

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention de diplôme de **Master** en

Domaine : SNV

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Effet des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* sur la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*

Présenté par :

- MAZOUZI Asma
- KADI Somia
- EL ALIAOUI Nor El Houda

Devant le jury :

| | | | |
|----------------------|-----|--------------|------------------------|
| BENOUAKLIL F. | MCA | Présidente | (U.D.B Khemis Miliana) |
| LATTAB A. | MCB | Promotrice | (U.D.B Khemis Miliana) |
| GUETARNI H. | MCA | Examinatrice | (U.D.B Khemis Miliana) |

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir donnée la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce travail. Nous tenons à exprimer toute notre remerciements à madame Aicha LATTAB notre encadreur, pour avoir accepté d'encadrer notre travail, pour ses conseils, et son aide ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité, son assistance et son soutien indéfectible.

Mme Benouaklil F. pour l'honneur qu'elle nous a fait pour assurer la présidence du jury.

Mme Guetarni H. d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail.

A tous les enseignants de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre de l'Université Djilali Bounaama Khemis Miliana à Ain Defla, qui ont fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui nous vous remercions du fond du cœur pour vos conseils lors de la conception de ce travail et le fait de nous avoir mis en contact avec notre superviseur.

Nous remercions 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 promotion de Microbiologie Appliquée 2022.

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

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mes chères parents pour toute leur affection, les sacrifices consentis à mon égard, leur soutien et leurs encouragements, qui m'ont permis d'aller de l'avant et de toujours donner le meilleur de moi-même.

A ma sœur Somia pour son soutien et mon frère Abderrahmene, et aussi mon frère Amine, que Allah lui fasse miséricorde qui a été mon premier supporter et qui a toujours rêvé de ma remise de diplôme.

A ma chère nièce Nourhane.

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

A mes très chères trinômes Nor el houda et Somia.

A mes proches Fedwa, Nada, Ahlam et Nesrine merci pour votre soutien.

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 !

Asma

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mes chères parents pour toute leur affection, les sacrifices consentis à mon égard, leur soutien et leurs encouragements, qui m'ont permis d'aller de l'avant et de toujours donner le meilleur de moi-même.

A mes sœurs Bouthaina et Naziha, et mes frères Abdelkader, Samir.

A mon mari Abdeldjalil pour votre soutien.

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

A mes très chères trinômes Nor el houda et Asma .

A mes proches Nada, Nesrine, Fedwa, Ahlam, Narimane, Zahida et ma cousine Fati. Merci pour votre soutien.

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

A tous ceux que j'aime.

Merci !

Somia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

A mes chères parents pour toute leur affection, les sacrifices consentis à mon égard, leur soutien et leurs encouragements, qui m'ont permis d'aller de l'avant et de toujours donner le meilleur de moi-même.

A mes sœurs Ines, Djihad et mon frère Dhayae.

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

A mes très chères trinômes Asma et Somia.

A mes proches Nada, Nesrine, Fedwa et Ahlam. Merci pour votre soutien.

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

A tous ceux que j'aime.

Merci !

Nor el houda.

الملخص

Pseudomonas aeruginosa هي بكتيريا انتهازية ممرضة تشارك في التهابات المستشفيات الخطيرة التي يصعب علاجها، بسبب مقاومتها المتعددة، فضلا عن قدرتها في تكوين غشاء حيوي يوفر لهذه البكتيريا بيئة كثيفة تحميها من المضادات الحيوية ومناعة النظام المضيف.

في هذه الدراسة كنا مهتمين بدراسة تأثير الزيوت الأساسية لعطر *Ammi visnaga* ضد تكوين البيوفيلم على *Pseudomonas aeruginosa* بهدف محاربة تكوين الأخير.

وفقا للنتائج التي سجلتها الاعمال السابقة، يلاحظ ان الزيوت الأساسية من *Ammi visnaga* تظهر نشاطا مضادا للبكتيريا ضد عزلات *Pseudomonas aeruginosa* التي تم اختبارها، باقطار مناطق التنشيط الواقعة بين 8 الى 14.5 مم مسجلة بطريقة الانتشار في وسط اجار مولر-هينتون.

يعطي تحديد الحد الأدنى لتركيز المثبط (MIC) بواسطة haloui وآخرون (2015) فيما تتراوح بين 6.25 مغ /مل و 12.5 مغ /مل .

لتأثير الزيوت العطرية من *Ammi visnaga* ضد تكوين البيوفيلم ل *Pseudomonas aeruginosa*، لاحظنا عدم وجود نتائج من ناحية اخرى اظهر تأثير المستخلصات الفينولية لهذا النبات نشاطا مثبطا جيدا على كمية البيوفيلم الملتصقة على الاسطح التي تم اختباره عليها.

الكلمات المفتاحية

Pseudomonas aeruginosa, biofilm, *Ammi visnaga*, زيوت عطرية.

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste impliquée dans des graves infections nosocomiales difficiles à traiter, en raison de sa multirésistance, ainsi à sa capacité de former un biofilm qui fournit à cette bactérie un environnement dense qui la protège contre les antibiotiques et le système immunitaire de l'hôte.

Dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* contre la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* pour but de lutter contre la formation de ce dernier.

Ce travail est une synthèse bibliographique rassemblant les résultats de certaines études réalisées sur les huiles essentielle d'*Ammi visnaga*.

Suivant les résultats enregistrés dans des travaux antérieurs, on remarque que les huiles essentielles d'*Ammi visnaga* montrent une activité antibactérienne contre les isolats de *P. aeruginosa* testés, avec des diamètres des zones d'inhibition situés entre 8 à 14,5mm enregistrés par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton.

La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) donne des valeurs situées entre 6,25 mg/ml et 12,5 mg/ml.

Pour l'effet des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* contre la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*, on a remarqué l'absence de résultats par contre l'effet des extraits phénoliques de cette plante montrent une bonne activité inhibitrice sur la quantité des biofilms adhérents sur les surfaces testées

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, *Ammi visnaga*, biofilm, huiles essentielles. CMI, CMB, Activité antibactérienne, Activité antibiofilm

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogenic bacterium implicated in serious nosocomial infections that are difficult to treat, due to its multi-resistance, as well as its ability to form a biofilm, which provides this bacterium with a dense environment that protects it against antibiotics and the immune system of the host.

We were interested in the study of the effect of the essential oils of *Ammi visnaga* against the formation of biofilm to *Pseudomonas aeruginosa* aims to fight against the formation of the latter.

This work is a bibliographical synthesis bringing together the results of certain studies carried out on the essential oils of *Ammi visnaga*.

According to the results recorded by previous works, it noted that the essential oils of *Ammi visnaga* show antibacterial activity against the isolates of *P. aeruginosa* tested, with diameters of the zones of inhibition located between 8 to 14.5mm recorded by Mueller-Hinton agar diffusion method.

The determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) gives values between 6.25 mg/ml and 12.5 mg/ml (Haloui *et al.*, 2015).

For the effect of essential oils of *Ammi visnaga* against the formation of biofilm with *Pseudomonas aeruginosa*, we noticed the absence of results on the other hand the effect of the phenolic extracts of this plant show a good inhibitory activity on the quantity of biofilm adhered on surfaces tested.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, *Ammi visnaga*, biofilm, essential oils. CMI, CMB, antibacterial activity, antibiofilm activity.

Table des Matières

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

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Généralités sur *Pseudomonas aeruginosa*

| | |
|--|----|
| I.1.Description..... | 3 |
| I.2. Apport génomique chez <i>P.aeruginosa</i> | 4 |
| I.3.Classification..... | 5 |
| I.4.Habitat et pouvoir pathogène..... | 5 |
| I.5.Mode de transmission..... | 6 |
| I.6. Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i> | 7 |
| I.6.1.Facteurs de virulence impliqués dans l'adhérence de <i>P. aeruginosa</i> | 7 |
| I.6.1.1.Flagelle..... | 7 |
| I. 6.1.2.Pili de type 4..... | 7 |
| I.6.1.3.facteur d'attachement de type fimbriae (ou cup)..... | 8 |
| I.6.1.4.lipopolysaccharide (lps)..... | 8 |
| I.6.2. Facteurs impliqués dans la colonisation de l'hôte..... | 9 |
| I.6.2.1.Exotoxines..... | 9 |
| I.6.2.2.Elastase..... | 9 |
| I.6.2.3.Phospholipases..... | 9 |
| I.6.2.4.Rhamnolipides..... | 10 |
| I.6.2.5.Chromophores..... | 10 |
| A. Pyoverdine..... | 10 |
| B. Pyocyanine..... | 11 |
| I.7.Systèmes de sécrétion de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 11 |
| I.7.1.Système de Sécrétion de type I..... | 11 |
| I. 7.2. Système de Sécrétion de type II..... | 11 |
| I.7.3. Système de sécrétion de type III..... | 12 |
| I.8.Résistance aux antibiotiques..... | 12 |

| | |
|---|----|
| I.8.1. Résistance naturelle..... | 12 |
| I.8.1.1. Résistance aux β -lactamines..... | 13 |
| I.8.1.2. Résistance aux aminosides..... | 13 |
| I.8.2. Résistance acquise..... | 13 |
| I.9. Epidémiologie de la multirésistance chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 13 |

Chapitre II : Biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

| | |
|--|----|
| II.1. Historique..... | 15 |
| II.2. Définition..... | 15 |
| II.3. Organisation de biofilm chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 16 |
| II.3.1. Constituant d'un biofilm..... | 16 |
| Psl..... | 17 |
| Pel..... | 17 |
| Alginate..... | 17 |
| ADN extracellulaire..... | 17 |
| II.3.2. Formation de biofilm..... | 18 |
| II.3.2.1. Attachement réversible..... | 18 |
| II.3.2.2. Attachement irréversible..... | 19 |
| II.3.2.3. Maturation du biofilm..... | 19 |
| II.3.2.4. Dispersion..... | 20 |
| II.4. Facteurs favorisant la formation de Biofilm..... | 20 |
| II.4.1. Propriétés des surfaces..... | 20 |
| II.4.2. Propriétés du milieu aqueux environnant..... | 20 |
| II.4.3. Propriétés des cellules..... | 21 |
| II.5. Systèmes de régulation impliquées dans la formation de biofilm à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 21 |
| II.5.1. Quorum sensing..... | 21 |
| II.5.2. Systèmes à deux composants GacS/GacA et RetS/LadS..... | 23 |
| II.6. Mécanismes de résistance de biofilm chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 24 |

Chapitre III : Les huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

| | |
|--|----|
| III .1. Phytothérapie..... | 26 |
| III .1.1. Importance et caractéristique de la phytothérapie..... | 26 |

| | |
|---|----|
| III .2. Huiles essentielles..... | 27 |
| III .3. <i>Ammi visnaga</i> | 27 |
| III .3.1. Description botanique..... | 27 |
| III .3.2. Classification taxonomique de <i>Ammi visnaga</i> | 28 |
| III.3.3. Origine et répartition géographique..... | 28 |
| III.3.4. Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle..... | 29 |
| III .3.5. Principaux constituants photochimiques d' <i>Ammi visnaga</i> | 30 |
| III.3.6. Composition chimique des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> | 32 |
| III.3.7. Activités biologiques des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> | 32 |
| 1. Activités antimicrobiennes..... | 32 |
| 2. Activités antioxydantes..... | 33 |
| 3. Activité antibiofilm..... | 33 |

PARTIE EXPERIMENTALE

Chapitre IV : Matériel et méthodes

| | |
|---|----|
| IV.1. Objectif du travail..... | 34 |
| IV.2. Souches bactériennes..... | 34 |
| IV.2.1. Isolement..... | 34 |
| IV.2.2. Identification..... | 34 |
| IV.2.2.1. Etude macroscopique des colonies..... | 34 |
| A- Culture sur milieu King A et King B..... | 34 |
| B- La croissance à 42 °C..... | 35 |
| IV.2.2.2. Etude microscopique..... | 35 |
| A- L'examen à l'état frais..... | 35 |
| B- Coloration de Gram..... | 35 |
| C- Identification biochimique..... | 36 |
| a. Recherche de l'oxydase..... | 36 |
| b. Recherche de catalase..... | 36 |
| c. La galerie API 20 NE..... | 36 |
| IV.2.2.3. Antibiogramme..... | 37 |
| IV.3. Matériel végétal (<i>Ammi visnaga</i>)..... | 38 |

| | |
|---|----|
| IV.3.1.Procédés d'extraction des huiles essentielle (hydrodistillation)..... | 39 |
| IV.3.2.Calcul de rendement d'extraction..... | 40 |
| IV.4.Aromatogramme..... | 40 |
| IV.5.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide(CMB)..... | 41 |
| IV.6.Effet des huiles essentielles sur la formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 42 |

Chapitre V : Travaux intérieurs

| | |
|---|----|
| V.1. Isolement et identification des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 44 |
| V.1.1.Étude macroscopique..... | 44 |
| V.1.2.Examen microscopique..... | 44 |
| A-Observation à l'état frais..... | 44 |
| B-Coloration de Gram..... | 45 |
| V.1.3.Test oxydase..... | 45 |
| V.1.4.Test catalase..... | 46 |
| V.1.5.Galerie biochimique API 20NE..... | 46 |
| V.2.Antibiogramme..... | 46 |
| V.3.Effet antibactérien des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> | 49 |
| V.3.1. Rendement d'extraction des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> | 49 |
| V.3.2.Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> (Aromatogramme)..... | 50 |
| V.3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)..... | 52 |
| V.4.Effets des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> contre la formation de biofilm chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 53 |
| Conclusion..... | 55 |
| Références bibliographiques..... | 56 |
| Annexe..... | 73 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 5 |
| Tableau 02 : Composition chimique de l' <i>Ammi visnaga</i> | 31 |
| Tableau 03 : Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme..... | 38 |
| Tableau 04 : Résultats des tests biochimiques (API 20NE) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 47 |
| Tableau 05 : Résultats de l'antibiogramme d'un isolat de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 48 |
| Tableau 06 : Activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> contre les isolats de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 51 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Observation de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> au microscope électronique..... | 4 |
| Figure 02 : Modèle de formation d'un biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 18 |
| Figure 03 : Mécanisme de Quorum sensing chez les microorganismes..... | 22 |
| Figure 04 : Structure des AHLs et PGS chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 23 |
| Figure 05 : <i>Ammi visnaga</i> (L.) Lam..... | 28 |
| figure 06 : Origine et répartition géographique d' <i>Ammi visnaga</i> | 29 |
| Figure07 : La galerie biochimique API 20 NE..... | 37 |
| Figure 08 : <i>Ammi visnaga</i> | 38 |
| Figure 09 : Schéma du principe de la technique d'hydro-distillation..... | 39 |
| Figure10 : Principe de la technique de diffusion des disques sur milieu gélosé... .. | 41 |
| Figure11 : Aspect macroscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ensemencée sur milieu King A..... | 44 |
| Figure 12 : Observation microscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> G×100..... | 45 |
| Figure13 : Un exemple d'un profil numérique chez un isolat de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 46 |
| Figure 14 : Résultat de la galerie API 20 NE..... | 47 |
| Figure 15 : Résultat d'Antibiogramme d'un isolat de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> réalisé au sein de laboratoire hopital militaire d'instruction Mohamed V..... | 48 |
| Figure 16 : L'activité antibactérienne des huiles essentielles d' <i>Ammi visnaga</i> | 51 |

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AHL : Acylhomosérine lactone

ATCC : American Type Culture Collection

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMB : Concentration minimale bactéricide

Cup : Chaperone-usher pathway

di-GMPc : Di-guanosine monophosphate cyclique

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E. coli : *Escherichia coli*

EPS : Exopolysaccharides

ExoA, U : Exotoxine A, U

H.E : huile essentielle

LPS : Lipopolysaccharide

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

Pel : PELlicle locus

PLC : Phospholipases C

Psl : Polysaccharide synthesis locus

QS : Quorum sensing

SST2 : Système de Sécrétion de Type 2

SST3 : Système de Sécrétion de Type 3

UFC : Unité Formant Colonie

INTRODUCTION

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à coloration de Gram négative omniprésente trouvée dans de nombreux environnements. *P. aeruginosa* a été isolée pour la première fois en 1882 par Gessard. C'est en 1862 que Luke a mis en œuvre l'implication de *P. aeruginosa* dans des infections chez l'homme. Il a observé des particules de forme circulaire dans un pus de coloration bleu-vert. La même coloration a été observée par Sedillot. C'est le pigment pyocyanique (la pyocyanine) produit par *P. aeruginosa* qui est à l'origine de cette coloration. La pyocyanine est diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le nom du bacille pyocyanique (Hichem *et al.*, 2012).

En 2017, *P. aeruginosa* a été reconnue comme l'une des bactéries les plus mortelles et répertoriée comme agent pathogène prioritaire pour la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Les agents antimicrobiens courants comme les antibiotiques présentent souvent une efficacité limitée en raison de l'adaptabilité et de la résistance intrinsèque élevée aux antibiotiques de *P. aeruginosa*, augmentant ainsi la mortalité (Pang *et al.*, 2019).

De plus, le traitement de ces infections est également entravé par la capacité de *P. aeruginosa* à former des biofilms qui les protègent des stress environnementaux environnants, empêchent la phagocytose et confèrent ainsi une capacité de colonisation et de persistance à long terme (Moradali *et al.*, 2017). Une telle capacité est favorisée par des communications efficaces de cellule à cellule au sein des communautés microbiennes de *P. aeruginosa*, connues sous le nom de détection de quorum sensing. En conséquence, des biofilms hautement structurés peuvent se former, ce qui est souvent identifié chez les patients atteints d'infections chroniques, telles que l'infection pulmonaire chronique, l'infection chronique des plaies et la rhinosinusite chronique (Romling *et al.*, 2004). Il a été estimé que les biofilms ont une incidence importante sur plus de 90 % des infections chroniques des plaies, entraînant une mauvaise cicatrisation des plaies. Il est donc important de diagnostiquer les infections à *P. aeruginosa* à un stade précoce avant le développement du biofilm qui pourrait augmenter la résistance de *P. aeruginosa* vers les traitements antimicrobiens. Cependant, l'incidence croissante des infections et persistantes dans le monde souligne également la nécessité de développer des stratégies thérapeutiques comme alternative aux antibiotiques traditionnels, censées désarmer et éradiquer cette bactérie à coloration de Gram négative.

En effet l'usage des plantes médicinales peut apporter directement des réponses à certains problèmes de santé. Les plantes médicinales ont été utilisées dans la médecine traditionnelle depuis longtemps. Actuellement, la recherche sur les plantes médicinales a permis de découvrir de nouveaux médicaments contre diverses maladies (Derwich *et al.*, 2010).

Les huiles essentielles, également appelées huiles odoriférantes volatiles, sont des liquides huileux aromatiques extraits de différentes parties de plantes ; les feuilles, les écorces, les fleurs, les bourgeons, les graines, etc. (Tongnuanchan et Benjakul, 2014). Il existe au moins 150 types d'huiles essentielles commercialisées sur le marché international (Kusuma et Mahfud, 2017).

Ammi visnaga est une plante vivace largement répandue dans la surface méditerranéenne (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 (Dirar *et al.*, 2014 ; Hashim *et al.*, 2014).

L'objectif principal de cette étude est d'examiner l'effet des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* contre la formation du biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* pour but lutter contre sa multirésistance vis à vis les agents antimicrobiens et le système immunitaire due à la formation de cette communauté bactérienne (Biofilm).

Ce travail est une synthèse bibliographique rassemblant les résultats de certaines études réalisées sur les huiles essentielle d'*Ammi visnaga*.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

Généralités sur

Pseudomonas aeruginosa

I. *Pseudomonas aeruginosa*

I.1. Description

Pseudomonas aeruginosa a été découverte en 1882 par Carle Gessard, un pharmacien des armées et bactériologiste français. Une expérience sur les colorations bleues et vertes du pus laissé sur les bandages recouvrant les plaies des soldats lui a fait identifier un pigment soluble dans l'eau et fluorescent lorsqu'il est exposé à la lumière ultraviolette. Son étude l'amène isoler la bactérie à conclure sur la nature pathogène de *P. aeruginosa* et à classifier la souche (Gessard, 1984).

P. aeruginosa est une bactérie de la famille des *Pseudomonadaceae*. Elle est aussi appelée bacille pyocyanique en raison de sa forme allongée et de la production de pigments bleus et verts par la bactérie : la pyocyanine et la pyoverdine.

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif (figure 1) strictement aérobie non sporulée, très mobile et omniprésente dans l'environnement. Cette espèce, autrefois sensible à la quasi-totalité des antibiotiques est aujourd'hui responsable d'infections survenant par épidémies et impliquant des souches de plus en plus résistantes. La séquence complète de son génome a permis de rationaliser cette observation car 0.3 % des gènes sont directement impliqués dans les mécanismes de résistance (Stover *et al.*, 2000). Elle est aussi capable d'acquérir des grands éléments mobiles provenant d'autres bactéries (intégrons) codant pour des mécanismes de résistance (Woods, 2004 ; Kipnis et Sawa, 2006).

