

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.AGR/2018



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV **Filière** : Science Biologique
Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

ATTOUI Hassiba & RAFA Amina

Thème

**L'effet de l'acide salicylique sur la formation de biofilm de
*Pseudomonas aeruginosa***

Soutenu le : 25/06/2018

Devant le jury composé de :

M. KADRI N	MCA	Président	UAMOB
Mme MEDBOUA C	MAA	Examineur	UAMOB
M.CHERGUI A	MAA	Encadreur	UAMOB

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciement

Nous tenons tout d'abord à remercier dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donner la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

En seconde lieu, nous tenons à remercier notre chère encadreur M CHARQNI Achour pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptent de diriger ce travail et pour son compréhension

Notre vif remerciement pour les membres du jury M. KADRI Zui nous a fait l'honneur de présider notre jury.

A Mm MADBOUA d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Notre vif remerciement à l'ensemble de l'équipe du laboratoire d'hygiène de proximité de santé publique de Bouira surtout Mme RABOUH Monira pour ses conseils

Nos profonds remerciements vont également à tous les enseignants qui nous ont donné les bases de la recherche pendant les cinq ans.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

À la mémoire de mon cher père, qu'Allah ait son âme.

À La personne la plus chère à mon cœur : Maman qui m'a supportée vaillamment pas à pas tout au long de ma vie.

À mes frères Zaki, Abdou, Youcef, et Mostapha, pour l'amour, l'attention et l'aide qu'ils m'ont apportés.

À mes très chères sœurs Assia, Sara, Fati & Samara, qui ont toujours été présents dans les moments les plus difficiles.

Spéciale dédicace à Mohamed.

À mes chères amies ; Zizo, Hanane, NaSima, Fatima, Kahina, Samir, Kaddour, Khalid Et Hassiba pour tous les moments qui nous avons partagé.

À tous les membres de familles : Rafa, Aissani, et Nich.

À la mémoire des gens qui nous a quittés et que dieu le tout.

Amina

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

A la mémoire de mon cher père, qu'Allah ait son âme.

*A La personne la plus chère à mon cœur : Maman qui m'a
supportée vaillamment pas à pas tout au long de ma vie.*

*A mes frères et a mes soeurs pour l'amour, l'attention et l'aide qu'ils
m'ont apportés.*

Spéciale dédicace à Salah, Mohamed et Malika.

*A mes chères amies ; Kahina, Hadjira, Amina Houria,
Akila, Djawhar, Faiza, Sara Hayat.*

pour tous les moments qui nous avons partagé.

A tous les membres de familles

A la mémoire des gens qui nous a quittés et que dieu le tout.

Hassiba

Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Introduction.....	1
Chapitre I : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
I.1. Présentation de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
I.1.1. Nomenclature.....	3
I.1.2. Classification.....	3
I.1.3. Habitat.....	3
I.2. Caractéristique générale de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
I.2.1. Caractères structuraux.....	4
I.2.2. Caractéristiques biochimiques.....	4
I-2.2.1. Principales Caractéristiques de métabolisme.....	5
I-2.2.2. Production de pigments.....	5
I.2.3. Caractéristiques culturelles.....	5
I.2.4. Caractéristiques génomiques.....	5
I.3. Les facteurs de virulences.....	6
I.3.1. Facteurs de virulence de surface.....	6
I.3.2. Facteurs de virulence enzymatiques.....	10
I.4. Infection par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
Chapitre II : Biofilms.....	14
II.1. Définition de biofilm.....	14
II.2. Les étapes de la formation du biofilm de <i>P.aerugénosa</i>	15
II.2.1. Adhésion réversible.....	15
II.2.2. Adhésion irréversible.....	16

II.2.3. Maturation primaire.....	16
II.2.4. Maturation secondaire.....	16
II.2.5. Détachement.....	16
II.3. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm	16
II.3.1. Les caractéristiques de la surface.....	17
II.3.1.1. Rugosité de la surface.....	17
II.3.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface.....	17
II.3.1.3. Présence de films protéiques sur la surface.....	17
II.3.2. Caractéristiques du milieu.....	18
II.3.3. Caractéristiques des microorganismes.....	18
II.4. Régulation de la formation de biofilm.....	18
Chapitre III: L'acide salicylique.....	20
III.1. Définition de l'acide salicylique.....	20
III.2. Structure et biosynthèse de l'acide salicylique.....	20
III.3. Rôle physiologique de l'acide salicylique.....	21
Chapitre IV : Matériel et méthodes.....	24
IV.1. Lieu d'étude.....	24
IV.2. L'objectif.....	24
IV.3. Matériel.....	24
IV.4 Méthode.....	24
IV.4.1. Etudes des caractères cultureux, morphologiques, et biochimiques de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
IV.4.1.1. Etude macroscopique des colonies.....	25
IV.4.1.2. Etude microscopique.....	25
IV.4.1.3. Croissance à 4°C et 42°C.....	25

IV.4.1.4. Production d'oxydase.....	25
IV.4.1.5. Production de catalase.....	25
IV.4.1.6. Production des pigments.....	25
IV.4.1.7. Utilisation du mannitol et recherche de la mobilité.....	26
IV.4.1.8. Recherche de type respiratoire.....	26
IV.4.1.9 Hydrolyse de l'amidon.....	26
IV.4.2 Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'Acide salicylique.....	26
IV.4.3 Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'Acide salicylique.....	28
IV.4.4 L'étude de l'effet acide salicylique sur la formation de biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Chapitre V : Résultats et Discussion.....	31
V.1. Résultats.....	31
V.1.1. Etudes des caractères cultureux, morphologiques et biochimie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
V.1.1.1. L'étude macroscopique.....	31
V.1.1.2. L'étude microscopique.....	31
V.1.1.3. Croissance à 4°C et à 42°C.....	32
V.1.1.4. Test de l'oxydase.....	32
V.1.1.5. Test de la catalase.....	32
V.1.1.6. Recherche de type respiratoire.....	33
V.1.1.7. Utilisation du mannitol et recherche de la mobilité.....	33
V.1.1.8. Dégradation de l'amidon.....	33
V.1.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'Acide salicylique.....	34
V.1.3. Concentrations Minimale Bactéricide (CMB) de l'acide salicylique.....	36

V.1.4. L'effet de l'acide salicylique sur la formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i>	37
V.2. Discussion.....	38
Conclusion.....	40
Références bibliographiques	
Annexe	
Résumé	

Liste des abréviations

- **AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique.
- **AS** : Acide salicylique.
- **°C** : Degré Celcius.
- **C** : cytosine.
- **CMB** : Concentration Minimale Bactéricide.
- **CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice.
- **CV** : cristal violet.
- **DO**: densité optique.
- **DsB**: disulfide bond.
- **EPS**: Extra Polymeric Substances.
- **ExoS, T, U et Y** : Exotoxine S, T, U et Y.
- **G**: guanine.
- **GN** : Gélose nutritive.
- **H₂O₂** : eau oxygénée.
- **H₂S** : hydrogène sulfuré.
- **IgA**: Immunoglobulin A.
- **IgG**: immunoglobulin G.
- **ISR**: Induced Systemic Resistance.
- **LPS** : Lipopolysaccharides.
- **MEVAG** : Mise Evidence Voie Attaque Glucose.
- **OprF**: Outer membrane protein F.
- ***P. aeruginosa***: *Pseudomonas aeruginosa*.
- **PA**: *Pseudomonas aeruginosa*.
- **PQS**: *Pseudomonas* le signal de quinolone
- **PRs**: Protein resistances
- **QS** : Quorum sensing.
- **SAR** : Systemic Acquired Resistance.
- **TSB**: Tryptic-Soy-Broth.
- **UFC** : Unité Formant Colonie.

Liste des figures

Figure 01 : Aspects microscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
Figure 02: Représentation circulaire du génome de <i>P. aeruginosa</i>	6
Figure 03 : Principaux facteurs de virulence chez <i>P. aeruginosa</i> et leurs interactions avec l'hôte	7
Figure 04 : Structure d'un flagelle bactérien.....	8
Figure 05 : Structure du lipopolysaccharide.....	9
Figure 06 : Représentation d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> au microscope électronique à balayage.....	14
Figure 07: Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
Figure 08: Représentation simplifiée des voies de biosynthèse de l'acide salicylique.....	21
Figure 09 : Diagramme représentant les différentes étapes de préparation de \neq concentration testées.....	27
Figure 10 : Diagramme représentant les différentes étapes de détermination de CMI de l'AS.....	28
Figure 11 : Formation de biofilm en microplaque.....	29
Figure 12 : Aspect macroscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ensemencée sur King A et sur King B.....	31
Figure 13 : Observation microscopique de <i>P. aeruginosa</i> après une coloration de Gram (x100).....	31
Figure 14: Résultat de test de pour l'oxydase le <i>P. aeruginosa</i>	32
Figure 15 : Résultat de test de la catalase pour le <i>P. aeruginosa</i>	32
Figure 16: Résultat de recherche de type respiratoire pour le <i>P. aeruginosa</i>	33
Figure 17: Résultat de test mannitol mobilité pour le <i>P. aeruginosa</i>	33
Figure 18 : Résultat de dégradation de l'amidon pour le <i>P. aeruginosa</i>	34
Figure 19: Variation de la turbidité due à la croissance de <i>P. aeruginosa</i> en fonction de la concentration de l'acide salicylique.....	35
Figure 20 : Variation de la turbidité induite par la croissance de <i>P. aeruginosa</i> en fonction de	

la concentration en AS.....	35
Figure 21 : Résultat de CMB de l'acide salicylique.....	36
Figure 22 : Résultats de l'effet de l'acide salicylique sur la formation de biofilm de <i>P.aeruginosa</i>	37
Figure 23 : Résultat d'évaluation de la biofilm de <i>P. aeruginosa</i> par analyse cristal violet.....	37

Introduction

Actuellement, *Pseudomonas aeruginosa* occupe une place majeure et considérable dans les établissements de santé (Alyajouri, 2012). Elle est responsable d'infections nosocomiales graves, d'infections potentiellement mortelles chez les personnes immunodéprimées et d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011). La fréquence des infections à bacille pyocyanique s'accroît toujours et régulièrement en milieu hospitalier (Diarra, 2009).

P. aeruginosa, comme d'autres bactéries à Gram négatif, produit des agrégats structurés ou biofilms maintenus par une matrice protectrice (khalilzadeh, 2009). Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'Homme. En effet, 65 % des infections bactériennes sont dues à des biofilms et plus de 80 % des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (Chalvet de Rochemonteix, 2009).

Le biofilm est important dans la pathogénie de *P. aeruginosa* car il lui permet de persister sur les dispositifs médicaux implantables et de constituer un réservoir, notamment dans les hôpitaux et de résister aux antibiotiques et aux désinfectants. Il est directement impliqué dans la pathogénicité de *P. aeruginosa*, dans la mucoviscidose et les infections sur matériels médicaux (Méar, 2014).

Les antimicrobiens conventionnels ont une efficacité limitée contre les infections liées au biofilm, qui augmentent l'émergence de *P. aeruginosa* multirésistant (Walters *et al.*, 2003). Ainsi, la découverte de nouveaux agents anti-infectieux, activement contre les micro-organismes incorporés dans les biofilms est un objectif important dans le traitement des infections liées au biofilm (Projan et Youngman, 2002). Fait intéressant, plusieurs études ont montré que certains médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens possèdent une activité antimicrobienne. Chen et Wen (2011) ont découvert que les traitements, y compris l'administration d'antibiotiques avec des médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens, sont actifs contre les bactéries présentes dans le biofilm. Il a été démontré que médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens, tels que l'acide salicylique, caractérisés avec une réaction bactéricide sur les bactéries dans les cellules planctoniques ainsi que biofilm (Dutta *et al.*, 2008, Reslinski *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2003).

L'objectif principal du présent travail était d'étudier la formation de biofilm avec l'acide salicylique et d'explorer les effets de l'acide salicylique sur la croissance de *P. aeruginosa*.

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

Dans le premier chapitre, nous avons abordé la présentation de *P. aeruginosa*, les caractéristiques générales, les facteurs de virulence, et les infections par *P. aeruginosa*.

Le deuxième chapitre consacré aux généralités, sur le biofilms, les étapes de formation, Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm, et régulation de la formation de biofilm de *P. aeruginosa*.

Le troisième chapitre a présenté des généralités sur l'acide salicylique, la structure et la biosynthèse, rôle physiologique de l'acide salicylique, et l'effet de l'acide salicylique sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa*.

Dans la deuxième partie, nous avons procédé à une approche expérimentale selon les étapes suivantes :

- Etudes des caractères cultureux, morphologiques, et biochimiques de *P. aeruginosa*.
- Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'acide salicylique présentant un effet inhibiteur sur *P. aeruginosa*.
- L'étude de l'effet de l'acide salicylique sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa*.

I.1. Présentation de *Pseudomonas aeruginosa*

I.1.1. Nomenclatureur

P. aeruginosa, autrement connue sous le nom de bacille pyocyanique, du grec puon = pus et du grec kuanos = bleu foncé, est désigné sous le nom d'espèce *Pseudomonas aeruginosa* du latin aeruginosus = couvert de rouille. C'est l'espèce la plus connue et la plus répandue du genre *Pseudomonas*, elle constitue l'espèce-type du genre, isolé en 1882 par Gessard (Avril *et al.*, 1992).

I.1.2. Classification

Domaine : *Bactéria*.

Phylum: *Proteobacteria*.

Classe : *Gammaproteobacteria*.

Ordre: *Pseudomonadales*.

Famille: *Pseudomonadaceae*.

Genre: *Pseudomonas*.

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

I.1.3. Habitat

La bactérie *P. aeruginosa* est omniprésente dans l'environnement, on la trouve dans de très nombreux milieux : végétaux, poussières, aliments crus (particulièrement les légumes : tomates, carottes, céleris) 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 les trouve aussi dans les eaux chaudes sanitaires, dans les tours de refroidissement, les bains bouillonnants, ventilateurs, nébuliseurs, humidificateurs et malheureusement au milieu hospitalier [éviers, siphons, vases, antiseptiques (dans les solutions de désinfectants)] incriminé dans les infections nosocomiales (Green *et al.*, 1974; Leclerc, 2002).

I.2. Caractéristique générale de *Pseudomonas aeruginosa*

I.2.1. Caractères structuraux

P. aeruginosa est un bacille Gram négatif en forme de bâtonnet, de 0.5 à 0.8 μm de diamètre sur 1 à 3 μm de long. Mobile grâce à un flagelle polaire généralement unique, dépourvu de spores et de capsules. (Sadolff et Sartenstein, 1974). Mais parfois entourée d'une pseudo-capsule, (Clave, 2011).

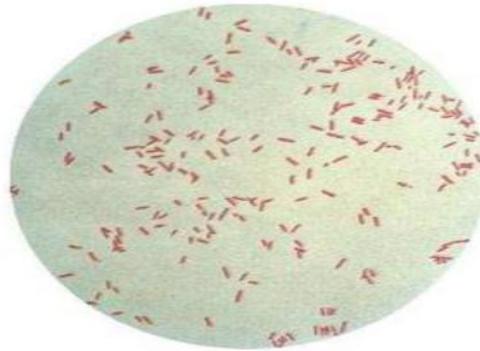


Figure 01 : Aspects microscopique de *P. aeruginosa* (354 \times 300)

www.microbe-edu.org/.../imgburk/gram3.jpg

(Philippon et Lalande, 2005)

I.2.2. Caractéristiques biochimiques :

I.2.2.1. Principales Caractéristiques de métabolisme :

Sont décrits importants les caractères métaboliques qui suivent :

- La réduction des nitrates allant souvent jusqu'au stade azote gazeux.
- La présence d'une oxydase.
- Le métabolisme oxydatif des sucres, appréciable en milieu MEVAG ou de Hugh et Leifson (milieu très pauvre en peptone recouvertes ou non de vaseline), retenir essentiellement l'action sur le glucose et sur le D-arabinose.
- Le pouvoir protéolytique : liquéfaction de la gélatine en entonnoir puis coupe renverser.
- La présence d'une lécithinase (Drjean, 1994).

Comme la plupart des *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* possède une oxydase, d'autres caractères sont utiles pour le diagnostic d'espèce : Indole (-), urée (-), TDA (tryptophane-

désaminase) (-), H₂S (-), gélatine (+), ONPG (-) (orthonitrophényl-galactose), Nitrate-réductase (+), LDC (-), (Lysine-décarboxylase), ODC (Ornithine-décarboxylase) (-), ADH (Arginine-deshydrogénase) (+) (Lie, 2002).

I-2.2.2. Production de pigments

Comme d'autres *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* sécrète un certain nombre de pigments, dont les principaux la pyocyanine (bleu-vert), et la pyoverdine (jaune vert) (Khalilzadeh, 2009).

Les pigments peuvent être apparents sur milieux ordinaires ou mieux sur sérum de bœuf coagulé. On doit parfois voir recours à des milieux spéciaux, type milieux de King A (pyocyanine) et King B(pyoverdine). (Lilet *et al.*, 1983).

I.2.3. Caractéristiques culturelles

Le bacille pyocyanique est une bactérie aux besoins très limités. Croissant sur des milieux synthétiques simples, elle pousse facilement en 24 heures à 37°C. Elle peut croître entre 5 et 42°C avec un optimum de 30°C. Par contre, elle supporte de moindres variations de pH (6.5 à 7.5) avec un pH optimal de 7.2. *P. aeruginosa* est une bactérie aérobique stricte mais capable d'utiliser les nitrates en conditions anaérobies (Souley, 2002). Elle est caractérisée par une odeur florale (Flandrois, 1997). Un milieu sélectif à base cétrimide (ammonium quaternaire) permet la recherche et l'isolement de *P. aeruginosa* à partir de produits biologiques (selles, urines, pus, liquide céphalo-rachidien...) en bactériologie médicale (Dellarras, 2007).

I.2.4. Caractéristiques génomiques

Le génome de la souche PA01 de *P. aeruginosa* a été complètement séquencé en 2000(Figure 2). Il est le plus grand génome bactérien qui comprend 6,3 millions de paires de bases. Ce génome contenant 5570 gènes, la plupart sont riches en guanine et cytosine (G+C) (66,6). Seuls 6,7 % de ces gènes ont une fonction bien connue. Ce génome contient un nombre important de gènes régulateurs impliqués dans le métabolisme, le transport, l'efflux de composés organiques et différents systèmes de sécrétion et de mobilité (Stover *et al.*, 2000) mais il contient aussi une quantité très élevée de gènes codant pour des facteurs de virulence et des mécanismes de régulation, ce qui lui confère une grande capacité à s'adapter à divers environnements et la capacité d'infecter différents hôtes (Faille, 2010).

Le bacille pyocyanique contient plusieurs plasmides donnant différents caractères phénotypiques (résistance aux antiseptiques et aux antibiotiques, modification du taux de croissance, acquisition d'activités cataboliques sur certains substrats) ceci peut compliquer la reconnaissance de cette espèce (Flandrois, 1997).

