gélose nutritive par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées. Après l'incubation on prend à l'aide d'une anse de platine stérile une colonie bien isolé et mise dans un tube contenant l'eau physiologie stérile puis agité par un vortex pour obtenir une suspension bactérienne homogène. 1 ml de cette suspension a été déposé sur la gélose MH en boite pétri, l'excédent d'inoculum est éliminé par aspiration 5 min plus tard, les disques en papier Whattman qui ont été imprégnés durant 20 min dans des solutés des extraits ont été déposés dans des condition aseptique sur la surface de la gélose des boites inoculées.

Pour l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*A. visnaga*, des disques de papier Whattman stériles de 6 mm de diamètre ont été imprégnés avec cet huile et déposés stérilement sur les boites ensemencées.

L'ensemble des boîtes ont été laissées pendant 15 min à température ambiante pour permettre la diffusion des extraits et les huiles essentielles puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition développées autour des disques ont été mesurés.

IV-3-3-2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) :

De façon générale la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 h. La technique de microdilution dans des microplaques à 96 puits est la méthode choisie pour déterminer la CMI des extraits testés (Fadipe *et al.*, 2015).

a. Préparation des suspensions

A l'aide d'une anse de platine stérile et pour chaque isolat testés, on a prélevé une colonie bactérienne bien isolé à partir d'une culture jeune de 24h et ensemencer dans un tube de l'eau physiologie stérile et agiter par un vortex, à partir de cette suspension on transfère un volume de 100µl par micropipette vers un tube de 9ml de bouillon nutritif double concentré.

b. Préparation des concentrations :

Avant la préparation de la gamme de concentration, les extraits (Extrait d'acétate d'éthyle et extrait butanolique) sous forme de poudre ont été solubilisés dans 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour préparer une solution de 100mg/ml puis stérilisés par une filtration par filtre millipore 0,22 µm.

A partir de cette solution stérile pour chaque extrait préparé, une gamme de concentrations a été préparée dans des tubes à essai contenant 5ml de l'eau distillée stérile par la méthode d'une dilution selon une progression géométrique de raison de 2, avec des concentrations allant de 100 mg/ml à 1,6 mg/ml.

c. Inoculation

La répartition d'extrait végétal est faite de sorte que les puits de première ligne de microplaque remplie par 100 µl de la plus grande concentration (100 mg/ml). Les puits de la deuxième ligne par la deuxième concentration ainsi de suite jusqu'à la septième ligne qui recevra 100 µl d'extrait végétal de 1,6 mg/ml. La dernière ligne recevra 100 µl d'eau distillée

stérile à chaque puit qui a servi de témoin. Ensuite les puits de la microplaque sont inoculés par 100 µl de bouillon nutritive double concentré inoculé.

Les résultats sont lus après une incubation de la microplaque à 37 °C pendant 24 h. La CMI a été donc la concentration du premier puit à partir duquel aucun trouble visible à l'œil nu n'a été observé (Choukchou-Braham *et al.*, 2010).

La CMB est la concentration de l'antimicrobien qui laisse au plus 0.01% de germes survivants (Moroh *et al.*, 2008).

Après la lecture de la CMI, des prélèvements sont effectués de chacun des puits dépourvus de trouble bactérien puis déposés « en stries » sur gélose Mueller Hinton puis incubés à 37°C. La CMB est déterminée après une incubation de 24 heures (Biyiti *et al.*, 2004).

IV-3-4- Effet des extraits sur la formation du biofilm

Pour évaluer l'effet des extraits testés (Extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique) d'*A. visnaga* sur la formation des biofilms de *P. aeruginosa*, une série de concentrations des extraits sont préparé avec l'inoculation de la même manière à ceux effectuées dans la détermination de la concentration minimale inhibitrice (La technique de microdilution dans des microplaques à 96 puits).

La formation du biofilm est évaluée après 24 heures d'incubation de la culture à 37°C. Le milieu de culture est ensuite aspiré, les puits de la microplaque sont lavés 3 fois à l'aide de 200 µl d'eau distillée afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Après séchage à l'air pendant 45 min, les cellules adhérentes sont colorées par une solution de Cristal Violet à 0,5% (m/v) et le colorant est laissé en contact avec les puits pendant 45 min. Le cristal violet est lié aux molécules de surface chargées négativement et aux polysaccharides de la matrice extracellulaire. Les bactéries vivantes, les bactéries mortes et la matrice exopolysaccharidique sont donc colorées par le Cristal Violet (Belkacem *et al.*, 2017). Ensuite, l'excès de colorant est éliminé et les puits sont lavés 3 fois à l'aide de 300 µl d'eau distillée et séchés de nouveau à l'air. La lecture de la formation de biofilm a été faite à l'œil nu (El abed *et al.*, 2011).

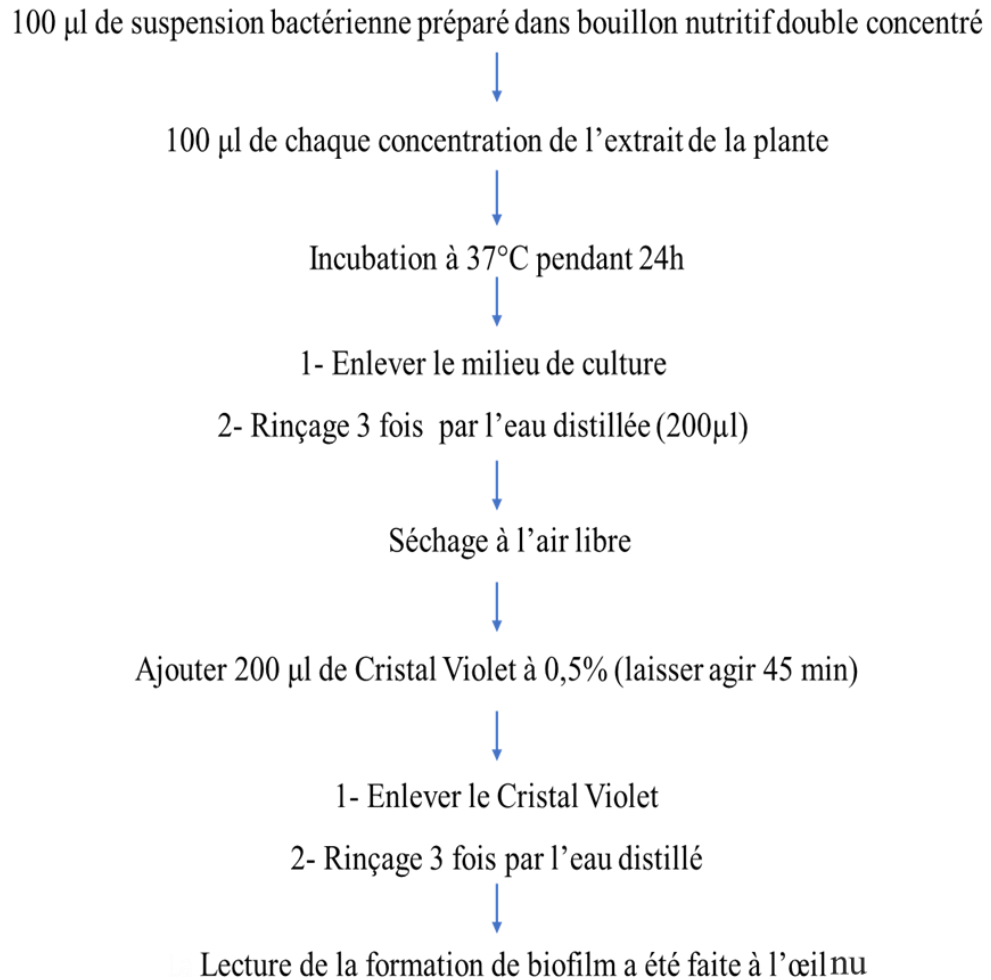


Figure 14: Les étapes de l'étude de l'effet des extraits sur la formation de biofilm.

Chapitre V

Résultats et discussion

V. Résultats et discussion

V.1. Identification des souches

V.1.1. Étude macroscopique

L'observation macroscopique permet de définir les caractères morphologiques des bactéries. Les colonies de *P. aeruginosa* présentent une forme plate, bombée, de contour régulier, avec un aspect métallique, une pigmentation jaune verdâtre sur le milieu King B et bleu-vert sur le milieu King A.

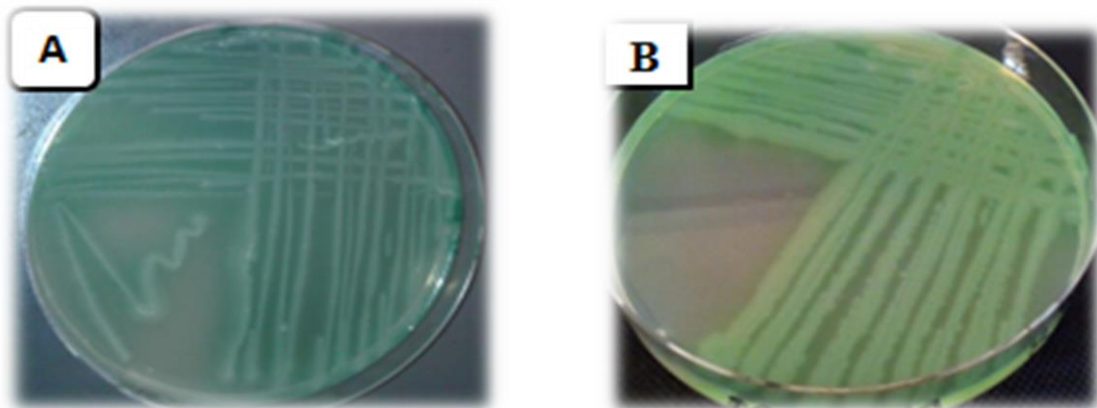


Figure 15 : Aspect macroscopique de *P. aeruginosa* ensemencée sur milieu King A (A) et sur milieu King B (B).

V.1.2. Étude microscopique

L'observation microscopique de *P. aeruginosa* suite à une coloration de gram révèle des bâtonnets droits ou légèrement incurvés de couleur rose (Gramme négative).