P. aeruginosa peut présenter trois morphotypes différents (Sharon *et al.*, 1990), des colonies rugueuses, larges et légèrement bombées (souche parentale) (Sharon *et al.*, 1995). Des petites colonies rugueuses appelées « Small Colony Variant » (SCV) présentant un comportement autoagréatif (Rüdiger *et al.*, 2000 ; Häussler *et al.*, 2003). Les colonies «SCV» et « mucoïdes » sont associées à un état de biofilm, mais *P. aeruginosa* peut également exister sous forme planctonique présentant une mobilité par le biais d'un flagelle polaire unique.



Figure 1 : Observation de *Pseudomonas aeruginosa* au microscope électronique (Dennis *et al.*, 2007).

I.2. Apport génomique chez *Pseudomonas aeruginosa*

Le génome de *P. aeruginosa* est l'un des plus grands génomes bactériens identifiés. Selon les souches, sa taille varie de 5,2 à 7,1 Mb et contient environ 5500 ORF (Open Reading Frame). 8,4 % de son génome est constitué de gènes impliqués dans la régulation, ceci confère à cette bactérie de considérables facultés d'adaptation et la possibilité de coloniser un grand nombre de niches environnementales (Croft *et al.*, 2000 ; Stover *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2006). Cette variation s'explique par la perte ou le gain de matériel génétique par transferts horizontaux (Römling *et al.*, 1997).

Une étude comparative entre les génomes des différentes souches a mis en évidence un squelette commun très conservé et une partie variable qui représentent 90% et 10% du génome respectivement (Spencer *et al.*, 2003). Cette variation résulte de l'acquisition de plasmides, de transposons, de bactériophages et d'autres régions instables appelées îlot génomiques. Les îlots génomiques, par l'acquisition de nouveaux mécanismes, sont un moyen pour la bactérie de s'adapter rapidement face à la pression de sélection. Parmi les îlots génomiques, les régions spécialisées qui codent pour des facteurs de virulence sont nommés îlots de pathogénicité. Par exemple, dans la souche PA14, il a été identifié deux îlots de pathogénicité : PAPI-1 et PAPI-2 (He *et al.*, 2004). L'îlot PAPI-2 code pour l'exotoxine ExoU sécrétée par le système de sécrétion de type III. Cette phospholipase dégrade les phospholipides de la membrane épithéliale ce qui conduit à la destruction des cellules et à des infections aiguës (Finck-

Barbançon *et al.*, 1997). Ils expliquent les différences de virulence observées en fonction des souches.

I.3. Classification

Le genre *Pseudomonas* regroupe 7 espèces : *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. syringae*.

P. aeruginosa est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Sa taxinomie est présentée dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Taxinomie de *Pseudomonas aeruginosa* (Chaker, 2012).

| | |
|----------------------|-------------------------------|
| Régne | Bacteria |
| Embrenchement | Prokaryota |
| Division | Proteobacteria |
| Classe | Gammaproteobacteria |
| Ordre | Pseudomonadales |
| Famille | Pseudomonadaceae |
| Genre | <i>Pseudomonas</i> |
| Espèce | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |

I.4. Habitat et pouvoir pathogène

La bactérie *P. aeruginosa* est omniprésente dans l'environnement, on la trouve dans de très nombreux milieux : végétaux, poussières, aliments crus et même parfois commensale du tube digestif de l'homme (Leclerc, 2002). C'est une bactérie saprophyte d'eau, ubiquitaire de l'environnement humide, son réservoir naturel est le sol, les lacs, les rivières, l'eau polluée, les piscines et les jacuzzis (Green *et al.*, 1974 ; Floret, 2009). *P. aeruginosa* est un germe aquicole qui se multiplie dans l'eau quel que soit son contenu en matières organiques (Leclerc, 2002) et comme leur multiplication est favorisée par la température, on la trouve aussi dans les eaux chaudes sanitaires, dans les tours de refroidissement et dans les piscines, les bains bouillonnants, ventilateurs, nébuliseurs, humidificateurs et malheureusement au milieu hospitalier incriminé dans les infections nosocomiales (Green *et al.*, 1974 ; Leclerc, 2002).

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes comme les amibes, les nématodes, les insectes, les plantes, les animaux et l'homme (Silby *et al.*, 2011). Chez les individus sains, il est peu virulent mais il est la cause de graves infections chez les individus immunodéprimés (cancéreux, malades du SIDA), les grands brûlés, les patients intubés-ventilés en réanimation et les patients qui souffrent de maladies chroniques respiratoires comme la mucoviscidose.

Après *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* figure au troisième rang des pathogènes causant des infections nosocomiales. Chez les patients atteints de la mucoviscidose [Cystic Fibrosis (CF)], il représente la principale cause de mortalité en entraînant un sévère déclin des fonctions respiratoires. En fonction de l'environnement, le génotype et les phénotypes de *P. aeruginosa* varient (Hogardt et Heesemann, 2010). A l'étape initiale de l'infection, le pathogène sous la forme planctonique exprime des facteurs de virulence qui induisent des infections aiguës. Des molécules toxiques sont secrétées par différents systèmes de sécrétions ce qui entraîne une destruction rapide des cellules (systèmes de sécrétion de type II et III). Les infections aiguës sont transitoires bien qu'elles peuvent conduire à une septicémie. A un stade plus avancé, *P. aeruginosa* va former un biofilm lui permettant de persister au sein des poumons de son hôte. La formation d'un biofilm entraîne une destruction lente des tissus pulmonaires et est souvent associée à des infections chroniques.

I.6. Mode de transmission

Il a été établi que *P. aeruginosa* pouvait survivre dans les microgouttelettes et peut demeurer longtemps en suspension dans des aérosols, d'où le risque de transmission par voie aérienne (Clifton *et al.*, 2010). Une des principales voies de transmission est le contact avec de l'eau contaminée, mais comme la dose orale infectieuse est très élevée, les voies de transmission qui présentent les plus grands risques pour la santé sont l'exposition cutanée (par exemple dans l'eau contaminée des cuves thermales) et l'exposition pulmonaire à des aérosols inhalés qui ont été projetés par des personnes infectées hors de leurs voies respiratoires (Mena *et al.*, 2009). La bactérie peut souvent pénétrer dans l'organisme par des blessures et des plaies (Kayser *et al.*, 2001). Le recours à des ventilateurs mécaniques contaminés dans les hôpitaux est également une source courante d'infections nosocomiales (Banerjee *et al.*, 2000).

I.7. Facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa possède de nombreux facteurs de virulence lui permettant de survivre dans de nombreux environnements et de coloniser divers types d'hôtes (Lazdunski *et al.*, 1998).

I.7.1. Facteurs de virulence impliqués dans la mobilité et dans l'adhérence de *Pseudomonas aeruginosa*

I.7.1.1. Flagelle

Chez *P. aeruginosa*, le flagelle est un appendice extracellulaire unique et polaire composé d'un corps basal ou moteur rotatif (Berg *et al.*, 1973 ; Silverman *et al.*, 1974), d'un crochet flexible et d'un filament rigide constitué de polymères de flagelline codée par *fliC* (De Pamphilis et Adler. 1971a ; De Pamphilis et Adler. 1971b). L'ultrastructure du corps basal du flagelle est très similaire à celle de l'appareil de sécrétion du SST3 de *P. aeruginosa* (Blocker *et al.*, 2003). Ces deux machineries présentent une forte conservation de leur structure et il existe une régulation négative croisée directe entre la mobilité flagellaire et un SST3 actif (Soscia *et al.*, 2007). Le flagelle permet à la bactérie de se déplacer dans un milieu aqueux par « swimming » mais également sur des surfaces semi-solides. L'un des rôles du flagelle est sa contribution à la mise en place du biofilm bactérien. De plus, le flagelle est impliqué dans la virulence aiguë de la bactérie : en effet, un mutant $\Delta fliC$ présente une virulence amoindrie (délai dans la mortalité) dans un modèle de pneumonie chez la souris. La flagelline est reconnue par le système immunitaire grâce au TLR5 ce qui déclenche la voie de signalisation NF-Kappa B et conduit à une réponse immunitaire (Balloy *et al.*, 2007 ; Bardoel *et al.*, 2011). Il a été montré que le flagelle est nécessaire et suffisant pour la fixation des bactéries aux protéoglycanes à héparane sulfate et pour leur internalisation par le domaine basolatéral de la cellule épithéliale polarisée (Bucior *et al.*, 2012). L'internalisation permettrait à la bactérie de pénétrer la couche de cellules épithéliales, d'atteindre la circulation sanguine et de disséminer dans les organes distaux et/ou elle représenterait un mécanisme de défense de l'hôte contribuant à la clairance de la bactérie (Engel *et al.*, 2000).

I.7.1.2. Pili de type IV

Le pili de type IV est la principale adhésine de *P. aeruginosa* responsable de l'adhésion aux cellules épithéliales (Hahn *et al.*, 1997). Ils jouent un rôle dans l'attachement/adhésion de

surface, l'agrégation cellule-cellule, la formation de biofilm et la motilité (Bradley *et al.*, 1980 ; Mattick *et al.*, 2002 ; Burrows, 2005 ; Pelicic *et al.*, 2008). Les pili de type IV sont impliqués dans les mobilités de type “twitching” (Wall *et al.*, 1999) et de type “swarming” (Kohler *et al.*, 2000). De plus, ces structures interagissent *in vitro* avec la région glycosylée des glycosphingo lipides asialo GM1 et asialo GM2, située à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Vallet *et al.*, 2001).

Son expression est soumise au contrôle d'un système de régulation de la transcription à deux composants pilS et pilR (Hobbs *et al.*, 1993). Les pili de type IV sont importants pour la virulence, car les mutants dépourvus de T4P sont altérés pour la colonisation des cellules hôtes et donc moins infectieux (Farinha *et al.*, 1994 ; Hahn, 1997).

I.7.1.3. Facteur d'attachement de type fimbriae (ou Cup)

Chez *P. aeruginosa*, ces facteurs d'attachement sont essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques, comme le verre et le plastique, mais également dans la formation du biofilm (vallet *et al.*, 2001). Il s'agit de pili de type fimbriae qui sont assemblés par la voie “chaperone/usher/pathway” (Cup) (Vallet *et al.*, 2001). Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes Cup appelés CupA, CupB et CupC ont été identifiés (Vallet *et al.*, 2003).

I.7.1.4. Lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS est un composant essentiel de la paroi bactérienne de *P. aeruginosa*. Il est constitué d'un lipide A, une région hydrophobe permettant l'ancrage de la structure dans la membrane externe, d'un cœur oligosaccharidique et de l'antigène-O, une partie polysaccharidique variable débordant de la membrane externe. Le lipide A possède des propriétés toxiques correspondant à l'endotoxine des bactéries Gram négatives et est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort. La variabilité de l'antigène-O est responsable de la spécificité antigénique O au sein d'une même espèce bactérienne. Selon que l'antigène O est présent ou absent sur le cœur oligosaccharidique, on parle respectivement de phénotype lisse ou rugueux. Le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent par rapport à un mutant isogénique possédant un phénotype rugueux (Rocchetta *et al.*, 1999).

L'immunogénicité des LPS en fait des cibles évidentes pour l'immunothérapie. Néanmoins, l'immunisation active basée sur des vaccins d'antigènes O montre un faible

pouvoir protecteur quand plusieurs antigènes O de stéréotypes différents sont conjugués (Pier 2007 ; Lam *et al.*, 2011).

I.7.2. Facteurs impliqués dans la colonisation de l'hôte

I.7.2.1. Exotoxine A (ETA)

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

I.7.2.2. Elastase

La protéine élastase de *Pseudomonas aeruginosa* (PAE) est l'un des plus d'une douzaine de facteurs de virulence produits par le pathogène lors de l'infection d'un hôte (Liu *et al.*, 1974, Young *et al.*, 1980). Bien que ce soit précis l'activité *in vivo* n'est pas bien comprise, ses activités *in vitro*, dégradation de l'élastine (Heck *et al.*, 1986) et du collagène (Heck *et al.*, 1986), ainsi que des protéines des IgG humaines (Holder *et al.*, 1984), inhibiteur de la protéinase sérique I (Moriyama *et al.*, 1984) et composants du système du complément (Schultz *et al.*, 1974).

I.7.2.3. Phospholipases

Les phospholipases sont des enzymes extracellulaires thermolabiles d'environ 80 kDa sécrétées par le SST2, contenant des ions zinc essentiels à l'activité enzymatique dont la cible

majeure est la phosphatidylcholine présente dans les membranes eucaryotes (Zuckert *et al.*, 1998 ; Barker *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* sécrète également des phospholipases de type C (PLC) avec différentes spécificités de substrats (Stonehouse *et al.*, 2002). Certaines ont une activité hémolytique (PlcN et PlcH) et peuvent jouer un rôle dans la mobilité de type «twitching» comme PlcB (Barker *et al.*, 2004).

I.7.2.4. Rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des molécules amphipathiques composées d'un lipide hydrophobe et d'un fragment sucre hydrophile. Cela confère à ces molécules des propriétés tensioactives capables de réduire la tension superficielle, de former des émulsions et de provoquer une pseudosolubilisation de substrats insolubles, ce qui permet à *P. aeruginosa* d'utiliser diverses sources de carbone telles que les alcanes (Goma *et al.*, 1973 ; Beal *et al.*, 2000). Ils augmentent également la liaison à ces substrats en améliorant l'hydrophobicité de la surface cellulaire par le déplacement des lipopolysaccharides (Chen *et al.*, 2005). Ces deux propriétés font de *P. aeruginosa* une espèce candidate pour la bioremédiation. De plus, il a été démontré que l'ajout de rhamnolipides aux sols contaminés récupère le pyrène et les métaux lourds, tels que le cuivre et le zinc (Mulligan *et al.*, 2001 ; Bordas *et al.*, 2005).

I.7.2.5. Chromophores

P. aeruginosa, comme la plupart des bactéries Gram négatif aérobies, est confronté au problème d'insolubilité du fer et doit donc excréter des molécules chélatant le fer, les sidérophores. Ces protéines permettent à ce microorganisme d'obtenir le fer des transferrines, des ferritines, de l'hémoglobine et d'autres protéines de l'hôte contenant du fer (Ratledge *et al.*, 2000).

A. Pyoverdine

La pyoverdine et la pyochéline, des sidérophores sécrétés par la bactérie en condition de carence en fer, qui agiraient comme des toxines pour l'hôte en séquestrant le fer de l'hôte (Meyer *et al.*, 1996 ; Takase *et al.*, 2000).

B. Pyocyanine

La pyocyanine, un pigment soluble bleu-vert, qui serait aussi associé à la virulence du pathogène. Cette toxine de faible poids moléculaire peut facilement traverser les membranes biologiques et affecterait différentes fonctions dans la cellule hôte, telles que l'inhibition de la respiration cellulaire, de la fonction ciliaire ou de la croissance des cellules épidermiques (Lau *et al.*, 2004).

I.8. Systèmes de sécrétion de *Pseudomonas aeruginosa*

Afin de permettre aux toxines d'atteindre les cellules hôtes, les bactéries à Gram négatif ont développé plusieurs systèmes de sécrétion. Le génome de *P. aeruginosa* porte cinq types des systèmes de sécrétion, Dont les principaux :

I.8.1. Système de sécrétion de type I

Le système de sécrétion de type I (SSTI) est composé d'une protéine spécifique de la membrane externe appelée OMP (Outer Membrane Protein) qui forme un tonneau β renfermant un pore hydrophile, d'un ABC transporteur (ATP Binding Cassette) inséré dans la membrane interne qui fournit l'énergie nécessaire pour le transport, et d'une protéine dite de « fusion membranaire » (MFP), ancrée dans la membrane interne qui relie l'ABC transporteur à l'OMP (Delepelaire, 2004; Holland *et al.*, 2005). Chez *P. aeruginosa*, deux SSTI ont été bien étudiés : Apr et Has DEF (Ma *et al.*, 2003). Le système Apr est impliqué dans la sécrétion de la protéase alcaline AprA et la protéine AprX (Guzzo *et al.*, 1991; Duong *et al.*, 2001). Le système Has DEF est impliqué dans l'utilisation du fer. Il sécrète la protéine HasAp qui chélate des ions de l'hème de l'hémoglobine (Wandersman *et al.*, 2004).

I.8.2. Système de sécrétion de type II

Le SSTII est composé d'un pseudo-pilus supposé traverser l'espace périplasmique et d'un pore formé dans la membrane externe, composé de multimères d'une protéine de la famille des sécrétines. En plus de ces deux composants, le complexe de la machinerie Tat ou Sec situé au niveau de la membrane interne est nécessaire (Johnson *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* possède deux SSTII complets, les systèmes Xcp et Hcx (Voulhoux *et al.*, 2001 ; Ball *et al.*, 2002). Le système Xcp est codé par un cluster de 11 gènes *xcpP-Z* (Filloux *et al.*, 2004). Le système Xcp transporte environ 14 protéines, parmi lesquelles, les élastases LasA et LasB, l'exotoxine A,

des phospholipases C, des lipases, une phosphatase alcaline (PhoA) (Ostroff et Vasil, 1987 ; Bever et Iglewski, 1988 ; Wohlfarth *et al.*, 1992 ; Filloux *et al.*, 1998). Le système Hcx (homologous to Xcp) comporte également 11 gènes *hxcP-Z* (Ball *et al.*, 2002). La protéine XcpA (PilD) est aussi essentielle pour sa fonction. Ce système transporte une phosphatase alcaline (LapA) dite de bas poids moléculaire. Le gène *LapA* se trouve dans le même cluster des gènes Hcx. De ce fait, il est vraisemblable que le système Hcx soit dédié uniquement au transport de la protéine LapA.

I.8.3. Système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III de *P. aeruginosa* a été découvert en 1996 (Yahr *et al.*, 1996). Il induit une mort cellulaire de type nécrose des cellules de l'immunité innée (polynucléaires neutrophiles et macrophages) et permet ainsi à la bactérie d'échapper au système immunitaire. Sur les cellules épithéliales, le SSTT provoque une déstructuration du cytosquelette. Lors d'une infection pulmonaire, notamment chez les personnes atteintes de mucoviscidose, le SSTT joue un rôle prépondérant dans la phase initiale de colonisation et probablement dans la progression de l'infection (Dacheux *et al.*, 1999 ; Jain *et al.*, 2004 ; Corech *et al.*, 2005).

I.9. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques joue un rôle majeur dans la pathogénèse de *P. aeruginosa*, et ce, quel que soit le type d'infection induit. Cependant, dans le cas d'infection chronique, les bactéries présentent des niveaux de résistance plus importants (Balasubramanian *et al.*, 2013).

I.9.1. Résistance naturelle

P. aeruginosa est naturellement résistant à de très nombreuses β -lactamines : par une mauvaise perméabilité membranaire, l'existence de mécanismes d'efflux actif et par une production d'une céphalosporinase chromosomique inductible. Ainsi les β -lactamines restant actives sont les carboxypénicillines (ticarcilline), les uréidopénicillines (pipéracilline), certaines céphalosporines (ceftazidime, cefépime), les carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème) et les monobactams (aztréonam) (Danielle *et al.*, 2011).

I.9.1.1. Résistance aux β -lactamines

Elle est liée à plusieurs mécanismes :

- Production d'une céphalosporinase chromosomique inductible du gène *AmpC* (McGowan *et al.*, 2006).
- Faible perméabilité membranaire aux β -lactamines, due à la taille insuffisante des porines (poole *et al.*, 2004).
- Système d'efflux membranaire MexAB-OprM, capable d'exporter les antibiotiques en dehors de la cellule (Masuda *et al.*, 2000).

I.9.A.2. Résistance aux aminosides

La résistance aux aminosides est liée le plus souvent à l'acquisition d'enzymes inactivatrices et/ou d'un efflux actif (MexXY-OprM) (Bonomo *et al.*, 2006). L'acquisition de plusieurs enzymes peut conférer une résistance croisée à l'ensemble des aminosides. Plus rares sont les résistances de haut niveau dues à l'acquisition de méthylases (ribosomal methyl transférase ou Rmt) de l'ARNr 16S, cible de cette classe d'antibiotiques.

I.9.2. Résistance acquise

Suite à l'utilisation d'antibiothérapies répétitives contre *P. aeruginosa*, des souches multi-résistantes aux antibiotiques sont apparues. Cette bactérie a développé de nombreux mécanismes d'échappement (inactivation enzymatique, blocage de l'accès aux cibles, mutations) (Poole *et al.*, 2011 ; Morita *et al.*, 2014).