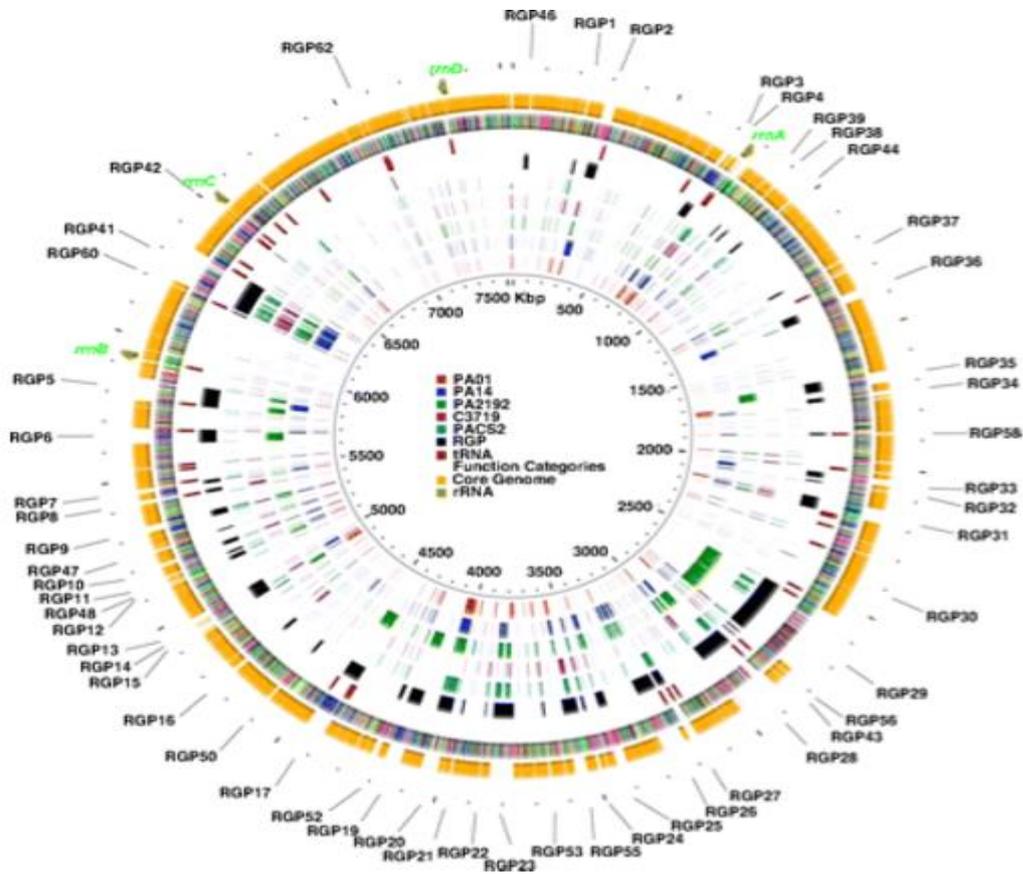


Figure 2 : Génome de *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000).

I.3. Les facteurs de virulences

La pathogénie de *P. aeruginosa* est liée à la production de nombreux facteurs de virulence membranaires et extracellulaires (Figure 3). Les facteurs de virulence sont des molécules qui permettent à la bactérie de survivre et de se multiplier dans différents microenvironnements, en particulier chez l'hôte. Les facteurs de virulence de surface incluent le flagelle, le pilus, et le LPS. Les facteurs sécrétés comportent les produits extracellulaires (protéases, hémolysine, Exotoxine A,...), les protéines du système de sécrétion de type III, les molécules du "Quorum sensing" et l'alginate (Mesaros *et al.*, 2007).

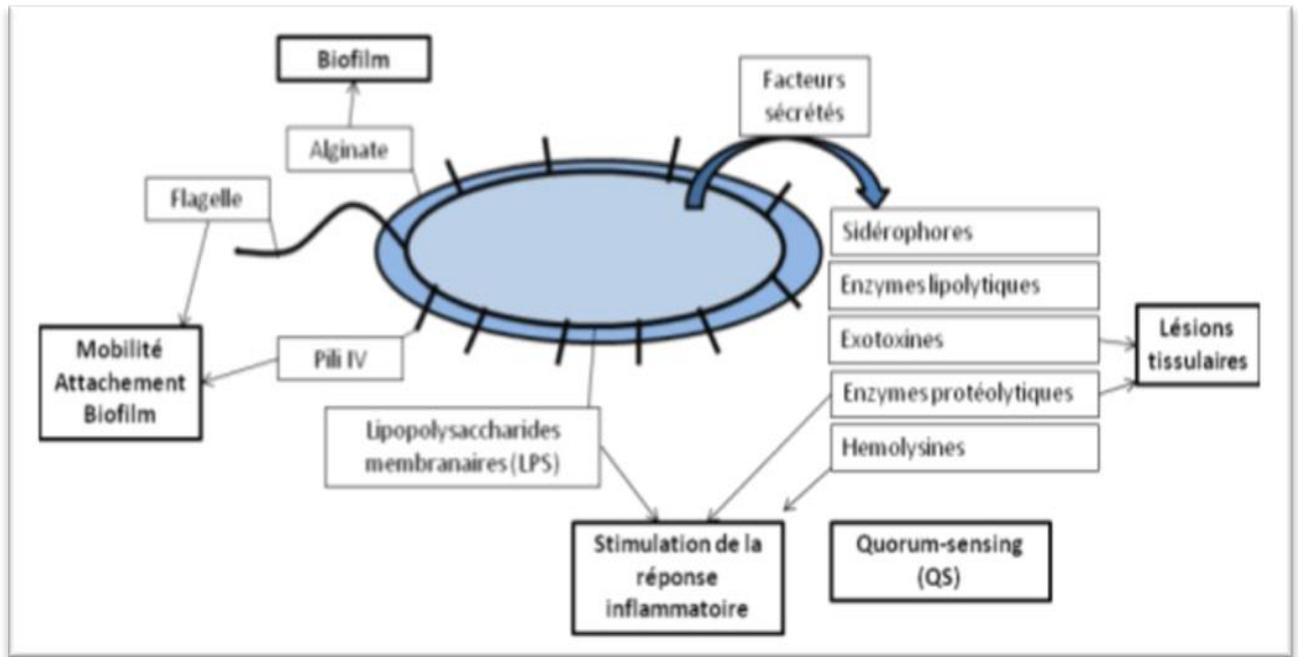


Figure 3 : Principaux facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* (Panetier et Benoit, 2010).

I.3.1. Facteurs de virulence de surface

I.3.1.1. Le flagelle

Le flagelle est un complexe multiprotéique, il s'agit de l'appendice le plus important dans la motilité des bactéries à Gram négatif. *P. aeruginosa* possède un seul flagelle monotriche polaire lui conférant une mobilité de type « swimming » dans un environnement aqueux et une mobilité de type « swarming » permettant le déplacement sur des surfaces semi solides (Toutain et *al.*, 2005; Mc Carter, 2006; Kaiser, 2007). Le flagelle est également nécessaire pour la formation du biofilm. Il intervient dans l'adhérence à la surface et la dissémination du biofilm par la suite (O'Toole et Kolter, 1998 ; Sauer *et al.*, 2002). Le flagelle participe aussi à la virulence en induisant une réponse inflammatoire par interaction avec les récepteurs Toll, TR5 et TR2, ce qui a pour conséquence la production d'IL-8, d'IL-6 et de mucine (Adamo *et al.*, 2004).

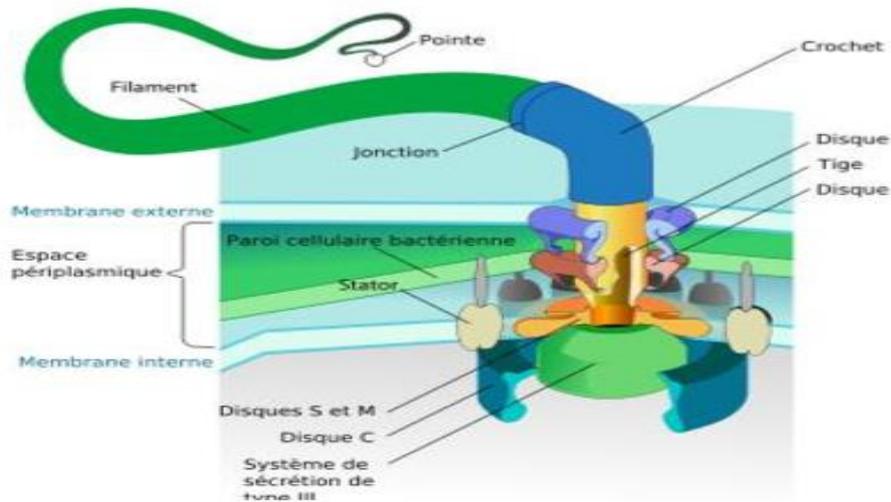


Figure 4 : Structure d'un flagelle bactérien (Elmeskini, 2011).

I.3.1.2. Les pili de type IV

P. aeruginosa exprime un nombre limité de pili polaires. Le pilus est une petite structure filamenteuse d'environ 6 nm de diamètre constituée d'empilements de monomères de la protéine appelée piline. Les pili de type IV, par leurs propriétés rétractiles, permettent à *P. aeruginosa* d'envahir les surfaces hydratées et de coloniser rapidement les voies respiratoires. Le pilus facilite aussi l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales en se liant au récepteur Asialo-GM1 et est indispensable à la virulence de *P. aeruginosa* (Comolli *et al.*, 1999). Les pili de type IV sont impliqués dans les mobilités de type "switching" (Wall et Kaiser, 1999), et de type "swarming".

I.3.1.3. Facteur d'attachement de type fimbriae (ou Cup)

Un nouveau facteur d'attachement a été récemment mis en évidence chez *P. aeruginosa*. Il s'agit de pili de type fimbriae qui sont assemblés par la voie Cup (chaperone, usher, pathway). Chez *P. aeruginosa*, trois systèmes Cup appelés CupA, CupB et CupC ont été identifiés. Chez *P. aeruginosa*, ces facteurs d'attachement sont essentiels pour l'adhérence aux surfaces abiotiques et dans la formation du biofilm (Comolli *et al.*, 1999).

I.3.1.4. Lipopolysaccharides (LPS)

Le LPS (figure 5) 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 négatif et est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort.(Rocchetta *et al.*, 1999). L'antigène somatique « O » joue un rôle important dans le pouvoir pathogène et dans l'immunité ; les anticorps correspondants sont agglutinants et couvrant, ce qui explique la particulière fréquence des infections à *Pseudomonas* chez les sujets immunodéprimés. (Lilet *et al.*, 1983).

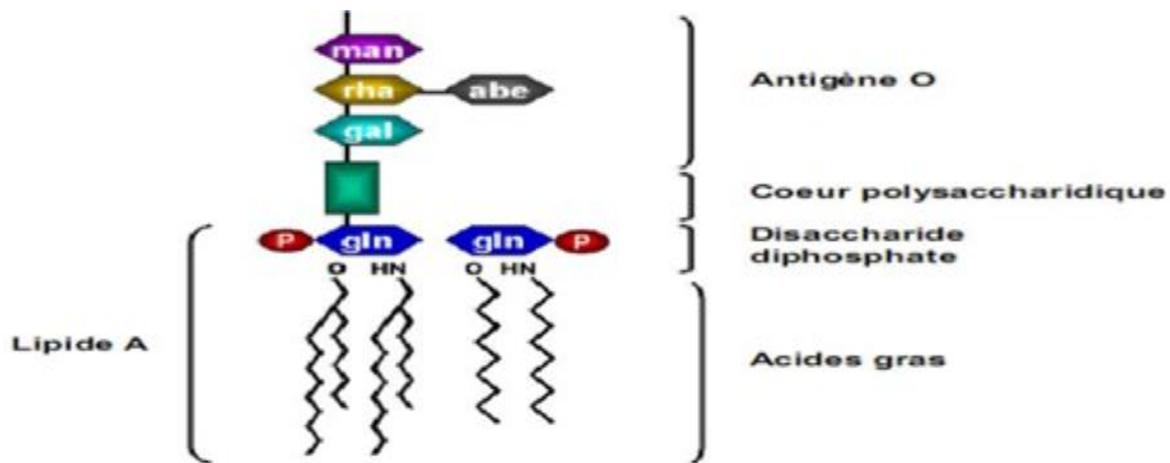


Figure 5 : Structure du lipopolysaccharide (Elmeskini, 2011).

I.3.1.5. L'alginate :

Les alginates sont des exopolysaccharides visqueux et extracellulaires produites par *P. aeruginosa* durant les deux phases aiguë et chronique de l'infection. Ils sont composés de polymères répétés d'acide mannuronique et d'acide glucuronique et, donnent à la bactérie un aspect mucoïde (Evans et Linker, 1973; Shankar *et al.*, 1995). *P. aeruginosa* produit l'alginate pour s'adapter dans certaines situations environnementales inappropriées au développement bactérien. C'est le cas des infections pulmonaires chroniques des patients atteints de mucoviscidose (Carpentier *et al.*, 2003). La production d'alginate par ces souches permet la formation d'un biofilm qui favorise l'adhésion aux cellules épithéliales et protège la bactérie de la phagocytose, des anticorps, l'action des antibiotiques et des désinfectants (Ruim et Andermunt, 2004).

I.3.1.6. La protéine OprF

La protéine OprF de la membrane externe de *P. aeruginosa* est une porine majeure . Il s'agit d'une protéine bifonctionnelle possédant une activité porine à travers son canal à eau et jouant le rôle de protéine de structure importante au maintien de l'intégrité bactérienne. Cette protéine forme un nombre limité de larges canaux au niveau de la membrane externe de *P. aeruginosa*. Le diamètre du canal OprF est de 2 nm et permet la diffusion de polysaccharides ayant un poids moléculaire compris entre 2000 et 3000 daltons (Nestorovich *et al.*, 2006). OprF possède un rôle structural déterminant dans la morphologie bactérienne et dans la capacité des bactéries à croître dans un milieu à faible osmolarité . Il a été démontré également qu'OprF contribue à l'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales pulmonaires et facilite ainsi l'interaction de *P. aeruginosa* avec l'épithélium en favorisant la colonisation de l'épithélium respiratoire et l'initiation de l'infection pulmonaire (Azghani *et al.*, 2002) .

I .3 .2. Facteurs de virulence enzymatiques

A- Exoenzymes à travers le système de sécrétion de type III

P. aeruginosa utilise un système de sécrétion de type III qui est un déterminant majeur de la virulence et permet à la bactérie d'injecter ses toxines dans la cellule hôte. Les protéines secrétées via le système de sécrétion de type III (ainsi que via le système de sécrétion de type I) sont transloquées à travers les deux membranes de l'enveloppe cellulaire en une seule étape sans intermédiaire périplasmique. Ce système de sécrétion, provoquant des infections aiguës, nécessite le contact des pili bactériens à la cellule épithéliale pour être activé. (Berthelot *et al.*, 2003).

P. aeruginosa secrète quatre exoenzymes à travers le système de sécrétion de type III :

- ExoS, une ADP-ribosyltransférase, nécessaire à la destruction des tissus au site de l'inflammation et à la dissémination bactérienne. ExoS pourrait aussi contribuer à l'inflammation pulmonaire en stimulant la prolifération lymphocytaire (Krall *et al.*, 2002).
- ExoT, une exotoxine qui semble interférer avec l'organisation des filaments d'actine, empêche l'exocytose, la progression du cycle cellulaire et la phagocytose (Vallis *et al.*, 1999).

- ExoU, une toxine nécrotique qui détruit les membranes cellulaires induisant la perméabilité des cellules épithéliales, des macrophages et des fibroblastes (Sato *et al.*, 2003) .
- ExoY, une adénylate cyclase induisant une accumulation d'AMP cyclique dans les cellules intoxiquées de l'hôte (Yahr *et al.*, 1998).

B- Enzymes protéolytiques (Élastases, protéase IV et protéase alcaline)

P. aeruginosa sécrète quatre types de protéases agissant en synergie pour dégrader les protéines et interférer avec le système immunitaire de l'hôte.

Ces exoprotéases sont les élastases, la protéase IV et la protéase alcaline; toutes ces enzymes ont des substrats protéiques différents. La contraction et le relâchement du tissu pulmonaire repose sur les propriétés d'élasticité de l'élastine, le composant majeur du tissu pulmonaire. L'activité élastase de *P. aeruginosa* est médiée par l'action combinée de deux enzymes protéolytiques, LasA et LasB contrôlé par le quorum sensing. Cette activité conduit à la destruction de tissu pulmonaire. L'élastase LasB est une métalloprotéase à zinc sécrétée par le système de sécrétion de type II, également capable de moduler la réponse immunitaire en inactivant les IgA et les IgG, des composants du complément, la fibrine et le collagène (Hong et Ghebrehiwet, 1992). L'élastase LasA est une protéase à sérine agissant en synergie avec LasB pour dégrader l'élastine. LasA coupe l'élastine, et la rend ainsi plus accessible à l'action d'autres protéases comme LasB et la protéase alcaline et l'élastase du neutrophile (Galloway, 1991).

La protéase IV (lysyl endopeptidase) est aussi une protéase à sérine codée par le gène *prpL*. Elle est impliquée dans la dégradation de nombreuses protéines comme le fibrinogène, la plasmine, le plasminogène, l'immunoglobuline, les composantes du complément et l'épithélium cornéen (Engel *et al.*, 1998).

La protéase alcaline est une métalloprotéase codée par le gène *aprA* et contrôlée par le quorum sensing de *P. aeruginosa*. Elle constitue la seule exoprotéase sécrétée par le système de sécrétion de type I. Elle dégrade efficacement les composantes du complément ainsi que les cytokines impliquées dans la réponse immune et inflammatoire comme l'INF- γ et le TNF- α (Avidano *et al.*, 1998).

C- Enzymes lipolytiques (Lipase, estérase et phospholipase C)

Le système lipolytique de *P. aeruginosa* comprend trois enzymes; la lipase A, l'estérase A et la phospholipase C qui hydrolysent les esters de glycérols des acides gras à chaîne longue et à chaîne courte (Wilhelm *et al.*, 1999). Ces activités enzymatiques permettent à la bactérie d'utiliser une panoplie de substrats lipidiques.

Par définition, les lipases sont les carboxyl-estérases catalysant la formation et le clivage des acyl-glycérols à chaîne longue. Le rôle de lipases microbiennes dans la pathogénie et dans la formation de biofilm a déjà été démontré (Berto *et al.*, 1999). La lipase A de *P. aeruginosa* est sécrétée via le système de sécrétion de type II et hydrolyse les esters carboxyliques des acides gras à chaîne courte, insolubles comme trieoil-glycérol et p-nitrophénylpalmitate. La pré-lipase cytoplasmique contient une séquence signal typique permettant l'exportation via la machinerie. Dans le périplasme, la lipase adopte une conformation active assistée par la chaperonne intermoléculaire spécifique Lif et par les catalyseurs accessoires non spécifiques incluant les protéines Dsb qui catalysent la formation des ponts disulfures. Une fois active, la lipase est transportée dans le milieu extracellulaire via la machinerie de sécrétion très complexe Xcp composée de 12 protéines différentes. La régulation de l'expression de la lipase de *P. aeruginosa* est complexe et partiellement connu (Rosenau et Jaeger, 2000). L'estérase de *P. aeruginosa* est attachée à la membrane externe; le domaine catalytique est exposé à la surface et hydrolyse de préférence les acyl thio- ou oxyesters à chaîne longue. L'estérase A de *P. aeruginosa* est la première enzyme identifiée dans la membrane externe excrétée dans le milieu extracellulaire via la machinerie du système de sécrétion de type IV.