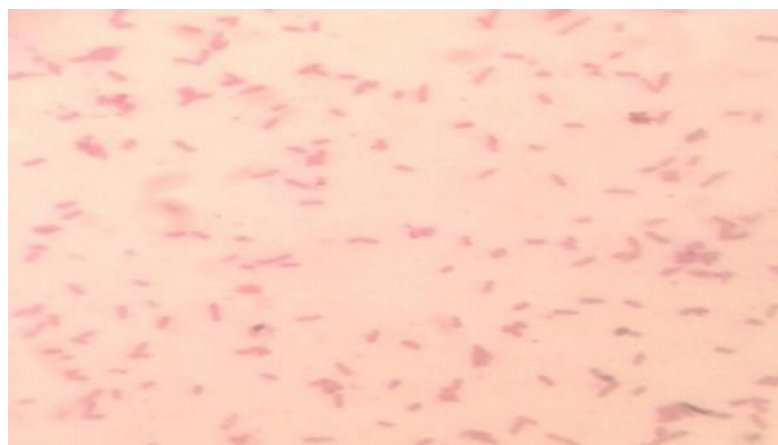


Figure 16 : Observation microscopique de *P. aeruginosa* G \times 100.

V.2. Croissance à 42°C et 4°C

Après 48 heures d'incubation, toutes les bactéries ont poussées à 42°C par contre aucune croissance n'a été enregistrée à 4°C.

V.3. Test de catalase

La présence d'une catalase se traduit en quelques secondes par la formation de bulles d'oxygène.

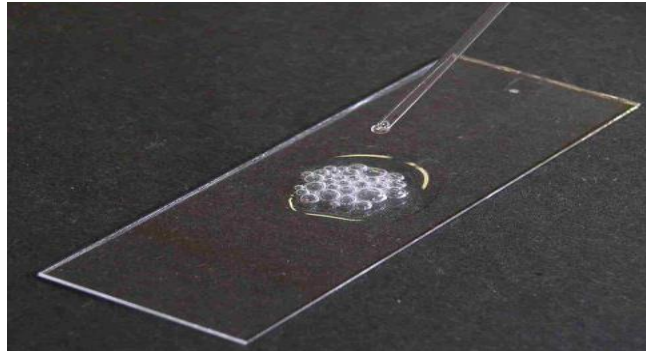


Figure 17 : Résultats de test catalase

V.4. Caractère biochimique

V.4.1. Test TSI (Triple-Sugar-Iron)

Les huit souches de *P. aeruginosa* après une incubation à 37°C pendant 24h présentent une pente alcaline et un culot alcalin (rouge/rouge) ce qui signifie qu'elles sont incapables de fermenter les trois sucres (lactose, glucose et saccharose). L'absence des bulles d'air et des précipités noirs signifie l'absence de gaz et d' H_2S .



Figure 18 : Résultats de test TSI de quelques souches de *P. aeruginosa*

V.4.2. Galerie biochimique API 20 E

Tableau 02 : Résultats de différents tests biochimiques de la galerie API 20 E.

Teste	résultats
ONPG (orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside)	-
ADH (arginine dihydrolase)	+
LDC (lysine décarboxylase)	-
ODC (ornithine décarboxylase)	-
CIT (Assimilation du citrate)	+
H ₂ S (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 (Mélitiose)	-
AMY (Amygdaline)	-

(+) résultats positive.

(-) résultats négative.

**Figure 19** : La galerie biochimique API 20 E après une incubation à 37°C pendant 24h.

V.5. L'activité antibactérienne des extraits et l'huile essentiel d'*Ammi visnaga* sur *Pseudomonas aeruginosa*

V.5.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits et des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

L'activité antibactérienne a été étudiée à l'aide d'une méthode de diffusion par disque sur le milieu gélosé MH. C'est une technique qualitative basée sur la détermination du diamètre des zones d'inhibition apparentées autour des disques chargés par les extraits testés après une incubation de 24h à 37°C.

Les résultats des effets antibactériens des huiles essentielles et des extraits organiques d'*Ammi visnaga* contre les huit souches de *P. aeruginosa* sont positifs et les zones d'inhibition obtenues par l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique étaient dans l'ordre de 6 à 10,3mm et de 8 à 14,5mm pour l'huile essentielle. Après les résultats obtenu nous avons remarqué que les deux extraits organique ont peu inhibé la croissance des isolas de *Pseudomonas* testés tandis que les souches sont plus sensibles à l'huile essentielle.

La comparaison de nos résultats avec d'autres études montre une différence qualitative et quantitative qui peut être attribuée à des différences de protocole de préparation des extraits utilisés. Généralement, les activités antimicrobiennes d'*A. visnaga* ont été associées à la khellin et visnagin. Ces deux constituants ont été considérés comme ayant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales. L'extrait éthanolique à 95% de graines d'*Ammi visnaga* montre une activité antibactérienne contre *Mycobacterium tuberculosis*. De même l'extrait d'acétone (50%), l'extrait aqueux (50%) et l'extrait éthanolique (95%) inhibe la croissance fongique in vitro de *Neurospora crassa* (Hashim *et al.*, 2014).

Dans une autre étude montre de recherche similaire, l'effet antimicrobien de cette plante a été confirmé où elle a montré de nombreux effets thérapeutiques importants. Abroush *et al* (2001) ont signalé l'activité antimicrobienne d'*A. visnaga* (Noukha) contre *S. viridans*. Une étude a montré l'activité antimicrobienne de *A. visnaga* contre certaines espèces des Streptocoques oraux (Semyari *et al.*, 2011). Des travaux de Ghareeb *et al* (2011) sur l'activité antibactérienne et antifongique d'*A. visnaga* ont montré son efficacité contre *K. pneumoniae* et *E. coli* et d'autre souches et sur des espèces fongiques. Al-snafi (2013) a montré les effets antimicrobiens de l'extrait éthanolique et de l'extrait aqueux d'*Ammi visnaga* qui ont été testés contre huit microorganismes pathogènes *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *C. tropicalis* et *C. albicans*,

Jaradat *et al* (2015) et Al-snafi (2013) ont constaté que les extraits d'*Ammi visnaga* obtenus à l'aide de solvants organiques ont montré une forte activité antimicrobienne que l'extrait aqueux.

Selon la méthode de diffusion par disque sur gélose, l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a présenté une forte activité antibactérienne contre les isolats testés de *P. aeruginosa*. On a enregistré des diamètres des zones d'inhibition rapportées entre (8-14,5 mm). Ce résultat est confirmé par des études qui indiquent que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a montré la grande activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* et *S. aureus* ATCC 43300 avec des diamètres d'inhibition de 25, 29, 25 et 25 mm respectivement (Khalfallah *et al.*, 2011 ; Al-Snafi, 2013). Une autre étude a montré l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* contre, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* et *Morganella morganii* (Al-Snafi, 2013). D'autre étude similaire ont démontré l'effet inhibiteur de HE d'*Ammi visnaga* contre des souches d'*Enterococcus faecalis* avec des zones d'inhibition situées entre 10 et 11 mm (Benbalaid, 2015).

En outre HE d'*Ammi visnaga* possède une activité antimicrobienne *in vitro* plus importante vis-à-vis des bactéries et des champignons ou les bactéries sont plus sensibles. Cette activité antimicrobienne d'HE d'*Ammi visnaga* est principalement liée à son profil chimique (Badr *et al.*, 2004).

Tableau 03 : L'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique et l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* contre les isolats de *P. aeruginosa*.

Isolats	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait butanolique	Huile essentielle
SR	10	10,3	8
S1	7	6	9
S2	9	0	9
S3	10	6	11
S4	9	9	14,5
S5	8	0	14
S6	9	9	13
S7	9	8	12

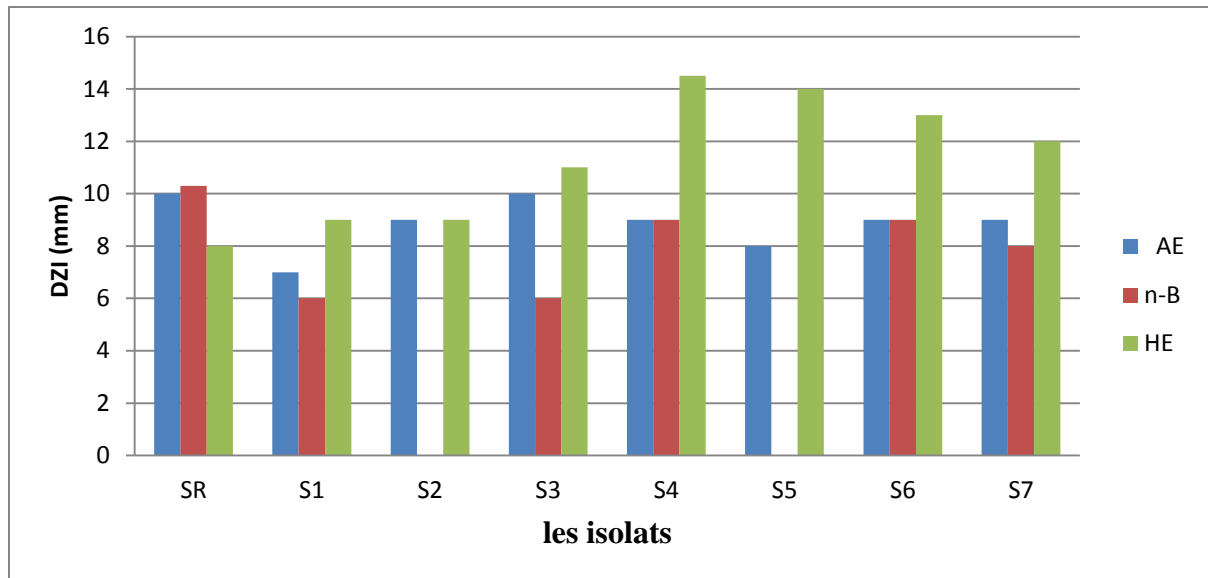


Figure 20 : Résultats des zones d'inhibition (DZI) de l'extrait d'acétate d'éthyle (AE) et l'extrait butanol (n-B) et l'huile essentielle (HE) sur milieu gélosé MH d'*Ammi visnaga* contre les isolats testés de *P. aeruginosa*.