I.10. Epidémiologie de la multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*

Le profil de résistance le plus fréquent (6 % de l'ensemble) était la panrésistance (pipéracilline \pm tazobactam, céphalosporines à large spectre, carbapénèmes, aminosides, fluoroquinolones). La prévalence des souches multirésistantes atteignait 30 à 40 % dans certains pays d'Europe de l'Est et en Grèce. En France, elle semble rester stable au cours de la période 2005-2008 (n = 1 110 isolats), de l'ordre de 12 % à 14 %. L'incidence des PAMR dans les services de réanimation est en hausse constante au cours des deux dernières décennies. Dans une étude multicentrique nord-américaine (n = 13 999 isolats), elle a augmenté de 4 % en 1993 à 14 % en 2002 (Obritsch *et al.*, 2004). Cette tendance a été confirmée par d'autres séries (Livermore *et al.*, 2002 ; Lockhart *et al.*, 2007).

Une colonisation bronchique chronique à *P. aeruginosa* est retrouvée chez environ 40% des patients atteints de mucoviscidose. La colonisation se fait initialement par des souches environnementales, lesquelles vont ensuite s'adapter à l'hôte en développant des caractères phénotypiques relativement spécifiques à cette population de patients et responsables de la pérennisation de la colonisation : capacité de production du biofilm (rôle de la protéine régulatrice PvrR) et d'alginate (souches « muqueuses ») accrue, diminution de l'expression de la flagelline et de la pilline (Sadikot *et al.*, 2005). Ce pathogène est le plus fréquemment responsable de surinfections bronchopulmonaires sur ce terrain. L'incidence des résistances, notamment aux aminosides, est en augmentation dans cette population, et la prévalence des souches multirésistantes est actuellement comprise entre 10 % et 20 % (Lambiase *et al.*, 2006 ; George *et al.*, 2009).

CHAPITRE II

Biofilm chez

Pseudomonas aeruginosa

II.1. Historique

Antonie Van Leeuwenhoek observe la présence de microorganismes issus d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire. Il peut être considéré comme le découvreur des biofilms.

250 ans plus tard, Heukalagianet Heller (1940) observent « l'effet de bouteille » : la fourniture d'un substrat solide auquel des microorganismes marins peuvent s'attacher augmente leur croissance et activité métabolique (Heukelekiagnet, 1940).

En 1943, Zobell observe que dans le milieu marin la quantité de bactéries fixée à un substrat est largement supérieure à la quantité de bactéries libres dans la phase liquide (Zobell, 1943).

Jones (1969), travaillant sur des filtres de station de traitement des eaux, grâce à l'utilisation de la microscopie électronique à transmission et à balayage, ajoutant le rouge de Ruthénium (marquage des sucres) au tétraoxyde d'Osmium, confirme non seulement les agrégats mono ou polymicrobiens, mais aussi l'existence d'une matrice polysidique (Jones *et al.*, 1969).

Characklis (1973) démontre que des dépôts microbiens au sein de conduites d'eau de systèmes industriels apparaissent tenaces et résistants aux désinfectants (Characklis, 1973).

Costerton (1978), sur la base de l'observation de l'ultrastructure de la plaque dentaire et de communautés microbiennes sessiles dans les torrents de montagne, propose la théorie des biofilms (Costerton *et al.*, 1973).

II.2. Définition

Selon Chaharacklis en 1990 : « Un biofilm est une communauté microbienne adhérant à une surface et fréquemment incluse dans une matrice de polymères exocellulaires ». Cette matrice est aussi appelée « couche muqueuse ».

D'une façon plus générale, un biofilm est une communauté de micro-organismes assez complexe, adhérente à une surface et encapsulée dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) produite par les membres de cette communauté. Selon Costerton et autres (1995), cette définition inclut les agrégats (par exemple les floccs microbiens dans les stations

d'épurations) et aussi les populations bactériennes adhérant à des surfaces (par exemple les biofilms dans les pores de milieux poreux). Les biofilms peuvent être constitués d'une ou plusieurs espèces de bactéries et ce d'envelopper sur des interfaces solides ou liquides variées, que l'on rencontre par exemple dans l'environnement : fond de rivières, cailloux, racines...et dans les organismes vivants : tube digestifs, plaque dentaire, plaies (Costerton *et al.*, 1987).

Bien connus en médecine, les biofilms contribuent à une panoplie de problèmes et de complications plus ou moins graves, l'endocardite infectieuse par exemple, une maladie cardiaque souvent mortelle, ou l'otite de l'oreille moyenne, fréquente en pédiatrie mais généralement sans gravité. Les biofilms sont aussi présents dans les infections provoquées par des corps étrangers comme les sutures d'une plaie ou un cathéter urinaire (Hurlow et Bowler, 2009).

Pour se développer, les biofilms ont besoin d'une surface à laquelle adhérer et d'un environnement humide et stagnant riche en nutriments. On en trouve surtout dans les plaies chroniques : 60 % d'entre elles en contiennent contre seulement 6 % dans les plaies aiguës (Phillips *et al.*, 2010). Les conditions favorables à leur développement dans une plaie comprennent l'ischémie ou la nécrose, la dénutrition et les comorbidités qui affectent le système immunitaire, par exemple le diabète (Phillips *et al.*, 2010). Le Dr Randall Wolcott affirme dans une entrevue que si on empêchait les biofilms de se former dans les plaies chroniques du pied diabétique, le nombre d'amputations serait grandement réduit (Proal, 2008).

II.3. Organisation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

II.3.1. Constituant d'un biofilm

Un biofilm est constitué de deux grands éléments : les microorganismes, organisés en microcolonies et la matrice extracellulaire (MEC), celle-ci constituant environ 85% du biofilm (Costerton *et al.*, 1995). Cette matrice extracellulaire prend la forme d'un réseau de structure tridimensionnelle complexe (Costerton *et al.*, 1995). Elle est avant tout une interface entre les microcolonies et l'environnement, permet l'attachement au surface, facilite les interactions entre cellules ou sous-population (échanges de matériel génétique, de signaux chimiques ou de produits métaboliques) et procure une protection contre les attaques chimiques (antibiotiques et biocides), mécaniques (forces hydrodynamiques ou abrasion) et thermiques (choc thermique). Elle est majoritairement constituée d'eau, élément indispensable à la survie des

microorganismes au sein du biofilm. Les mécanismes régissant sa rétention et sa mobilité au sein de la matrice ne sont pas encore bien déterminés (Flemming, 2001). L'eau permet l'acheminement des nutriments via les canaux sillonnant la matrice et est essentielle à la physiologie et au maintien de l'intégrité des cellules et du biofilm : elle prévient le tassement de la MEC en maintenant une certaine distance entre les différents exopolymères. La distribution de ces exopolymères au sein de la matrice est hétérogène et variable au cours du cycle de développement du biofilm (Sutherland, 2001). Ces exopolymères sont principalement représentés par des exopolysaccharides, de l'ADN extracellulaire (ADNe), des protéines et des biosurfactants.

Trois exopolysaccharides entrent dans la composition de la matrice extracellulaire de *P. aeruginosa* et contribuent particulièrement au développement et au maintien de la structure tridimensionnelle du biofilm en favorisant les interactions cellule-cellule. L'exopolysaccharide Psl, qui est constitué de motifs répétés de mannose, glucose et rhamnose. Pel, qui est composé de N-acétylgalactosamine et N-acétylglucosamine, reliés entre eux par des liaisons β -1,4. Enfin, l'alginate qui est un polysaccharide acétylé, d'acides L-gulonique et D-mannuronique reliés entre eux par des liaisons β -1,4 (Harmsen, 2010 ; Moradali, 2017). L'alginate est particulièrement produit par les souches de *P. aeruginosa* isolées des infections pulmonaires chroniques des patients atteints de mucoviscidose : il contribue au caractère muqueux des colonies, en retenant l'eau et les nutriments, confère une architecture très structurée à la matrice et participerait à la tolérance du biofilm vis-à-vis des antibiotiques (Hentzer, 2001).

L'ADNe est un autre composant essentiel du biofilm. Son origine génomique a été confirmée (Allesen-Holm, 2006). Il peut alors provenir de la lyse d'une fraction de la population bactérienne sessile, d'une excrétion active par des cellules vivantes via des vésicules de transport membranaire (Jakubovics, 2013). Les exopolysaccharides Pel et Psl interagissent avec l'ADNe pour renforcer la cohésion intercellulaire au sein du biofilm (Jennings, 2015).

La structure du biofilm évolue en fonction de son stade de maturation. Présent en moindre quantité dans un biofilm de 6 jours, l'ADNe était retrouvé à la jonction entre la base et la partie supérieure des structures en forme de champignon ; dans un biofilm de 4 jours il était localisé dans la partie externe de la monocouche (Allesen-Holm, 2006). La composition du biofilm dépend également de la souche bactérienne considérée et de l'environnement dans lequel le biofilm se développe. Par exemple, *P. aeruginosa* PA14, qui est une souche de

laboratoire initialement isolée d'une surinfection de brûlure d'un patient et dont le génome est entièrement séquencé, ne synthétise pas Psl, l'exopolysaccharide majoritaire constituant la matrice extracellulaire du biofilm est Pel (Friedman, 2004 ; Colvin, 2011 ; Limoli, 2015).

II.3.2. Formation de biofilm

Les microbiologistes ont réalisé l'importance de ce phénomène et du fait que la vie en biofilm est le mode de vie principal des bactéries aquatiques et terrestres, représentant 90 à 99% de la biomasse bactérienne (Géraldine *et al.*, 2010).

La formation d'un biofilm est un cycle se déroulant en plusieurs étapes :

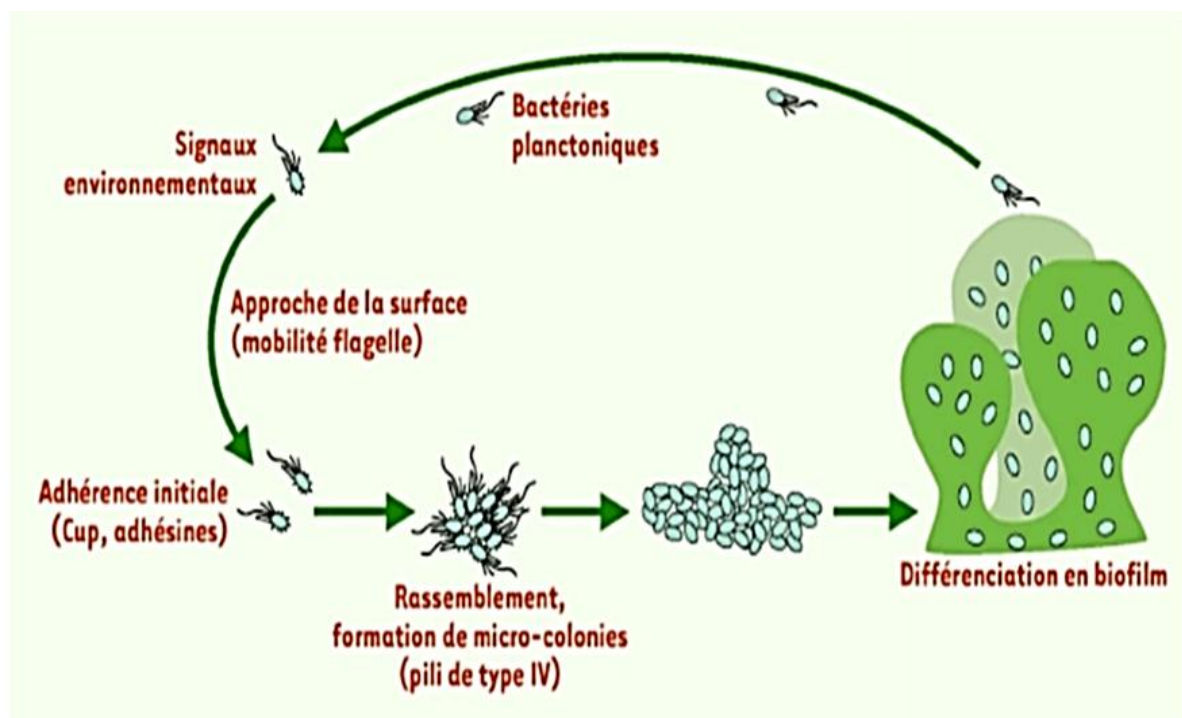


Figure 02 : Modèle de formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* (Filloux et Vallet, 2003).

II.3.2.1. Attachement réversible

L'attachement initial est sous le contrôle de plusieurs paramètres, tels que l'hydrophobicité de la surface, les forces électrostatiques, la disponibilité des nutriments, l'hydrodynamique, la communication cellulaire (Allison *et al.*, 1998 ; Baillie et Douglas, 1998) ainsi que certaines conditions physico-chimiques comme la température, le pH, l'osmolarité et le taux d'oxygène (Watnick et Kolter, 1999 ; O'Toole *et al.*, 2000 ; Ramage *et al.*, 2005).

II.3.2.2. Attachement irréversible

L'adhésion des bactéries au support déclenche des modifications physiologiques qui accompagnent la transition à une adhésion irréversible à la surface (Stoodley *et al.*, 2002). Suite à l'interaction des bactéries avec le support, elles se redistribuent tout au long de la surface et forment des microcolonies, les unités élémentaires d'un biofilm (Donlan, *et al.*, 2002). Ce mécanisme fait intervenir dans certains cas des structures de surface comme les pili de type IV (O'Toole *et al.*, 1998 ; Conrad *et al.*, 2002). Les interactions qui s'établissent entre les bactéries au sein d'une microcolonie renforcent les interactions de bactéries avec le support (O'Toole *et al.*, 1998). D'autre part, les bactéries produisent une matrice d'EPS qui les englobe et les protège de stress environnementaux (Sheng *et al.*, 2010). Cette matrice joue un rôle très important dans la transition à une adhésion irréversible par formation des liaisons entre les bactéries et le support (Flemming *et al.*, 2010).

II.3.2.3. Maturation du biofilm

La maturation du biofilm se poursuit avec la multiplication bactérienne et la production des EPS. Il en résulte l'élaboration d'une architecture complexe avec l'organisation de microcolonies sous forme de tours ou de structures dites en « champignon ». Ces structures sont séparées par des canaux d'eau (Tolker-Nielsen et Molin, 2000). Ces canaux ne contiennent pas une matrice dense d'EPC (Sauer *et al.*, 2002) et permettent la diffusion de l'oxygène et des nutriments, ce qui crée des microenvironnements très hétérogènes au sein du biofilm (Tolker-Nielsen et Molin, 2000 ; Donlan, 2002). Les modifications physiologiques déclenchées suite à l'adhésion bactérienne confèrent aux bactéries sessiles des propriétés qui les distinguent de leurs homologues planctoniques. Ceci correspond à l'expression de gènes spécifiques du mode de vie sessile (Prigent-Combaret *et al.*, 1999 ; Tolker-Nielsen et Molin, 2000 ; Donlan et Costerton, 2002).

II.3.2.4. Dispersion

La dernière étape de la formation d'un biofilm est caractérisée par un détachement d'une partie des bactéries, permettant la colonisation de nouvelles surfaces et l'initiation d'un nouveau biofilm (McDougald *et al.*, 2012).

La dispersion est divisée en deux processus : l'érosion qui est le détachement continu de bactéries individuelles ou de portions de biofilm, et la desquamation qui est la perte massive de grandes portions du biofilm (Stoodley *et al.*, 2001). Ce processus facilite la dissémination des infections et les contaminations dans divers environnements, comme les réseaux de distribution d'eau potable et les environnements cliniques, ce qui pose des problèmes majeurs dans le domaine de la santé publique (Stoodley *et al.*, 2001).

II.4. Facteurs favorisant la formation de Biofilm

L'attachement des micro-organismes à une surface est un processus complexe, prenant en compte un grand nombre de variables (Donlan *et al.*, 2002) :

II.4.1. Propriétés des surfaces

Les propriétés physicochimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur : d'une part l'hydrophobicité, les microorganismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux. Et d'autre part la présence d'un film protéique, en effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms. Alors ce film organique masque en partie ou totalement les propriétés initiales de la surface et augmente l'adhésion ou au contraire la diminue (Baier, 1970 ; Bradshaw, 1997).

II.4.2. Propriétés du milieu aqueux environnant

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clés. On peut citer les facteurs suivants : vitesse du flux (présence d'un flux laminaire ou non) température, pH (conditions optimales de formation de biofilms en situation

de neutralité), concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques (Ca^{2+} , Na^{2+} , ...), sources de carbone disponibles, concentrations en nutriments et la présence d'agents antimicrobiens (Fletcher, 1988; Martinez et Casadevall, 2007). La concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (Sporman, 2008).

II.4.3. Propriétés des cellules

L'hydrophobicité de la surface bactérienne joue un rôle important dans la formation des biofilms, la présence de fimbriae et de flagelles et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité est une propriété inter-faciale directement liée à l'énergie de surface de Gibbs, qui est la somme nette des interactions attractives de Van Der Waals et des interactions électrostatiques (Palmer *et al.*, 2007). Une augmentation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire créera une diminution équivalente dans l'excès de l'énergie de surface de Gibbs. Cela favorise l'interaction cellule-cellule qui constitue par la suite une force motrice pour l'agrégation bactérienne hors de la phase aqueuse (Liu et Tay, 2002). Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les flagelles, fimbriae, certaines protéines et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positifs) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (Donlan, 2002).

II.5. Systèmes de régulations impliqués dans la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*

II.5.1. Quorum sensing

Le QS est l'ensemble des molécules synthétisées par les bactéries lorsqu'elles arrivent à une densité cellulaire importante. Ces molécules contrôlent certaines fonctions telles que le comportement cellulaire et peuvent ainsi détecter et initier des réponses aux stress inattendus. Ce système a été initialement découvert comme régulateur de certains nombres d'activités telles que l'expression génique des facteurs de virulence, la bioluminescence, la sporulation, la formation de biofilms et l'accouplement (Bassker, 2002 ; Trosko, 2016). Le QS est formé via

la production de molécules dites auto-inductrices ou phéromones bactériennes. L'expression génique de ces derniers n'aura lieu que lorsqu'une population bactérienne atteint un seuil de densité cellulaire significative, entraînant ainsi l'activation ou la répression des gènes. Par conséquent, toute population bactérienne apte à exprimer ces auto-inducteurs est appelée quorum (Bassler, 2002 ; Xu, 2016). L'expression des auto-inducteurs dépend de la nature des bactéries (Gram⁻ ou Gram⁺) et de son état physiologique (densité cellulaire), mais aussi elle nécessite la présence d'autres éléments : les signaux synthèses, les signaux récepteurs, les gènes et les signaux régulateurs (Reading et Sperandio, 2006).

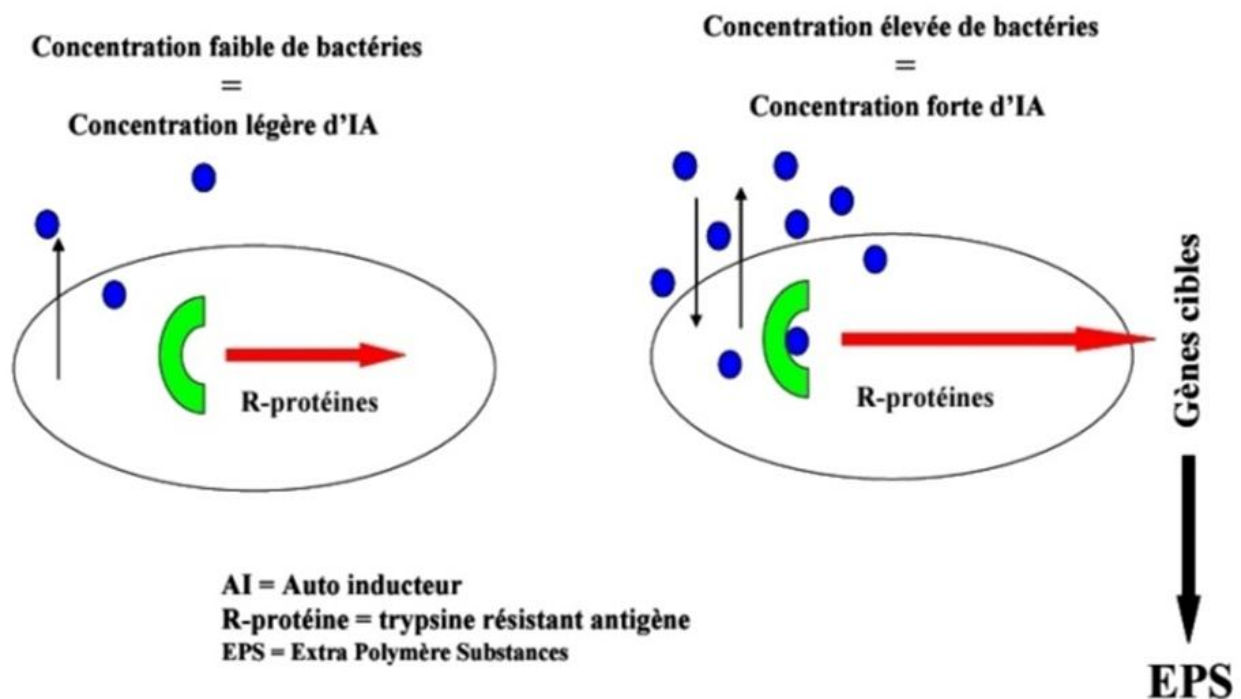


Figure 03 : Mécanisme de Quorum sensing chez les microorganismes (Ronald *et al.*, 1999).