Les phospholipases sont des enzymes extracellulaires thermolabiles (Zuckert *et al.*, 1998). Trois phospholipases C ont été identifiées chez *P. aeruginosa* avec une spécificité de substrat différente (Stonehouse., 2002).

La première phospholipase C est non-hémolytique dénommée PlcN et hydrolyse la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine. La deuxième phospholipase C est hémolytique et appelée PlcH (Hogan et Kolter, 2002). Il s'agit d'une enzyme multifonctionnelle puisqu'elle hydrolyse la phosphatidylcholine et la sphingomyéline mais possède également une activité sphingomyéline synthase (Luberto *et al.*, 2003). Finalement, la troisième phospholipase C dénommée PlcB hydrolyse phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine. Les PlcN et PlcH agissent préférentiellement sur la phosphatidylcholine

et permettent la colonisation bactérienne des poumons. La PlcB est impliquée dans la mobilité bactérienne de type twitching chez *P. aeruginosa* suivant un gradient de dérivés de la phosphatidyléthanolamine et de la phosphatidylcholine (Barker *et al.*, 2004). Une activité synergique de la lipase A et la phospholipases C hémolytique PlcH de *P. aeruginosa* mène à la dégradation complète du principal surfactant pulmonaire, le lipide dipalmitoylphosphatidylcholine (Rosenau et Jaeger, 2000).

D- La pyocyanine

La pyocyanine est un pigment bleu sécrété par la bactérie et impliqué dans de nombreux mécanismes de pathogénicité (Braun *et al.*, 2001). Elle réprime la réponse immunitaire de la cellule hôte, induit l'apoptose des neutrophiles (Lau *et al.*, 2004) et induit la production d'IL-8 (Allen *et al.*, 2005). Son importance dans la virulence de *P. aeruginosa* a été démontrée lors d'infections sur modèle animal (Denning *et al.*, 1998). Ses propriétés oxydo-réductrices lui permettent d'oxyder la glutathione, d'inactiver la catalase des cellules épithéliales bronchiques et ainsi de participer aux lésions liées au stress oxydatif (Lau *et al.*, 2004).

E- La pyoverdine

La pyoverdine est un sidérophore jouant également un rôle important dans la virulence de *P. aeruginosa* (O'Malley *et al.*, 2004) notamment par régulation de l'expression d'autres facteurs de virulence comme l'exotoxine (Takase *et al.*, 2000).

I.4. Infection par *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste capable d'infecter un large spectre d'hôtes. L'opportuniste de ce pyocyanique est à l'origine de sepsis graves sur les terrains fragilisés: brûlures graves, immunodéprimés, malades de réanimation, ventilation assistée invasive, dispositifs invasifs (sonde, cathéters périphériques et centraux) (Didier, 2005 ; Chaibdraa *et al.*, 2008).

Chez les patients atteints de mucoviscidose, *P. aeruginosa* est aujourd'hui le principal pathogène et pose des problèmes tout à fait spécifiques (Mesaros *et al.*, 2007). *P. aeruginosa* est capable de coloniser une grande diversité de tissus provoquant entre autres des bactériémies, ou des infections oculaires, intestinales, ou urinaires, des méningites et ostéomyélites en infectant le système nerveux central et les structures osseuses (Didier, 2005).

II.1. Définition de biofilm

Le terme « biofilm » est proposé pour la première fois en 1978 par John William Costerton *et al.*, Ces derniers les avaient définis comme étant des populations de bactéries, adhérents les unes aux autres et/ou à des surfaces ou interfaces et englobées dans une matrice. Cette définition inclut les agrégats et floculats bactériens ainsi que les bactéries fixées dans les interstices de milieux poreux. La notion de biofilm n'a cessé d'évoluer depuis, en fonction des avancements des travaux visant la compréhension profonde de ce phénomène. Characklis (1989) l'avait définie comme étant une association de microorganismes inclus dans une matrice d'exopolymères qui sont généralement attachés à la surface de toutes sortes de matériaux, tels que les métaux, les plastiques, les particules des sols, tissus,...etc. Bourion (1995) le définissait comme étant une communauté microbienne enfouie dans une matrice fibreuse de polymère extracellulaire et immobilisée sur une surface. Selon Bosgiraud *et al.*, (2003) le biofilm est une structure très organisée avec de nombreuses communications intercellulaires pour assurer un équilibre et un mode de vie coopératif. Les biofilms aujourd'hui sont vus comme un ensemble de microcolonies, entouré d'une matrice hautement hydratée, anionique et constituée d'exopolysaccharides (EPS) (Lahaye, 2006).

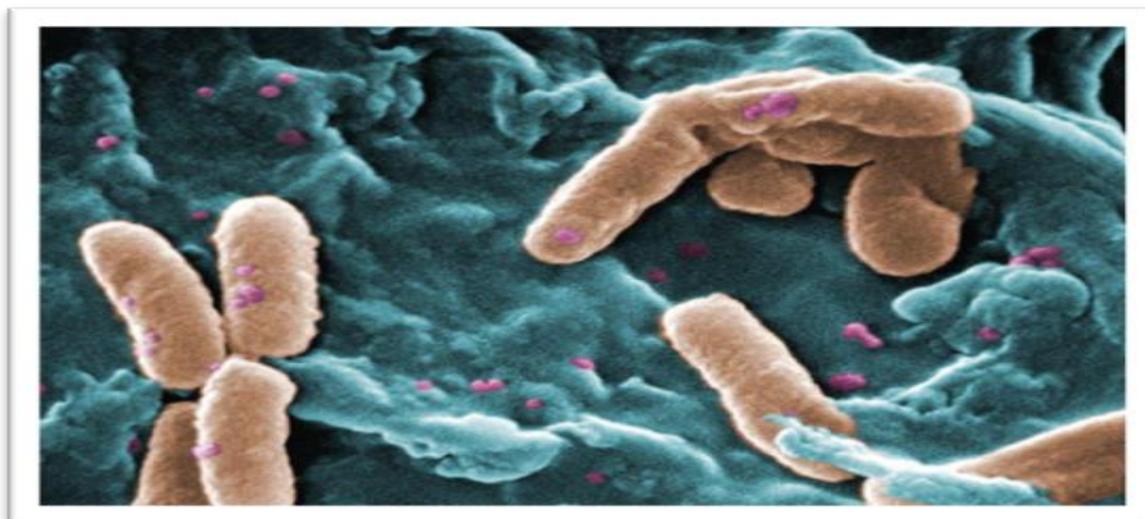


Figure 6: Représentation d'un biofilm de *P. aeruginosa* au microscope électronique à balayage. (Les bactéries sont colorées en brun, la matrice extracellulaire en bleu-vert) (Stoodley *et al.*, 2002).

II.2. Les étapes de la formation du biofilm de *P.aeruginosa*

La formation du biofilm est un phénomène complexe se déroulant en plusieurs étapes influencées par des facteurs autant physico-chimiques que biologiques. Le nombre d'étapes présentées dans la littérature varie en fonction des auteurs et du niveau de détail auquel ils décrivent le phénomène.

Le mécanisme de la formation du biofilm de *P. aeruginosa* peut être décrit comme un processus dynamique impliquant 5 stades successifs (Sauer *et al.*, 2002 ; Renner et Weibel, 2011 ; Kim *et al.*, 2012).

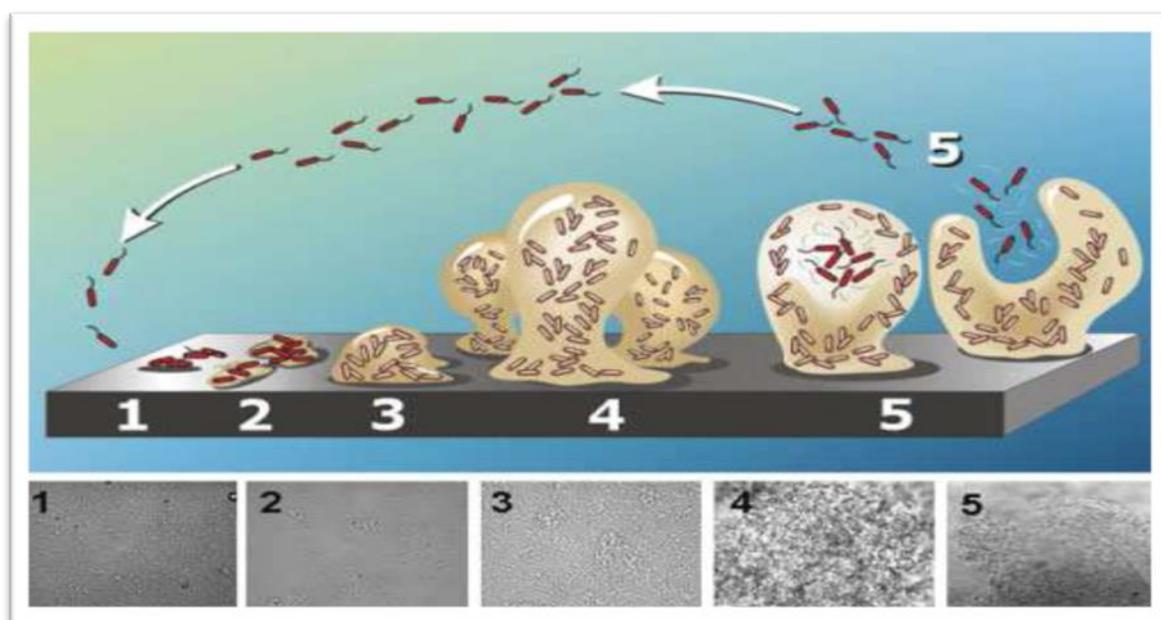


Figure 7 : Représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm de *P. aeruginosa* et visualisation par microscopie à transmission : 1 adhésion réversible, 2 adhésion irréversible, 3 et 4 maturation, 5 détachement (Stoodley *et al.*, 2002).

II.2.1. Adhésion réversible

L'étape initiale de la formation du biofilm est une adhésion réversible des bactéries planctoniques à une surface naturelle (minérale, végétale, animale) ou artificielle en réponse à des signaux environnementaux ou nutritionnels (Filloux et Vallet, 2003).

A ce stade, *P. aeruginosa* est transitoirement fixé au substrat et est capable de se détacher librement (Sauer *et al.*, 2002). Les bactéries planctoniques s'approchent des surfaces par l'intervention de la mobilité bactérienne ou sous l'influence des forces physiques comme

les forces d'attraction de van der Waals, les charges électrostatiques de surfaces et des interactions hydrophobes (Donlan, 2002; Kim *et al.*, 2012). Le flagelle de *P. aeruginosa* s'avère très important dans l'étape de l'approche au support (O'Toole et Kolter, 1998). L'adhésion initiale des bactéries à la surface fait également intervenir des adhésines dont les facteurs d'attachement de type fimbriae.

II.2.2. Adhésion irréversible

Dans un second temps, les bactéries s'attachent fermement et de manière irréversible à la surface. Cette étape nécessite l'intervention de structures bactériennes spécialisées, telles que les exopolymères (EPS) produits par les bactéries ainsi que les appendices cellulaires qui interagissent avec ces EPS. Des liaisons covalentes sont établies aussi entre le glycocalix bactérien et le film de macromolécules recouvrant la surface (Wahl, 1989). Des liaisons cellule-cellule interviennent également car la présence d'une espèce de micro-organisme sur la surface peut promouvoir l'adhésion d'une autre (Savage et Fletcher, 1985).

II.2.3. Maturation primaire

Après l'étape de colonisation de la surface, on observe une prolifération des bactéries qui donne lieu à la formation des micro-colonies. La formation des micro-colonies est un mécanisme d'agrégation cellulaire qui nécessite une mobilité bactérienne obtenue par les pili de type IV. Les bactéries secrètent une matrice d'exopolymères dans laquelle elles s'encapsulent et qui forme une barrière physique entre la communauté et l'environnement extracellulaire (Renner et Weibel, 2011).

II.2.4. Maturation secondaire

Les micro-colonies se différencient et permettent la maturation du biofilm par les cellules qui se répliquent et les exopolymères (EPS) qui s'accumulent. Ainsi les bactéries se multiplient imbibées dans une matrice d'exopolysaccharides. Ce stade implique l'intervention du Quorum sensing (production de rhamnolipides), la production d'exopolysaccharides ainsi que la répression de l'expression des différents appendices de mobilité (flagelle et pili de type IV) (Ruimy et Andremont, 2004 ; Kukavica-Ibrulj, 2007).

II.2.5. Détachement

À un stade avancé de la maturation du biofilm, des cellules individuelles ou des parties du biofilm peuvent être séparées de la masse hétérogène suite à la diminution de nutriments, à l'apparition d'anaérobiose, ou encore sous l'effet des forces de cisaillement ou de tout autre stress environnemental (Boyd et Chakrabarty, 1994 ; Walker et Marsh, 2004). Allison *et al.* (1998) ont montré, également, que la dégradation enzymatique (par l'action des EPS lyases spécifiques) des exopolymères joue un rôle spécifique dans le détachement et la dispersion des cellules de *Pseudomonas* en conditions de limitation en nutriments. De même, Boyd et Chakrabarty (1994) ont montré le rôle déterminant de l'exopolysaccharide alginate de *P. aeruginosa* dans le degré de détachement des cellules d'une surface d'agar. Sa présence renforce l'adhésion bactérienne et sa dégradation, par l'alginate lyase, augmente le détachement cellulaire. Par ailleurs, le détachement sera d'autant plus facile que la matrice d'exopolysaccharides sera moins polymérisée, moins dense (Boyd et Chakrabarty, 1994).

II.3. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs parmi lesquels: la surface, le milieu et les microorganismes (Branger *et al.*, 2007).

II.3.1. Les caractéristiques de la surface

La rugosité, les propriétés physicochimiques et la formation préalable d'un film protéique sur une surface influencent l'attachement des bactéries à cette surface et par conséquent la formation d'un biofilm (Klein, 2011 ; Bellifa, 2014).

II.3.1.1. Rugosité de la surface

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante (Characklis et Marshall, 1990). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités (Donlan, 2002).

II.3.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface :

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Teflon ou d'autres matières plastiques, que

sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (Bendinger *et al.*, 2003).

II.3.1.3. Présence de films protéiques sur la surface

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière.

En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (Nobbs *et al.*, 2009).

II.3.2. Caractéristiques du milieu

Comprenant les conditions environnementales telles que : la disponibilité de nutriments (excès ou carence) et les différents stress physicochimiques (pH, température, présence de composés bactéricides, etc.) (Marchal, 2010).

II.3.3. Caractéristiques des microorganismes

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Cette hydrophobicité influence l'attachement des bactéries sur une surface, moins les surfaces sont polarisées plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes (Liesse, 2012; Bellifa, 2014). Cette association stable avec la surface s'établit grâce à des structures adhésives telles que des adhésines filamenteuses (fimbriae, pili) ou non (EPS, capsule,...) (Perrin, 2009).

II.4. Régulation de la formation de biofilm

II. 4.1. Les molécules impliquées dans le quorum sensing

Le QS est un mécanisme global de régulation de gènes qui permet aux cellules bactériennes individuelles de communiquer et de coordonner leurs comportements au sein de la population bactérienne notamment en fonction de leur densité. Trois systèmes de QS ont été individualisés chez *P. aeruginosa* (las, rhl et pqs) (Roux et Ricard, 2013).

Les molécules du quorum sensing sont différentes selon les types de bactéries (Irie et Parsek, 2008). En général, on trouve des acylhomosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries Gram négatives. La majorité des bactéries Gram-positives utilisent des peptides autoinducteurs (AI), dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés). Les molécules du

quorum sensing sont dégradées par des enzymes. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du quorum sensing au sein d'un biofilm (Irie et Parsek, 2008).

Le quorum sensing régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm. Il initie les phénomènes de dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm (Irie et Parsek, 2008). Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm. Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases (Irie et Parsek, 2008).

L'altération des mécanismes de quorum sensing peut aboutir à d'importantes modifications phénotypiques des micro-organismes du biofilm, par exemple une sensibilité augmentée à des antibiotiques ou à des antiseptiques, ou des anomalies dans le cycle de développement du biofilm, surtout lors des étapes de formation et de dispersion (Irie et Parsek, 2008).

III.1. Définition de l'acide salicylique

L'acide salicylique (AS) est un métabolite phénolique produit par les plantes (Prithiviraj *et al.*, 2005). issu de la voie de biosynthèse des shikimate-phénylpropanoïdes, joue un rôle clé dans les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes. En effet, ce composé est impliqué à la fois dans la mise en place d'une résistance locale, dans la régulation de l'expression des gènes de défense et la réaction d'hypersensibilité, et dans la mise en place d'une résistance générale, de longue durée et à large spectre, qui protège la plante contre des infections ultérieures et appelée SAR (de l'anglais « Systemic Acquired Resistance ») (Durrant et Dong, 2004 ; Loake et Grant, 2007).

III.2. Structure et biosynthèse de l'acide salicylique

Chimiquement, l'AS appartient à un groupe de composés phénoliques qui possèdent un anneau aromatique et un groupe hydroxyle. C'est une petite molécule de 138,12 g/mol de poids moléculaire, peu soluble dans l'eau, mais soluble dans des solvants organiques.

Deux voies de biosynthèse d'AS ont été décrites (figure n°8):

- La voie des shikimate-phénylpropanoïdes (Hermann et Weaver, 1999). Elle commence par la conversion du phénylalanine en acide trans-cinnamique par la PAL (phénylalanine ammonialyase). L'acide trans-cinnamique donne l'AS après une chaîne de réactions produisant l'acide benzoïque qui en subissant une hydroxylation au niveau du carbone 2 donne l'acide salicylique (Yalpani *et al.*, 1993).
- Cependant, il a été montré que quelques plantes sont capables de synthétiser l'AS à partir du chorismate. Cette voie de synthèse implique deux enzymes, l'isochorismate synthase (ICS) et l'isochorismate pyruvate lyase (IPL) (Vasyukova et Ozeretskoykaya, 2007).