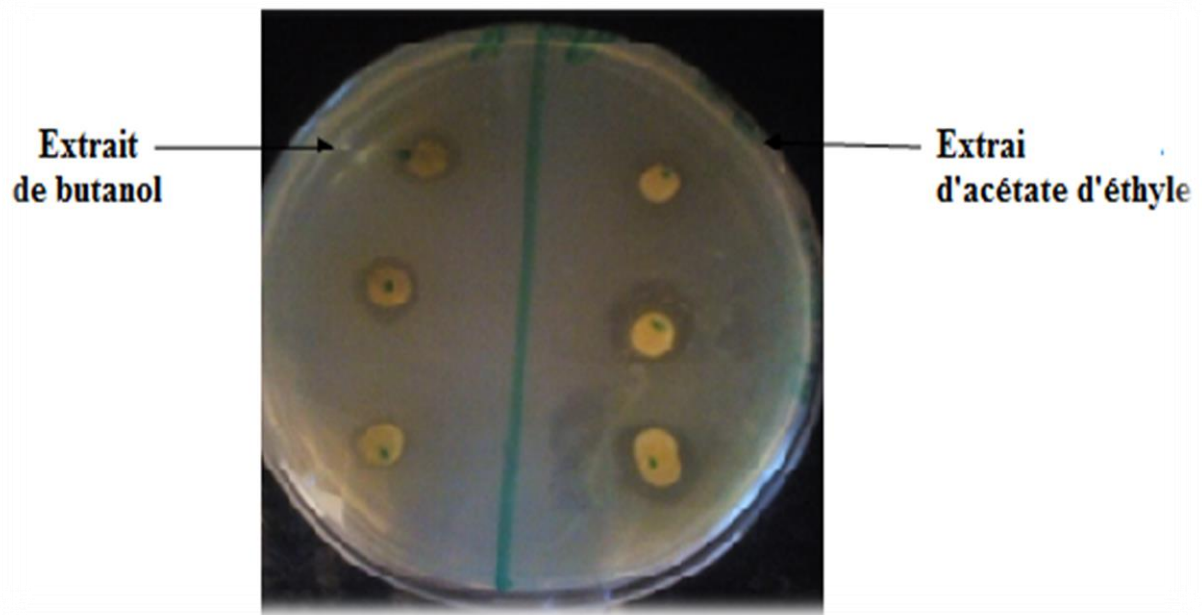


Figure 21 : L'activité antibactérienne des extraits d'acétate d'éthyle et du butanol.

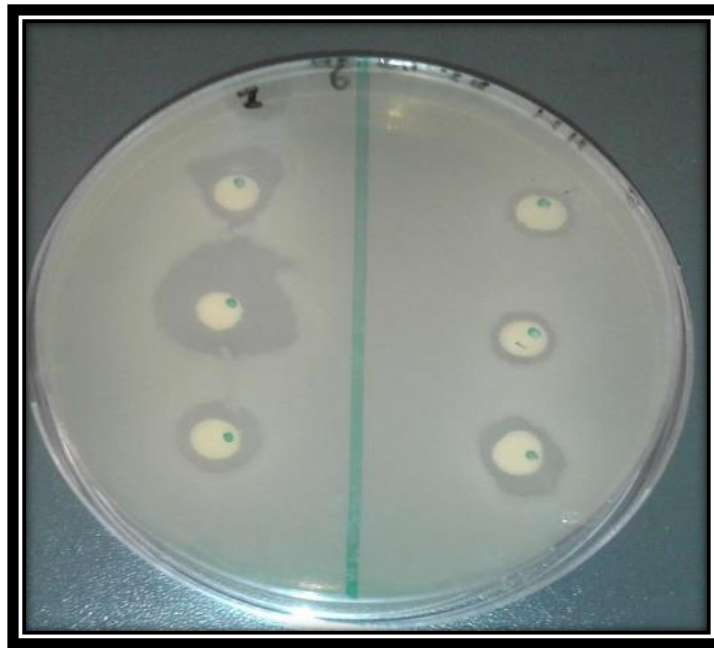


Figure 22 : l'activité antibactérienne de l'Huile essentielle d'*Ammi visnaga*.

V.5.2. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La détermination de la Concentration Minimale d'Inhibitrice de l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique d'*Ammi visnaga* contre une souche de référence (*P. aeruginosa* ATCC 27853 et sept isolats de même espèce en milieu liquide a été faite par la présence ou l'absence de trouble bactérien en présence de différents concentrations des extraits après une incubation de 24h à 37°C.

La comparaison de l'activité antibactérienne entre les deux fractions obtenues par l'acétate d'éthyle et le butanol indique que la fraction d'acétate d'éthyle inhibe les bactéries testée plus que la fraction butanolique avec une CMI de 6,25 mg/ml pour tous les isolats testés. Ceci peut être dû à la grande quantité des substances actives précipitées au cours du processus d'extraction. Cependant, la fraction butanolique exerce une activité inhibitrice (CMI) à une concentration de 12,5mg/ml pour la souche de référence et les isolats S1, S4 et S5 et de 6,25mg/ml pour les isolats S2, S3, S6 et S7.

Selon les résultats obtenus de la CMB (Tableau 05 et les figures 15 et 16), l'extrait d'acétate d'éthyle a montré une action bactéricide élevée par rapport à l'extrait butanolique à une concentration de 6,25 et 12,5mg/ml respectivement.

L'étude de Semyari *et al* (2011) a montré une activité antibactérienne des extraits aqueux et hydroalcoolique d'*Ammi visnaga* contre des *Streptocoque*, La CMI de deux extraits testés (extrait aqueux et hydroalcoolique) de cette plante contre *S. sanguis* était de 5% et la CMB était de 7%. L'extrait hydroalcoolique des graines de cette plante a montré une activité inhibitrice à une concentration de 5% contre *S. sanguis*. L'extrait aqueux a montré une CMI et une CMB à une concentration de 15 et 30% respectivement contre *S. sanguis* et 20 et 30% contre *S. mutans*.

L'extrait éthanolique et aqueux d'*Ammi visnaga* contre des bactéries à coloration de Gram négative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) a présenté une activité inhibitrice à une concentration de 12,5 mg/ml, et à une concentration de 5mg/ml contre *Enterococcus faecalis*. Alors que contre une levure une haute concentration d'extrait était nécessaire pour causer l'inhibition (Al-snafi, 2013).

Tableau 04 : Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide de l'extrait d'acétate d'éthyle sur les isolats testés de *P. aeruginosa*.

Les isolats	L'extrait d'acétate d'éthyle	
	CMI	CMB
SR	6,25	12,5
S1	6,25	12,5
S2	6,25	6,25
S3	6,25	6,25
S4	6,25	12,5
S5	6,25	6,25
S6	6,25	12,5
S7	6,25	6,25

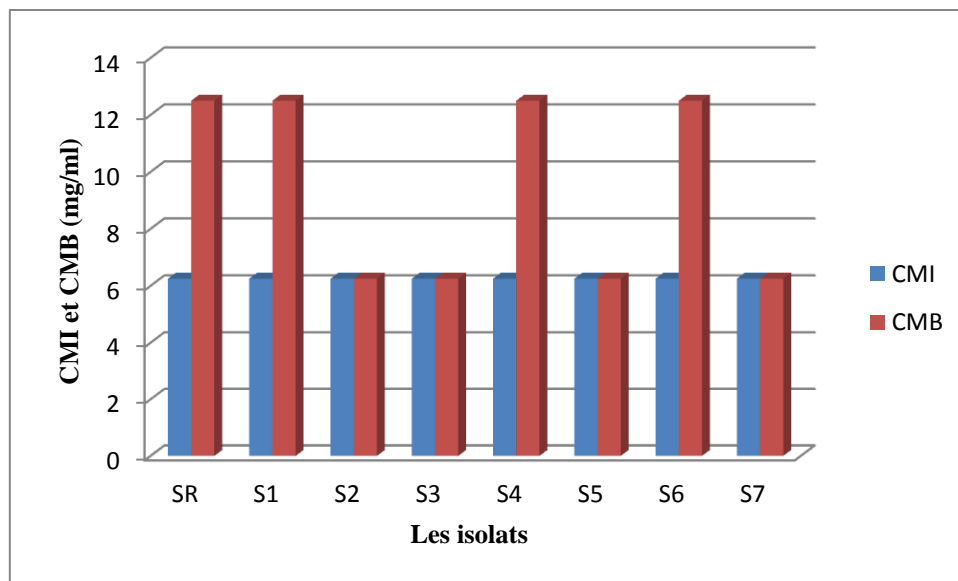


Figure 23 : Résultats de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide de l'extrait d'acétate d'éthyle contre les isolats testés de *P. aeruginosa*

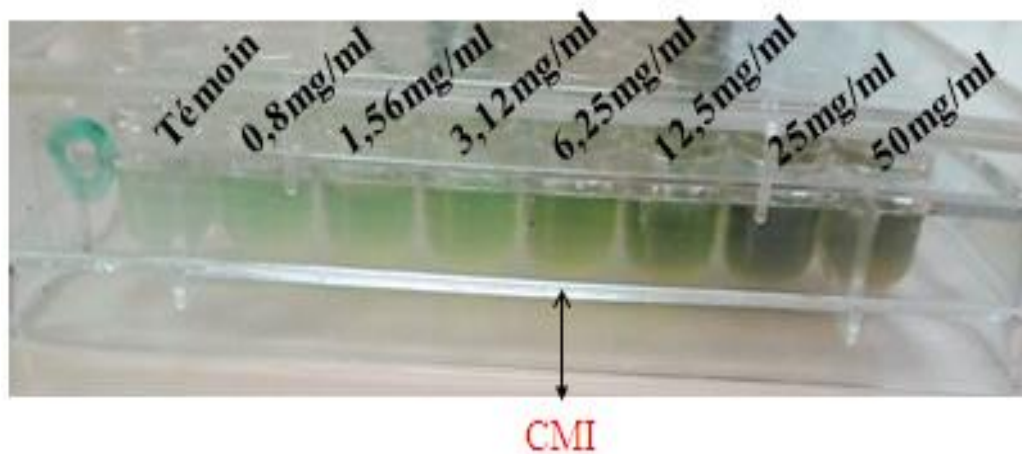


Figure 24 : Résultats de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait d'acétate d'éthyle contre *P. aeruginosa*.