Chez *P. aeruginosa*, le Quorum Sensing est un système de régulation primordial dans l'expression de la virulence. En effet, son impact a été démontré à différents niveaux, de la phase d'adhésion à la formation du biofilm, dans l'expression des facteurs de virulence et dans la persistance de la bactérie au niveau pulmonaire (Smith et Iglewski, 2003 ; Imamura *et al.*, 2005). Les auto-inducteurs mis en évidence pour la communication inter-cellulaire chez *P. aeruginosa* correspondent à des AHLs et des molécules proches des quinolones (*Pseudomonas* Quinolone Signal : *PQS*) (Juhas *et al.*, 2005) (Figure 4).

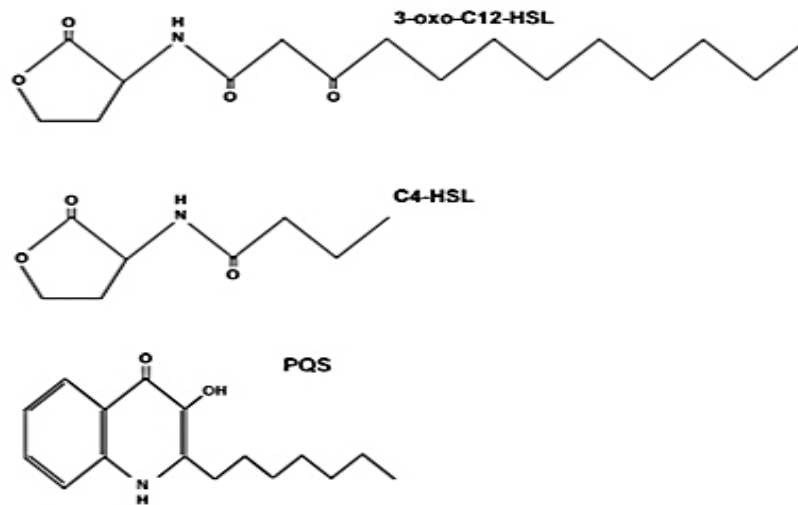


Figure 04 : Structure des AHLs et PGS chez *Pseudomonas aeruginosa* (Juhás *et al.*, 2005).

Chez *P. aeruginosa*, deux systèmes effecteur/récepteur impliquant les AHLs coexistent et interviennent dans la régulation de l'expression d'un très grand nombre de gènes. Le système LasI/R fait intervenir une 3-oxo-C12-homosérine lactone (3OC12-HSL) et le système RhlI/R une C4-homosérine lactone (C4-HSL). C4-HSL diffuse librement à travers la structure pariétale bactérienne, alors que la 3-oxo-C12-HSL fait intervenir un transport actif par pompes d'efflux (Pearson *et al.*, 1999). LasI, appartenant à la famille des synthèses de type LuxI, synthétise la 3-oxo-C12HSL (*Pseudomonas* autoinducer 1 : PAI1) qui se lie au régulateur LasR, homologue de LuxR (Gambello et Iglewski, 1991 ; Pearson *et al.*, 1994). Le couple LasR/PAI1 régule l'expression de nombreux gènes, dont notamment ceux correspondant à des facteurs de virulence comme LasA, LasB et l'exotoxine A. Par ailleurs, il régule positivement certains gènes impliqués dans l'appareil de sécrétion de type II, couplant ainsi l'expression et l'export de certaines toxines (Smith et Iglewski, 2003). La fixation de PAI1 sur LasR induit également une activation de lasI créant une boucle d'auto-induction (Seed *et al.*, 1995). Le second système de régulation est codé par les gènes rhlI et rhlR. RhlI permet la synthèse de PAI2 ou C4-HSL (Ochsner et Reiser, 1995) qui se lie au régulateur RhlR. L'activation de ce dernier permet la régulation de gènes impliqués dans la synthèse des rhamnolipides et la production de métabolites secondaires, tels que la pyocyanine.

II.5.2. Systèmes à deux composants GacS/GacA et RetS/LadS

Parmi les 60 systèmes à deux composants trouvés dans le génome de *P. aeruginosa* (Rodrigue *et al.*, 2000), le système GacS/GacA agit comme un super régulateur du système QS

et participe à la production de multiples facteurs de virulence ainsi que dans la formation de biofilm (Parkins *et al.*, 2001). Le système Gac se compose d'un capteur kinase transmembranaire (GacS) qui, lors de l'autophosphorylation, transfère un groupe phosphate à son régulateur apparenté (GacA) qui, à son tour, augmente l'expression des petits ARN régulateurs (RsmZ et RsmY). RsmZ et RsmY captent la petite protéine régulatrice de liaison à l'ARN RsmA (codée par le gène *RsmA*), un répresseur qui régule post-transcriptionnellement le *psl* locus (*pslA-L*) (Brencic *et al.*, 2009 ; Irie *et al.*, 2010). Le système GacS/GacA a également un contrôle sur le système AHL car il inactive RsmA libre qui contrôle négativement la synthèse de C4-HSL et 3-oxo-C12-HSL et donc les facteurs de virulence extracellulaires contrôlés par les systèmes *las* et *rhl* (Reimmann *et al.*, 1997 ; Kay *et al.*, 2006).

II.6. Mécanismes de résistance de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

Le biofilm est un mode de vie qui offre à la bactérie une plus grande résistance aux attaques du système immunitaire et aux agents antimicrobiens. Cette résistance est due à la matrice extracellulaire riche en exopolysaccharides qui agit comme une barrière naturelle. Face à cette structure qui peut atteindre 100 μm d'épaisseur, les cellules phagocytaires sont inefficaces. Le processus de phagocytose reste donc bloqué (Alhede *et al.*, 2009 ; Mishra *et al.*, 2012). De plus, les anticorps sont incapables de diffuser au travers de cette matrice extracellulaire pour reconnaître les différents antigènes ainsi que les composés hydrophiles est chargés positivement. Des expériences ont montré qu'une solution contenant 2 % d'alginate bloque totalement la diffusion des antibiotiques tels que la gentamycine et la tobramycine. La lyse de cet EPS (majoritairement produit par des souches mucoïdes de *P. aeruginosa* retrouvés chez les patients CF) augmente l'efficacité des antibiotiques sur le biofilm (Hatch et Schiller, 1998 ; Alkawash *et al.*, 2006). L'alginate permettrait de retarder principalement la pénétration des aminoglycosides qui sont chargés positivement. Les β -lactamates et des fluoroquinolones seraient retardés avec une moins grande efficacité par l'alginate du fait de la différence de charge.

Un mode vie en biofilm offre plusieurs modes de protection :

- Écran protecteur : La matrice empêche les grosses molécules (anticorps), les cellules inflammatoires et même les petites molécules (agents antimicrobiens) de pénétrer profondément dans le biofilm et d'atteindre les bactéries.

- Protection mutuelle : Les différentes espèces microbiennes présentes dans le biofilm coopèrent entre elles et se protègent mutuellement. Par exemple, une bactérie résistante à un antibiotique sécrètera des enzymes protectrices qui préserveront ainsi une bactérie non résistante (Phillips *et al.*, 2010). De même, la cohabitation des bactéries anaérobiques et aérobiques dans le biofilm permet aux anaérobiques de survivre aux effets toxiques de l'oxygène lorsque la plaie est exposée à l'air (Percival et Bowler, 2004). Selon certains, le biofilm entraîne aussi une mutation des bactéries qui contrevient aux mécanismes d'action des antibiotiques.
- État d'hibernation : Certaines bactéries sont en état d'hibernation métabolique dans le biofilm. Pour que les antibiotiques puissent être efficaces, les bactéries doivent être actives métaboliquement. Cette inactivité les rend résistantes à l'antibiothérapie. Des recherches sur plusieurs antibiotiques démontrent que les doses requises pour vaincre les biofilms dépassent la posologie maximale (Phillips *et al.*, 2010).

CHAPITRE III

Les huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

III. Les huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

III.1. Phytothérapie

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes, car elles renferment une part importante des composés utilisés pour prévenir, soigner ou soulager divers maux (par la consommation ou l'utilisation en voie externe de produits à base de plante) s'appelle phytothérapie.

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).

Un nombre important des plantes dans la nature sont d'une grande importance dans le traitement de plusieurs maladies et vu à leurs propriétés thérapeutiques à contenir des substances actives dont les plus importantes, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les tanins. Malgré le degré de développement scientifique atteint, ces plantes restent toujours concurrentes des médicaments et des produits paramédicaux (Lahmer *et al.*, 2011).

III.1.1. Importance et caractéristique de la phytothérapie

La phytothérapie est une méthode thérapeutique qui utilise les vertus des plantes pour soigner une maladie. Cette thérapie se base sur l'utilisation des plantes naturelles pour guérir une maladie spécifique. Certaines catégories des plantes ont des vertus thérapeutiques agissant au même titre que les produits chimiques ou de synthèse, mais la différence réside dans le fait que les plantes ne provoquent pas des effets secondaires (Lucienne, 2007).

La phytothérapie est la médecine qui soigne par les plantes, utilisées sous forme de tisanes, d'extraits secs, de poudres et d'huiles essentielles. Les formes de plantes utilisées dépendent de l'usage voulu. La phytothérapie reste le moyen de soigner le plus utilisé dans le monde, de par son efficacité et son prix peu coûteux (Lahmer *et al.*, 2011).

III.2. Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances naturelles existant depuis l'antiquité, on en trouve la trace en Egypte, 4000 ans environ avant Jésus Christ (Odoul, 2003).

Une huile essentielle selon la pharmacopée est un produit de composition complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux. Il est le plus souvent séparé de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (Satrani *et al.*, 2004). Ils ne sont pas des corps simples, mais, en général, des assemblages de molécules ayant chacune leurs propriétés particulières. L'importance de la connaissance des familles, genres et espèces botaniques est évidente, mais aussi de celle de leur provenance. Des plantes botaniquement identiques peuvent, en effet, donner des essences dont les différences peuvent être plus ou moins importantes (Lamendin *et al.*, 2004).

III.3. *Ammi visnaga*

III.3.1. Description botanique

Synonyme : *Daucus visnaga* Linn.

Visnaga daucoides Gaertn.

Khella ou bien « Noukha » en Algérie (Belkacem *et al.*, 2016) est une plante vivace qui pousse annuelle ou bisannuelle généralement au printemps (Vogel, 2013 ; Jaradat *et al.*, 2015). Les feuilles inférieures sont pennées, les autres de 2 à 3 plumes ; Tous avec des lobes étroits linéaires ou filamenteux, mince et breveté en fleur, devient dressé, épais et ferme en fruits. La fraction de 1 à 2 karachites, égale ou supérieure aux rayons ; bractéoles subulées. Les pédicelles sont dressés, forts et fermes en fruits. Fruits 2-2,5 mm (Mifsud, 2021).

Ammi visnaga porte des fruits ovoïdes, contracté par deux méricarpes (d'environ 3 mm de longueur), ces dernier privilégies par une couleur brun-vert avec une nuance violette et portent des graines ovales (Bishr *et al.*, 2014 ; Hashim *et al.*, 2014; Meepagala *et al.*, 2016).



Figure 05 : *Ammi visnaga* (L.) Lam (Mifsud, 2021).

III.3.2. Classification taxonomique d'*Ammi visnaga*

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

| | |
|-----------------|---------------------|
| Règne : | Pantae |
| Embranchement : | Magnoliophyta |
| Classe : | Magnoliopsida |
| Ordre : | Apiales |
| Famille : | Apiaceae |
| Genre : | <i>Ammi</i> |
| Espèce : | <i>Ammi visnaga</i> |

III.3.3. Origine et répartition géographique

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 majorité des Apiacées sont des plantes aromatiques grâce à leurs sécrétions d'huiles essentielles (Paloma, 2012).

Ammi visnaga L. (*Visnaga daucooides* Gaertn, Famille Apiaceae), également connue sous le nom de Khella Baldi ou cure-dents, est une herbe de la région méditerranéenne de l'Afrique du Nord, de l'Asie et de l'Europe (Khalil *et al.*, 2020). Elle est une plante médicinale appartenir à la famille des Apiaceae, largement utilisée en médecine traditionnelle. C'est une plante vivace, spontanée très abondante, principalement dans la région du nord, dans le bassin méditerranéen. En Algérie *Ammi visnaga* est une plante annuelle ou bisannuelle, qui pousse généralement au printemps (Badr *et al.*, 2004 ; Lakehal, 2021).



Figure 06 : Origine et répartition géographique d'*Ammi visnaga* (Mifsud, 2021).

III.3.4. Utilisation thérapeutique en médecine traditionnelle

Ammi visnaga est connue depuis longtemps pour son utilisation en médecine traditionnelle. Dans le cadre de la lutte contre la COVID-19. Cette plante a attiré l'attention de certains chercheurs car ses propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes et antibactériennes sont établies (Haoud et Mellali, 2021).

Khella contient de la khelline (1%), de la visnagine, du glycoside de khellol, des flavonoïdes, des stérols, des huiles volatiles (0,2%). La khelline et la visnagine exercent un puissant effet antispasmodique sur les petits muscles bronchiques, les artères coronaires et sur les tubules urinaires. Khellin soulage les patients asthmatiques, soulage également les spasmes

douloureux des calculs rénaux et vésicaux (n'est plus utilisé pour expulser les calculs rénaux) (Khare, 2014).

L'extrait de graines d'*Ammi visnaga* a également montré une très forte activité diurétique. La diminution du poids corporel, l'augmentation du poids des reins, l'augmentation de la consommation d'eau et la diminution de la production d'urine présentes dans le groupe témoin d'acide glycolique ont été évitées à des degrés divers dans le traitement par *Ammi visnaga* (Zulfaqar *et al.*, 2001).

Ammi visnaga L. est utilisé en médecine traditionnelle par la population du Moyen-Orient depuis l'Antiquité. La décoction de fruits était utilisée pour le traitement des coliques néphrétiques par les anciens Égyptiens comme traitement de l'inflammation rénale en Irak et en Palestine et dans le traitement de la lithiase urinaire et douleurs prostatiques en Algérie. Son usage s'était répandu au point qu'il était considéré comme le plus espèces recommandées pour le traitement des infections urinaires (Khalil *et al.*, 2020).

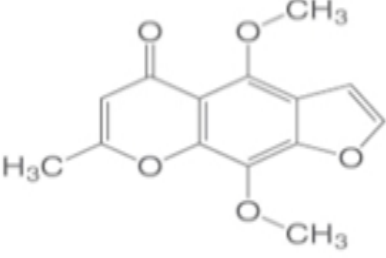
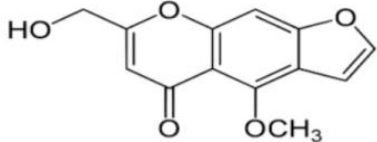
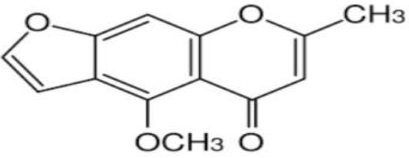
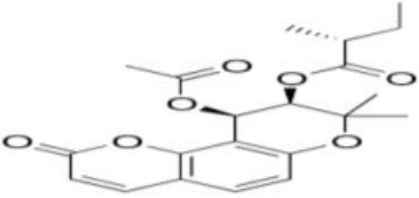
D'autre part, ils ont démontré l'effet neuroprotecteur de la visnagine en supprimant la pathogénèse causée par l'acide kainique. Ces effets neuroprotecteurs sont liés entre autres à son potentiel anti-inflammatoire (Haoud et Mellali, 2021).

III.3.5. Principaux constituants phytochimique d'*Ammi visnaga*

L'espèce d'*Ammi visnaga* fournisse une multitude de composés bioactifs (principalement les coumarines et les flavonoïdes) (Thukaa *et al.*, 2010).

Les tests de caractérisation des métabolites secondaires impliquent une analyse qualitative soit sur la formation de complexes utilisant des réactions de précipitation ou dans la formation de complexes colorés utilisant des réactions de coloration (Boufellous *et al.*, 2019). Les études phytochimiques d'*Ammi visnaga* ont révélé sa richesse en différentes composants, (Khalfallah *et al.*, 2011) résumant dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Composition phytochimique de l'*Ammi visnaga*

| Familles | Composants | Structures de majeurs composants (Dirar <i>et al.</i> , 2014 ; Hashim <i>et al.</i> , 2014) |
|-------------------------|--|--|
| Fruranochromones | γ -pyrones 4%., la khelline (0,3-1,2%), la visnagine (0,05 à 0,30%), khellinol, ammiol, khellol et khellinvisammiol , khellinone, visnaginone (Hashim <i>et al.</i> , 2014) |  <p style="text-align: center;">Khelline</p> |
| Pyranocoumarines | 0,2-0,5% comprenant : la visnadine, lasamidine et dihydrosamidine (Ghoneim <i>et al.</i> , 2014) |  <p style="text-align: center;">Khellol</p> |
| Furanocomarines | xanthotoxine et d'amoidine (Jaradat <i>et al.</i> , 2015) | |
| Flavonoïdes | comprenant : la quercétine et l'isorhamnetine et leurs trisulfates ainsi que le kaempferol (Jaradat <i>et al.</i> , 2015) |  <p style="text-align: center;">Visnagine</p> |
| Volatiles | Les plus abondant :linalool and aliphatic esters (Ghoneim <i>et al.</i> , 2014) | |
| Protéïnes | (fruits mûrs sèches) 12-16% (Bishr <i>et al.</i> , 2014). |  <p style="text-align: center;">Visnadine</p> |

III.3.6. Composition chimique des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe et soumise à de très nombreuses variables. Connaître avec exactitude les constituants d'une huile essentielle est fondamental, à la fois pour vérifier sa qualité, expliquer ses propriétés et prévoir sa toxicité potentielle (Françoise Couic-Marinier et Annelise Lobstein, 2013).

Les 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 (Satrani *et al.*, 2004).

Ils comportent 39 composés identifiés repartis en diterpènes (58.04%), esters (14.39%), monoterpènes (22.05%), sesquiterpènes (2.69%). L'abiétadiène est le chémostype avec 53.42% (Douar, 2012).

III.3.7. Activités biologique des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

1. Activités antimicrobienne

Plusieurs études ont porté sur les effets antimicrobiens des huiles essentielles d'*A. visnaga* L., montrant leur efficacité contre divers micro-organismes tels que *Escherichia coli*, des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*. Cependant, ils se sont montrés faibles activités antifongiques mais identifiés des composants qui inhibaient fortement la formation d'aflatoxine chez les champignons toxigènes, par exemple la khelline, la xanthotoxine et le bergaptène (Khalil *et al.*, 2020).

Généralement, ses activités ont été associées à la composition chimique de la plante, précisément à la khelline et à la visnagine, deux constituants considérés comme des agents antifongiques, antibactériens et antiviraux (Hashim *et al.*, 2014).

L'utilisation d'agents à base de plantes est une question importante dans les recherches récentes. Une étude visait à évaluer l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux et hydroalcoolique de graines et tiges d'*Ammi visnaga*. Les résultats montrent que les extraits testés possèdent un effet antibactérien contre certaines espèces de streptocoques oraux, dont *S. sanguis* et *S. mutans*. Par conséquent, peuvent l'utiliser pour prévenir la carie dentaire (Semyari *et al.*, 2011).

2. Activités antioxydantes

Les principaux composants des huiles volatiles étaient le 2-méthylbutyl-2-méthylbutyrate (16,7-27,4%), le linalol (24,8-41,2%), le limonène (6,8-9,9%) et l'isoamylisofalate (7,3-7,4%). L'efficacité antioxydante a été testée à l'aide de la méthode de piégeage des radicaux 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) par rapport à l'hydroxytoluène-butylé (BHT), qui a été utilisé comme contrôle positif. Tous les échantillons ont montré une faible activité (Amina *et al.*, 2016).

Les extraits aqueux et méthanolique d'*Ammi visnaga* possèdent une activité antioxydante importante due à la présence des composés phénoliques qui peuvent être exploités dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Himeur *et al.*, 2021).

Les principaux composants identifiés étaient l'acide butanoïque, le 2-méthyl-, l'ester pentylique, le (Z)- β -ocimène, le D-limonène, le linalol, la pulégone et le lavandulyl-butyrate. Les tests *in vitro* de DPPH et de pouvoir réducteur ont montré une activité de piégeage des radicaux libres modérée à faible et le pouvoir antioxydant était positivement corrélé à la concentration des polyphénols. *In vivo*, l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* L. a montré une capacité antioxydante élevée aux deux concentrations (600 et 1200 mg/kg), augmentant efficacement les niveaux de glutathion réduit, de superoxyde dismutase et de catalase et réduisant significativement la peroxydation lipidique. Selon ces résultats suggèrent qu'*Ammi visnaga* L. pourrait représenter une source de molécules à potentiel antioxydant dans la prévention des maladies liées aux radicaux libres (Kamal *et al.*, 2022).