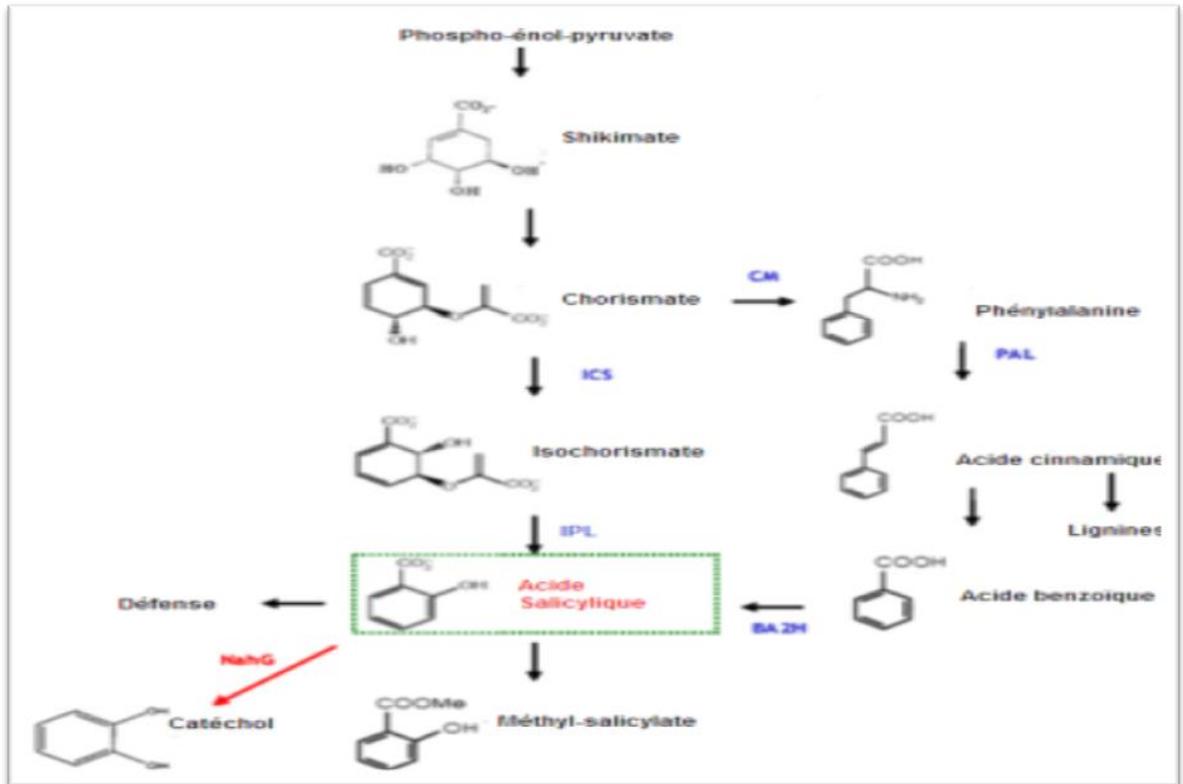


Figure 08: Représentation simplifiée des voies de biosynthèse de l'acide salicylique (Wildermuth *et al.*, 2001).

III.3. Rôle physiologique de l'acide salicylique

- L'AS exerce un rôle dans des phénomènes physiologiques comme la photosynthèse, la floraison, la perméabilité de la membrane, la production de chaleur, la croissance et développement des plantes, et les interactions plantes - pathogènes (Raskin, 1992 ; Hayat *et al.*, 2007).
- Il a été impliqué notamment dans le phénomène de SAR (C'est une réponse de résistance généralisée à la plante, déclenchée par une molécule chimique) où une plante devient résistante vis-à-vis d'un grand nombre d'agents pathogènes différents suite à une attaque locale par un microorganisme à virulent. L'application exogène d'AS peut protéger les plantes contre certains pathogènes et activer l'expression d'un groupe de gènes associés à la défense comme les gènes des protéines PRs lesquelles sont aussi induites dans les plantes infectées (van Loon, 1999).

- Dans une revue récente (Vasyukova et Ozeretskovskaya, 2007) l'implication du SA dans l'immunité des plantes est liée à 3 fonctions:
 - a.- L'AS est une molécule mobile capable d'intervenir dans la chaîne de perception, amplification et transmission de l'information quand une cellule de la plante est attaquée par un agent pathogène; ceci mène à l'expression de gènes de défense responsables de la protection structurale et fonctionnelle (Vasyukova *et al.*, 1999). L'AS migre dans les vaisseaux de la plante, et confère une immunité à distance aux tissus de la plante dans la SAR (Chen et Klessig, 1991 ; Raskin, 1992 ; Vernooij *et al.*, 1994). Dans des tissus de plantes infectées ou traitées avec un éliciteur les niveaux d'AS augmentent localement ou à distance (de l'ordre d'une magnitude ou plus). Un traitement avec l'AS peut induire les protéines PRs localement et systémiquement. Tout ceci indique que l'AS est impliqué dans la régulation de l'immunité induite de la plante.
 - b.- L'AS est impliqué (avec le peroxyde d'hydrogène, oxyde de nitrogène et d'autres composés) dans la fonction de plusieurs systèmes signal, et les unifie vers un réseau d'interactions régulatrices. Les catalases, ascorbate peroxydases, aconitases et certaines MAP kinases sont considérés comme des récepteurs d'AS (Farmer *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Cao et Dong, 1998; Mikołajczyk *et al.*, 2000). Il semble que le mécanisme d'action du SA soit déterminé par sa capacité de lier des enzymes, ce qui mène à la formation de radicaux phénol impliqués dans la peroxydation des lipides. Les produits de la peroxydation de lipides pourraient activer l'expression de gènes de défense (Farmer *et al.*, 1998).
 - c.- La capacité du SA d'inhiber l'activité de la catalase (enzyme qui détoxifie le peroxyde d'hydrogène) mène à une augmentation des taux de peroxyde d'hydrogène *in vivo* et induit un choc oxydatif aux sites de l'attaque par le pathogène ou du traitement avec un éliciteur (Chen et Klessig, 1991; Ruffer *et al.*, 1995; Panina *et al.*, 2004). Des similarités structurales entre SA et H₂O₂ sont à la base de la liaison et inhibition de la catalase par l'AS.
- En plus de sa fonction bien connue de régulation de la défense végétale, L'acide salicylique possède des actions thérapeutiques. Elle réduit la douleur (analgésique) en bloquant la production des hormones responsables des messages transmis aux récepteurs de la douleur dans le cerveau, d'où son efficacité sur les migraines et les douleurs d'origines diverses. Par le même mode d'action, elle réduit les inflammations

résultant d'une dilatation vasculaire, comme les coups de chaleur, qui ne s'accompagnent pas forcément de coups de soleil (Härtel, 204).

IV.1. Lieu d'étude

Cette étude est réalisée au niveau d'un laboratoire d'hygiène à proximité de sante publique de Bouira.

IV.2. L'objectif : L'objectif principal du présent travail était d'étudier les caractères généraux, la formation de biofilm avec AS et d'explorer les effets de la AS sur la croissance de *P. aeruginosa*.

IV. 3. Matériel :

- **Matériel biologique:** Nous avons utilisés souche de *Pseudomonas aeruginosa* a été isolé à partir d'un prélèvement de pus.
- **Instrument**
 - Anse de platine.
 - Microscope optique "Optikka".
 - Pince.
 - Pipette Pasteur.
 - Pipette graduées.
 - Boites de Pétri.
 - Tubes à essais.
 - Lames et lamelles.
 - Etuve (Venticell).
 - Autoclave (Wiseclave).
 - Bec Bunsen.
 - Spectrophotometer (Sicomman).
 - Agitateur (hotplate stirrer).
- **Autre produit**
 - Eau oxygénée.
 - bandelettes d'oxydases.
 - L'eau physiologie.
 - Eau distillé.
 - Acide salicylique.
 - Huile d'immersion.

IV.4.Méthode

IV.4.1.Etudes des caractères cultureux, morphologiques et biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa*

IV.4.1.1. Etude macroscopique des colonies

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

IV.4.1.2. Etude microscopique

La coloration de Gram « **Annexe 1** » permet non seulement d'observer la morphologie de cellules des *Pseudomonas* et leurs modes de regroupement, mais aussi de différencier ces bactéries à Gram négatif des bactéries à Gram positif (Denis, 2007).

IV.4.1.3. Croissance à 4°C et 42°C

P. aeruginosa estensemencée dans des boîtes de Pétri contenant le milieu ordinaire, ensuite elle est incubée à 4°C et 42°C pendant 48 heures. La lecture se base sur la présence ou l'absence de croissance (Ajello *et al.*, 1976)

IV.4.1.4. Recherche de l'oxydase

Ce test est basé sur la détection de la production de l'enzyme cytochrome oxydase par des bactéries oxydative (aérobie).

L'activité oxydase a été déterminée par la méthode des bandelettes d'oxydases. A l'aide d'une pipette Pasteur une colonie a été déposée sur la bandelette. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration violette, soit immédiatement, soit après quelques secondes. La lecture est limitée à 30s.

IV.4.1.5. Production de catalase

La catalase a été révélée en déposant sur une lame en verre propre, une colonie bactérienne en présence de H₂O₂. Une réaction catalase positive se traduit par l'apparition de bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Lévy *et al.*, 1992).

IV.4.1.6. Production des pigments

Les milieux King A et King B sont utilisés pour mettre en évidence successivement la pyocyanine et la pyoverdine de *P. aeruginosa*. En effet, la pyocyanine verdit le milieu King A et la pyoverdine jaunit le milieu King B. A l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile, des colonies bien isolées ont été prélevées etensemencées en stries serrées à la surface de chaque milieu. Ces boîtes de Pétri sont placés dans l'étuve à 37°C de 1 à 3 jours. La production de la pyocyanine est maximale sur le milieu King A et celle de la pyoverdine sur le milieu King B. La présence de pigment diffusible se traduit par l'apparition d'une couleur jaune-verdâtre pour la pyoverdine ou bleu-vert pour la pyocyanine qui peut diffuser sur toute la boîte.

IV.4.1.7. Utilisation du mannitol et recherche de la mobilité

Ce milieu semi-solide permet l'étude de la fermentation du mannitol et la mobilité de la souche.

Un tube de milieu mannitol mobilité est ensemencé par piqure centrale jusqu'au fond du tube et incubé pendant 24h à 37°C si le milieu devient jaune la bactérie est mannitol (+) et s'il y a formation de colonies en dehors de la ligne droite de la piqure centrale indiquant une mobilité positive.

IV.4.1.8. Recherche de type respiratoire

Pour savoir le type respiratoire des bactéries, nous avons ensemencé un tube contenant le bouillant de Viande-Foie par un ensemencement spirale de haut en bas et de bas en haut à l'aide d'une anse de platine contenant une culture prélevée à partir d'une boîte de *P. aeruginosa*.

Si la croissance de la bactérie est à la surface ce résultat révèle que la bactérie est aérobie stricte, si la croissance est au fond de tube, la bactérie dite anaérobie stricte.

IV.4.1.9. Hydrolyse de l'amidon

Le milieu amidon est préparé par l'addition de l'amidon à raison de 10g/l au milieu gélose nutritive. La souche est ensemencée en touches et l'incubation se fait 37°C pendant 48h, on peut rendre la lecture plus nette en versant sur le milieu quelques gouttes de lugol, si le pourtour de la colonie devient bleu alors la bactérie est dite amylase négative.

IV.4.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'Acide salicylique

Pour déterminer si la présence d'AS a eu des effets sur la croissance bactérienne en milieu liquide, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée en utilisant la méthode de dilution en bouillon (Moroh *et al.*, 2008).

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration de substances antibactériennes capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Ici sa détermination s'est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance des germes étudiés.

P. aeruginosa est inoculée dans un tube à raison de 10^5 UFC/ml soit 200 μ l de suspension bactérienne de DO \approx 0,04/tube ont été inoculés avec 2ml de milieu bouillon de

trypticase de soja ajusté avec les différentes concentrations de l'AS (10 mM - 5 mM - 2,5 mM - 1,25 mM - 0,62 mM - 0,31 mM - 0 mM) testées. Ces tubes sont incubés à 37°C pendant 24h.

La CMI correspondra donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. (Moroh *et al.*, 2008).

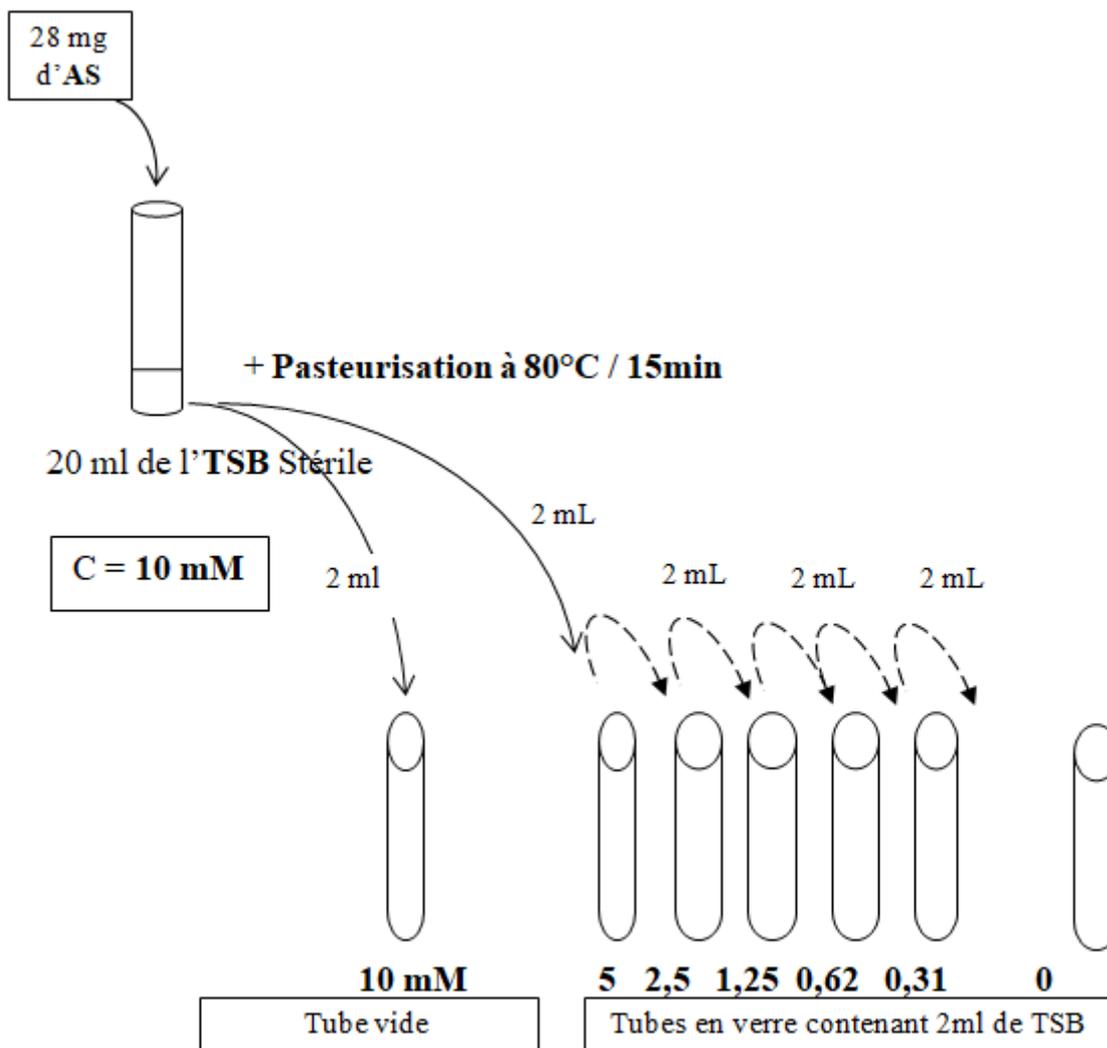


Figure 9 : Diagramme représentant les différentes étapes de préparation de déférent concentration testées.

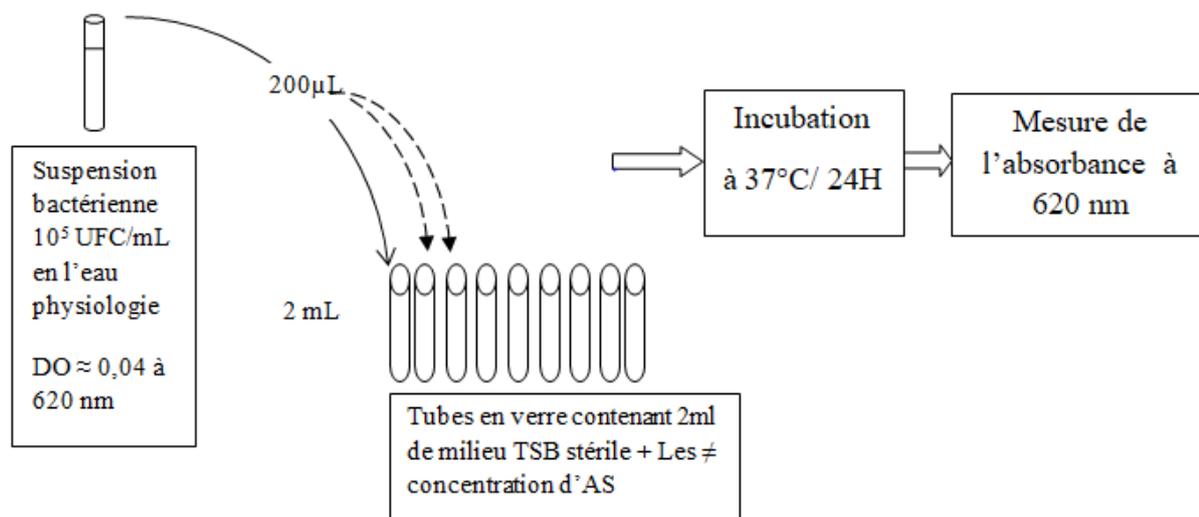


Figure10 : Diagramme représentant les différentes étapes de détermination de CMI de l'AS.

IV.4.3. Détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) de l'Acide salicylique

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

IV.4.4. L'étude de l'effet acide salicylique sur la formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa*

Dans le but d'étudier l'effet acide salicylique sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa*, nous avons utilisé la méthode d'analyse cristal violet (le cristal violet est une petite molécule qui diffuse à travers les membranes bactériennes et pénètre à l'intérieur des bactéries pour se complexer aux molécules chargées négativement) décrit par Djordjevic en 2002. Cette technique de quantification est parmi les méthodes indirectes d'estimation de la production de biofilm sur différents types de support (Djordjevic *et al.*, 2002). La coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé, et sa solubilisation permet une quantification de celui-ci (Musk *et al.*, 2005). En fonction de la lecture des densités optiques (DO) de la phase biofilm, les bactéries sont classées comme suit : non formatrices du biofilm, formation modérée, fortement formatrice du biofilm (Mathur *et al.*, 2006 ; Afreenich *et al.*, 2011 ; Bellifa, 2014).