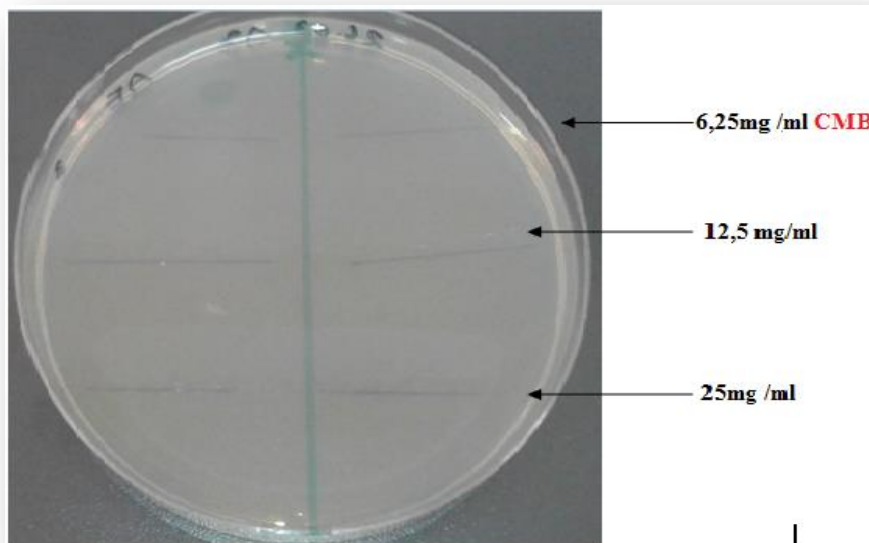


Figure 25 : Résultat de la CMB de l'extract d'acétate d'éthyle d'*Ammi visnaga*

Tableau 05 : Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide de l'extract de butanol sur des isolats de *P. aeruginosa*.

isolats	Extrait butanolique	
	CMI	CMB
SR	12,5	12,5
S1	12,5	12,5
S2	6,25	12,5
S3	12,5	12,5
S4	12,5	12,5
S5	12,5	12,5
S6	6,25	12,5
S7	6,25	12,5

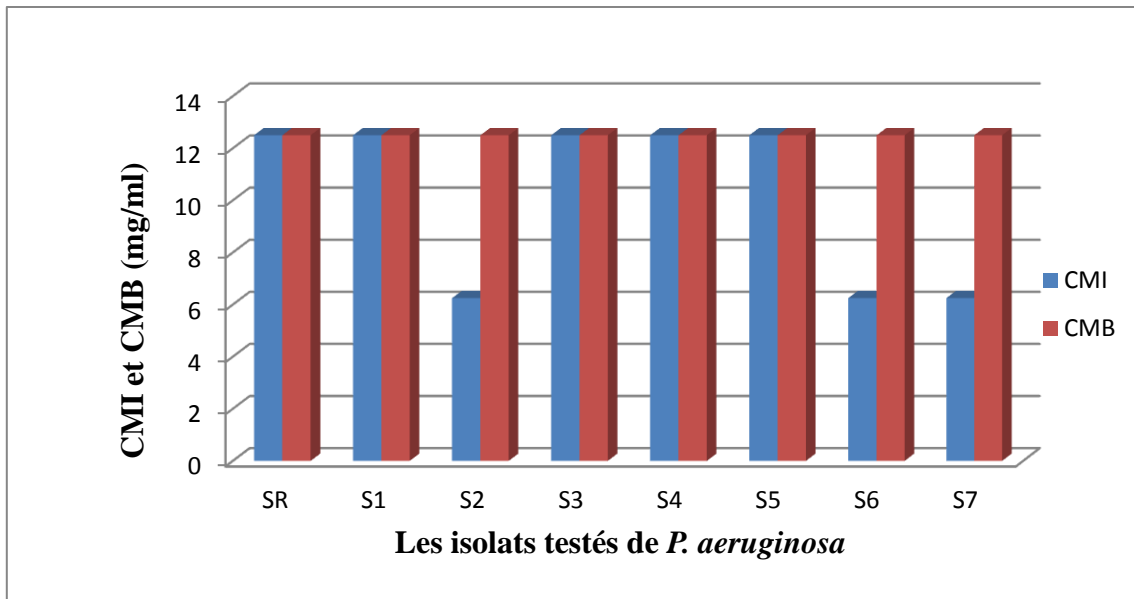


Figure 26: Résultats de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide d'extrait butanolique contre des isolats de *P. aeruginosa*.

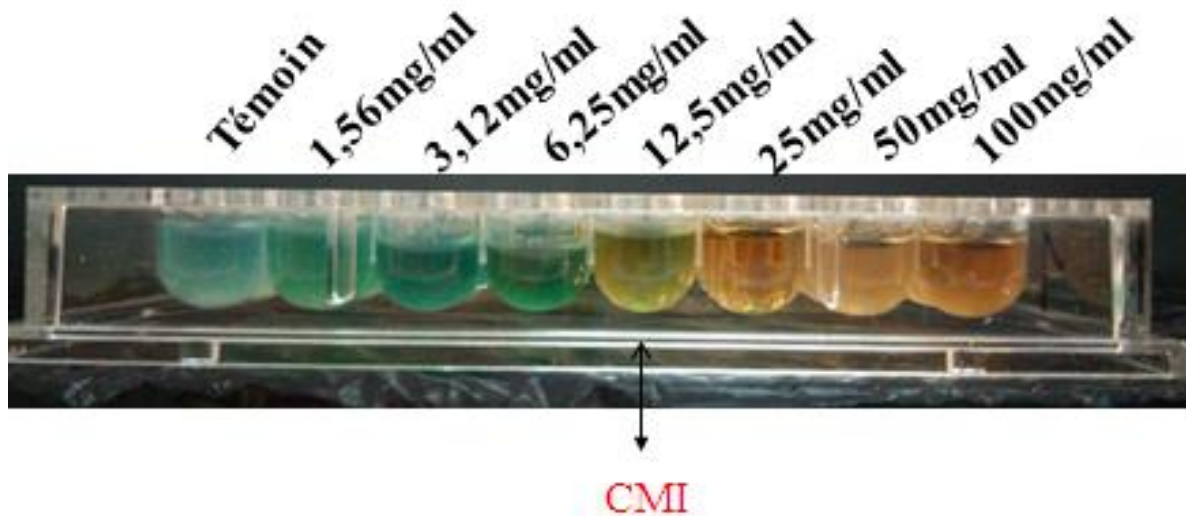


Figure 27 : Résultats de la concentration minimale inhibitrice de l'extrait butanolique contre des isolats de *P. aeruginosa*

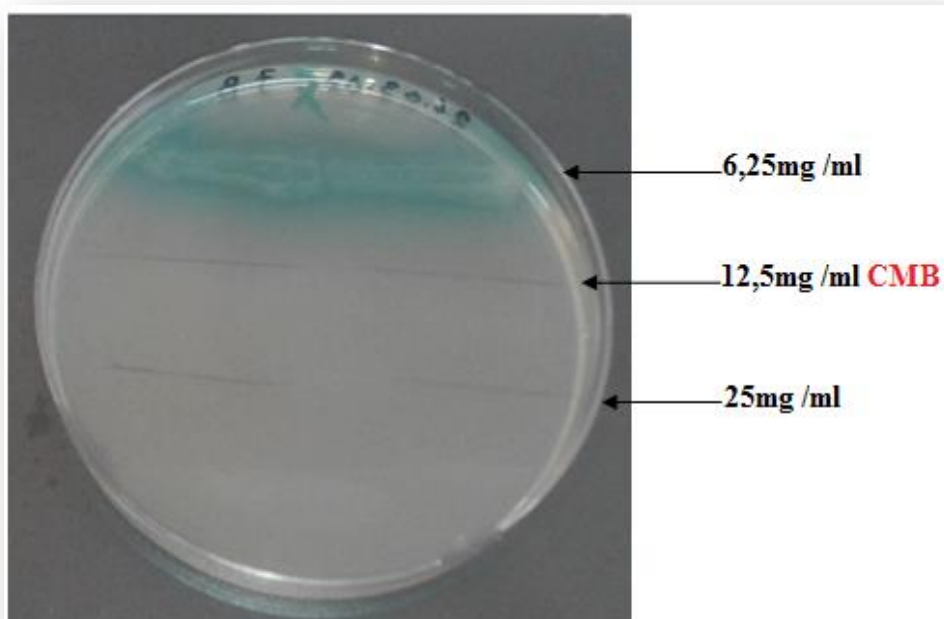


Figure 28 : Résultat de la CMB de l'extrait butanolique d'*Ammi visnaga*

V.5.3. Evaluation de l'activité antibiofilm des extraits d'*Ammi visnaga* contre des isolats de *Pseudomonas aeruginosa*

L'analyse cristal violet est la technique choisie pour estimer la production de biofilm sur des microplaques de 96 puits (Djordjevic *et al.*, 2002). Dans cette partie, on a fait la lecture de résultat par une simple observation à l'œil nu des puits après une coloration au cristal violet.

Les résultats de l'effet des concentrations sub-inhibitrices des extraits organique d'*Ammi visnaga* (extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique) sur des biofilm formés par des isolats de *P. aeruginosa* ont montré un effet significatif de l'extrait d'acétate d'éthyle. Où on a enregistré une diminution progressive dans la quantité des biofilms formés par les isolats testés de *P. aeruginosa* sa fonction de l'augmentation des concentrations de l'extrait d'acétate d'éthyle (0,8 ; 1,56 et 3,12). Alors qu'aucun effet n'a été enregistré en présence des concentrations subinhibitrice (1,56, 3,12, et 6,25) de l'extrait butanolique d'*Ammi visnaga*. L'effet d'*A. visnaga* contre la formation des biofilms bactériens a été montré aussi par une étude réalisée par Belkacem *et al* (2016), où l'extrait méthanolique (0,5, 1, 5 et 10 mg/ml) a

provoqué une diminution dans la quantité des biofilms formés par des souches de *B. cereus* et *S. aureus*.