3. Activité antibiofilm

L'extrait méthanolique d'*Ammi 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

CHPITRE IV

Matériel et Méthodes

IV. Matériel et Méthodes

IV .1. Objectif du travail

Le mode de vie en biofilm fournit à *Pseudomonas aeruginosa* une structure protectrice très résistante contre les antibiotiques et le système immunitaire de l'hôte, ce qui rend le traitement de ses infections plus compliqué et nécessite de nouvelles thérapies. L'objectif de cette étude est d'examiner l'effet d'huiles essentielles d'*Ammi visnaga* contre la formation de biofilm à *P. aeruginosa*

IV .2. Souche bactérienne

IV.2.1. Isolement

L'isolat de *Pseudomonas aeruginosa* incluse dans cette étude a été isolé à partir des prélèvements cliniques prélevés des patients diabétiques présentant des infections cutanées au niveau du service de Bactériologie à l'Hôpital de Makour Hammou, Aïn Defla.

IV.2.2. Identification

IV.2.2.1. Etude macroscopique des colonies

A-Culture sur milieu King A et King B

Comme d'autres espèces de *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* sécrète un certain nombre de pigments : entre autres la pyocyanine (bleu-vert), la pyoverdine (jaune-vert fluorescent) et la pyorubine (brun-rouge).

L'élaboration des pigments est influencée par la composition du milieu, ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents : King A et King B.

Les milieux de King (milieu King A et milieu King B) permettent de différencier entre les espèces du genre *Pseudomonas* par la mise en évidence de la production de pigments spécifiques.

Le milieu de King A permet la détection de la synthèse de pyocyanine, pigment élaboré spécifiquement par *Pseudomonas aeruginosa* (bacille pyocyanique). Il permet d'orienter

l'identification de cette bactérie. La production de pyocyanine se manifeste en colorant le milieu de culture en bleu.

La gélose King B permet la production de fluorescéine (ou pyoverdine), pigment jaune-vert fluorescent sous la lumière ultra-violette, par certains *Pseudomonas*.

A partir d'une suspension en eau physiologie ou dans un bouillon nutritif préparé à partir d'une culture purifiée sur gélose faire ensemencer les milieux en faisant des stries par l'anse à la surface de la gélose King A et King B. L'observation réalisée après une incubation pendant 24 à 48 heures à 37°C.

B. Croissance à 42 °C

Pour la croissance à 42 °C, il faut toujours faire un bouillon témoin à 37 °C car la souche peut être morte et, sans témoin, on pourrait croire que le test de croissance à 42 °C est négatif alors qu'en fait le germe est mort.

IV.2.2.2. Etude microscopique

A- Examen à l'état frais

C'est une technique qui permet l'observation microscopique des bactéries vivantes entre lame et lamelle à l'objectif 40. Le but de ce test est de déterminer la mobilité bactérienne.

A l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une goutte de l'eau physiologique stérile au centre d'une lame. On prélève une partie d'une colonie bactérienne à partir d'une culture jeune à l'aide d'une pipette Pasteur et on la dissocie dans la goutte. On applique ensuite une lamelle sur la goutte en évitant la formation des bulles d'air.

B- Coloration de Gram

Principe

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant de classer les bactéries en deux groupes selon la structure de leur paroi en : Bactéries à coloration de Gram positive et bactéries à coloration de Gram négative (Dennis, 2007).

En effet quand les bactéries sont mises au contact du violet de gentiane puis soumises à l'action du Lugol, il se forme un complexe colorant qui colore la cellule bactérienne en violet.

Cependant, lorsque ces bactéries colorées sont lavées à l'alcool, seules les bactéries à coloration de Gram négative (présence membrane externe et couche mince de peptidoglycane), qui perdent leur coloration et prennent la couleur rose après la coloration par la Fushine.

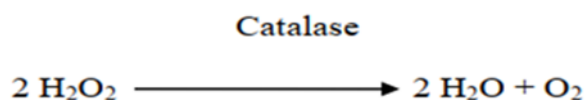
IV.2.2.3. Identification biochimique

a-Recherche de l'oxydase

Ce test est basé sur la détection de la production de l'enzyme cytochrome oxydase. Il est déterminé par la méthode des bandelettes d'oxydases. A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée on dépose une colonie sur la bandelette. La réaction positive est révélée par l'apparition d'une tache violette.

b-Recherche de catalase

La catalase est un enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante



Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par Prescott et autres (2003). Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu gélosé à l'aide d'une pipette Pasteur boutonné dans une goutte de l'eau oxygénée.

c-La galerie API 20 NE

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation. API 20 NE ne doit pas être utilisé directement à partir des prélèvements cliniques ou autres. Les microorganismes à identifier doivent dans un premier temps être isolés et purifier sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de bactériologie.



Figure 07 : La galerie biochimique API 20 NE (Lattab, 2018).

Principe

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture (Annexe) et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification apiweb™.

IV.2.3. Antibiogramme

Il est réalisé selon la méthode de diffusion des disques des antibiotiques sur gélose Muller Hilton. Une suspension a été préparée à partir d'une culture de 18-24 h sur milieu gélosé non sélectif en solution saline (0,9% NaCl) équivalente au standard McFarland 0,5 ($\approx 10^8$ UFC/mL). Sur milieu gélose Muller-Hilton, l'ensemencement est réalisé par inondation avec la suspension diluée au 1/100 ($\approx 10^6$ UFC/mL). Un mL de cette suspension a été déposé dans chaque boîte de Pétri contenant 20ml de gélose Mueller-Hinton. Après une imprégnation de 2 min, l'excédent d'inoculum est éliminé par aspiration. Après on laisse les boites a séchés pendant 10min. Puis on fait déposer les disques des antibiotiques testés.

Les antibiotiques suivants (tableau 03) ont été testés pour la réalisation de l'antibiogramme en suivant les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société française de Microbiologie (CASFM) :

Tableau 03 : Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme

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

IV.3. Matériel végétal (*Ammi visnaga*)

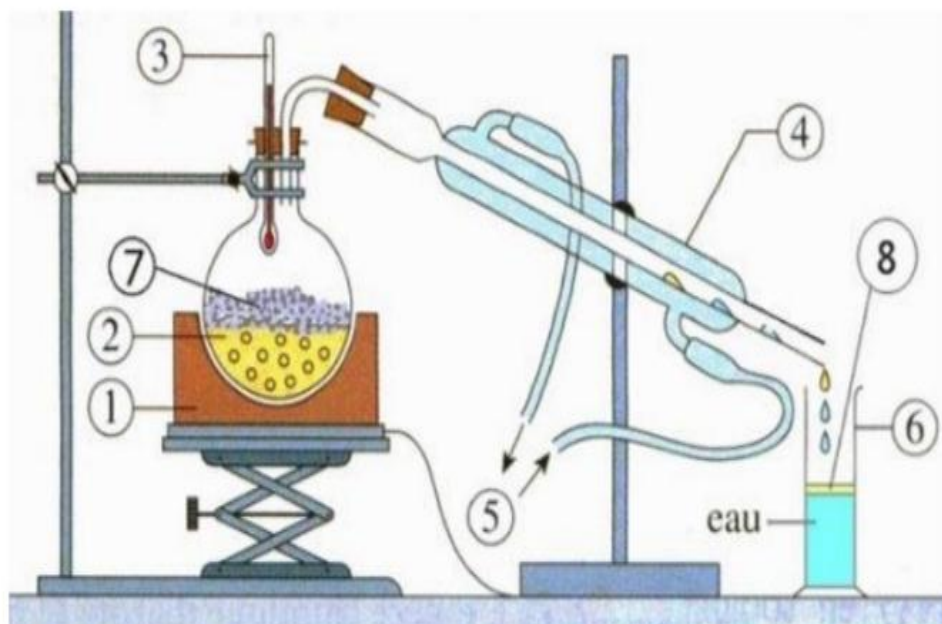
La photo de la plante d'*Ammi visnaga* a été prise en mois Mai 2022 dans la région de Mostaganem.



Figure 08 : *Ammi visnaga* de Mostaganem, Algérie.

IV.3.1. Procédé d'extraction des huiles essentielles (Hydrodistillation)

Il s'agit de la méthode la plus simple et la plus anciennement employée pour extraire les huiles essentielles. Le procédé consiste à immerger le matériel végétal dans un récipient rempli d'une quantité adéquate d'eau. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Les HEs forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Puis, les vapeurs sont condensées au moyen d'un réfrigérant. Dans un autre récipient de collecte, les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Les HEs étant plus légères que l'eau, elles surnagent au-dessus de l'hydrolysât. Cependant, l'hydrodistillation possède des limites. En effet, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (Lucchesi, 2005). Au laboratoire, le système utilisé pour l'extraction des huiles essentielles est de type Clevenger.



1. Chauffe ballon
2. Ballon
3. Thermomètre
4. Réfrigérant

5. Entrer et Sortie d'eau de refroidissement
6. Eprouvette graduée
7. Matière à extraire
8. La couche des HEs

Figure 09 : Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation (Lucchesi, 2005)

IV.3.2. Calcule de rendement d'extraction

Le rendement d'extraction de l'huile essentielle a été calculé selon l'équation ci-dessous (Kusuma et Mahfud, 2017). L'huile essentielle a ensuite été conservée dans l'obscurité à 4°C (Gardeli *et al.*, 2008).

$$y = (V/W) \times 100$$

y : Le rendement en huile essentielle (% , p/p),

V : Le poids de l'huile extraite (g),

W : Le poids des parties végétales fraîches (g).

IV.4. Activité Antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

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

Les huiles essentielles de la plante d'*Ammi visnaga* ont été dissoutes dans DMSO (diméthylsulfoxyde) à raison de 10%.

La souche testé de *P. aeruginosa* a étéensemencée dans des boîtes contenant la gélose nutritive GN 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 isolée et mise dans un tube contenant l'eau physiologie stérile puis agitée par un vortex pour obtenir une suspension bactérienne homogène. Cette suspension a été ajustée à 10⁸ UFC/mL.

Sur milieu gélose Mueller-Hilton, l'ensemencement est réalisé par inondation avec la suspension diluée au 1/100 (≈10⁶ UFC/mL). 1 ml de cette suspension a été déposé dans chaque boîte de Pétri contenant 20ml de gélose Mueller-Hinton. Après une imprégnation de 2 min, l'excédent d'inoculum est éliminé par aspiration. Après on laisse les boîtes a séchés pendant 10min.

Des disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre ont ensuite été imprégnés avec 5µl d'huile essentielle à l'aide d'une micropipette et déposés dans des conditions aseptiques sur la surface de la gélose des boîtes inoculées.

L'ensemble des boîtes ont été laissées pendant 15 min à température ambiante pour permettre la diffusion des huiles essentielles puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

La lecture de résultat se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition développées autour des disques.

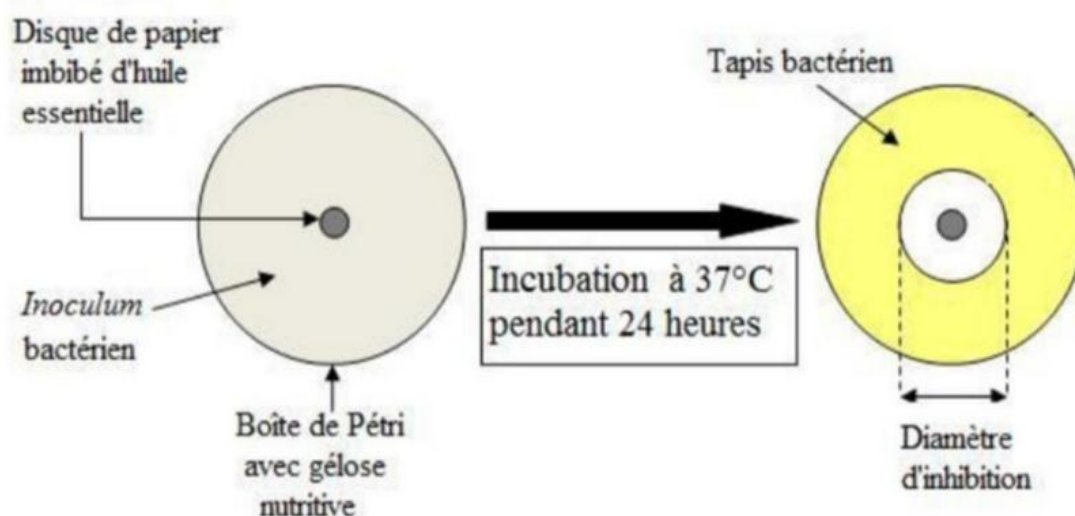


Figure 10 : Principe de la technique de diffusion des disques sur milieu gélosé (Kachetel et Sahmi, 2016).

IV.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et 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 24h. La technique de microdilution dans des microplaques à 96 puits est la méthode choisie pour déterminer la CMI des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* (Fadipe *et al.*, 2015).

Une suspension a été préparée dans bouillon trypticase de soja (TSB) à partir d'une culture de 18-24 h sur milieu gélosé. Cette suspension a été ajustée à une charge équivalente à 10^8 UFC/ml.

L'inoculum standardisé à 10^8 UFC/ml est dilué à 1/100 par le même milieu de culture bouillon trypticase de soja (TSB) pour avoir une concentration de 10^6 UFC/ml. Les puits de la première rangée verticale sont remplis par 100 μ l de la suspension microbienne standardisée à 10^6 UFC/ml comme premier témoin positif. Les puits de la deuxième rangée sont remplis par 100 μ l d'un mélange contenant du Tween 80 dilué à 0,1 % (v/v) dans la suspension microbienne standardisée à 10^6 UFC/ml afin de vérifier l'effet du Tween 80 sur les souches testées. Le reste des dix rangées est rempli par les différentes concentrations d'huiles essentielles. Pour cela, une série de dilutions au 1/2 a été préparée à partir d'une solution mère contenant 400 mg/ml d'huile essentielle et 1 % de Tween 80 dilués ensemble dans bouillon trypticase de soja (TSB). Les autres solutions filles contenaient déjà un mélange de Tween 80 dilué à 1 % dans le TSB (dans la même concentration que la solution mère), dans un volume total égalant à la moitié du volume total de la solution mère, pour garder la concentration de Tween 80 constante à 1 %. Les dix puits dans chaque rangée sont remplis par 90 μ l de suspension puis 10 μ l de la concentration correspondante venant de la plus faible à la plus grande concentration, dans une gamme finale de 0,08–40 mg/ml. La concentration finale du Tween 80 dans les puits était 0,1 %. La dernière rangée horizontale a été remplie par 100 μ l de TSB dans chaque puits comme témoin négatif.

Après incubation des plaques à 37 °C pendant 24h, la CMI est déterminée en tant que la plus faible concentration du produit à tester (huiles essentielles) pour laquelle la croissance microbienne n'est pas observée à l'œil nu.

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.6. L'effet des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* sur la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*

Pour évaluer l'effet des huiles essentielles testées d'*Ammi visnaga* sur la formation des biofilms de *P. aeruginosa*, une série de concentrations sub-inhibitrices des HEs sont préparés 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 μ l 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 cellules bactériennes adhérentes sur la paroi des puits. Ensuite, l'excès de colorant est éliminé et les puits sont lavés 3 fois à l'aide de 300 μ l 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).

CHAPITRE V

Travaux intérieurs

V. Travaux intérieurs

V.1. Isolement et identification de *Pseudomonas aeruginosa*

V.1.1. Étude macroscopique

L'observation macroscopique montre que les colonies de *P. aeruginosa* ayant une forme plate, bombée, de contour régulier et parfois irrégulier, avec un aspect métallique, une couleur jaune verdâtres présente sur le milieu King B et bleu-vert sur le milieu King A (Figure 11) (Guillaume, 2004).



Figure 11 : Aspect macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa*ensemencée sur milieu King A.
(e-biblio.univ-mosta.dz)

V.1.2.Examen microscopique

A-Observation à l'état frais

L'examen à l'état frais montre que les cellules bactériennes de *Pseudomonas aeruginosa* sont mobiles (Nour el houdanaili et Elgarni, 2019).

B-Coloration de Gram

L'observation microscopique des bactéries après une coloration de Gram des frottis réalisés à partir d'une culture purifiée a montré que les cellules apparaissent sous forme de bacille avec une couleur rose (Figure 12) ce qui signifie que *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie à coloration de Gram négative.

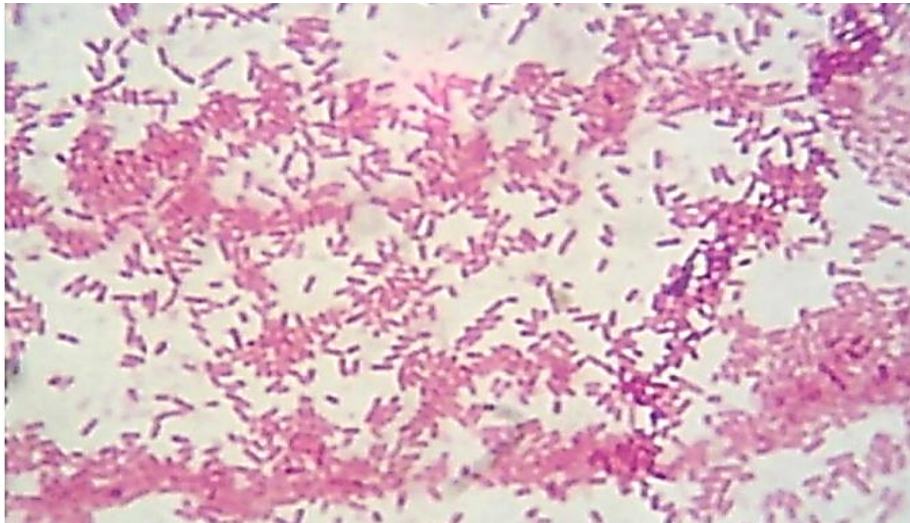


Figure 12 : Observation microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* G×100 (Darghout et Metheni, 2016).

V.1.3. Test oxydase

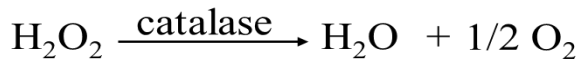
La coloration violette foncée qui a apparue en quelques secondes, révèle une réaction positive, l'isolat est dite oxydase positive (MacFaddin, 2000).

Le test de l'oxydase positif, met en évidence la présence d'un cytochrome oxydase qui oxyde le cytochrome c réduit. La présence de ce dernier dans les chaînes respiratoires grâce à des réactifs ayant le même potentiel d'oxydo-réduction que le cytochrome c (N-méthylé du paraphénylène diamine). L'existence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (Megraud, 1996).

V.1.4. Test catalase

L'apparition des bulles de gaz après l'addition de H₂O₂ signifie qu'il y a une production de l'enzyme catalase et que le test est positif.

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La présence d'une catalase active chez les bactéries isolées est traduite, par un dégagement gazeux abondant sous la forme de mousse ou de bulles d'oxygène, due à la dégradation de l'eau oxygénée formée, en eau et en oxygène comme l'indique la réaction suivante (Holt *et al.*, 1994) :



V.1.5. Galerie biochimique API 20NE

Après une incubation de la galerieensemencée à 37°C pendant 24h, la lecture de résultat doit se faire en se référant au tableau de lecture (Annexe). Et Sur la fiche des résultats on fait la détermination du profil numérique (Figure 13 et 14). L'identification est obtenue à partir ce profil à l'aide du logiciel d'identification ApiwebTM.

La révélation des deux tests NO₃ et TRP doit se faire en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air. Pour cela placer le couvercle de la boîte d'incubation au-dessus de ces tests (NO₃ et TRP), pendant la période de la révélation.

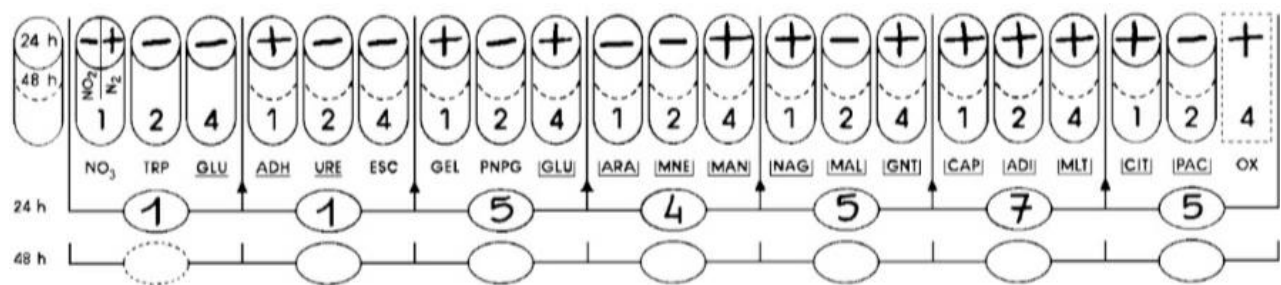


Figure 13 : Un exemple d'un profil numérique chez un isolat de *Pseudomonas aeruginosa*



Figure 14 : Résultat de la galerie API 20 NE (Darghout et Metheni, 2016).