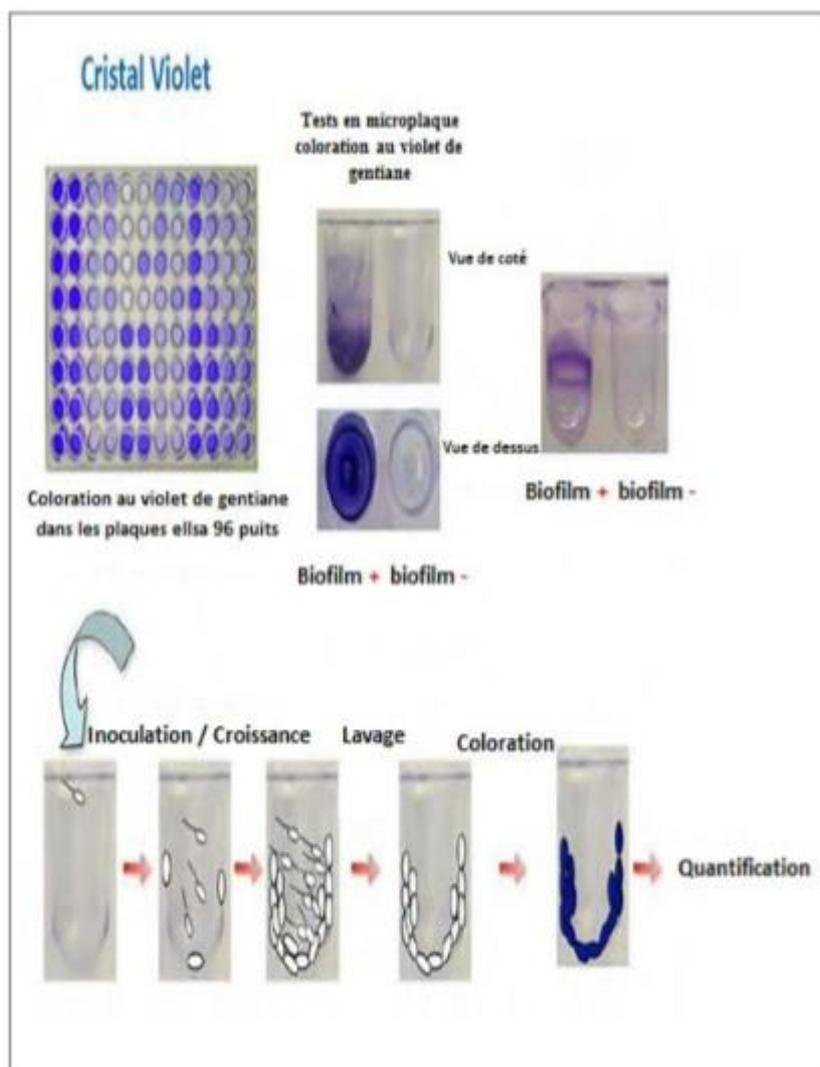


Figure 11 : Formation de biofilm en microplaques (Bellifa, 2014).

Pour *P. aeruginosa*, qui est une bactérie aérobie stricte, le biofilm se forme à l'interface air-liquide, ce qui correspond ici à la position de l'anneau violet. Le *Pseudomonas aeruginosa* est inoculée dans des tubes à raison de 10^5 UFC/ml soit 200 μ l de suspension bactérienne/tube, ces tubes contenant préalablement 2ml de milieu bouillon de trypticase de soja additionné par les différentes concentrations de l'AS (0 mM, 0,312mM, 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM, et 5mM). Ces tubes sont incubés à 37°C pendant 24h (Djordjevic *et al.*, 2002).

Après, chaque tube est soigneusement vidé de la culture bactérienne, et rincés 3 fois à l'eau distillée en vue d'éliminer les cellules planctoniques non adhérentes. La biomasse fixée sur les parois du tube (formation de biofilm) est révélée après coloration à l'aide d'une solution aqueuse de cristal violet. Après un temps de contact de 45 minutes, l'excès de

colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'eau distillée (jusqu'à l'obtention des gouttes transparentes). Les tubes sont enfin égouttés et mis à sécher à l'air libre. Le cristal violet fixé sur les parois du tube est solubilisé à l'aide d'une solution d'éthanol. Après 1 minutes du temps, La densité optique (DO à 580 nm) de 2 ml d'éthanol de chaque tube a été examinée à l'aide d'un spectrophotomètre (Djordjevic *et al.*, 2002).

La masse bactérienne accumulée au sein des biofilms formés est ainsi quantifiée. La quantité de colorant retenue étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries fixées.

V.1. Résultats

V.1.1. Etudes des caractères culturels, morphologiques et biochimie de *P. aeruginosa*

V.1.1.1. L'étude macroscopique

L'observation macroscopique a montré que la souche de *P. aeruginosa* ayant une forme plate opaque, bombée, de contour régulier et parfois irrégulier, avec un aspect métallique, une pigmentation jaune verdâtre présente dans le milieu King B (la pyoverdine) et bleu vert dans le milieu King A (la pyocyanine).

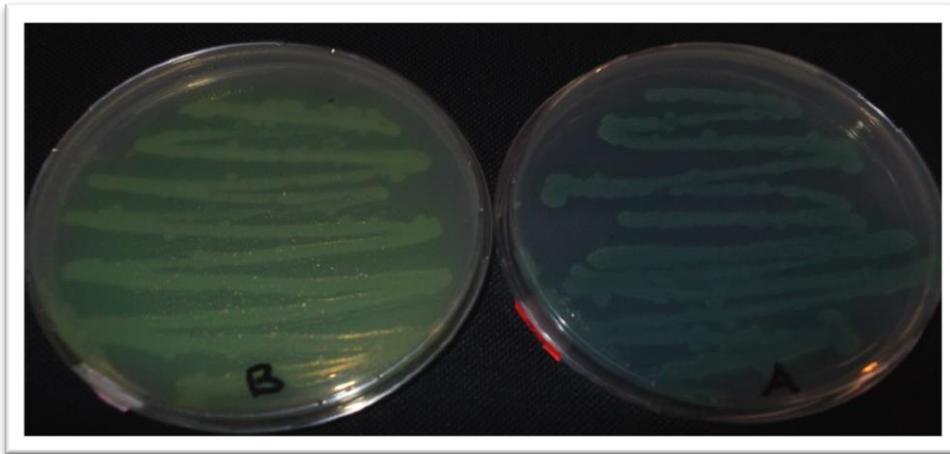


Figure 12: Aspect macroscopique de *P. aeruginosa* ensemencée sur King A et sur King B.

V.1.1.2. L'étude microscopique

L'observation microscopique de bactérie après la coloration de Gram de frottis réalisé à partir de culture purifiée a montré que la souche de *P. aeruginosa* apparaisse sous forme de bacille à couleur rose.

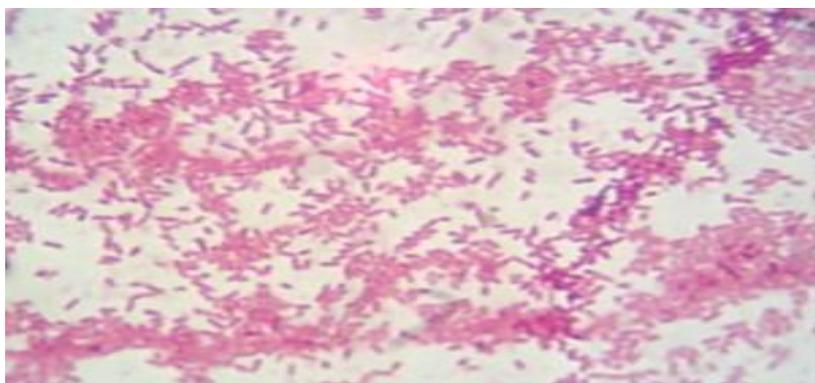


Figure 13: Observation microscopique de *P. aeruginosa* après une coloration de Gram (x100).

V.1.1.3. Croissance à 4°C et à 42°C

Après 48 heures d'incubation, la *P. aeruginosa* s'est développé à 42°C mais aucune culture n'a été obtenue à 4°C.

V.1.1.4. Test de l'oxydase

La zone réactionnelle sur la bandelette d'oxydase est colorée en bleu ou bleu-violet, ce qui suggère la présence du cytochrome oxydase.

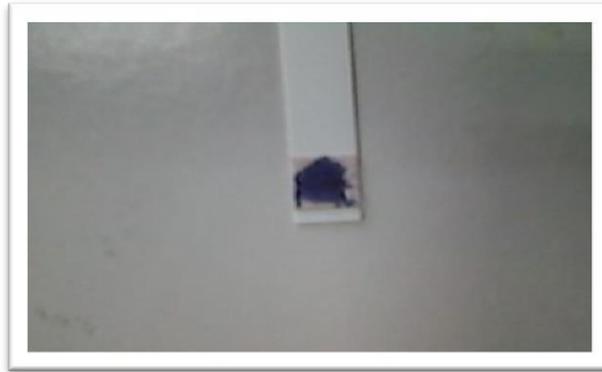


Figure 14: Résultat de test de pour l'oxydase le *P. aeruginosa*.

V.1.1.5. Test de la catalase

L'apparition des bulles de gaz après l'addition de H₂O₂, révèle une réaction positive.

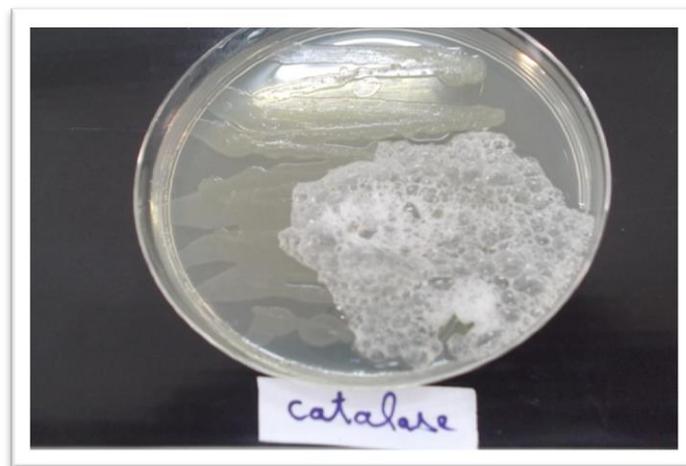


Figure 15: Résultat de test de la catalase pour le *P. aeruginosa*.

V.1.1.6. Recherche de type respiratoire

La croissance en surface (partie supérieure) du milieu viande-foie (VF), révèle que le *P. aeruginosa* aérobie stricte.



Figure 16: Résultat de recherche de type respiratoire pour le *P. aeruginosa*.

V.1.1.7. Utilisation du mannitol et recherche de la mobilité

La dispersion de bactérie dans le milieu mannitol mobilité, révèle que le *P. aeruginosa* est mobile et peuvent se déplacer dans la gélose molle du milieu utilisé. L'absence de dégradation du mannitol révèle que le *P. aeruginosa* mannitol négatif.

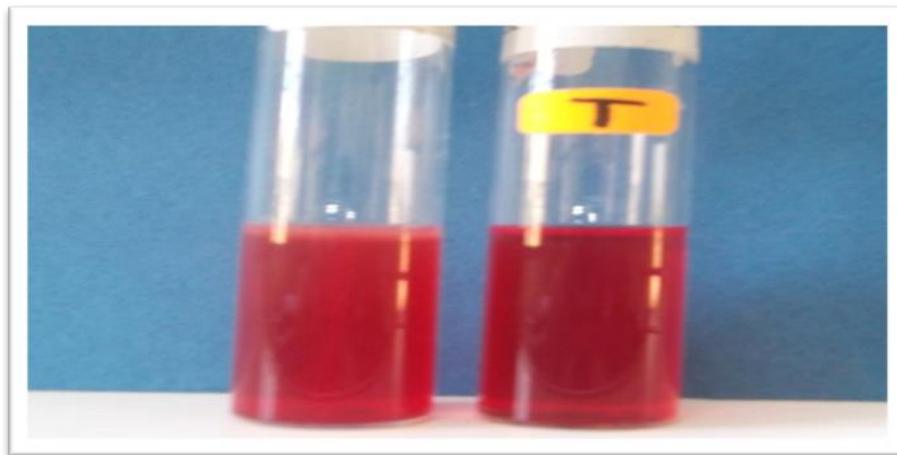
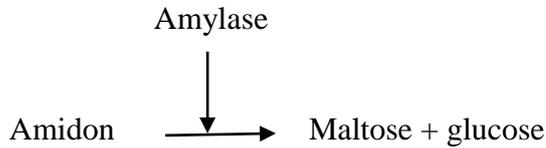


Figure 17 : Résultat de test mannitol mobilité pour le *P. aeruginosa*.

V.1.1.8. Dégradation de l'amidon

Le *P. aeruginosa* ne possède pas l'enzyme amylase qui dégrade l'amidon selon la réaction suivante:



Cette hydrolyse est mise en évidence par l'ajout d'une solution iodée « LUGOL » sur le milieu, l'iode donne une coloration bleue violette avec l'amidon. Seule la zone où l'amidon a été hydrolysé par notre bactérie donne un halo doré autour de la culture.

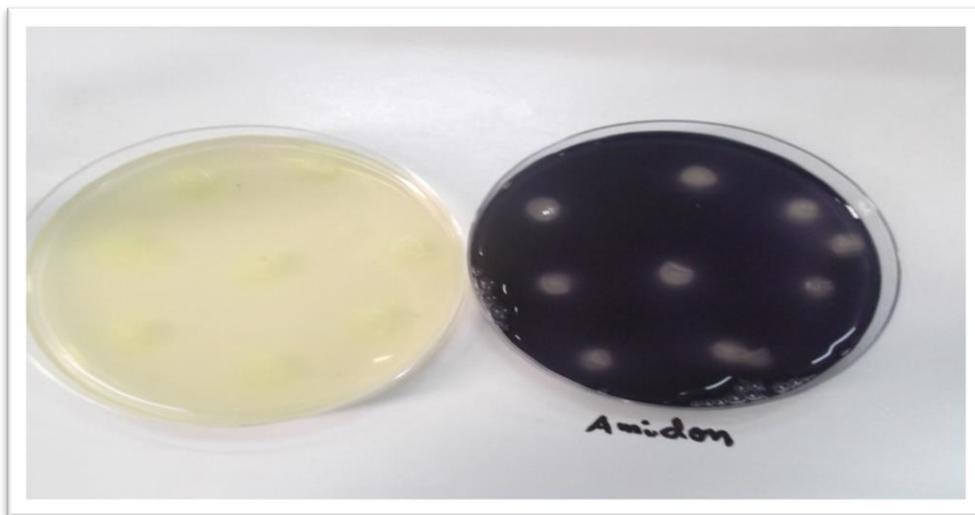


Figure 18: Résultat de dégradation de l'amidon pour le *P. aeruginosa*.

V.1.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de l'Acide salicylique

Les différentes valeurs de la turbidité due à la croissance de *P. aeruginosa* sont présentées dans la figure 19.

Les troubles bactériens observés lors de la croissance montrent que les concentrations élevées de l'AS brut (0,31- 0,62- 1,25- 2,5- 5- 10mM) provoquant une diminution progressive de la turbidité dans les tubes où la courbe présente une allure décroissante remarquable à partir de concentration 2,5mM. (Figure 20).

Les résultats que nous avons obtenus comparativement aux témoins montrent qu'avec l'augmentation de la concentration de l'AS ; il y a une diminution du nombre de bactéries.

Nous avons noté une absence de la croissance à la concentration de 2,5 mM, cette concentration correspond à la concentration minimale inhibitrice de l'AS sur les *P. aeruginosa* testés (Figure n°20).

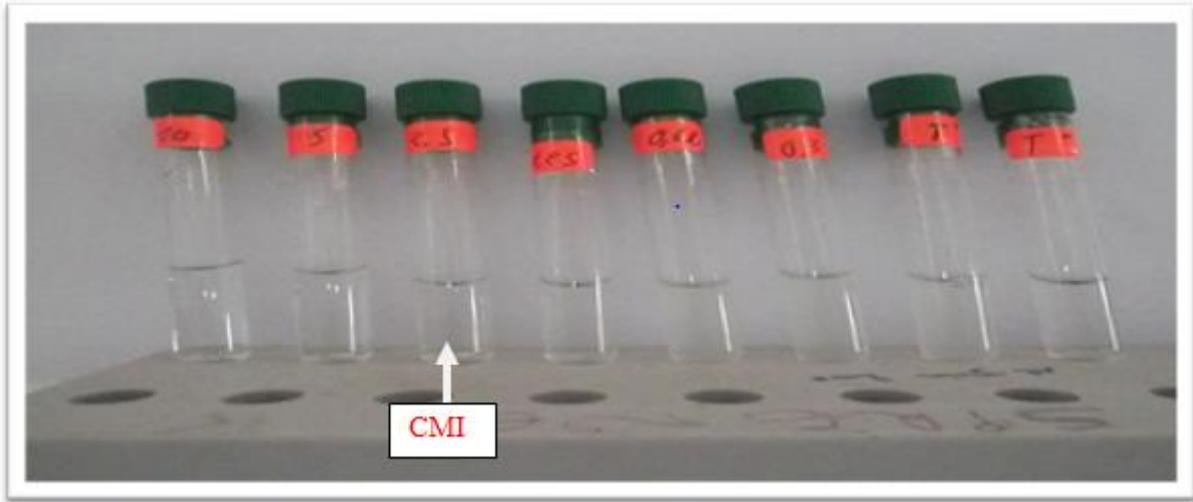


Figure 19: Variation de la turbidité due à la croissance de *P. aeruginosa* en fonction de la concentration de l'acide salicylique.

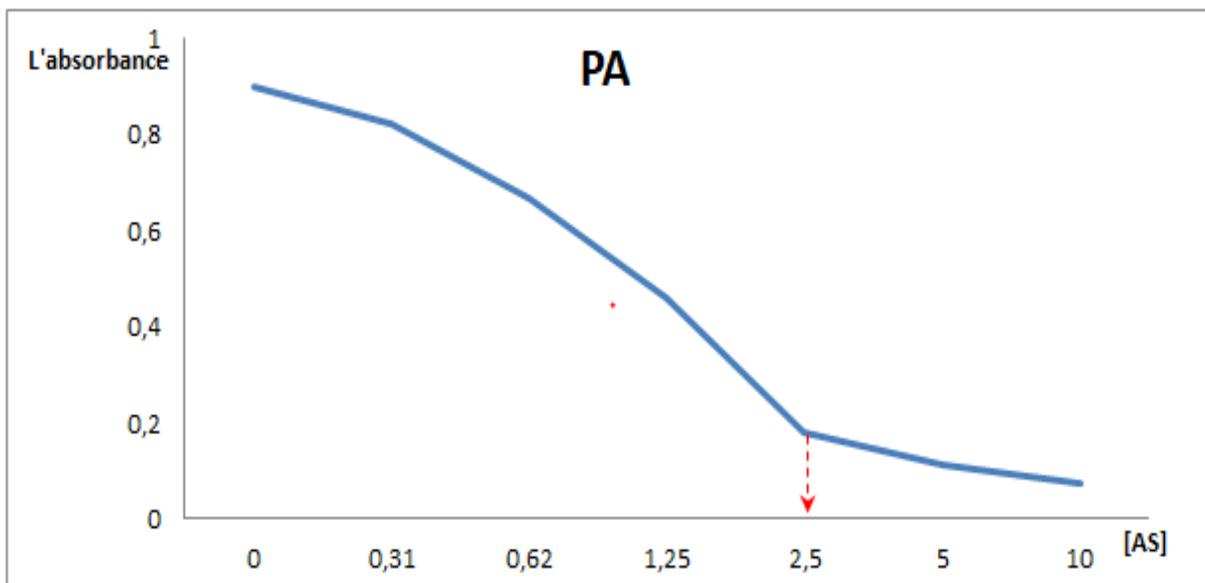


Figure 20 : Variation de la turbidité induite par la croissance de *P. aeruginosa* en fonction de la concentration en AS.