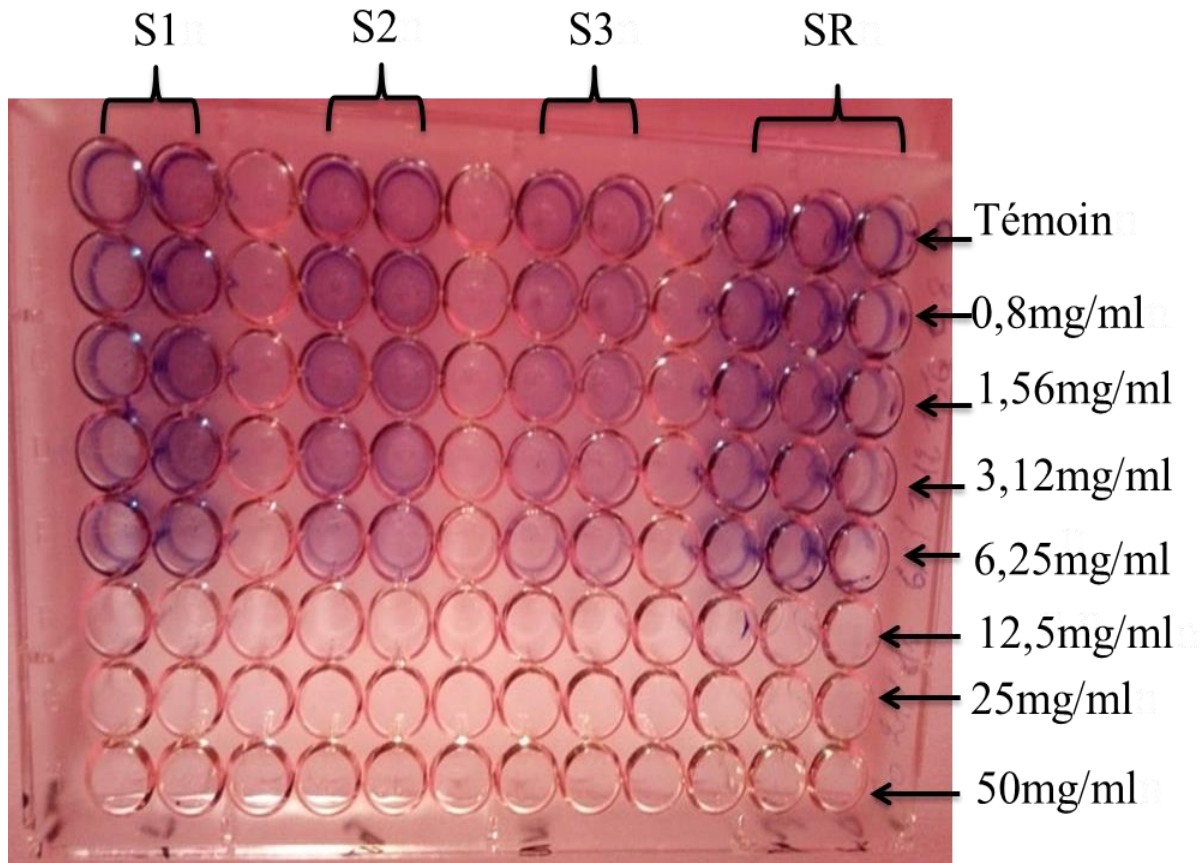


Figure 29 : Résultats de l'effet de l'extrait d'éthyle sur la formation de biofilm par les isolats testés de *P. aeruginosa*.

Conclusion

Conclusion

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie opportuniste responsable d'infections parfois incurables et mortelles, notamment chez les patients souffrant de mucoviscidose et les immunodéprimés. Elle est considérée comme une cible difficile en chimiothérapie anti-infectieuse, en raison de sa capacité d'acquérir des nouveaux mécanismes de résistance suite à l'exposition à des traitements aux antibiotiques, notamment la formation de biofilm et son implication pathologique où elle devient inaccessible aux antibiotiques et aux cellules du système immunitaire.

L'objectif de cette étude consiste à démontrer le pouvoir antibactérien des extraits organiques (extrait d'acétate d'éthyle et extrait butanolique) et de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* et leur effet sur la formation des biofilms vis-à-vis d'une souche de référence (*P. aeruginosa* ATCC 27853) et sept isolats de la même espèce.

Les résultats obtenus par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton indiquent que l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait butanolique et l'HE d'*Ammi visnaga* ont tous présenté une action antibactérienne contre les isolats de *P. aeruginosa* testée et l'HE était plus efficace que les extraits organiques. Les zones d'inhibition des extraits et de l'HE est autour de 6 à 10,5mm et 8 à 14,5mm respectivement.

D'après nos résultats, la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide sont situées autour de 6,25mg/ml et 12,5mg/ml respectivement pour l'extrait butanolique et pour l'extrait d'acétate d'éthyle, la Concentration Minimale Inhibitrice est égale à la Concentration Minimale Bactéricide et elles sont autour de 6,25mg/ml.

Dans ce travail, on a aussi conclu que l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Ammi visnaga* a montré un effet inhibiteur sur la formation des biofilms des isolats testés de *P. aeruginosa*.

Les résultats sur l'activité antibactérienne et l'effet antibiofilm d'*Ammi visnaga* sur les isolats de *P. aeruginosa* restent préliminaires et nécessitent des tests plus avancés *in vitro* et aussi *in vivo* pour plus de confirmation.

Référence bibliographique

Référence bibliographiques

- Aaron, S.D., Ferris, W., Ramotar, K., Vandemheen, K., Chan, F., Saginur, R. (2002).** Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *Journal Clinical Microbiology*, **40**(11), 4172-4179.
- Abroush, Z., Majd, A., Rezaee, M.B. (2001).** Evaluation of antimicrobial effect of Tooth pick plant, Master of Science thesis. Biology department. Azad University.
- Adam, E.C., Mitchell, B.S., Schumacher, D.U., Grant, G. and Schumacher, U. (1997).** *Pseudomonas aeruginosa* II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am. J RespirCrit Care Med.* **155**: 2102-2104.
- Aeschlimann, J.R. (2003).** The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria: insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy*, **23**, 916-924.
- Akshaya, S.B., Ahed, J.M., Al-Khatib, A. A.E., Naama, M. S. Al K., et Abdulla, S. (2015).** *Ammi Visnaga* in treatment of urolithiasis and hypertriglyceridemia. *Pharmacognosy Res*, **7**(4), 397–400.
- Al Akeel, R., Al-Sheikh, Y., Mateen, A., Syed, R., Janardhan, K., Gupta, V.C. (2014).** Evaluation of antibacterial activity of crude protein extracts from seeds of six different medical plants against standard bacterial strains. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **(21)**, 147–151.
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. (2006).** A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, **59**(4), 1114-28.
- Al-Mariri, A., Safi, M. (2014).** In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. *IJMS*, **39** (1).
- Aloush, V., Navon-Venezia, S., Seigman-Igra, Y., Cabili, S., Carmeli, Y. (2006).** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother* **50** (1) 43-8
- Al-Snafi, A. E. (2013).** Chemical constituents and pharmacological activities of *Ammi majus* and *Ammi visnaga*. A review. *International Journal of Pharmacy and Industrial Research*, **3**(3), 257-265.

Références bibliographiques

- Ammor, K., Bousta, D., Jennan, S., Chaqroune, A., Mahjoubi, F. (2017).** La teneur totale en polyphénols et le pouvoir antioxydant d'*Ammi visnaga* de Maroc. *Der Pharma Chemica*, **9** (4), 73-78.
- Ana Cecilia de Andrade Pinho Medeiros. (2016).** Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Mécanique des fluides [physics.class-ph].Thèse de doctorat. Université Grenoble Alpes, Français.
- Anthony, R., Magee et al. (2010).** « New tribal delimitations for the early diverging lineages of *Apiaceae* subfamily Apioideae », *Taxon*, **59**(2), p, 567.
- Antunes, L.C., Ferreira, R.B., Buckner, M.M., Finlay, B.B. (2010).** Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology*, **156**(8), 2271-2282.
- Azghani, A.O., Miller, E.J., Peterson, B.T. (2000).** Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung*. **178**: 261-269.
- Azghani, A. O., Idell, S., Bains, M. and Hancock, R. E. (2002).** *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb. Pathog.* **33**,109-114.
- Backhed, F., Normark, S., Schweda, E.K., Oscarson, S., Richter-Dahlfors, A. (2003).** Structural requirements for tlr4-mediated lps signalling: A biological role for lps modifications. *Microbes Infect.* **5**, 1057–1063.
- Badr, S., Abdellah, F., Mohammed, F., Mohammed, T et Mouna, L. B. (2004).** Composition chimique et activite antibacterienne et antifongique de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* (L.) Lam. du Maroc. *Acta Bot. Gallica*, **151** (1), 65-71.
- Bajolet-Laudinat, S., Girod-de Bentzmann, J.M., Tournier, C., Madoulet, M.C., Plotkowski, C., Chippaux, E. (1994).** Cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect Immun.* **62**: 4481–4487.
- Barbier, F., Wolff, M. (2010).** Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: towards a therapeutic dead end?. *Med Sci (Paris)*, **26**, 960-968.
- Bardy, S.L., Ng, S.Y., Jarrell, K.F. (2003).** Prokaryotic motility structures. *Microbiol.* **149**(2): 295-304.
- Belkacem, I., Rebai, O., Djibaoui, R. (2016).** Antimicrobial and antioxidant activity of *Ammi visnaga* (L) phenolic extracts and their effects on planktonic and biofilm growth of food spoilage *Bacillus cereus*. *Int. J. Biosci.* **9** (4), p. 32-47,

Références bibliographiques

- Benbelaid, F. (2015).** Effets des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques sur *Enterococcus faecalis* responsable d'infections d'origine dentaire. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. Faculte des Dciences de la Nature et de la Vie de la terre et de l'univers, p, 38, 69.
- Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Thien, H.V., Khedher, M. (2011).** Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations .*Ann Biol Clin; 69 (4) : 393-403.*
- Bert, F., Branger, C., and Lambert-Zechovsky, N. (2002).** Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother, 50*, 11-18.
- Berthelot, P., Grattard, F., Mallaval, F.O., Ros, A., Lucht, F. & Pozzetto, B. (2005).** Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathol Biol (Paris), 53*, 341-348.
- Bishr, M. M., Desoukey, S. Y., & Magdy, M. (2014).** The effect of soil on *Ammi visnaga* (L) Lam. plant grown in several localities of Egypt and Sudan.
- Biyiti, L.F., Meko'o, DJ. L., Tamzc, V., Amvam Zollo, PH. (2004).** Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine, 13*, 11-20.
- Bjarnsholt, T., 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.
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.O., Burmolle, M., Hentzer, M., Haagensen, J.A., Hougen, H.P., Calum, H., Madsen, K.G., Moser, C., Molin, S., Hoiby, N., Givskov, M. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology, 151*(2), 373-383.
- Bock, B., (2011).** Base de données nomenclaturale de la flore de France, version 4.02. *Tela Botanica, Montpellier (France).*
- Bodas, R., López, S., Fernandez, M., García-González, R., Rodríguez, A. B., Wallace, R. J., & González, J. S. (2008).** In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and, 145*(1), 245-258.
- Boles, B.R., Singh, P.K. (2008).** Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105*(34), 12503-12508.