Tableau 04 : Résultats des tests biochimiques (API 20NE) de *Pseudomonas aeruginosa*

| Tests | Bactérie (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) |
|-------|--|
| NO3 | + |
| TRP | - |
| GLU | - |
| ADH | + |
| URE | + |
| ESC | - |
| GEL | + |
| PNPG | - |
| GLU | + |
| ARA | + |
| MNE | - |
| MAN | + |
| NAG | + |
| MAL | - |
| GNT | + |
| CAP | + |
| ADI | + |
| MLT | + |
| CIT | + |
| PAC | - |

V.2.Antibiogramme

L'étude de la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques habituellement utilisés dans la thérapie de cette bactérie a été réalisée par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé M-H. Après une incubation à 37°C pendant 24h, la lecture de l'antibiogramme consiste à déduire à partir de la mesure des diamètres des zones d'inhibition, le caractère sensible, résistant ou intermédiaire. Lorsque la technique est parfaitement standardisée, les diamètres des zones d'inhibition dépendent uniquement de la sensibilité du germe.

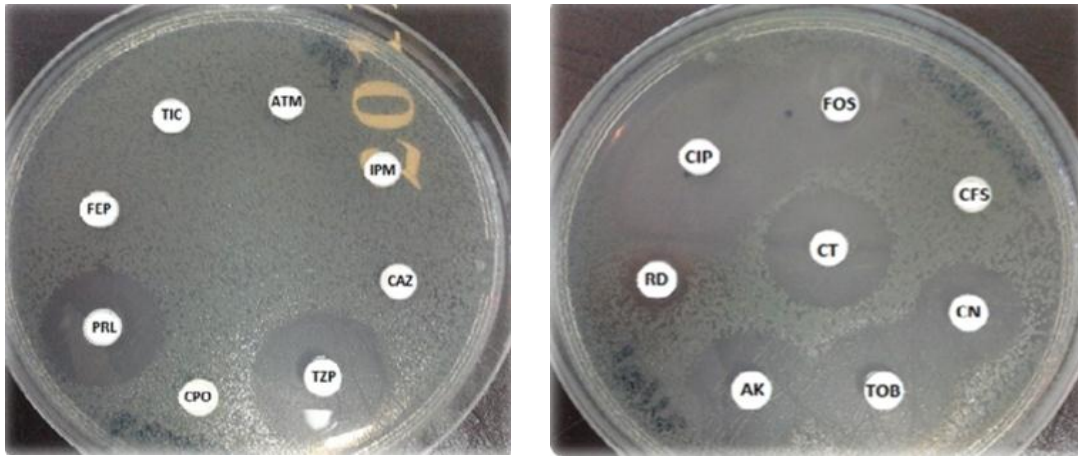


Figure 15 : Résultat d'Antibiogramme d'un isolat de *Pseudomonas aeruginosa* réalisé au sein de laboratoire hôpital militaire d'instruction Mohamed V (Rabat *et al.*, 2013).

Tableau 05 : Résultats de l'antibiogramme d'un isolat de *Pseudomonas aeruginosa* (Arabi, 2018)

| Antibiotique | Diamètre critique (mm) | | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | |
|--------------|------------------------|-------|-----|-------------------------------|----------|
| | R | I | S | Ø (mm) | Résultat |
| AK | ≤15 | 16-17 | ≥18 | 23.85 | S |
| CN | <16 | | >16 | 21.34 | S |
| TMN | <16 | | >16 | 22.33 | S |
| SXT | ≤10 | 11-15 | ≥16 | 7 | RN |
| CIP | ≤22 | 23-24 | ≥25 | 35.07 | S |
| FF | <16 | - | >16 | 6 | RN |

Suivant le résultat obtenu par Arabi (2018), l'isolat testé de *Pseudomonas aeruginosa* montre une sensibilité vis à vis l'Amikacine, la Gentamycine, la Tobramycine et la Ciprofloxacine. Une résistance élevée envers les antibiotiques testés appartenant aux groupes des β -lactames (Pénicilline G, Pipéracilline et Ticarcilline-clavulanate), Carbapénèmes (Imipénème) et céphalosporines (Céfépime) a été enregistré par Lattab (2018). Cette résistance est due à plusieurs mécanismes tels que la diminution de la concentration intracellulaire des β -lactames par la production de métallo- β -lactamases (MBLs) ou par l'augmentation de l'expression des pompes d'efflux comme MexAB, MexCD et MexXY. Ces mécanismes de résistance aux β -lactamines sont les plus répandus chez *P. aeruginosa* (Mesaros *et al.*, 2007). Les études réalisées par Kumar et autres (2012) et Sara et autres (2013) ont conclu que l'utilisation excessive de carbapénèmes dans les hôpitaux lors du traitement des infections nosocomiales provoque la forte prévalence des souches de *P. aeruginosa* résistantes aux carbapénèmes et producteurs de MBLs (résistance acquise).

V.3. Effet antibactérien des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

V.3.1. Rendement d'extraction des huiles essentielles d'*Ammi visnaga*

Les huiles essentielles sont extraites de la partie aérienne des matériaux végétaux secs, l'extraction est réalisée avec le dispositif de Clevenger. Le rendement en huile essentielle est variable d'une région à l'autre selon les facteurs pédoclimatiques.

Les HEs de l'*Ammi visnaga* de la région de Meknès-Tafilalet (Moyen Atlas), obtenue avec un rendement de $0.13\% \pm 0.04$ ml/100 g, comporte 39 composés identifiés repartis en diterpènes (58.04%), esters (14.39%), monoterpènes (22.05%), sesquiterpènes (2.69%). L'abiétadiène en est le chémotype avec 53.42%. L'étude phytochimique a révélé la présence de composés polyphénoliques (tanins catéchiques, flavones), alcaloïdes, stérols, terpènes et mucilage au sein de l'espèce. L'action de l'HE s'est révélée assez modérée contre les souches bactériennes testées (Soro *et al.*, 2015).

Selon plusieurs auteurs, l'espèce de la plante choisi, l'origine de récolte, la période de récolte, l'organe de la plante, la durée et la technique de séchage, les conditions de conservation de la plante séchée et la méthode et la durée d'extraction sont des facteurs parmi d'autres qui peuvent

aussi avoir un impact direct sur les rendements en huile essentielle (Russo *et al.*, 1998 ; Tonzibo,1998 ; Vekiari *et al.*, 2002 ; Karousou *et al.*, 2005 ; Kouamé, 2012).

V.3.2 Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* (Aromatogramme)

D'après des études réalisées, les huiles essentielles d'*Ammi visnaga* a présenté des effets antibactériens contre des souches testés de *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres espèce bactérienne pathogène comme *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* (Baghdadi Ben Attia et Bachket, 2019).

Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire et inhibiteur de l'HE d'*Ammi visnaga* à partir de disque sur le milieu gélosé. L'évaluation de pouvoir antimicrobien a été mise en évidence en mesurant le diamètre des zones d'inhibition de la prolifération microbienne pour l'HE après incubation à 37°C pendant 24h.Selon les études de Baghdadi Ben Attia et Bachket (2019) ont été enregistrés des diamètres des zones d'inhibition rapportées entre 8-14,5mm (Figure 16 et Tableau 06). Ce résultat est confirmé par des études qui indiquent que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a montré une activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC25922, *E. coli* et *S. aureus* ATCC 43300 avec des diamètres d'inhibition de 25, 29, 25 et 25mm respectivement (Khalfallah *et al.*, 2011). Une autre étude a montrél'effet antibactérien de l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* contre, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* et *Morganella morganii* (Al-Snafi, 2013).

L'espèce et la source botanique, la période de récolte et l'étape du développement de la plante, la technique d'extraction, le matériel de la plante frais ou séché, les souches des microorganismes et la méthodologie du test antimicrobien sont tous autant des facteurs qui influencent l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* (Janssen *et al.*, 1987 ; Cosentino et Tuberoso, 1999).

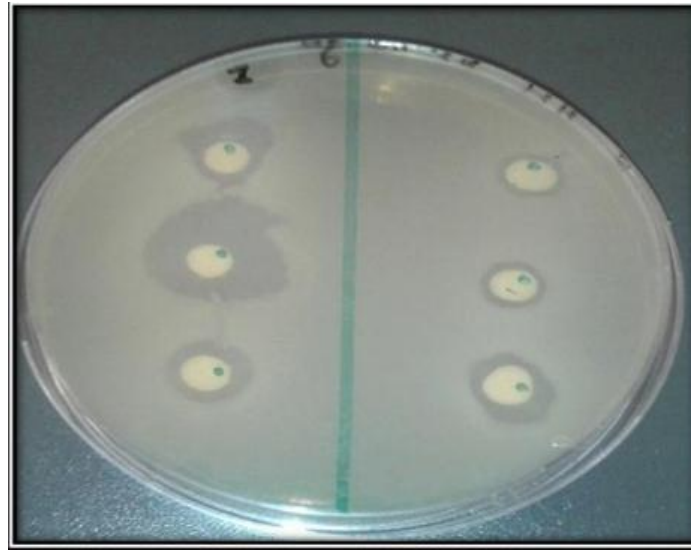


Figure 16 : L'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* (Baghdadi et Bachkat, 2019).

Tableau 06 : L'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* contre les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* (Baghdadi et Bachkat, 2019).

| isolats | Diamètre de la zone d'inhibition (mm) |
|---------|---------------------------------------|
| | Huile essentielle |
| SR | 8 |
| S1 | 9 |
| S2 | 9 |
| S3 | 11 |
| S4 | 14.5 |
| S5 | 14 |
| S6 | 13 |

SR : Souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

S1 : Isolat numéro 1

V.3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Suivant la plupart des travaux publiés, les bactéries à coloration de Gram positives semblent être plus sensibles aux huiles essentielles que ceux à Gram négatives (Dubber et Harder, 2008). Toutefois, cette observation n'est pas toujours confirmée et certaines bactéries à coloration de Gram positives ont été trouvées plus résistantes ou de sensibilité égale aux bactéries à coloration de Gram négatives (Burt, 2004 ; Elgayyar *et al.*, 2001 ; Sarter *et al.*, 2007).

Les bactéries à coloration de gram négatives comme *Pseudomonas aeruginosa* possèdent une membrane externe qui joue un rôle pour l'augmentation de la résistance aux éléments hydrophobes (Griffin *et al.*, 1999). Par contre la perméabilité des membranes des bactéries par la présence de pores protéiniques chez les bactéries gram négatives et la distribution intracellulaire des constituants des huiles sont des éléments clés qui influent sur la diffusion et l'action de l'huile essentielle dans la cellule. Bien que les activités antimicrobiennes des huiles essentielles soient bien établies (Baser *et al.*, 2006).

En effet, plusieurs chercheurs ont signalé qu'il existe une relation entre les composés volatils les plus abondants dans l'huile essentielle testée et l'activité antimicrobienne (Koutsoukadi *et al.*, 2005 ; Ghalem et Mohamed, 2009). Selon Rios et Recio (2005), les extraits ou les huiles des espèces végétales avec des valeurs de CMI inférieures à 100 µg/ml sont considérés comme prometteurs en tant qu'agents antimicrobiens potentiels. Haloui et autres (2015) ont signalé que l'huile essentielle présentait un effet antibactérien plus élevé avec des valeurs de CMI de 6.25mg/ml et 12.5mg/ml.

Lors de la détermination de la concentration minimale inhibitrice, les résultats montrent que *Escherichia coli* a été inhibé à partir de la concentration de 1/500 V/V alors que *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* ont été résisté jusqu'à la concentration 1/250 V/V en huile essentielle d'*Ammi visnaga*. (Satrani *et al.*, 2004). Ceci confirme les résultats de Charai et autres (1996) qui ont démontré que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* sont plus résistants que *Escherichia coli* à l'inhibition aux huiles essentielles d'*Origanum compactum* (riche en carvacrol : 50% et en p-cymène : 21 %) et d'*Origanum majorana* (riche en linalol: 33% et en terpinen-4-ol: 22%).

Les terpènes qui se sont une classe de composés chimique des huiles essentielles, ont été signalés pour provoquer la rupture des membranes de *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus* entraînant la fuite des constituants intracellulaires (Andrews *et al.*, 1980 ; Ultee *et al.*, 1999). Ces composés perturbés aussi la membrane de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et entraînaient des troubles au niveau de l'homéostasie, du pH et l'équilibre des ions inorganiques (Knobloch *et al.*, 1989 ; Lambert *et al.*, 2001 ; Ultee *et al.*, 2002). Outre ces effets sur les membranes cellulaires, les composés actifs d'huiles essentielles comme les terpènes peuvent inhiber les croissances bactériennes.

Les huiles essentielles sous forme de mélanges complexes, présentent des activités antimicrobiennes qui diffèrent de celles de leurs principaux composants testés uniquement (Delaquis *et al.*, 2002). En fait, l'activité inhibitrice d'une huile essentielle d'*Ammi visnaga* est le résultat d'une interaction complexe entre ses différents constituants, qui produisent des effets, additif, synergique ou antagoniste, même pour ceux qui sont présents à des concentrations plus faibles (Xianfei *et al.*, 2007).

V.4.Effets des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* contre la formation de biofilm a *Pseudomonas aeruginosa*

L'analyse cristal violet par l'utilisation des microplaques de 96 puits est la technique la plus choisi par plusieurs chercheurs pour estimer la production de biofilm ou pour tester une substance ou un agent antimicrobien contre la formation de ce dernier (Djordjevic *et al.*, 2002). Cette coloration est considérée comme l'une des techniques indirectes d'estimation de la production de biofilm sur des différents types de substrats (Djordjevic *et al.*, 2002). La coloration développée reflète directement la masse du biofilm formée, et sa solubilisation permet de la quantifier (Musk *et al.*, 2005).

L'observation visuelle des microplaques montre que la formation du biofilm a eu lieu préférentiellement sur les bordures des puits, se caractérisent par la formation d'un anneau variable d'une souche à l'autre à l'interface air-liquide. La densité du biofilm est en relation avec l'intensité de l'anneau formé (une couleur foncée indique que les souches sont fortement productrices de biofilm et vice versa) (Wijman *et al.*, 2007).

Les résultats d'effet de l'extrait d'acétate d'éthyle d'*Ammi visnaga* contre la biofilm formé par des souche de *P. aeruginosa* ont montré un effet inhibiteur sue la quantité des biofilm adhéré sur les bordures des puits, où elles ont enregistré une diminution progressive dans la quantité des biofilms formés par les isolats testés de *P. aeruginosa* en fonction de l'augmentation des concentrations d'extrait d'acétate d'éthyle d'*Ammi visnaga* (0,8 ; 1,56 et 3,12) (Baghdadi ben attia et Bachkat, 2019).

L'activité inhibitrice des extraits d'*A. visnaga* contre la formation des bioflms bactériens a été enregistré aussi par une étude réalisée en 2016 par Belkacem et autres, où les concentrations subinhibitrice (0,5, 1, 5 et 10 mg/ml) de l'extrait méthanolique a provoqué une diminution dans la quantité des bioflms formés par des souches de *B. cereus* et *S. aureus*.

CONCLUSION

Conclusion

Pseudomonas aeruginosa est le troisième pathogène opportuniste après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* impliqué dans de graves infections nosocomiales. Le traitement des infections causées par cette bactérie 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 un biofilm qui fournit à cette bactérie une structure dense qui la protège contre les antibiotiques et le système immunitaire de l'hôte.

L'objectif de notre étude est démontré le pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* et leur effet sur la formation des biofilm vis-à-vis *P. aeruginosa*. Ce travail est une synthèse bibliographique rassemblant les résultats de certaines études réalisées sur les huiles essentielle d'*Ammi visnaga*.

Suivant les résultats rassemblés de certaines études réalisées sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* contre *P. aeruginosa*, on a remarqué que les résultats obtenus par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton indiquent que l'huile essentielle d'*Ammi visnaga* a présenté une action antibactérienne contre les isolats de *Pseudomonas aeruginosa* testée avec des zones d'inhibition situés entre 8 à 14,5mm.

Pour la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), l'étude réalisée par Haloui et autres (2015) donne des valeurs situées entre 6,25 mg/ml et 12,5 mg/ml.

Alors pour l'effet des huiles essentielles d'*Ammi visnaga* contre la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*, on a remarqué le manque de résultats sur ce sujet par contre l'effet des extrait phénoliques comme l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait méthanolique de cette plante montrent une activité inhibitrice sur la quantité des biofilm adhérent sur les surfaces testées.

En perspectives, les recommandations suivantes sont suggérées :

Etablir la partie pratique de cette étude pour pouvoir déterminer l'effet antibactérien d'huiles essentielles d'*Ammi visnaga* et l'effet sur la formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- 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.
- Alhede, M., Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Phipps, R.K., Moser, C., Christophersen, L., Christensen, L.D., Van Gennip, M., Parsek, M., Høiby, N., Et Al. (2009). *Pseudomonas Aeruginosa* Recognizes And Responds Aggressively To The Presence Of Polymorphonuclear Leukocytes. *Microbiology (Reading, Engl.)* 155, 3500–3508.
- Alkawash, M.A., Soothill, J.S., And Schiller, N.L. (2006). Alginate Lyase Enhances Antibiotic Killing Of Mucoid *Pseudomonas Aeruginosa* In Biofilms. *APMIS* 114, 131–138.
- Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S, Molin S, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2006. A Characterization Of DNA Release In *Pseudomonas Aeruginosa* Cultures And Biofilms. *Mol Microbiol* 59:1114–1128.
- Allison D.G., Ruiz B., Sanjose C., Jaspe A., Gilbert P. (1998) Extracellular Products As Mediators Of The Formation And Detachment Of *Pseudomonas Fluorescens* Biofilms. *FEMS Microbiology Letters* ,167:179–84.
- Amina Keddad, Aoumeur Baaliouamer & Mohammed Hazzit (2016) Chemical Composition And Antioxidant Activity Of Essential Oils From Umbels Of Algerian *Ammi Visnaga* (L.), *Journal Of Essential Oil Bearing Plants*, 19:5, 1243-1250, DOI:10.1080/0972060X.2015.1085813
- Barker AP, Vasil AL, Filloux A, Ball G, Wilderman PJ, Vasil ML. 2004. A Novel Extracellular Phospholipase C Of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required For Phospholipid Chemotaxis *Mol. Microbiol*, 53(4): 1089-1098.
- Ball, G., Durand, E., Lazdunski, A. & Filloux, A. (2002). A Novel Type II Secretion System In *Pseudomonas Aeruginosa*. *Mol Microbiol* 43, 475-485.
- Balloy, V., Verma, A., Kuravi, S., Si-Tahar, M., Chignard, M., And Ramphal, R. (2007). The Role Of Flagellin Versus Motility In Acute Lung Disease Caused By *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 196, 289–296.
- Banerjee, D., & Stableforth, D. (2000). The Treatment Of Respiratory *Pseudomonas* Infection In Cystic Fibrosis : What Drug And Which Way? *Drugs*, 60(5), 1053-1064.

- Beal, R., And W. B. Betts. 2000. Role Of Rhamnolipid biosurfactants In The Uptake And Mineralization Of Hexadecane In *Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Microbiol. 89:158-168. [[Pubmed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Baier R.E (1970). Surface Properties Influencing Biological Adhesion, In Adhesion In Biological Systems, E.R.S. Manly, Editor. Academic Press. P. 15-48.
- Baillie G.S., Douglas L.J. (1998) Effect Of Growth Rate On Resistance Of *Candida Albicans* Biofilms To Antifungal Agents. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 42(8):1900–8.
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Kumari, H., And Mathee, K. (2013). A Dynamic And Intricate Regulatory Network Determines *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence. Nucleic Acids Res. 41, 1–20.
- Bonomo, R. A. & Szabo, D. (2006). Mechanisms Of Multidrug Resistance In *Acinetobacter* Species And *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 43, S49-56.
- Bardoel, B.W., Van Der Ent, S., Pel, M.J.C., Tommassen, J., Pieterse, C.M.J., Van Kessel, K.P.M., And Van Strijp, J.A.G. (2011). *Pseudomonas* Evades Immune Recognition Of Flagellin In Both Mammals And Plants. Plos Pathog. 7, E1002206.
- 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*, 9 (4),
- Bever, R. A., And Iglewski, B. H. (1988) J. Bacteriol. 170,4309-4314.
- Blocker, A., Komoriya, K. & Aizawa, S. (2003). Type III Secretion Systems And Bacterial Flagella: Insights Into Their Function From Structural Similarities. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 3027-3030.
- Bucior I, Pielage JF, Engel JN. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Pili And Flagella Mediate Distinct Binding And Signaling Events At The Apical And Basolateral Surface Of Airway Epithelium. Plos Pathogens, 8(4), E1002616.
- 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.