L'absorbance : 620 nm, [AS] : la Concentration de l'AS en mM.

V.1.3. Concentrations Minimale Bactéricide (CMB) de l'acide salicylique

Par la méthode de dilution en milieu liquide couplé avec un ensemencement sur milieu gélosé, on remarque un pouvoir bactéricide contre *P. aeruginosa* par rapport à différentes concentrations de l'AS, où il a été constaté une CMB de 10mM d'acide salicylique.

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

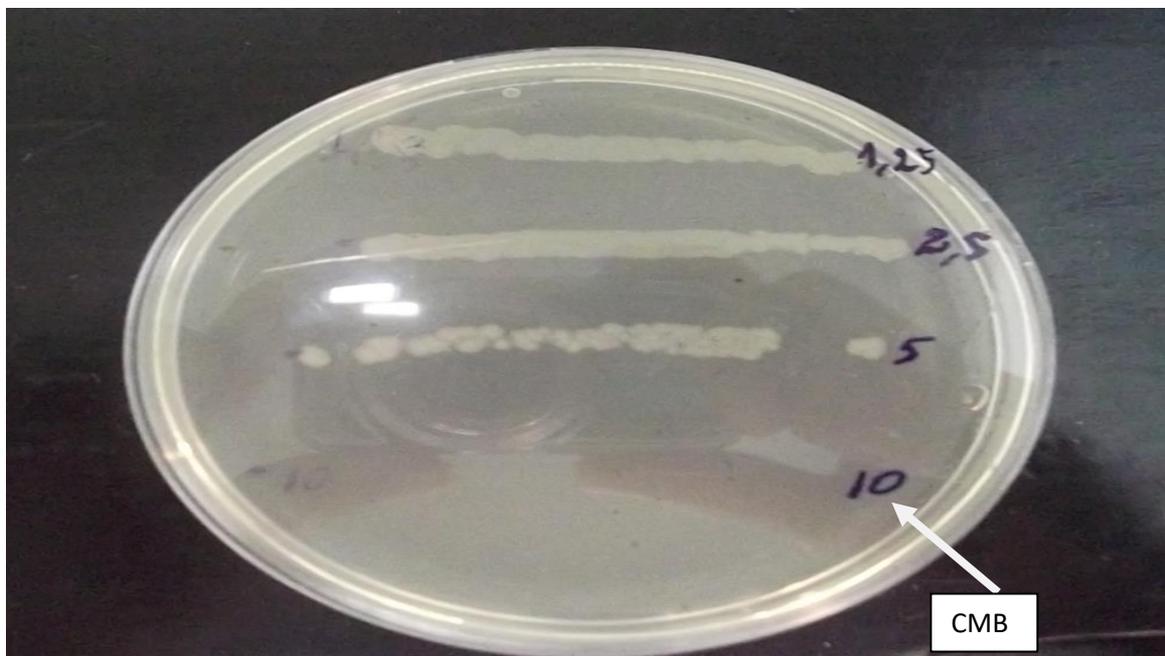


Figure 21 : Résultat de CMB de l'acide salicylique.

V.1.4. L'effet de l'acide salicylique sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa*

Le développement de biofilm est associé à la résistance antibactérienne et peut contribuer à des infections sévères (Høiby *et al.*, 2010). Pour tester si la présence d'AS affecté la formation de biofilm de *P. aeruginosa*, nous avons effectué une expérience in vitro dans laquelle AS a été complété dans le milieu de culture avec différentes concentrations.

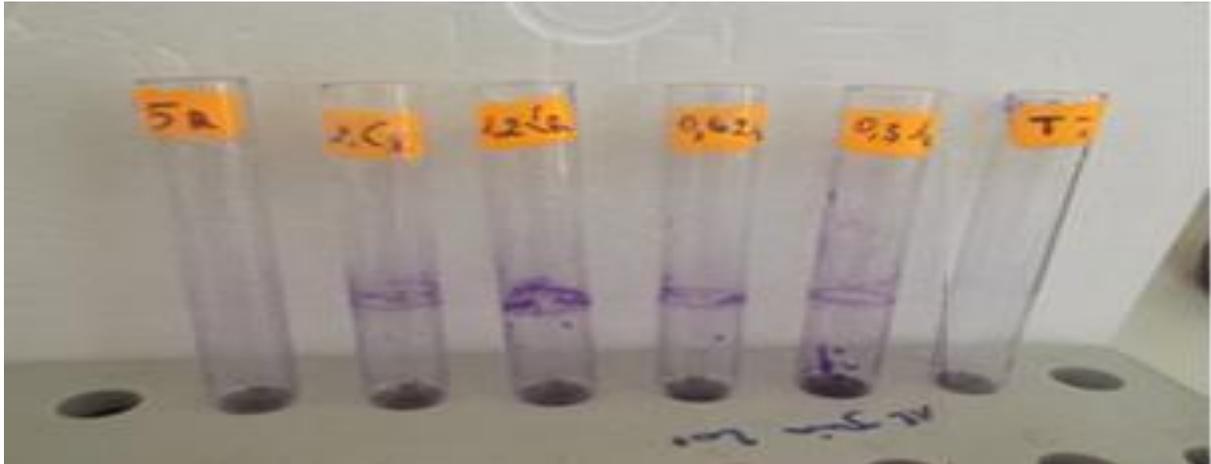


Figure 22 : Résultats de l'effet de l'acide salicylique sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa*.

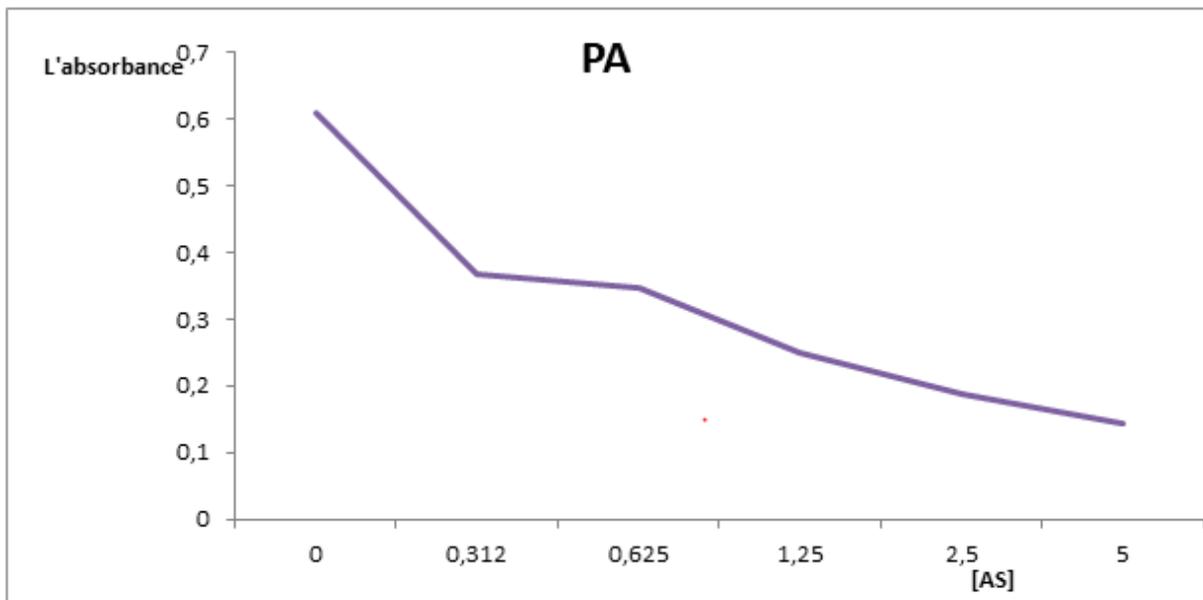


Figure 23 : Résultat d'évaluation de la biofilm de *P. aerogenosa* par analyse cristal violet.

L'absorbance : 580 nm, [AS] : la Concentration de l'AS en mM.

D'après les résultats obtenus, Il est clairement remarqué une diminution de la formation des biofilms de *P. aeruginosa*. En effet, la réduction de la formation des biofilms augmente avec l'augmentation des concentrations de l'AS.

Par ailleurs, la lecture des résultats rapportés dans les figures montre qu'en absence de *P. aeruginosa* dans le tube témoins, le biofilm n'est pas formé avec une valeur moyenne de densité optique de 0,12.

Parallèlement, après addition de concentrations croissantes en AS (0mM, 0,312mM, 0,625mM, 1,25mM, 2,5mM et 5mM) en présence, d'une part, de *P. aeruginosa*, les valeurs de densités optiques enregistrées étaient de l'ordre de 0,632-0,494-0,451- 0,365 -0,241 -0,183 (Figure 23).

P. aeruginosa a été fortement formatrices du biofilm dans les tube où les concentrations de l'AS (0mM, 0,312mM), la formation modérée dans les tube où les concentrations de l'AS (0,625mM, 1,25mM), et la faible formatrice du biofilm dans les tube où les concentrations de l'AS (2,5mM, 5mM).

Les résultats que nous avons obtenus montrent qu'avec l'augmentation de la concentration de l'AS ; il y'a une diminution de la formation de biofilm de *P. aeruginosa*.

Ces résultats nous amènent à conclure que l'AS inhibe la formation de biofilm de *P. aeruginosa*.

V.2. Discussion

La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. Parmi les bactéries possédant cette capacité, *P. aeruginosa* possède de nombreux facteurs de virulence lui conférant l'aptitude de former les biofilms sur des surfaces inertes ou vivantes avec une grande tolérance aux agents antimicrobiens (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011).

En raison de la persistance des biofilms et de l'augmentation de la multirésistance, les antibiotiques pourraient être moins actifs contre les bactéries intégrées dans un biofilm, ce qui permettrait d'étudier l'activité antimicrobienne de l'AS contre les planctoniques, mais aussi contre les bactéries. les organismes associés au biofilm (del Prado *et al.*, 2010).

Dans cette étude qui consiste à tester l'effet l'AS sur la formation de biofilms de *P. aeruginosa*.

Les résultats des tests effectués ont montré un effet important de l'acide salicylique sur la formation de biofilm de *P. aeruginosa* comparé à une étude récente menée par Mei *et al.* (2010) qui a démontré que la densité décroissante de biofilm avec l'augmentation de la

concentration de l'acide salicylique est dû à l'effet de ce dernier sur sa formation. En outre, cette étude suggère que l'acide salicylique pouvant interférer dans la formation de biofilm par *P. aeruginosa*.

Un certain nombre d'études ont montré que l'AS peut réduire la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (Prithviraj *et al.*, 2005, Mei *et al.*, 2010, Samuel *et al.*, 2011). On a trouvé que les films des polymères libérant de l'acide salicylique inhibaient la formation de biofilm par *P. aeruginosa* et *E. coli* (Nowatzki *et al.*, 2012).

Une hypothèse qui pourrait expliquer l'inhibition du biofilm observée est que l'AS affecte d'une manière ou d'une autre le sens de quorum sensing (QS) (Davies *et al.*, 1998).

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

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

Conclusion

Après les résultats obtenus, nous pouvons conclure qu'AS inhibe la croissance bactérienne dépendante des concentrations. Les CMI et MBC de AS ont été enregistrés autour de 2,5 et 10 mM respectivement. Nous pouvons également retenir qu'AS réduit la formation de biofilm par *Pseudomonas*.

En perspectives, les recommandations suivantes sont suggérées:

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

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

Références bibliographiques

A)

- Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez, Mand Prince A(2004). *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialo GM1 and Toll-like receptor 2 as well as Toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **30** : 1–8.
- Adonizio A, Kong K, Mathee K (2008). Inhibition of quorum-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plants extracts. *Antimicrob Agents Chemother*, **52** (1): 198-203.
- Ajello GW, Hoadley AW(1976). *Pseudomonas* fluorescents capables de croître à 41°C mais distincts de *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*. **4** (5): 443-449.
- Allen L, Dockrell H, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, Whyte MK (2005). Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol*. **174**: 3643-3649.
- Avidano MA, Cotter CS, Stringer SP, Schultz G (1998). Analysis of protease activity in human otitis media. *Otolaryngol Head Neck Surg* **119** : 346-51.
- Azghani AO, Idell S, Bains M, Hancock RE (2002). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb Pathog*, **33**:109-114.

B)

- Bandara BM, Zhu H, Sankaridurg PR, Willcox MD (2006). Salicylic acid reduces the production of several potential virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* associated with microbial keratitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, **47** : 4453– 4460
- Barker AP, Vasil AI, 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) : 1089-98.
- Bellifa S (2014). *Evaluation de la formation du biofilm des souches de Klebsiella pneumoniae isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen*. Thèse de doctorat, Université abou bekr belkaid, Tlemcen, 90p.

- Ben Haj Khalifa A, Moissenet D, Vu Thien H, Khedher M (2011). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. *Ann Biol Clin*, **69**(4): 393-403.
- Bendinger B, Rijnaarts HH, Altendorf K, Zehnder AJ (2003). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and environmental microbiology*, **59**(11): 3973-3977.
- Berthelot P, Attree I, Plesiat P, Chabert J, Bentzmann S, Pozzetto B, Grattard F (2003). Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes. *J Infect Dis*, **188**(4) : 512-8.
- Berto P, Commenil P, Belingheri L, Dehorter B (1999). Occurrence of à lipase in spores of *Alternaria brassicicola* with a crucial role in the infection of cauliflower leaves. *FEMS Microbiol Lett*, **180**(2) : 183-9.
- Biyiti LF, Meko'o D-JL, Tamzc V, Amvam Zollo PH (2004). Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharm Méd Trad Afr*, **13** : 11-20.
- Bourion F (1995). *Etude de la formation et de la désinfection de biofilms mono- et bimicrobiens de Pseudomonas aeruginosa et de Listeria innocua*. Thèse de doctorat de l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaire, Massy, France, 96p.
- Boyd A, Chakrabarty AM (1994). Rôle of Alginate Lyase in Cell Detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(7) : 2355–2359.
- Branger A, Richer MM, Roustel S (2007). *Quelque système microbien : les biofilms*. Dans : *Microbiochimie et alimentation*. Educagri éditions, dijon. p.131-164.
- Braun P, Ockhuijsen C, Eppens E, Koster M, Bitter W, J. Tommassen (2001). Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Formation of the disulfide bonds*. *J. Biol. Chem*, **276**:26030-26035.

C)

- Cao H, Li X, Dong X (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**: 6531-6536.
- Carpentier IP, Morillon M, Petrognani R, Cavallo JD (2003). Infections à bacille pyocyanique. *Encycl Méd Chir*, **8** : 25-50.
- Chalvet A (2009). *Les biofilms et la peau*. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire, École Nationale Vétérinaire D'alfort, Paris, 110 p.
- Chen L, Wen YM (2011). The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *International Journal of Oral Science*, **3** : 66–73.
- Chen Z, Klessig DF (1991). Identification of a soluble salicylic acid binding protein that may function in signal transduction in the plant disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 8179–8183.
- Comolli JC, Hauser AR, Waite L, Whitchurch CB, Mattick JS, Engel JN (1999). *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* **67**: 3625-3630.

D)

- Da ML, Heroux AK, Pakzad Z, Schiffmacher KFES (2010). Salicylic acid attenuates biofilm formation but not swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, **14** : 69-73.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, **280** : 295-298.
- Del Prado G, Ruiz V, Naves P, Rodríguez-Cerrato V, Soriano F, del Carmen Ponte M (2010). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strains and effects of human serum albumin, ibuprofen, N-acetyl-l-cysteine, amoxicillin, erythromycin, and levofloxacin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **67** : 311–318.

- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, GutRella, M, Kessmann H, Ward E, Ryals J (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science*, **266** : 1247-1250.
- Denning GM, Wollenweber LA, Railsback MA, Cox CD, Stoll LL, Britigan BE (1998). *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun*, **66**(12): 5777-5784.
- Diarra F (2009). *Fréquence d'isolement des Pseudomonas au laboratoire de bactériologie CVD du CHU Gabriel Toure de 2002 à 2008*. Thèse de doctorat. Université de Bamako, Mali, 53p.
- Djordjevic D, Wiedmann M, Mclandsborough LA (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **68** :2950-2958.
- Donlan RM (2002). Biofilms: Microbial life on surface. *Emerging Infectious Disease journal*, **8**(9): 881-890.
- Durrant W, Dong X (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopahtol*, **42**:185-209.
- Dutta NK, Mazumdar K, Baek MW, Kim DJ, Na YR, Park SH, ... Park JH (2008). In vitro efficacy of diclofenac against *Listeria monocytogenes*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **27** : 315–319.

E)

- Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ (1998). Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, **273**(27) : 16792-7.
- Evans LR, Linker A (1973). Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **116** : 915-924.

F)

- Farmer EE, Weber H, Vollenweider S (1998). Fatty acid signaling in Arabidopsis. *Planta*, **206**: 167–174.

•Filloux A, Vallet I (2003). Biofilm: set-up and organization of a bacterial community. *Med. Sci. (Paris)*, **19**: 77-83.

•Floret D (2009). Immunization: process of elaborating guidelines and their evolution in France. *Ann Pharm Fr*, **67** : 219-223.

G)

•Galloway DR (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol Microbiol*, **5**(10) : 2315-21.

•Green SK, Schroth MN, Cho J, Kominos SK, Vitanza-Jack VB (1974). Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol*, **28** : 987-991.

H)

•Härtel C, J Von Puttkamer et al., (2004). « Dose-dependent Immunomodulatory Effects of Acetylsalicylic Acid and Indomethacin in Human Whole Blood: Potential Role of Cyclooxygenase-2 Inhibition ». *Scand. J. Immunol*, **60**(4) : 412–420.

•Herrmann K, Weaver LM (1999). The shikimate pathway. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio*, **50**: 473-503.

•Hogan DA, Kolter R (2002). *Pseudomonas*-*Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science*, **296**(5576) : 2229-32.

•Højby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **35**: 322-332.

•Hong YQ, Ghebrehiwet B (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol*, **62**(2) : 133-8.

I)

•Irie Y, Parsek M (2008). Quorum sensing and microbial biofilm. *Curr Top Microbiol Immunol*, **322**: 67-84.