Références bibliographiques

- Bouchouka, E. (2016).** Extraction des polyphénols et étude des activités antioxydante et antibactérienne de quelques plantes Sahariennes. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar–Annaba. Faculté des Sciences, p, 62-63.
- Bouderdara, N. (2013).** Séparation et détermination de structures des métabolites secondaires de *Cachrys libanotis* L. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine. Faculté des Sciences exactes, p, 119.
- Boyle, W. (1995).** Spices and essential oils as perspectives. *American Perfumer Essential Oil Review*, **66**, 25-28.
- Breidenstein, E.B.M., De la Fuente-Nuñez, C., Hancock, R.E.W. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiology*, **19**(8), 419-426.
- Burt, S. (2004).** Essential oil: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 223-253.
- Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerova, M., Guery, B. P. & Faure, K. (2009).** Role of LecA and LecB lectin in *Pseudomonas aeruginosa* induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun* **77**, 2065-2075.
- Chiang, W.C., Nilsson, M., Jensen, P.O., Hoiby, N., Nielsen, T.E., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. (2013).** Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**(5), 2352-2361.
- Choukchou-Braham, N., Rahmoun, M.N., Benabdallah, M., Villemin, D., Boucherit, K., Mostefa-Kara, B., Ziani-Cherif, C. (2010).** Antimicrobial screening of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). *Der Pharma Chemica*, **2**(6), 320-332.
- Christiane, Y.E. (2013).** Etude épidémiologique de souche de *Pseudomonas aeruginosa* Responsable d'infections et leur bactériophage pour une approche thérapeutique. Thèse. Université paris-sud.
- Chugani, S., Greenberg, E.P. (2010).** LuxR homolog-independent gene regulation by acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**(23), 10673-10678.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte', J., Pieters, L., Vlietinck, A.J. (2002).** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharm*, **79**, 213–220.
- Clutterbuck, A.L., Woods, E.J., et al. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, **121**(1-2), 1-17.

Références bibliographiques

- Comolli, J. C., L. L. Waite, K. E. Mostov, and J. N. Engel. (1999).** Pili binding to asialo-GM1 on epithelial cells can mediate cytotoxicity or bacterial internalization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **67**, 3207-3214.
- Cornaglia, G., Giamarellou, H., and Rossolini, G.M. (2011).** Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis*, **11**, 381-393.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J. (1978).** How bacteria stick. *Scientific American*, **238**(1), 86-95.
- Costerton, JW. (2001).** Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends in Microbiology*, **9**(2), 50-52.
- David, C. H. (2001).** Emerging mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. *Emerging Infectious Diseases*, **7**(2), 337-341.
- De Kievit, T.R., Gillis, R., Marx, S., Brown, C., and Iglewski, B.H. (2001).** Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression pattern. *Appl. Environ. Microbiol*, **67**(4), 1865- 1873.
- De Kievit, T.R., (2008).** Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental. Microbiology*, **11**(2), 279-288.
- Deepak, B. , Hansi, K. , et Kalai, M. (2015).** *Pseudomonas aeruginosa* AmpR: un régulateur de commutation aigu – chronique. *pathogens and disease* ; **73** (2), 1–14.
- 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.
- Dirar, A. I., Mohamed, M.A., Osman, W. J. A., Abdalgadir, H., and. Khalid, H.S. (2014).** A Phytopharmacological Review on Four Antitumor Medicinal Plants Grown in Sudan. *Am. J. PharmTech Res*, **4**(5).
- Djarri, I. (2011).** Contribution à l'étude des huiles essentielles et des métabolites secondaires de trois plantes algériennes de la famille des Apiaceae. Université MENTOURI de Constantine, P, 12.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., Mclandsborough, L.A. (2002).** Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(6), 2950-2958.
- Drlica, K., and Zhao, X. (1997).** DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 377–392.

Références bibliographiques

- El abed, S., Ibsouda, k. S., Latrache, H., Zineb, G.h., Mouradi, H., Remmal, A. (2011).** Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation, *African Journal of Microbiology Research*, **5**(20), 3229-3232.
- Emmanuel, F., Kelly, K., Dao, N. (2018).** *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infections: How to Adapt Within the Host? *Frontiers in Volume 9*, P, 1-10.
- Endimiani, A., Luzzaro, F., Pini, B., Amicosante, G., Maria, R.G., and Toniolo, A.Q. (2006).** *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to expression of the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. *BMC Infect Dis*, **6**, 52.
- Ernst, R.K., Hajjar, A.M., Tsai, J.H., Moskowitz, S.M., Wilson, C.B., Miller, S.I., Govan, J.R. & Deretic, V. (2003).** Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and Burkholderiacepacia. *Microbiol Rev*, **60** (3), 539-74.
- Eve, M., Martin, W. (2017).** Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm Formation. *Pathogens & Pathogenicity*, **364**(13), 01-09.
- Fadipe, V.O., Mongalo, N.I., Opoku, A.R. (2015).** In vitro évaluation of the comprehensive antimicrobial and antioxidant properties of *curtisida dentata* (burm.f) c.a. sm: toxicological effect on the human embryonic kidney (hek293) and human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell lines. *excli journal*, **14**, 971-983.
- 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.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, **331**(5), 372–379.
- Fathiazad, F., Mazandarani, M., Hamedeyazdan, S. (2011).** Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from Iran. *Advanc ed Pharmaceutical Bulletin*, **1**(2), 63-67.
- Fazli, M., Almlad, H., Rybtke, M.L., Givskov, M., Eberl, L., Tolker-Nielsen, T. (2014).** Regulation of biofilm formation in *Pseudomonas* and *Burkholderia* species. *Environ Microbiol*, **16**, 1961–81.
- François, B., Michel, W. (2010).** Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa* Vers l'impasse thérapeutique ? *medecine/sciences*, **26**, 960-8

Références bibliographiques

- Friedman, L. et Kolter, R. (2004).** Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J. Bacteriol.* **186**, 4457-4465.
- Galimand, M., Sabtcheva, S., Courvalin, P., and Lambert, T. (2005).** Worldwide disseminated *armA* aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2949–2953.
- Geoff, D., Susannah, J., Featherstone, C., Barton, M. (2005).** The role of radiotherapy in cancer treatment Estimating optimal utilization. a review :evidence-based clinical guidelines.
- Girlich, D., Naas, T., Nordmann, P. (2004).** Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* Jun 1, **48** (6), 2043–8.
- Giske, C.G., Monnet, D.L., Cars, O., Carmeli, Y. (2008).** Clinical and economic impact of common multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *Antimicrob agents chemother.* **52**, 813-21.
- Ghareeb, A. M., Zedan, T. H., Gharb, L. A. (2011).** Antibacterial and antifungal activities of *ammi visnaga* extracts against pathogenic microorganisms. *Iraqi Journal of Science*, **52** (1), 30-36.
- Govan, J.R. & Deretic, V. (1996)** Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and Burkholderiacepacia. *Microbiol Rev* **60**(3), 539-74.
- Gupta, S.K., Berk, R.S., Masinick, S. and Hazlett, L.D. (1994).** Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun.* **62**: 4572-4579.
- Hajjar, A.M., Ernst, R.K., Tsai, J.H., Wilson, C.B., Miller, S.I. (2002).** Human toll-like receptor 4 recognizes host-specific lps modifications. *Nat Immunol.* **3**(4), 354-359.
- Hancock, R. E. (1998).** Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin. Infect. Dis.* **27**, S93–S99.
- Hashim, S., Jan, A., Marwat, K. B., & Khan, M. A. (2014).** Phytochemistry and medicinal properties of *Ammi visnaga* (*Apiaceae*). *Pakistan Journal of Botany*, **46**(3), 861- 86.
- 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.
- Hichem, C. (2006).** Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane. Thèse de doctorat. Université de Grenoble. La Médecine et l'Environnement, 15-16.
- Hogardt, M., Heesemann, J. (2013).** Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung, **358**: 91-118.

Références bibliographiques

- Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., Ciofu, O. (2010b).** Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **35**(4), 322-332.
- Hoiby, N., Ciofu, O., Bjarnsholt, T. (2010a).** *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology*. **5**(11), 1663-1674.
- Hong, Y.Q., Ghebrehiwet, B. (1992).** Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complements and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathology*, **62**, 133-138.
- Huang, H., Jeanteur, D., Pattus, F., and Hancock, R.E. (1995).** Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD. *Mol Microbiol*, **16**, 931-941.
- 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.
- Irie, Y., Parsek, M.R. (2008).** Quorum sensing and microbial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **322**, 67- 84.
- Jaradat, N. A., Abualhasan, M., Al-Masri, M., Speih, R. I., Johari, M. A., Awad, M. A. (2015).** Phytochemical Screening and *In-vitro* Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Entire Khella Plant (*Ammi visnaga. L.*) A member of Palestinian Flora. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical*, **7**(1), 137-143.
- Jeeb, S. A., Mohammed, M. S., Fathelrahman, A. E., & Wadah, J. (2016).** Bioactivityguided isolation of two sesquiterpenes with potential anti-fungal activity from Citrullu.
- John, J.V., Mariette, B., Xavier, M., Piotr, B., Jennifer, A. B., Joshua, P. O., Inmaculada, Martinez-Ramos., Lauren, E. H., Michael, R., Davis, Jr.F., Heath, D., George, W., Liechti, J. P., Vitor, A. P., Martins, D.S., Robert, K., Ernst, J. A., Papin, S. A., Antonio, O., and Joanna, B. G. (2015).** Genotypic and phenotypic analyses of a *Pseudomonas aeruginosa* chronic bronchiectasis isolate reveal differences from cystic fibrosis and laboratory strains .*BMC Genomics* **16**(883), P, 1-27.
- Joo, H.S., Otto, M. (2012).** Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemistry and Biology*, **19** (12), 1503-1513.
- Kalia, V.C. (2013).** Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, **31**(2), 224-245.

Références bibliographiques

- Kara, D., Jackson, M., S., Stefanie, K., Matthew, R.P., and Daniel, J.W. (2004).** Identification of *psl*, a locus encoding a potential exopolysaccharide that is essential for *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm formation. *Journal of bacteriology*, **186** (14), 4466-4475.
- Kato, J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, and H. Suzuki. (1990).** New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli* Cell, **63**,393–404.
- Kelly, M. C., Vernita, D. G., Keiji, M., Bradley, R. B., Daniel, J. W., Gerard, C. L. W., Matthew, R. P. (2011).** The Pel Polysaccharide Can Serve a Structural and Protective Role In The Biofilm Matrix Of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Pathogens*.
- Khalfallah, A., Labed, A., Semra, Z., Alkaki, B., Kabouche, A., Touzani, R., & Kabouche, Z. (2011).** Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Ammi visnaga* L. (*Apiaceae*) from Constantine, Algeria. *International Journal of Medicine and Aromatic Plant*, **1**(3), 302-305.
- Khalilzadeh, P. (2009).** Formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : Evaluation d'inhibiteurs potentiel du quorum Sensing .Thèse. Université Paul Sabatier, Toulouse : 50
- Khodursky, A.B., Cozzarelli, N.R. (1998).** The mechanism of inhibition of topoisomerase IV by quinolone antibacterials. *J Biol Chem*, **273** (42), 27668-77.
- Kirkeby, S., Wimmerova, M., Moe, D. & Hansen, A. K. (2007).** The mink as an animal model for *Pseudomonas aeruginosa* adhesion: binding of the bacterial lectin (PA-IL and PA-III) to neoglycoproteins and to sections of pancreas and lung tissues from healthy mink. *Microbes Infect* **9**, 566–573.
- Kohler, T., Curty, L.K., Barja, F., Van Delden, C., Pecher, J.C. (2000).** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagelle 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
- Kunikazu, Y., Jun-ichi, W., Yohei, N. D., Hiroshi, K., and Yoshichika, A. (2005).** Global Spread of Multiple Aminoglycoside Resistance Genes. *Emerging Infectious Diseases*, **11**(6).