- Bonomo RA, Szabo D. Mechanisms Of Multidrug Resistance In Acinetobacter Species And *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis 2006; 43 (Suppl 2) : S49-56. [[Google Scholar](#)]
- Bock B., (2011). Base De Données Nomenclaturale De La Flore De France, Version 4.02. Tela Botanica, Montpellier (France)
- Bordas, F., P. Lafrance, And R. Villemur. 2005. Conditions For Effective Removal Of Pyrene From An Artificially Contaminated Soil Using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ Rhamnolipids. Environ. Pollut. 38:69-76. [PubMed] [Google Scholar]
- Bradshaw D.J. (1997). Effect Of Conditioning Films On Oral Microbial Biofilm Development. Biofouling. 11(3): P. 217-226.
- Brencic A, Mcfarland KA, Mcmanus HR Et Al. 2009. The Gacs/Gaca Signal Transduction System Of *Pseudomonas aeruginosa* Acts Exclusively Through Its Control Over The Transcription Of The RsmY And RsmZ Regulatory Small RNAs. Molecular Microbiology, 73(3), 434-445.
- Chaker H. 2012. Régulation De L'adaptation De La Bactérie *Pseudomonas aeruginosa* A Son Hôte: Implication Des Métabolites Du Tryptophane. Thèse De Doctorat, Université Grenoblefrance, 291 P.
- Chen, G., And H. Zhu. 2005. Lux-Marked *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide Production In The Presence Of Rhamnolipid. Colloids Surf. B 41:43-48. [PubMed] [[Google Scholar](#)]
- Characklis WG. 1973. Water Res.,7:1249-1258).
- Cryz SJ, Pitt TL, Furer E, Germanier R. Role Of Lipopolysaccharide In Virulence Of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 1984 ; 44 : 508-13.
- Clifton, I. J., & Peckham, D. G. (2010). Defining Routes Of Airborne Transmission Of *Pseudomonas aeruginosa* In People With Cystic Fibrosis. Expert Review Of Respiratory Medicine, 4(4), 519-529. Doi : 10.1586/Ers.10.42
- Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, Wong GCL, Parsek MR. 2011. The Pel Polysaccharide Can Serve A Structural And Protective Role In The Biofilm Matrix Of *Pseudomonas aeruginosa*. Plos Pathog 7:E1001264.
- Conrad, J.C., Physics Of Bacterial Near-Surface Motility Using Flagella And Type IV Pili: Implications For Biofilm Formation. Research In Microbiology, 2012. 163(9-10): P. 619-629.
- Costerton Et Coll. 1973. How Bacteria Stick. Sci.Am.,238:86-95).

- Costerton, J W, Lewandowski, Z, Caldwell, D E, Korber, D R, &Lappin-Scott, H M. 1995. Microbial Biofilms. Annual Review Of Microbiology, 49(1), 711–745.
- Costerton, J W, Cheng, K J, Geesey, G G, Ladd, T I, Nickel, J C, Dasgupta, M, &Marrie, T J. 1987. Bacterial Biofilms In Nature And Disease. Annual Review Of Microbiology, 41(1), 435–464.
- Croft, L., Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Huang, B., Blakeley, R.L., And Mattick, J.S. (2000). An Interactive Web-Based *Pseudomonas aeruginosa* Genome Database: Discovery Of New Genes, Pathways And Structures. Microbiology (Reading, Engl.) 146 (Pt 10), 2351–2364.
- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C. &Toussaint, B. (1999). Cell Death Of Human Polymorphonuclear Neutrophils Induced By A *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolate Requires A Functional Type III Secretion System. Infect Immun 67, 6164-6167.
- Dasgupta T, De Kievit TR, Masoud H, Altman E, Richards JC, Sadovskaya I, Et Al. Characterization Of Lipopolysaccharide-Deficient Mutants Of *Pseudomonas aeruginosa* Derived From Serotypes O3, O5, And O6. Infect Immun 1994 ; 62 : 809-17
- Denis F., M-C Poly., C Martin., E Bingen., Rquentin.2007.Bactériologie Médicale, Techniques Usuelles .Masson, Cedex. P333-335.
- Deziel, E., F. Lepine, S. Milot, And R. Villemur. 2003. Rhla Is Required For The Production Of A Novel Biosurfactant Promoting Swarming Motility In *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-Hydroxyalkanoxyloxy)Alkanoic Acids (Haas), The Precursors Of Rhamnolipids. Microbiology 149:2005-2013. [[Pubmed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Duong, F., Bonnet, E., Géli, V., Lazdunski, A., Murgier, M., And Filloux, A. (2001). The Aprx Protein Of Pseudomonas Aeruginosa: A New Substrate For The Apr Type I Secretion System. Gene 262, 147–153.
- Dubois V, Arpin C, Melon M, Et Al. Nosocomial Outbreak Due To A Multiresistant Strain Of Pseudomonas Aeruginosa P12: Efficacy Of Cefepime-Amikacin Therapy And Analysis Of Beta-Lactam Resistance. J Clinmicrobiol 2001; 39 : 2072-8. [[Google Scholar](#)]
- Donlan RM. (2002) Biofilms: Microbial Life On Surface. Emerg. Infect. Dis. 8 (9), 881890.
- Donlan, R.M. And J.W. Costerton, Biofilms: Survival Mechanisms Of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews, 2002. 15(2): P. 167-193.
- Douar Latreche, Sabrina (2012),Huiles Essentielles ; Extraits ; Thymus Pallescens ; Chenopodium Ambrosiodes ; *Ammi Visnaga* ; Activite Antioxydante.

- Edwards, J., And J. A. Hayashi. 1965. Structure Of A Rhamnolipid From *Pseudomonas aeruginosa*. Arch. Biochem. Biophys. 111:415-421. [[Pubmed](#)] [[Google Scholar](#)]
- 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.
- Farinha, M. A., Conway, B. D., Glasier, L. M., Ellert, N. W., Sherburne, R., Irvin, R. T. , Sherburne, R. &Paranchych, W. (1994). Alteration Of The Pilin Adhesin Of *Pseudomonas aeruginosa* PAO Results In Normal Pilus Biogenesis But A Loss Of Adherence To Human Pneumocyte Cells And Decreased Virulence In Mice. Infect Immun 62, 4118–4123.
- Finck-Barbançon, V., Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J.P., Fleiszig, S.M., Wu, C., Mende-Mueller, L., And Frank, D.W. (1997). Exou Expression By *Pseudomonas aeruginosa* Correlates With Acute Cytotoxicity And Epithelial Injury. Mol. Microbiol. 25, 547–557.
- Fukushima, J., Yamamoto, S.,Moriyama, K., Atsumi, Y . ,Takeu- Chi, H., Kawamoto, S.,And Okuda, K. (1989)J. Bacteriol. 171,1698-1704
- Flamm RK, Weaver MK, Thornsberry C, Et Al. Factors Associated With Relative Rates Of Antibiotic Resistance In *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Tested In Clinical Laboratories In The United States From 1999 To 2002. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48 : 2431-6. [[Google Scholar](#)]
- Filloux A. &Vallet I.; 2003; Biofilm: Set-Up And Organization Of A Bacterial Community.Med Sci (Paris). 19(1): 77–83
- Flemming, H.C. And J. Wingender, The Biofilm Matrix. Nature Reviews Microbiology, 2010. 8(9): P. 623-633.
- Fletcher M (1988) Attachment Of *Pseudomonas Fluorescens* To Glass And Influence Of Electrolytes On Bacterium- Substratum Separation Distance. J. Bacteriol., 170: 2027-2030
- Friedman L, Kolter R. 2004. Two Genetic Loci Produce Distinct Carbohydrate-Rich Structural Components Of The *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. J Bacteriol 186:4457–4465.
- Françoise Couic-Marinier View In Scopus(Docteur En Pharmacie) 201 Bis Avenue Du Général-Leclerc, 54000 Nancy, France
- Gambello, M.J. &Iglewski, B.H.; 1991; Cloning And Characterization Of The *Pseudomonas aeruginosa* Lasr Gene, A Transcriptional Activator Of Elastase Expression. J Bacteriol. 173(9): 3000-3009

-Gattefossé Jean. L'Ammi Visnaga Et La Khelline . In: Revue Internationale De Botanique Appliquée Et D'agriculture Tropicale, 32^e Année, Bulletin N°353-354, Mars-Avril 1952. Pp. 116-123.

-Ghoneim, K., Mohammad, A. A., Al-Daly, A. G., Amer, M. S., Khadrawy, F., & Mahmoud, M. A. (2014). Metabolic Responsiveness Of Desert Locust *Schistocerca Gregaria* (Forsk)(Orthoptera: Acrididae) To The Khella Plant *Ammi Visnaga* L.(Apiaceae) Extracts. *Int. J. Adv. Life Sci*, 7(2), 204-216

-Goma, G., A. Pareilleux, And G. Durand. 1973. Specific Hydrocarbon Solubilization During Growth Of *Candida Lipolytica*. *J. Ferment. Technol.* 51:616-618. [[Google Scholar](#)]

-Gray, G. L., Smith, D. H., Baldrige, J. S., Harkins, R. N., Vasil, M. L., Chen, E. Y. & Heyneker, H. L. (1984). Cloning, Nucleotide Sequence, And Expression In *Escherichia Coli* Of The Exotoxin A Structural Gene Of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 2645-2649.

-Green, S. K., Schroth, M. N., Cho, J. J., Kominos, S. K. & Vitanza-Jack, V. B. (1974).

Agricultural Plants And Soil As A Reservoir For *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 28, 987-991.

-George AM, Jones PM, Middleton PG. Cystic Fibrosis Infections: Treatment Strategies And Prospects. *FEMS Microbiollett* 2009; 300 : 153-64. [[Google Scholar](#)]

-GUZZO J., PAGES JM., DUONG F., LAZDUNSKI A., MURGIER M. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* Al Kaline Protease : Evidence For Secretion Genes And Study Of Secretion Mechanism. *J Bacteriol* ; 173 : 5290-7.

-Hahn HP. The Type-4 Pilus Is The Major Virulence-Associated Adhesin Of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 1997 ; 192 : 99-108.

-Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. 2010. An Update On *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation, Tolerance, And Dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59:253–268.

-Hauser, G., And M. L. Karnovsky. 1957. Rhamnose And Rhamnolipid Biosynthesis By *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 224:91-105. [[Pubmed](#)] [[Google Scholar](#)]

-Häussler, S., Ziegler, I., Löttel, A., Von Götz, F., Rohde, M., Wehmhöner, D., Saravanamuthu, S., Tümmler, B., And Steinmetz, I. (2003). Highly Adherent Small-Colony Variants Of *Pseudomonas aeruginosa* In Cystic Fibrosis Lung Infection. *J. Med. Microbiol.* 52, 295–301.

- Hatch, R.A., And Schiller, N.L. (1998). Alginate Lyase Promotes Diffusion Of Aminoglycosides Through The Extracellular Polysaccharide Of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 974–977.
- He, J., Baldini, R.L., Déziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H.M., And Rahme, L.G. (2004). The Broad Host Range Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA14 Carries Two Pathogenicity Islands Harboring Plant And Animal Virulence Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2530–2535..
- Heck, L. W., Morihara, K., And Abrahamson, D. (1986) *Infect.Immun.* 54, 149-153.
- Heck, L. W., Morihara, K., Abrahamson, D. R., Degradation Of Soluble Laminin And Depletion Of Tissue-Associated Basement Membrane Laminin By *Pseudomonas aeruginosa* Elastase And Alkaline Protease. *Infection And Immunity* 1986 ; 54, (1), 149- 53
- Heck, L. W., Morihara, K., Mcrae, W. B., And Miller, E. J. (1986) *Infect. Immun.* 51, 115-118
- Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, Parsek MR. 2001. Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure And Function. *J Bacteriol* 183:5395–5401.
- Herz,J., Kowal,R.C., Goldstein,J.L., And Brown,M.S. (1990) Proteolytic Processing Of The 600 Kd Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP) Occurs In A Transgolgi Compartment *EMBO J.* 9: 1769-1776.
- Heukelekian H,Heller A. 1940. *J. Bacteriol.*,40:547-558)
- Hobbs M., Collie Es., Free Pd., Livingston Sp., Mattick Js.1993.Pils And Pilr, A Two Component Transcriptional Regulatory System Controlling Expression Of Type 4 Fimbriae In *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*; 7 : 669-82.
- Holder, I. A. (1984) *Can. J. Microbiol.*30,1118-1124.
- Hogardt, M. &Heesemann, J. (2010). Adaptation Of *Pseudomonas aeruginosa* During Persistence In The Cystic Fibrosis Lung. *Int J Med Microbiol* 300, 557-562.
- Holder, I. A. ; Wheeler, R., Experimental Studies Of The Pathogenesis Of Infections Owing To *Pseudomonas aeruginosa* : Elastase, An Igg Protease. *Can J Microbiol* 1984 ; 30, (9), 1118-24.
- Holland, I. B., Schmitt, L. &Young, J. (2005). Type 1 Protein Secretion In Bacteria, The ABCTransporter Dependent Pathway. *Mol Membr Biol* 22, 29–39.
- Hurlow, J. Et P.G. Bowler. « Clinical Experience With Wound Biofilm And Management : A Case Series », *Ostomy/Wound Management*, Vol. 55, N° 4, Avril 2009, P. 38-49

- Iglewski, B. H. & Kabat, D. (1975). NAD-Dependent Inhibition Of Protein Synthesis By *Pseudomonas Aeruginosa* Toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2284-2288.
- Imamura, Y., Yanagihara, K., Tomono, K., Ohno, H., Higashiyama, Y., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mizuta, Y., Kadota, J., Tsukamoto, K., Kohno, S.; 2005; Role Of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Systems In A Mouse Model Of Chronic Respiratory Infection. *J Med Microbiol.* 54(6): 515-518
- Irie Y, Starkey M, Edwards AN, Wozniak DJ, Romeo T, Parsek MR. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix Polysaccharide Psl Is Regulated Transcriptionally By Rpos And Posttranscriptionally By Rsma. *Molecular Microbiology*, 78(1), 158–172.
- Jakubovics NS, Shields RC, Rajarajan N, Burgess JG. 2013. Life After Death: The Critical Role Of Extracellular DNA In Microbial Biofilms. *Lett Appl Microbiol* 57:467–475.
- Jarvis, F. G., And M. J. Johnson. 1949. A Glycolipid Produced By *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 71:4124-4126. [[Google Scholar](#)]
- Jennings LK, Storek KM, Ledvina HE, Coulon C, Marmont LS, Sadovskaya I, Secor PR, Tseng BS, Scian M, Filloux A, Wozniak DJ, Howell PL, Parsek MR. 2015. Pel Is A Cationic Exopolysaccharide That Cross-Links Extracellular DNA In The *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *Proc Natl Acad Sci* 112:11353–11358.
- Johnson JK, Smith G, Lee MS, Et Al. The Role Of Patient-To-Patient Transmission In The Acquisition Of Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Colonization In The Intensive Care Unit. *J Infect Dis* 2009; 200 : 900-5. [[Google Scholar](#)]
- Jones Et Coll.1969.*J.Bacteriol.*,99 :316-325
- Jones ME, Draghi DC, Thornsberry C, Et Al. Emerging Resistance Among Bacterial Pathogens In The Intensive Care Unit: A European And North American Surveillance Study (2000-2002). *Ann Clinmicrobiolantimicrob* 2004; 3 : 14. [[Google Scholar](#)]
- Juhas, M., Eberl, L., Tümmler, B.; 2005; Quorum Sensing: The Power Of Cooperation In The World Of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol.* 7(4): 459-471
- K. N Soro · L. Sabri · S. Amalich · Y. Khabbal · T. Zair. Article pp.168-175 du Vol.13 n°3 (2015).10.1007/s10298-015-0936-4
- Kamal, Fatima Z., Gabriela D. Stanciu, Radu Lefter, Valeriu V. Cotea, Marius Niculaua, Daniela C. Ababei, Alin Ciobica, And Abdellah Ech-Chahad. 2022. "Chemical Composition And Antioxidant Activity Of *Ammi Visnaga* L. Essential Oil" *Antioxidants* 11, No. 2: 347

- Kayser, F. H., Bienz, K. A., Eckert, J., & Zingernagel, R. M. (Eds.). (2001). *Medical Microbiology* (10th Ed.). Stuttgart, Germany : Georg Thiemeverlag.
- Khalfallah, M., Et Al. (2011) Denture Foreign Bodies Impacted In The Thoracic Esophagus. A Systematic Review. *Revista Portuguesa De Cirurgia*, 16, 13-19
- Khalil, N., Bishr, M., Desouky, S., & Salama, O. (2020). *Ammi Visnaga L.*, A Potential Medicinal Plant: A Review. *Molecules*, 25(2), 301.
- Khalil, R., Mansour, A. E., Fadda, W. A., Almisnid, K., Aldamegh, M., Al-Nafeesah, A., & Al-Wutayd, O. (2020). The Sudden Transition To Synchronized Online Learning During The COVID-19 Pandemic In Saudi Arabia: A Qualitative Study Exploring Medical Students' Perspectives. *BMC Medical Education*, 20(1), 1–10.
- Khan, Z.A., Assiri, A.M., Al-Afghani, H.M. Et Al. Inhibition Of Oxalate Nephrolithiasis With *Ammi Visnaga* (Al-Khillah). *Int Urol Nephrol* 33, 605–608 (2001).
- 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.
- Khare, A. (2014) 'Antecedents To Green Buying Behaviour: A Study On Consumers In An Emerging Economy', *Marketing Intelligence & Planning*, 33(3), Pp. 309–329. Doi: 10.1108/Mip-05-2014-0083.
- Kipnis, E., Sawa, T., And Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting Mechanisms Of *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenesis. *Med Mal Infect* 36, 78–91.
- Lam MY, McGroarty EJ, Kropinski AM, Macdonald LA, Pedersen SS, Hoiby N, Et Al. Occurrence Of A Common Lipopolysaccharide Antigen In Standard And Clinical Strains Of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clinmicrobiol* 1989 ; 27 : 962-7.
- Lambiase A, Raia V, Del Pezzo M, Et Al. Microbiology Of Airway Disease In A Cohort Of Patients With Cystic Fibrosis. *BMC Infect Dis* 2006; 6 : 4. [\[Google Scholar\]](#)
- Lamendin H, Mazri MR, Remache S, Bencheikh-Lafgoun A. Plantes Médicinales Bucco-Dentaires, Aujourd'hui (Enquête En Constantinois, Algérie). *Chir Dent Fr* 2002.
- Lau, G.W. DJ., Hassett, R.H., Kong, F. (2004). Le Rôle De La Pyocyanine Dans 'Infection Par *Pseudomonas aeruginosa*, 10 (12), 599-606.

- Lang AB, Horn MP, Imboden MA, Zuercher AW. Prophylaxis And Therapy Of *Pseudomonas aeruginosa* Infection In Cystic Fibrosis And Immunocompromised Patients. *Vaccine* 2004 ; 22 : S44-8.
- Lang, S., And D. Wullbrandt. 1999. Rhamnolipids—Biosynthesis, Microbial Production And Application Potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:22-32. [[Pubmed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Lazdunski. : Les Facteurs De Virulence De *Pseudomonas aeruginosa* Et Leur Régulation. *Méd Mal Infect* 1998 ; 28 : 109-18.
- 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., Et Al. (2006). Genomic Analysis Reveals That *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence Is Combinatorial. *Genome Biol.* 7, R90.
- Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. 2015. Bacterial Extracellular Polysaccharides In Biofilm Formation And Function. *Microbiol Spectr* 3.
- Liu, P. V. (1974). Extracellular Toxins Of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal Of Infectious Diseases*, 130 Suppl(0), S94-9.
- Liu Y., Tay J.-H (2002). The Essential Role Of Hydrodynamic Shear Force In The Formation Of Biofilm And Granular Sludge. *Water Research*, Vol. 36, P. 1653-1665.
- Livermore DM. Multiple Mechanisms Of Antimicrobial Resistance In *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? *Clin Infect Dis* 2002; 34 : 634-40. [[Google Scholar](#)]
- Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, Et Al. Antimicrobial Resistance Among Gram-Negative Bacilli Causing Infections In Intensive Care Unit Patients In The United States Between 1993 And 2004. *J Clinmicrobiol* 2007; 45 : 3352-9. [[Google Scholar](#)]
- Lolans K, Queenan AM, Bush K, Et Al. First Nosocomial Outbreak Of *Pseudomonas aeruginosa* Producing An Integron-Borne Metallo-Beta-Lactamase (VIM-2) In The United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49 : 3538-40. [[Google Scholar](#)]
- Lucienne,D,2007- Les Plantes Médicinales d'Algérie .Ed Berti,Alger
- Maier, R. M., And G. Soberon-Chavez. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* Rhamnolipids: Biosynthesis And Potential Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:625-633. [[Pubmed](#)] [[Google Scholar](#)]
- Martinez LR, Casadevall A (2007). Cryptococcus Neoformans Biofilm Formation Depends On Surface Support And Carbone Source And Reduces Fungal Cells Susceptibility To Heat, Cold And UV Light. *Appl. Environ. Microbiol.* 4592- 4601.

- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate Specificities Of Mexab-Oprn, Mexcd-Oprj, And Mexxy-Oprn Efflux Pumps In *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2000 Dec;44(12):3322-7.
- Mattick, J. S. (2002). Type IV Pili And Twitching Motility. Annu Rev Microbiol 56, 289-314.
- Ma, Q., Zhai, Y., Schneider, J. C., Ramseier, T. M. & Saier, M. H. Jr. (2003). Protein Secretion Systems Of *Pseudomonas aeruginosa* And *P. Fluorescens*. Biochim Biophys Acta 1611, 223-233.
- Mcdougald D, Rice SA, Barraud N, Steinberg PD, Kjelleberg S. Should We Stay Or Should We Go: Mechanisms And Ecological Consequences For Biofilm Dispersal. Nat. Rev. Microbiol. 2012;10(1):39–50.
- Mcgowan JE, Jr. Resistance In Nonfermenting Gram-Negative Bacteria: Multidrug Resistance To The Maximum. Am J Infect Control. 2006 Jun;34 (5 Suppl 1):S29-37; Discussion S64-73.
- Mena, K. D., & Gerba, C. P. (2009). Risk Assessment Of *Pseudomonas aeruginosa* In Water. Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology, 201, 71-115. Doi : 10.1007/978-1-4419-0032-6_3.
- Meyer, J. M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C. & Holder, I. A. (1996). Pyoverdine Is Essential For Virulence Of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 64, 518–523.
- Mérensa A, Delacoura H, Plésiat P, Cavallo J.D, Jeannot K. *Pseudomonas aeruginosa* Et Résistance Aux Antibiotiques. Revue Francophone Des Laboratoires 2011(435):49-62.
- Mishra, M., Byrd, M.S., Sergeant, S., Azad, A.K., Parsek, M.R., Mcphail, L., Schlesinger, L.S., And Wozniak, D.J. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Psl Polysaccharide Reduces Neutrophil Phagocytosis And The Oxidative Response By Limiting Complement-Mediated Opsonization. Cell. Microbiol. 14, 95106 .
- Miyazaki, S., Matsumoto, T., Tateda, K., Ohno, A. & Yamaguchi, K. (1995). Role Of Exotoxin A In Inducing Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infections In Mice. J Med Microbiol 43, 169–175.
- Moriyama, K., Tsuzuki, H., Harada, M., And Iwata, T. (1984) J. Biochem. 95, 795-804
- Moriyama, K., Tsuzuki, H., Oka, T., Inoue, H., And Ebata, M. (1965) J. Biol. Chem. 240, 3295-3304
- Moradali M.F., Ghods S., Rehm B.H. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm For Adaptation, Survival, And Persistence. Front. Cell Infect. Microbiol. 2017;7:39. Doi: 10.3389/fcimb.2017.00039. [[PMC Free Article](#)] [[Pubmed](#)] [[Crossref](#)] [[Google Scholar](#)]

- 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.
- Liu, P. V. (1974). Extracellular Toxins Of *Pseudomonas aeruginosa*. The Journal Of Infectious Diseases, 130 Suppl(0), S94-9.
- Obritsch MD, Fish DN, Maclaren R, Jung R. National Surveillance Of Antimicrobial Resistance In *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained From Intensive Care Unit Patients From 1993 To 2002. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48 : 4606-10. [[Google Scholar](#)]
- Ochsner, U.A. &Reiser, J.; 1995; Autoinducer-Mediated Regulation Of Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis In *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA. 92(14): 6424-6428
- O'Toole, G.A. And R. Kolter, Flagellar And Twitching Motility Are Necessary For *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development. Molecular Microbiology, 1998. 30(2): P. 295-304.
- O'Toole G.A., Gibbs K.A., Hager P.W., Phibbs P.V. Jr, Kolter R. (2000) The Global Carbon Metabolism Regulator Crc Is A Component Of A Signal Transduction Pathway Required For Biofilm Development By *Pseudomonas aeruginosa*. Journal Of Bacteriology, 182:425–31.
- Pang Z., Raudonis R., Glick B.R., Lin T.J., Cheng Z. Antibiotic Resistance In *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms And Alternative Therapeutic Strategies. Biotechnol. Adv. 2019;37:177–192. Doi: 10.1016/J.Biotechadv.2018.11.013. [[Pubmed](#)] [[Crossref](#)] [[Google Scholar](#)]
- Parkins MD, Ceri H, Storey DG. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* Gaca, A Factor In Multihost Virulence, Is Also Essential For Biofilm Formation, Molecular Microbiology, 40(5), 1215-1226.
- Palmer J., Flint S., Brooks J (2007). Bacterial Cell Attachment, The Beginning Of A Biofilm. Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology, Vol. 34, P. 577-588.
- Pavlovskis, O. R., Iglewski B. H. &Pollack, M. (1978). Mechanism Of Action Of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A In Experimental Mouse Infections: Adenosine Diphosphate Ribosylation Of Elongation Factor 2. Infect Immun 19, 29–33.
- Pearson, J.P., Van Delden, C., Iglewski, B.H.; 1999; Active Efflux And Diffusion Are Involved In Transports Of *Pseudomonas aeruginosa* Cell-To-Cell Signals. J Bacterial. 181(4): 1203-1210
- Percival, S. Et P. Bowler. « Understanding The Effects Of Bacterial Communities And Biofilms On Wound Healing », World Wide Wounds, Juil. 2004.

- Phillips, P.L., R.D. Wolcott, J. Fletcher Et G.S. Schultz. « Biofilms Made Easy », Wounds International, Vol. 1, N° 3, 25 Mai 2010. [En Ligne : [Www.Woundsinternational.Com](http://www.Woundsinternational.Com)]
- Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P.; 1994; Structure Of The Autoinducer Required For Expression Of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Genes. Proc Natl Acad Sci USA. 91(1):197-201
- Pier GB. Promises And Pitfalls Of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide As a Vaccine Antigen. Carbohydr Res 2003 ; 338 : 2549-56.
- Pierre, M., Husson, M. O., Le Berre, R., Desseyn, J. L., Galabert, C., Béghin, L., Beermann, C., Dagenais, A., Berthiaume, Y., Cardinaud, B., Barbry, P., Gottrand, F. &Guery, B. P. (2007). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Improve Host Response In Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection In Mice. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 292, L1422-1431.
- Poole K. Efflux-Mediated Multiresistance In Gram-Negative Bacteria. Clinmicrobiol Infect. 2004 Jan;10(1):12-26
- Prigent-Combaret, C., Et Al., Abiotic Surface Sensing And Biofilm-Dependent Regulation Of Gene Expression In Escherichia Coli. Journal Of Bacteriology, 1999. 181(19): P. 5993-6002.
- Proal, A. « Interview With Dr. Randall Wolcott, Bacterial Biofilm Wound Specialist », Bacteriality, 13 Avril 2008. [En Ligne : [Http://Bacteriality.Com/2008/04/13/ Wolcott/](http://Bacteriality.Com/2008/04/13/Wolcott/)]La Formation De Biofilm.
- Ratledge C. Et Dover L.G. Iron Metabolism In Pathogenic Bacteria. Annu Rev Microbiol2000 ; 54: 881-941.
- Reading NC, Sperandio V (2006) Quorum Sensing: The Many Languages Of Bacteria. FEMS Microbiol Lett 254:1–11
- Reimann C, Beyeler M, Latifi A Et Al. 1997. The Global Activator Gaca Of *Pseudomonas aeruginosa* PAO Positively Controls The Production Of The Autoinducer N-Butyryl-Homoserine Lactone And The Formation Of The Virulence Factors Pyocyanin, Cyanide, And Lipase. Molecular Microbiology, 24(2), 309–319.
- Rocchetta, H.L., Burrows, L.L. &Lam, J.S. (1999) Genetics Of O-Antigen Biosynthesis In *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiolmolbiol Rev 63(3), 523-53 .
- Rodrigue A, Quentin Y, Lazdunski A, Méjean V, Foglino M. 2000. Two-Component Systems In *Pseudomonas aeruginosa*: Why So Many?. Trends In Microbiology, 8(11), 498–504

- Römling, U., Schmidt, K.D., And Tümmler, B. (1997). Large Chromosomal Inversions Occur In *Pseudomonas aeruginosa* Clone C Strains Isolated From Cystic Fibrosis Patients. FEMS Microbiol. Lett. 150, 149–156.
- Romling U., Balsalobre C. Biofilm Infections, Their Resilience To Therapy And Innovative Treatment Strategies. J. Intern. Med. 2012;272:541–561. Doi: 10.1111/Joim.12004. [[Pubmed](#)] [[Crossref](#)] [[Google Scholar](#)]
- Rüdiger, H., Siebert, H. C., Solís, D., Jiménez-Barbero, J., Romero, A., Von Der Lieth, C. W., Diaz-Mariño, T., And Gabius, H. J. (2000) Medicinal Chemistry Based On The Sugar Code. Fundamentals Of Lectinology And Experimental Strategies With Lectins As Targets. Curr. Med. Chem. 7, 389–416
- Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-Host Interactions In *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. Am J Respircrit Care Med 2005; 171 : 1209-23. [[Google Scholar](#)]
- Satrani B, Farah A, Fechtal M, Et Al. (2004) Composition Chi-Mique Et Activité Antibactérienne De L’huile Essentielle d’*Ammi Visnaga*(L.) Lam. Du Maroc. Act Bot Gallica 151: 65–71
- Sauer, K., Et Al., *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes During Development As A Biofilm. J.Bacteriol., 2002. 184(4): P. 1140-1154 .
- Sen C.K., Gordillo G.M., Roy S., Kirsner R., Lambert L., Hunt T.K., Gottrup F., Gurtner G.C., Longaker M.T. Human Skin Wounds: A Major And Snowballing Threat To Public Health And The Economy. Wound Repair Regen. 2009;17:763–771. Doi: 10.1111/J.1524-475X.2009.00543.X. [[PMC Free Article](#)] [[Pubmed](#)] [[Crossref](#)] [[Google Scholar](#)]
- Seed, P.C., Passador, L., Iglewski, B.H.; 1995; Activation Of The *Pseudomonas Aeruginosa* Lasi Gene By Lasr And The *Pseudomonas* Autoinducer PAI: An Autoinduction Regulatory Hierarchy. J Bacteriol. 177(3): 654-659
- Sharon, N., And Lis, H. (1990) Legume Lectins. A Large Family Of Homologous Proteins. FASEB J. 4, 3198–3208
- Sharon, N., And Lis, H. (1995) Lectins. Proteins With A Sweet Tooth. Functions In Cell Recognition. Essays Biochem. 30, 59–75
- 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.

- Sheng, G.-P., H.-Q. Yu, And X.-Y. Li, Extracellular Polymeric Substances (EPS) Of Microbial Aggregates In Biological Wastewater Treatment Systems: A Review. *Biotechnology Advances*, 2010. 28(6): P. 882-894.
- Schultz, D. R., And Miller, K. D. (1974)*Infect. Immun.* 10, 128-135.
- Schultz, M. J., Speelman, P., Zaat, S. A., Hack, C. E., Van Deventer, S. J. & Van Der Poll, T. (2000). The Effect Of *Pseudomonas* Exotoxin A On Cytokine Production In Whole Blood Exposed To *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29, 227–232.
- Schultz, M. J., Rijneveld, A. W., Florquin, S., Speelman, P., Van Deventer, S. J. & Van Der Poll, T. (2001). Impairment Of Host Defence By Exotoxin A In *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia In Mice. *J Med Microbiol* 50, 822–827.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B., And Jackson, R.W. (2011). *Pseudomonas* Genomes: Diverse And Adaptable. *FEMS Microbiology Reviews* 35, 652–680.
- Smith, R.S. & Iglewski, B.H.; 2003; *P. aeruginosa* Quorum-Sensing Systems And Virulence. *Curr Opin Microbiol.* 6(1): 56-60
- Spencer, D.H., Kas, A., Smith, E.E., Raymond, C.K., Sims, E.H., Hastings, M., Burns, J.L., Kaul, R., And Olson, M.V. (2003). Whole-Genome Sequence Variation Among Multiple Isolates Of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185, 1316–1325.
- Spormann AM (2008). Physiology Of Microbes In Biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*, 322: 17- 36.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., And Wong, G.K.S. (2000) Complete Genome Sequence Of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, An Opportunistic Pathogen *Nature* 406: 959-964.
- Stover, G. B., Drake, D. R., & Montie, T. C. (1983). Virulence Of Different *Pseudomonas* Species In A Burned Mouse Model : Tissue Colonization By *Pseudomonas* Cepacia. *Infection And Immunity*, 41(3), 1099-1104.
- Stoodley, P., K. Sauer, Et Al. (200). “Biofilms As Complex Differentiated Communities.” *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209

-Stoodley, P., Et Al., Biofilms As Complex Differentiated Communities. Annual Review Of Microbiology, 2002. 56: P. 187-209.

-Tolker-Nielsen, T. And S. Molin, Spatial Organization Of Microbial Biofilm Communities. Microbial Ecology, 2000. 40(2): P. 75-84.

-Trosko JE (2016) Evolution Of Microbial Quorum Sensing To Human Global Quorum Sensing: An Insight Into How Gap Junctional Intercellular Communication Might Be Linked To The Global Metabolic Disease Crisis. Biology (Basel) 5:29. Doi: 10.3390/Biology5020029

-Uropean Antimicrobial Resistance Surveillance System-EARSS Annual Report 2008.

-Vallet I., Olson J.W., Lory S., Lazdunski A. Et Filloux A. : The Chaperone/Usher Pathways Of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification Of Fimbrial Gene Clusters (Cup) And Their Involvement In Biofilm Formation. Proc Natl Acad Sci USA 2001 ; 98(12) : 6911–6.

-Vogel A., (2013). Encyclopédie Des Plantes. L'univers Des Plantes Médicinales; Act As Potent Inhibitors Of Phorbol Ester-Induced Nitric Oxide Generation In Rat Hepatocytes Independent Of Their Antioxidant Properties. Cancer Lett. 2000, 153 (1- 2)

- Wall D. Et Kaiser D. : Type IV Pili And Cell Motility. Mol Microbiol 1999 ; 32:1-10.

-Watnick P.I., Kolter R. (1999) Steps In The Development Of A *Vibrio Cholerae*

El Tor Biofilm. Molecular Biology. 34(3):586–95.

-World Health Organization . Prioritization Of Pathogens To Guide Discovery, Research And Development Of New Antibiotics For Drug-Resistant Bacterial Infections, Including Tuberculosis. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2017. [[Google Scholar](#)]

-Xu GM (2016) Relationships Between The Regulatory Systems Of Quorum Sensing And Multidrug Resistance. Front Microbiol 7:958

-Yahr, T. L., Goranson, J. & Frank, D. W. (1996). Exoenzyme S Of *Pseudomonas aeruginosa* Is Secreted By A Type III Pathway. Mol Microbiol 22, 991–1003.

-Young, L. S. (1980) J. Infect. Dis. 142,626-630

-Zulfaqar A. Khan, Department Of Biochemistry, Faculty Of Medicine And Medical Sciences, Umm Al-Qura University, P.O. Box 12475, Makkah, Saudi Arabia

-ZUCKERT WR., MARQUIS H., GOLDFINE H. 1998. Modulation Of Enzymatic Activity And Biological Function Of *Listeria monocytogenes* Broad-Range Phospholipase C By Aminoacid Substitutions And By Replacement With The *Bacillus cereus* ortholog. Infect Immun; 66 : 4823-

31. Stonehouse Mj., Cota-Gomez A., Parker Sk., Martin We., Hankin JA., Murphy Rc. 2002. A Novel Class Of Microbial Phosphocholine Specific Phospholipases C. Mol Microbiol; 46 : 661-76.

-Zobell CE. 1943. J. Bacteriol., 46:39-56

Sites Web

[-https://onlinelibrary.wiley.com/action/dosearch?contribauthorraw=Gambello%2C+M+J](https://onlinelibrary.wiley.com/action/dosearch?contribauthorraw=Gambello%2C+M+J)

[-https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jb.88.3.745-757.1964#con](https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jb.88.3.745-757.1964#con)

[-http://www.rivm.nl/earss/images/earss%202008_final_tcm61-65020.pdf](http://www.rivm.nl/earss/images/earss%202008_final_tcm61-65020.pdf) . [\[Google Scholar\]](#)

Annexe

Annexe

Les étapes de coloration de Gram

- Réaliser un frottis ou un étalement : A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, on dépose une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.
- Ensuite on prélève une colonie bien isolée avec la pipette Pasteur boutonnée et dissociée dans la goutte puis étaler sur la lame .
- Fixer la préparation à la flamme, sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.
- Puis on recouvre totalement la lame de violet de gentiane pendant 1 min.
- Rincer à l'eau en transvasant les lames.
- On recouvre le frottis par le Lugol pendant 2 min.
- Laver à nouveau à l'eau
- Puis on ajoute l'alcool jusqu'à la disparition de la couleur violette pendant une dizaine de secondes et on lave rapidement à l'eau.
- Puis on colore à nouveau avec la solution de fuchsine diluée pendant 1 min.
- On Lave à l'eau et sécher à l'air.
- A la fin on observe à l'objectif X100, à l'aide d'huile d'immersion.

La galerie API

Mode Opératoire

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0,85 % Medium (2 ml)
- A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever 1 à 4 colonies de morphologie identique. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).

- Réaliser une suspension égale à 0,5 de McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

Inoculation et l'incubation de la galerie

- Remplir les tubes des tests NO₃ à PNPG avec la suspension précédente en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Remplir tubes et cupules des tests GLU à PAC en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave. Des cupules incomplètement remplies ou trop remplies peuvent entraîner des résultats incorrects.
- Remplir d'huile de paraffine les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) pour former un ménisque convexe.
- Refermer la boîte d'incubation et incuber à 29°C ± 2°C pendant 24 heures (± 2 heures).

Tableau de lecture d'API 20NE

| tests | Composants actifs | QTE (mg/cup.) | REACTIONS/ENZYMES | Resultat | |
|-------|---|------------------|--|--|------------------------------|
| | | | | Positif | negatif |
| NO3 | potassium nitrate | 0,136 | Reduction des nitrates en nitrites | <u>NIT 1+NIT 2/5 min</u> Incolore rose-rouge | |
| | | | Reduction des nitrates en azote | <u>Zn / 5 min</u> Rose incolore | |
| TRP | L-tryptophane | 0,2 | formation d'indole (TRyptophane) | <u>JAMES / immediate</u> incolore rose vert pâle / jaune | |
| GLU | D-glucose | 1,92 | fermentation (GLUcose) | Blue à vert | jaune |
| ADH | L-arginine | 1,92 | Arginine DiHydrolase | jaune | orange / rose /rouge |
| URE | urée | 0,76 | UREase | jaune | orange / rose /rouge |
| ESC | Esculine citrate de fer | 0,56 0,072 | hydrolyse (β -glucosidase) (ESCuline) | jaune | gris / marron / noir |
| GEL | gélatine (origine bovine) | 0,6 | hydrolyse (protéase) (GELatine) | Pas de diffusion dupigment | Diffusion du pigment noir |
| PNPG | 4-nitrophényl β D galactopyranoside | 0,22 | β -galactosidase (ParaNitroPhényl- β DGalactopyranosidase) | incolore | jaune |
| GLU | D-glucose | 1,56 | assimilation (GLUcose) | Transparence | trouble |
| ARA | L-arabinose | 1,4 | assimilation (ARABinose) | transparence | trouble |
| MNE | D-mannose | 1,4 | assimilation (ManNosE) | transparence | trouble |
| MAN | D-mannitol | 1,36 | assimilation (MANnitol) | transparence | trouble |
| NAG | N-acétyl glucosamine | 1,28 | assimilation (N- AcétylGlucosamine) | transparence | trouble |
| MAL | D-maltose | 1,4 | assimilation (MALtose) | Transparence | trouble |
| GNT | potassium gluconate | 1,84 | assimilation (potassium GlucoNaTe) | transparence | trouble |
| CAP | acide caprique | 0,78 | assimilation (acide CAPrique) | transparence | trouble |
| ADI | acide adipique | 1,12 | assimilation (acide ADIrique) | transparence | trouble |
| MLT | acide malique | 1,56 | assimilation (MaLaTe) | transparence | trouble |
| CTT | trisodium citrate | 2,28 | assimilation (trisodium CITrate) | transparence | trouble |
| PAC | acide phénylacétique | 0,8 | assimilation (acide PhénylACétique) | transparence | trouble |
| OX | (voir notice du test oxydase) | - | cytochrome-oxydase | (voir notice du test oxydase) | |