J)

•Jarlier V, Fosse T, Philippon A (1996). Antibiotic susceptibility in aerobic gram negative bacilli isolated in intensive care units in 39 French teaching hospitals (ICU study). *Intensive Care Med*, **22**(10):1057–65

K)

•Kamal EM (2011). *Etude épidémiologique des infections à Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat, Université Mohammed V-souissi Faculté de médecine et de pharmacie-Rabat, 143 p.

•Khalilzadeh P (2009). *Formation de biofilm à Pseudomonas aeruginosa : évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing*. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, 90 p.

•Kim J, Park H.D, Chung S (2012). Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules*, **17**: 9818-9834.

•Klein G (2011). *Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines*. Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale, Bretagne, 90 p.

•Krall, R, Sun J, Pederson KJ, Barbieri JT (2002). In vivo rho GTPaseactivating protein activity of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoS. *Infect Immun*, **70**(1) : 360-7.

•Kukavica-Ibrulj I (2007). *Génomique fonctionnelle du régulateur transcriptionnel PYCR de Pseudomonas aeruginosa essentiel in vivo et comparaison des cinétiques d'infection pulmonaire chronique*. Thèse de doctorat. Faculté de médecine. Université Laval Québec.

•Kus JV, Zaton K, Sarkar R, Cameron RK (2002). Age-related resistance in Arabidopsis is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, **14** : 479–490.

L)

•Lahaye E (2006). *Rôle structurant des exopolysaccharides dans un biofilm bactérien*. Thèse de doctorat, l'Université de Bretagne-Sud, Sud, 120 p.

- Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*, **10**:599-606.
 - Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun*, **72**: 4275-4278.
 - Leclerc H (2002). Presse therm climat bacteriologie de *Pseudomonas aeruginosa*. Société française d'hydrologie et de climatologie médicales.
 - Lie SA, Fousam K (2002). *Sensibilité et révolution de la résistance de Pseudomonas aeruginosa aux antibiotiques à l'hôpital du Point G*. Thèse de doctorat, Université Libre de Bruxelles d'Europe, France, 15 p.
 - Liesse Iyamba JM (2012). *Etude de l'interaction des souches cliniques de Staphylococcus aureus avec une surface abiotique*. Thèse de doctorat, Université Libre de Bruxelles d'Europe, France, 75 p.
 - Lilet C, Bourdon J, Toma B, Marchal N, Balbastre C (1983). *Bactériologie médicale et vétérinaire- systématique bactérienne*. Edition DOIN, p150-190.
 - Loake G, Grant M (2007). Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol*, **10**: 466-472.
 - Luberto C, Stonehouse MJ, Collins EA, Marchesini N, El-Bawab S, Vasil AI, Vasil ML, Hannun YA (2003). Purification, characterization, and identification of a sphingomyelin synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. PlcH is a multifunctional enzyme. *J Biol Chem*, **278**(35) : 32733-43.
- M)**
- M (2010). *Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants*. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France, 70p.
 - Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **24** (1):259.
 - McCarter LL (2006). Regulation of flagella. *Curr Opin Microbiol*, **9** : 180-186.

- Méar JB (2014). *Étude de la modulation de la virulence de Pseudomonas aeruginosa par Candida albicans dans un modèle de pneumonie*. Thèse de doctorat, Université Lille nord de France, France, 160 p.
- Mei LD, Aron K, Heroux, Zahra P, Karl FS (2010). Salicylic Acid Attenuates Biofilm Formation But Not Swarming In *Pseudomonas aeruginosa*. *Experimental Microbiology and Immunology*, **14** : 69-73.
- Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect*, **13**(6):560-78.
- Mikolajczyk M, Awotunde OS, Muszynska G (2000). Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cell. *Plant Cell*, **12**:165–178.
- Moroh JLA, Bahi C, Dje K, Loukou YG, Guede Guina F (2008). Study of the antibacterial activity of Morinda morindoides (Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetatique extract (ACE) on in-vitro growth of Escherichia coli strains. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, **77** : 44 – 61.
- Musk DJ, Banko DA, Hergenrother PJ (2005). Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry et Biology*, **12**: 789– 796.

N)

- Nestorovich EM, Sugawara E, Nikaido N, Bezrukov SM (2006). *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF: properties of the channel. *J Biol Chem*, **281**:16230-16237.
- Nobbs AH, Lamount RJ, Jenkinson H (2009). *Streptococcus* adherence and colonization, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **73** (3) : 407-505.
- Nowatzki PJ, Koepsel RR, Stoodley P, Min K, Harper A, Murata H, Donfack, J, Hortelano ER, Ehrlich GD, Russell AJ (2012). Salicylic acidreleasing polyurethane acrylate polymers as antibiofilm urological catheter coatings. *Acta Biomaterialia*, **8** : 1869-1880.

O)

- O'Malley YQ, Reszka KJ, Spitz DR, Denning GM, Britigan BE (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **287**(1): 94-103.
- O'Toole GA, Kolter R (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, **30**: 295-304.

P)

- Panina YS, Gerasimova NG, Chalenko GI, Vasyukova NI, Ozeretskoykaya OL (2004). Salicylic Acid and Phenylalanine Ammonia-Lyase in Potato Plants Infected with the Causal Agent of Late Blight. *Russian Journal of Plant Physiology*, **52**: 511–515.
- Perrin C (2009). *Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'Escherichia coli K-12*. L'Université Lyon I - Claude Bernard, France.
- Polonio RE, Mermel LA, Paquette GE, Sperry JF (2001). Eradication of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **45** : 3262–3266.
- Prithiviraj B, Bais HP, Weir T, Suresh B, Najarro EH, Dayakar BV (2005). Down regulation of virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* by salicylic acid attenuates its virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*, **73** : p.95319-95328.
- Projan SJ, Youngman PJ (2002). Antimicrobials: New solutions badly needed. *Current Opinion in Microbiology*, **5**: p. 463–465.

R)

- Raskin I (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **43**: p. 439-463.
- Renner LD, Weibel DB (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull*, **36**: p. 347-355.

Reslinski A, Dabrowiecki S, Glowacka K (2015). The impact of diclofenac and ibuprofen on biofilm formation on the surface of polypropylene mesh. *Hernia*, **19**: p. 179–185.

• Rocchetta HL, Burrows LL, Lam JS (1999). Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**(3) : p. 523-53.

• Rosenau F, Jaeger K (2000). Bacterial lipases from *Pseudomonas*: regulation of gene expression and mechanisms of secretion. *Biochimie*, **82**(11) : p. 1023-32.

• Rossolini GM, Mantengoli E (2005). Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*, **11** : p. 4 17-32.

• Roux D, J-D Ricard (2013). *Nouveautés et perspectives thérapeutiques des pneumonies acquises sous ventilation mécanique à Pseudomonas aeruginosa*. Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMRS-722, F-75018, Paris, France. p 282.

• Ruffer M, Steipe B, Zenk MH (1995). Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Letters*, **377**: 175–180.

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

S)

• Samuel C, Kevin G, Lucy J, Anthony N (2011). Salicylic Acid Affects Swimming, Twitching and Swarming Motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in Decreased Biofilm Formation. *Experimental Microbiology and Immunology*, **15** : 22 – 29.

• Sato H, Frank DW, Hillard CJ, Feix JB, Pankhaniya RR, Moriyama K, Finck-Barbancon V, Buchaklian A, Lei M, Long RM, Wiener-Kronish J, Sawa T(2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *Embo J*, **22**(12) : 2959-69.

• Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, **184** (4) : 1140-1154.

• Shankar S, Ye RW, Schlichtman D, Chakrabarty AM (1995). Exopolysaccharide alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: enzymology and regulation of gene expression. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **70** : 221-255.

•Stonehouse MJ, Cota-Gomez A, Parker SK, Martin WE, Hankin JA, Murphy RC, Chen W, Lim KB, Hackett M, Vasil AI, Vasil ML (2002). A novel class of microbial phosphocholine-specific phospholipases C. *Mol Microbiol*, **46**(3) : 661-76.

•Stoodley P, K Sauer, DG Davies, JW Costerton (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, **56**: 187-209.

•Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 an opportunistic pathogen. *Nature* 2000,**406** (6799) : 959-64.

T)

•Takase H, Nitanai H, Hoshino K, Otani T (2000). Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun*, **68**: 1834–1839.

•Toutain C M, Zegans ME, O'Toole GA (2005). Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **187** : 771-777.

V)

•Vallis AJ, Finck-Barbancon V, Yahr TL, Frank DW (1999). Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells. *Infect Immun*, **67**(4) : 2040-4.

•van Loon LC, Van Strien EA (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Mol plant Pathol*, **55**(2): p. 85-97.

•Vasyukova NI, Ozeretskovskaya OL (2007). Induced Plant Resistance and Salicylic Acid: A Review. *App. Biochem Microbiol*, **43**: p 367–373.

•Vasyukova NI, Gerasimova NG, Ozeretskovskaya OL (1999). *Prikl. Biokhim. Mikrobiol*, **35**: p 557–563.

•Vernooij B, Friedrich L, Morse A, Reist R, Kolditz-Jawhar R, Ward E, Uknes S, Kessmann H, Ryals J (1994). Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*, **6**: p 959-965.

W)

•Wahl M (1989). Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series*, **58** : p 175-189.

•Wall D, Kaiser D (1999). Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol*, **32**: p 1-10.

•Wang WH, Wong WM, Dailidienė D, Berg DE, Gu Q, Lai KC, Wong BC (2003). Aspirin inhibits the growth of *Helicobacter pylori* and enhances its susceptibility to antimicrobial agents. *Gut*, **52** : p 490–495.

•Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**(6863): p 562-565.

•Wilhelm S, Tommassen J, Jaeger KE (1999). A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **181**(22) : p 6977-86.

•Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47** : p 317–323.

Y)

•Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW (1998). ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(23) : 13899-904.

•Yalpani N, Leon J, Lawton MA, Raskin I (1993). Pathway of salicylic-acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol*, **103**: p 315–321.

•Yang L, Rybtke MT, Jakobsen TH, Hentzer M, Bjarnsholt T, Givskov M, Tolker-Nielsen T (2009). Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*, **53**: 2432-2443.

Z)

- Zhang S, Du H, Klessig DF (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell*, **3**: p 435–450.
- Zuckert WR, Marquis H, Goldfine H (1998). Modulation of enzymatic activity and biological function of *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase C by amino acid substitutions and by replacement with the *Bacillus cereus* ortholog. *Infect Immun*, **66**(10) : p 4823-31.

Annexe

Annexe 1 : Les étapes de la 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.
- Fixer la préparation à la flamme, sécher soigneusement puis laisser refroidir la lame.
- Recouvrir la lame de violet de gentiane phéniqué et laisser agir une minute.
- Rincer rapidement à l'eau et éliminer l'excès d'eau.
- Recouvrir la lame de lugol et laisser agir une minute.
- Rincer rapidement à l'eau et éliminer l'excès d'eau.
- Décolorer avec un alcool.
- Recouvrir la lame de fuchsine et laisser agir une minute.
- Rincer abondamment à l'eau du robinet.
- A la fin on observe à l'objectif (X100), à l'aide d'huile d'immersion.

Annexe 2 : Les milieux de culture et les réactifs

1) Les milieux de culture

- **Gélose nutritive (GN)**

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

- **King A solide**

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

- **King B solide**

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

- **Milieu TSB (Tryptic Soy Broth)**

Digestion pancréatique de caséine :	17 g/L
Digestion enzymatique de farine de soja :	3 g/L
NaCl :	5 g/L
K ₂ HPO ₄ :	2,5 g/L
Dextrose :	2,5 g/L
Eau distillée :	1000mL
pH :	7,2

- **Mannitol**

Peptone trypsique de viande	20 g/L
Mannitol	2 g/L
RP 1%	4mL
Nitrate K	1 g/L
Agar	4 g/L
pH :	7,6-7,8

- **le milieu viande de foie**

Base viande foie	30,0 g/L
Glucose	2,0 g/L
Agar	6,0 g/L
pH	7,4

- **Gélose à l'Amidon**

Peptones	5 g/L
Amidon (1%)	10 g/L
Agar	10 g/L
Eau distillée	1000 ml

2) Réactifs

- **Violet de gentiane:**

Phénol.....	2.0 g
Violet de gentiane.....	1.0 g
Éthanol à 90°.....	10 ml
Eau distillée.....	100 ml

- **Lugol**

Iodure de potassium.....	2.0 g
Iode métalloïde.....	1.0 g
Eau distillée	300 ml

- **Fuschine**

Fuchine basique.....	1.0g
Phénol.....	5.0 g
Éthanol à 90°.....	10 ml
Eau distillée	100 ml

- **Cristal violet (1%)**

Cristal violet.....	1g
Eau distillée.....	100ml

- **Alcool (éthanol)**

Annexe 3

Tableau 1 : résultats de l'effet de l'AS dans le milieu TSB sur la croissance bactérienne.

[AS] mM	0	0,31	0,62	1,25	2,5	5	10
Trouble	+	+	+	+	-	-	-
L'absorbance	0,898	0,820	0,669	0,461	0,182	0,111	0,072

(+) : présence de trouble, (-) : absence de trouble.

Tableau 2: résultats de l'effet de l'AS dans le milieu TSB sur la formation de biofilm.

[AS] mM	0	0,31	0,62	1,25	2,5	5	témoin
Trouble	+	+	+	+	-	-	-
L'absorbance	0,632	0,494	0,451	0,365	0,241	0,183	0,12

(+) : présence de trouble, (-) : absence de trouble.

Résumé

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste résistant à plusieurs antibiotiques. La résistance a été associée à la formation de biofilm bactérien favorisée par la présence d'exopolysaccharides (EPS) et la capacité à exprimer de nombreux facteurs de virulence. Dans notre étude, nous avons étudié l'utilisation de l'acide salicylique (AS) pour affecter la croissance et formation de biofilms de *P. aeruginosa* par la méthode de coloration au cristal violet (CV). Les résultats ont montré que CMI et CMB d'AS contre la bactérie étudiée a été enregistrées autour de 2,5 mM et 10 mM respectivement et la formation de biofilm a été fortement diminué lorsqu'il est incubé avec les concentrations d'AS sous-inhibitrices.

Mots clés : *P. aeruginosa*, Acide salicylique, CMI, CMB, biofilm,

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen resistant to several antibiotics. Resistance has been associated with bacterial biofilm formation favored by the presence of EPS and the ability to express many virulence factors. In our study, we investigated the use of salicylic acid (AS) to affect the croissance and the formation of *P. aeruginosa* biofilms by the crystal violet (CV) staining method. The results showed that MIC and MBC of AS against the bacterium studied were recorded around 2.5 mM and 10 mM respectively and biofilm formation was greatly decreased when incubated with sub-inhibitory AS concentrations.

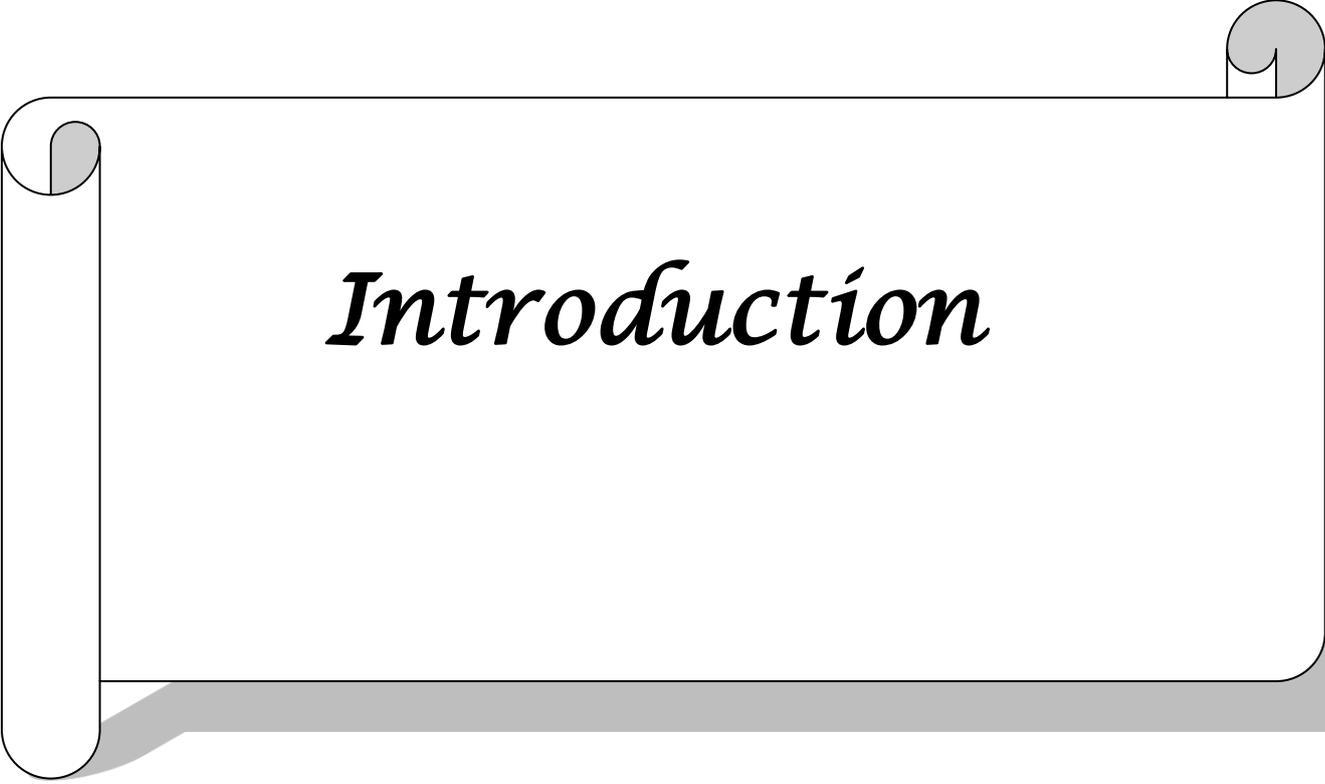
Key words: *P. aeruginosa*, salicylic acid, MIC, CMB, biofilm.