Références bibliographiques

- Lakhdar, DJ. (2011).** Contribution à l'étude des huiles essentielles et des métabolites secondaires de trois plant Algériennes de la famille des Apiaceae *Daucus reboudii* Coss. ex Batt. & Trab., *Kundmannia sicula* (L.) DC., et *Elaeoselinum thapsioides* Maire. Thèse de doctorat. Université Mentouri de Constantine. Faculté des Sciences exactes, 75-76.
- Lamont, I. L., Beare, P. A., Ochsner, U., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2002).** Siderophore mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A **99**, 7072–7077.
- Lau, G.W. DJ., Hassett, R.H., Kong, F. (2004).** Le rôle de la pyocyanine dans l'infection Par *Pseudomonas aeruginosa*, **10** (12), 599-606.
- Laughlin, R.S., Musch, M.W., Hollbrook, C.J., Rocha, F.M., Chang, E.B., Alverdy, J.C. (2000).** The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis. *Ann Surg.* **232**: 133-142.
- Lauretti, L., Riccio, M.L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., and Rossolini G.M. (1999).** Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne.
- Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L. G. & Ausubel, F. M. (2006).** Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* **7**, R90.
- Lee, J.Y., Na, I.Y., Park, Y.K., and Ko, K.S. (2014).** Genomic variations between colistin-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates and their effects on colistin resistance. *J Antimicrob Chemother*, **69**, 1248-56.
- Lequette, Y., Lee, J.H., Ledgham, F., Lazdunski, A., Greenberg, E.P. (2006).** A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *Journal of Bacteriology*, **188**(9), 3365-3370.
- Lister, P.D., Wolter, DJ., Hanson, N.D. (2009).** Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*, **22**, 582-610.
- Livermore, D.M. (1992).** Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, **36**, 2046-2048.
- Livermore, D.M. (2002).** Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis*, **34**, 634-640.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B. (2002).** Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection*, **2**(9), 1051-1060.

Références bibliographiques

- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M.R., Bayles, K., and Wozniak, DJ. (2009).** Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*, **5**(3), e1000354.
- Maeda, K., Kobayashi, Y., Oie, S., Ishida, S., Okano, Y., Kobayashi, T., Shikichi, K., Mizuno, H. & Kamiya, A. (2008).** Antimicrobial effects of drugs against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Biol Pharm Bull*, **31**, 1898–1901.
- Marc, V.A., Anne-Lise Basse-Guérinineau, Hervé, B., Robin, Dh., André, P. (1999).** *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogens ubiquitaria. In. Microbiologie et pathologie infectieuse. 2^{emé} Edition. Departament de Boeck Université. Paris, Bruxelles, 288.
- Mariencheck, W.I., Alcorn, J.F., Palmer, S.M., Wright, J.R. (2003).** *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J RespirCell Mol Biol*, **28**(4), 528-537.
- Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C. N., Engels, R., Zeng, E., Olavarietta, R., Doud, M., Smith, R. S., Montgomery, P., White, J. R., Godfrey, P. A., Kodira, C., Birren, B., Galagan, J. E. et Lory S. (2008).** Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3100-3105.
- Meepagala, K. M., Estep, A. S., & Becnel, J. J. (2016).** Mosquitocidal Activity of Extracts from *Ammi visnaga* (*Apiaceae*) Seeds. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, **5**(04), 170.
- Mengal, P. et Monpon, B., (1994).** Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. Brevet international, WO 94/26853.
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C. & Holder, I. A. (1996).** Pyoverdine is esencial for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **64**, 518–523.
- Michael, J. S. (2013).** Which Bacterial Biofilm Exopolysaccharide Is Preferred, Psl or Alginate? *Journal of Bacteriology*, **195**(8), 1623–1626.
- Miller, R. K. E. & Martin, W. (2005).** LPS, TLR4 and infectious disease diversity Samuel. *Bader Nature Reviews Microbiology*, **3**, 36-46.
- Mokhtar, M. B., Samar, Y. D., Mohamed, M. (2014).** The effect of soil on *Ammi visnaga* (L) Lam. plant grown in several localities of Egypt and Sudan. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*, **9**(3), 62-68.
- Montalegre, R. (2016).** Evaluation du risque d'émergence de résistances de *Pseudomonas aeruginosa* a différents antibiotiques anti pyocyaniques en réanimation. Thèse de doctorat. Université Toulouse III, faculté de médecine Toulouse, p, 22, 31,34.

Références bibliographiques

- Moore, E.R.B., Tindall, B.J., Martins Dos Santos, V.A.P., Pieper, D.H., Ramos, J.L., et Palleroni, N.J. (2006).** Nonmedical: *Pseudomonas*, p.646-703. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, et E. Stackebrandt (ed.), *Prokaryotes*, Springer, USA.
- Moroh, J.I.A., Bahi, C., Dje, k., Loukou, Y.G., Guede-guina, 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*. Bulletin de la société royale des sciences de liège, **77**, 44 – 61.
- Morten, H., Liang, Y., su nje, j. P., et Tim, tolker-nielsen. (2010).** An update on *pseudomonas aeruginosa* bioϕlmformation, tolerance, and dispersal.fems immunol med microbiol, **59**,253–268.
- Moskowitz, S. M., Ernst R.K., and Miller S.I. (2004).** PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol*, **186**, 575-579.
- Naas, T., and Nordmann, P. (1999).** OXA-type bêta-lactamases. *Curr Pharm Des*, **5**, 865-879.
- Nabila, A., Benaïssa, A., Nour Eddine, E, Alain, B. (2006).** multirésistance aux antibiotique *pseudomonas aeruginosa*, p. fluorescens et staphylococcus aureus et survie sur divers tissus hospitaliers. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **145**, 61-76.
- Nadell, C.D., Xavier, L.B., Levin, S.A., Foster, K.R. (2008).** The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLos Biology*, **6**(1), 171-179.
- Nakamura, S., Higashiyama, Y., Izumikawa, K., Seki, M., Kakeya, H., Yamamoto, Y., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Mizuta, Y. & Kohno, S. (2008).** The roles of the quorum-sensing system in the release of extracellular DNA, lipopolysaccharide, and membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa*. *Jpn J Infect Dis*, **61**, 375–378.
- Nation, R. L., and Li, J. (2009).** Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis*, **22**, 535-543.
- Nestorovich, E. M., E. Sugawara, H. Nikaido, and S. M. Bezrukov. (2006).** *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel. *J. Biol. Chem*, **281**, 16230-16237.
- Nicole, B., Maria, R. M., Marina, C., Roberto, R., Yekaterina, T., Roman, S., Katharina, R. (2013).** The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-Acting Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa*Biofilms. *Plos Pathogens*, **9**(8): e1003526.
- Niels, H., Thomas, B., Michael, G., Oana, C. (2010).** Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, **35**, 322-332.

Références bibliographiques

- Nordmann, P, Guibert, M. (1998).** Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* Aug, **42**(2), 128-31.
- Nordmann, P., and Poirel, L. (2002).** Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*, **8**, 321-331.
- Nordmann, P. (2003).** Mechanisms of resistance to beta lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Fr Anesth Reanim*, **22**, 527-530.
- Nyaledome, A. I. (2016).** *pseudomonas aeruginosa* : epidemiologie et etat actuel des resistances à l'hôpital militaire d'instruction mohammed v. universite mohammed v-rabat- faculte de medecine et de pharmacie. P. 39.
- Oinuma, K. and Greenberg, E.P. (2011).** Acyl-homoserine lactone binding to and stability of the orphan *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal receptor QscR. *Journal of Bacteriology*, **193**(2), 421-428.
- O'Toole, G.A. & Kolter, R. (1998).** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol.* **30**(2), 295-304.
- Paloma, F. (2012).** Les plantes de la famille des *Apiacées* dans les troubles digestifs. Thèse de doctorat en pharmaceutiques, p, 15.
- Paraje, M.G. (2011).** Antimicrobien résistance in biofilms. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. *Ed. A. Mendez-Vilas*, **2**, 736-744.
- Parsek, M.R, Tolker-Nielsen, T. (2008).** Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, **11**(6), 1-7.
- Pascal, C. (2010).** Analyse génétique des souches multi-résistantes de *P. aeruginosa* dans l'Est de la France, apport prédictif potentiel sur le risque infectieux. Thèse de doctorat. Université de Franche-Comte. Science de la vie et de la santé, 26.
- Pesci EC, Milbank JBJ, Pearson JP, McKnight S, Kende, AS, Greenberg, EP et Iglewski BH. (1999).** Quinolone signaling in the cell to cellcommunication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of National Academy Sciences of U.S.A.*, **96**(20), 11229-11234.
- Philippon, A., Dusart, J., Joris, B., and Frere, J.M. (1998).** The diversity, structure and regulation of beta-lactamases. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 341-346.
- Piddock, L. J. (2006).** Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*, **4**, 629-636.
- 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.

Références bibliographiques

- Poole, K. (2001).** Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **3**, 255-264.
- Poole, K. (2005).** Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* Feb, **49**(2), 479-87.
- Poole, K. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol*, **2**, 65.
- Pressler, T., Bohmova, C., Conway, S., Dumcius, S., Hjelte, L., Høiby, N., Kollberg, H., Tümmler, B., Vavrova, V. (2011).** Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition: EuroCareCF Working Group report. *Suppl 2: S75-8.*
- Rodriguez-Martinez, J. M., Poirel, L. & Nordmann, P. (2009).** Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**, 4783-4788.
- Rossolini, G.M., and Mantengoli, E. (2005).** Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* **11** Suppl, **4**, 17-32.
- Ruimy, R., Andremont, A. (2004).** Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*: mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular mechanism, clinical impact, and inhibition. *Réanimation*, **13**, 176–184.
- Sadovskaya, I., Brisson, J.R., Lam, J.S., Richards, J.C., Altman, E. (1998).** Structural elucidation of the lipopolysaccharide core regions of the wild-type strain PAO1 and O-chain-deficient mutant strains AK1401 and AK1012 from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5. *Eur J Biochem*, **255**, 673-684.
- Schuster, M., Lostroh, C.P., Ogi, T., Greenberg, E.P. (2003).** Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **185**, 2066-2079.
- Scott, T.M., Ann, E.L., David, J.R., Richard, M., R., Victoria, J.F., And Marin, H. K. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection: Importance of Appropriate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* P. 1306–1311. American Society for Microbiology.
- Sefraoui, I. E. K. (2015).** Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse de doctorat. Université Abou bekr belkaid. Faculte des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'univers, 12.
- Semyari, H., Owlia, P., Farhadi, S et Tabrizi, S. M. (2011).** Évaluation de l'effet antimicrobien de « *Ammi visnaga* » contre les streptocoques oraux. *Journal de microbiologie et antimicrobiens* ; **3** (5), 126-129.

Références bibliographiques

- Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. et Khoshnoodi, M. (2007).** In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* **18**, 800–805.
- Shorr, A.F. (2009).** Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit. *Crit Care Med*, **37**, 1463-9.
- Siew, M. L., Ganeswrei, R. S.D., Ampalam, P., and Kek, H. C. (2019).** Antimicrobial susceptibility and virulence genes of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PeerJ*; **7**, e6217.
- 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.
- Sinosh, S., Vaishnavi, S. S., Swathi, P., Supreetha, T. K., Sneha, B. C. (2018).** Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiologica*, **63**, 413–432.
- Stapper, A. P., Narasimhan, G., Ohman, D. E., Barakat, J., Hentzer, M., Molin, S., Kharazmi, A., Hoiby, N., Mathee, K. (2004).** Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol*, **53**, 679-690.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., et Costerton, J. W. (2002).** Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, **56**(1), 187–209.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., et al. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406**, 959–964.
- Takaaki, A., Mayumi, T., Akihito, Y., et Kenichi, S. (2001).** Mutations De La Topoisomérase De Type II Dans Les Souches Cliniques De *Pseudomonas aeruginosa* Résistant Aux Fluoroquinolones Isolées En 1998 Et 1999: Rôle De L'enzyme Cible Dans Le Mécanisme De Résistance Aux Fluoroquinolones. *antimicrobial agents and chemotherapy*, **45**(8) p, 2263–2268.
- Takase, H., Nitanai, H., Hoshino, K. & tani, T. (2000).** Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun*, **68**, 1834–1839.
- Teresa, R. de k., Richard, G., Steve, M., chris, B., and Barbara, H. I. (2001).** Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Their Role and Expression Patterns. *Applied and environmental microbiology*, **67**(4), p, 1865–1873.

Références bibliographiques

- Thukaa, Z. A-J., Kawkab, S., and Abdul- Mutalib, A. N. (2010).** Phytochemical Study of some Flavonoids Present in the Fruits of Two *Ammi L.* Species Wildly Grown in Iraq. *Iraqi J Pharm Sci*, **19**(1), 48-57.
- Tielker, D., Hacker, S., Loris, R., Strathmann, M., Wingender, J., Wilhelm, S., Rosenau, F., Jaeger, K.E. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Revue: The Structural Biology Brussels*, **151**(5), 1313-1323.
- Tim, W.R., Leea, K.G., Brownleea, S.P., Conwaya, M. D., James, M. L. (2003).** Evaluation of a new definition for chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, **2**, 29-34.
- Timothy, F. M., Aimee, L. B., Karen, E., Phyllis, L., Lori, G., Xueya, Cai., and Sanjay, Sethi. (2008).** *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *american journal of respiratory and critical care medicine*, **177**, p, 853-860.
- Vakulenkol, S.B., Mobashery, S. (2003).** Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev.* Jul, **16**(3), 430-50.
- Vasil, M. L., Stonehouse, M. J., Vasil, A. I., Wadsworth, S. J., Goldfine, H., Bolcome, R. E. 3rd. & Chan, J. (2009).** A complex extracellular sphingomyelinase of *Pseudomonas aeruginosa* inhibits angiogenesis by selective cytotoxicity to endothelial cells. *PLoS Pathog* **5**, e1000420.
- Vettoretti, L., Floret, N., Hocquet, D., Dehecq, B., Plesiat, P., Talon, D. & Bertrand, X. (2009).** Emergence of extensive-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **28**, 1217–1222.
- 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*. *Journal of Bacteriology*, **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.
- Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., 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), 317-323.
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., and Mitsuhashi, S. (1991).** Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, **35**, 147-151.
- Weldhagen, G.F., Poirel, L., and Nordmann, P. (2003).** Ambler Class A Extended-Spectrum B-Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 2385-2392.

Références bibliographiques

- Wen-Chi, C., Martin, N., Peter, Q. J., Niels, H., Thomas, E. N., Michael, G., Tim, Tolker-Nielsen . (2013).** Extracellular DNA Shields against Aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**(5), 2352–2361.
- Winstanley, C., Fothergill, J.L. (2009).** The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiology Letters*, **290**(1), 1-9.
- Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., Camara, M., Williams, P. (2000).** The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-III are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol.* **182**: 6401-6411.
- Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O’Toole, G. A., et 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.
- Wolfgang, M. C., Lee, V. T. Gilmore, M. E. & Lory, S. (2003).** Coordinate regulation of bacterial virulence genes by a novel adenylate cyclase-dependent signaling pathway. *Dev Cell* **4**, 253-263.
- Xavier, J.B., Foster, K.R. (2007).** Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(3), 876-881.
- Yohei, D., Doroti de Oliveira, G., Jennifer, A., and David, I. P. (2007).** Coproduction of novel 16s rna methylase rmtD and metallo- lactamase spm-1 in a panresistant *pseudomonas aeruginosa* isolate from brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **51**(3), 852–856.
- Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato H., Arakawa, Y. (2003).** Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mechanisms of disease*, **362**, P1888-1893.
- Zhao, W.H., Hu, Z.Q. (2010).** Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Rev Microbiol*, **36**, 245-258.

Annexe

Annexe

✓ Les étapes de coloration de Gram

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

✓ Composition des milieux de culture

• Gélose nutritive (GN)

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

- **Bouillon nutritif (BN)**

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

- **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

- **Milieu Mueller Hinton (MH)**

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

الملخص

يعد *Pseudomonas aeruginosa* من البكتيريا الانتهازية التي تساهم في عدوى المستشفيات والتي يصعب علاجها بسبب مقاومتها المتعددة وقدرتها على تكوين البيوفيلم .

و نظرا لاستخدام الطب التقليدي في الوقت الحالي على نطاق واسع و اكتسابه لأهمية صحية واقتصادية. وجدنا أنه من الأهمية بما كان أن نجري هذه الدراسة لتحديد تأثير المستخلصات العضوية (مستخلص خلاص الإيثيل و مستخلص البوتانوليك) و الزيت الأساسي لنبات (النوخة) *Ammi visnaga* ضد بكتريا *P. aeruginosa* ATCC 27853 وسبع عزلات طبية سريرية من نفس النوع.

تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن المستخلصات و الزيت الأساسي المختبرة أظهرت كلها تأثيرا فعالا ضد عزلات *P. aeruginosa*

كما بينت النتائج أيضا أن قيم كل من التركيز المثبط الأدنى و التركيز القاتل الأدنى لمستخلص البوتانوليك قدرت بحوالي 6.25 ملغم / مل و 12.5 ملغم / مل على التوالي. أما بالنسبة لمستخلص خلاص الإيثيل فإن قيمة التركيز المثبط الأدنى كانت مساوية لقيمة التركيز القاتل الأدنى و قدرت بحوالي 6.25 ملغم / مل.

كما وجدنا في هذا العمل أيضا أن مستخلص خلاص الإيثيل لنبات *Ammi visnaga* مارس تأثيرا مثبطا على تكوين البيوفيلم لعزلات *P. aeruginosa* المدروسة.

الكلمات المفتاحية: *P. aeruginosa* - *Ammi visnaga* - المستخلصات العضوية - مقاومتها المتعددة - الزيت الأساسي - التركيز المثبط الأدنى - التركيز القاتل الأدنى.

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est un agent pathogène opportuniste impliqué dans de graves infections nosocomiales difficile à traiter, en raison de sa multirésistance, ainsi à sa capacité de former un biofilm.

Actuellement, l'usage de la médecine traditionnelle est très répandu et revêt une importance sanitaire et économique croissante. Pour cela nous avons établi une étude pour déterminer l'effet antibactérien et le pouvoir antibiofilm des extraits organiques (extrait d'acétate d'éthyle et extrait butanolique) et l'huile essentiel obtenus à partir de la plante *Ammi visnaga* contre *P. aeruginosa* ATCC 27853 et sept isolats cliniques de même espèce.

Les résultats obtenus indiquent que les extraits et l'HE ont présenté une action antibactérienne contre les isolats testés de *P. aeruginosa*.

D'après nos résultats, la CMI et la CMB pour l'extrait butanolique sont situées autour de 6,25mg/ml et 12,5mg/ml respectivement. Pour l'extrait d'acétate d'éthyle ou la CMI est égale à la CMB et leur valeur est autour de 6,25mg/ml.

Dans ce travail, nous avons constaté aussi que l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Ammi visnaga* a exercé un effet inhibiteur sur la formation des biofilms des isolats testés de *P. aeruginosa*.

Mots clé : *P. aeruginosa* - Multirésistance – Biofilm - *Ammi visnaga* - Extraits organiques - Huile

essentielle – CMI - CMB.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen involved in severe nosocomial infections difficult to treat, because of its multi-resistance, and its ability to form biofilm.

Currently, the use of traditional medicine is widespread and acquired of increasing health and economic importance. In the present work we established a study to determine the antibacterial and antibiofilm effects of ethyl acetate and butanolic extracts and the essential oil obtained from the plant *Ammi visnaga* against *P. aeruginosa* ATCC 27853 and seven clinical isolates of the same species.

The results obtained indicate that the extracts and the HE showed an antibacterial action against the tested *P. aeruginosa* isolates.

According to our results, the MIC and CMB for butanol extract are around 6.25 mg / ml and 12.5 mg / ml respectively. For ethyl acetate extract, where MIC is equal to MBC and both are around 6.25mg / ml.

In this work, we confirm that the ethyl acetate extract of *Ammi visnaga* showed an inhibitory effect on the biofilm formation of the *P. aeruginosa* tested isolates.

Key words: *P. aeruginosa* - Multi-resistance – Biofilm - *Ammi visnaga* – Organic extracts - Essential oil - MIC – MBC.