الملخص

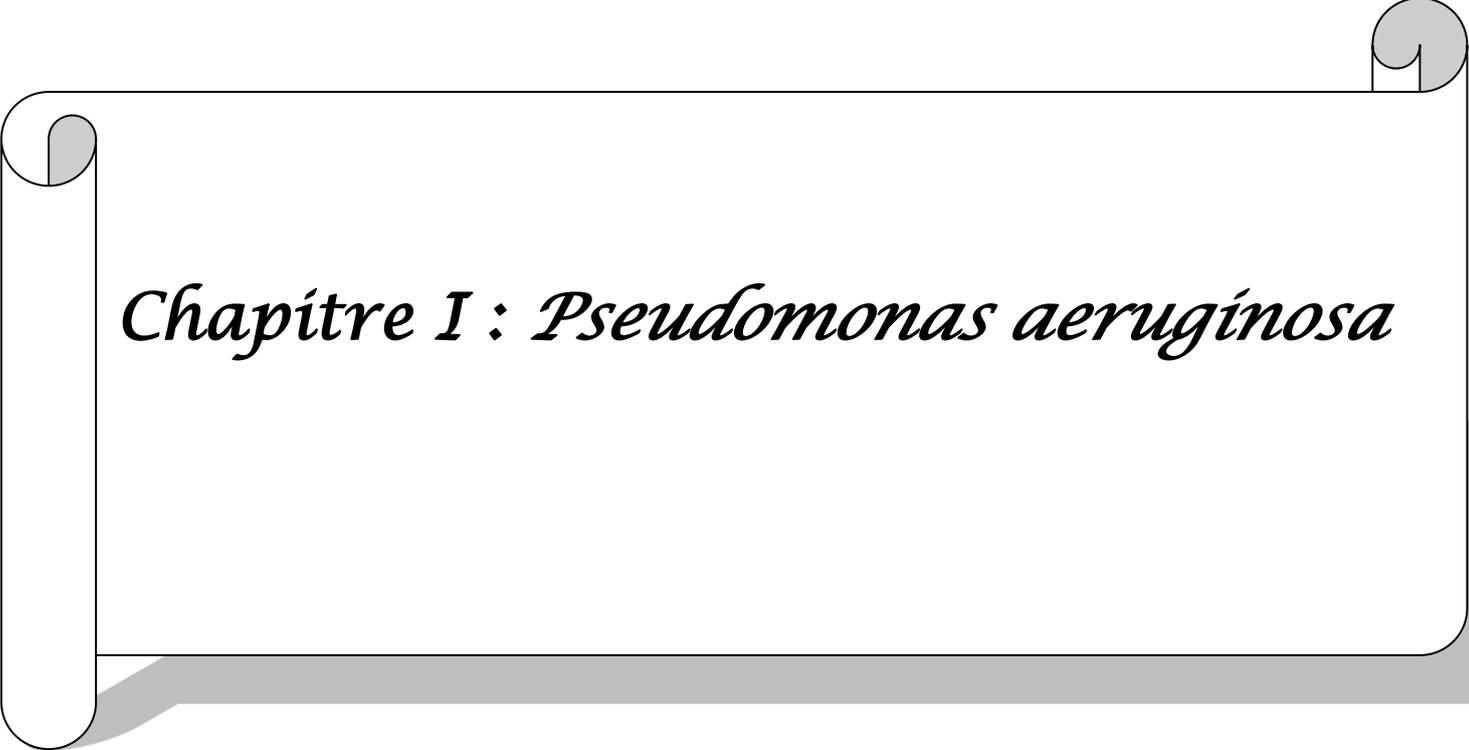
الزائفة الزنجارية هي العوامل المسببة للأمراض الانتهازية مقاومة للعديد من المضادات الحيوية. ارتبطت المقاومة بتكوين بيوفيلم جرثومي مفضل من قبل وجود السكريات الخارجية والقدرة على التعبير عن العديد من عوامل الفوعة. في دراستنا، حققنا في استخدام حمض الصفصاف للتأثير على تشكيل الأغشية الحيوية بواسطة طريقة تلوخ البنفسجي البلورية. أظهرت النتائج أن الحد الأدنى من تركيز المثبطة والتركيز الأدنى للبكتيرييسايد من حمض السلسيليك ضد البكتيريا المدروسة تم تسجيلها حوالي 2.5 ملي مولام و 10 ملي مول على التوالي وانخفض تكوين البيوفيلم بشكل كبير عند احتضانه مع التركيزات. من حمض الساليسيليك المثبط الفرعي.

الكلمات المفتاحية

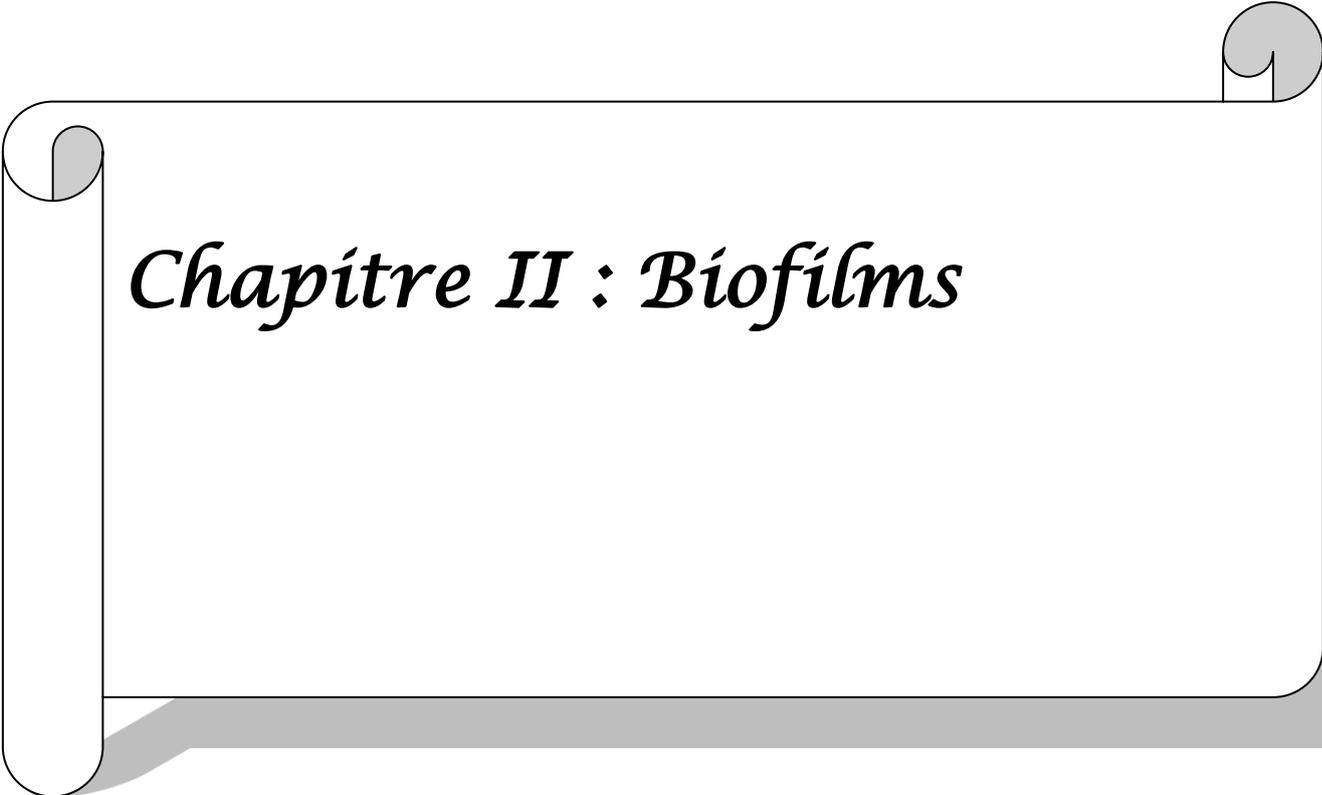
بيوفيلم، CMI، CMB، حمض الساليسيليك، *P. aeruginosa*.

A graphic of a scroll with a black outline and a light gray shadow. The scroll is partially unrolled, with the word "Introduction" written in a black, italicized serif font in the center. The top and bottom edges of the scroll are rounded, and the left edge is also rounded, suggesting it is a tube. The right edge is slightly curved, and there are small gray circles at the top and bottom corners of the scroll's frame, representing the ends of the scroll.

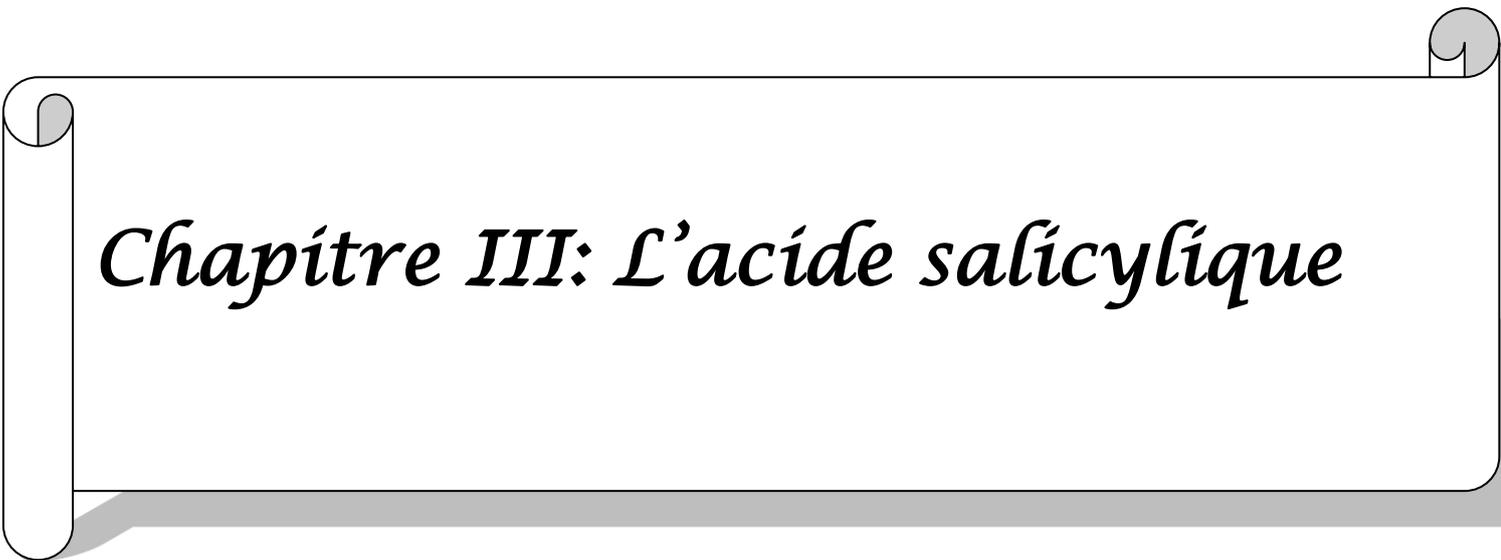
Introduction



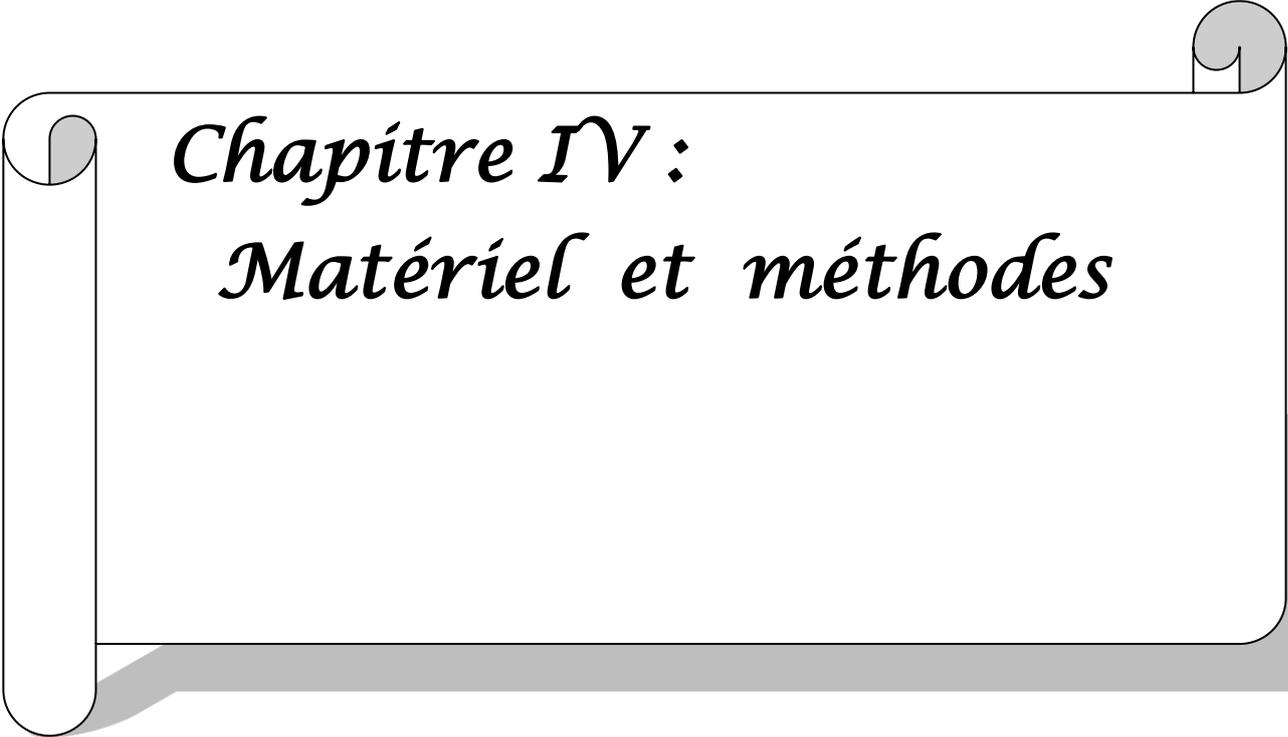
Chapitre I : Pseudomonas aeruginosa



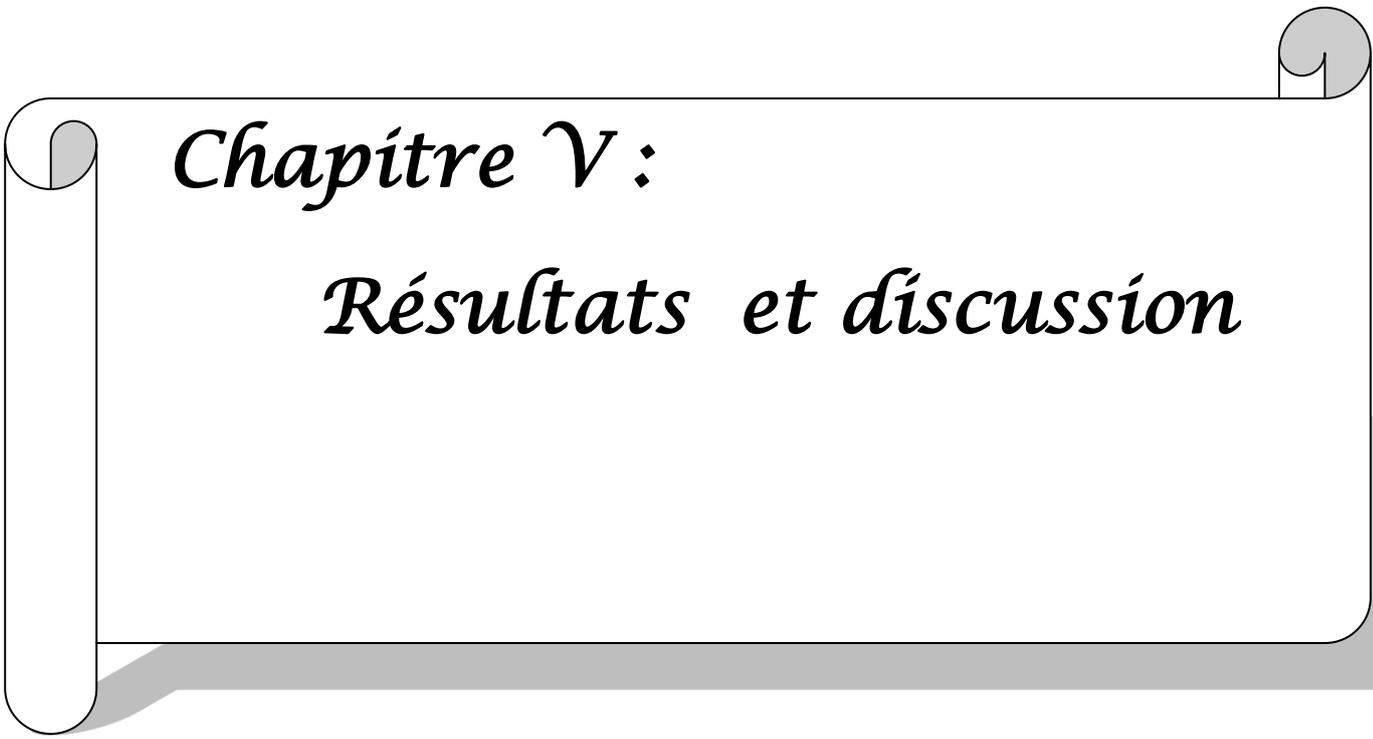
Chapitre II : Biofilms



Chapitre III: L'acide salicylique



Chapitre IV :
Matériel et méthodes

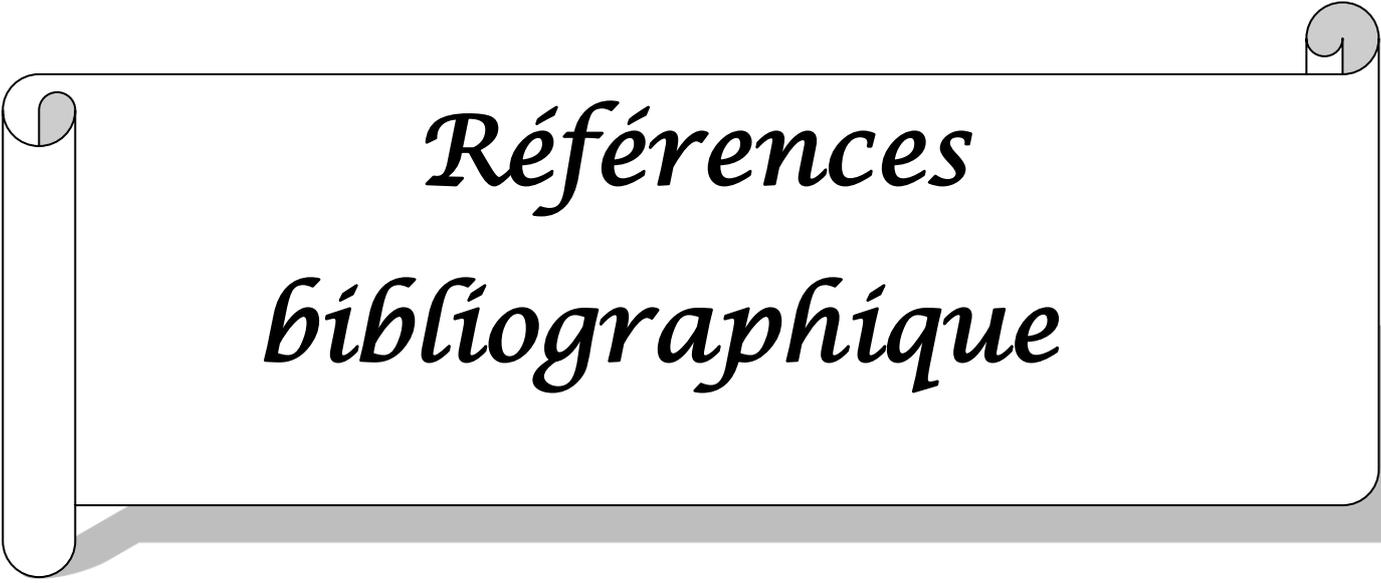


Chapitre V :

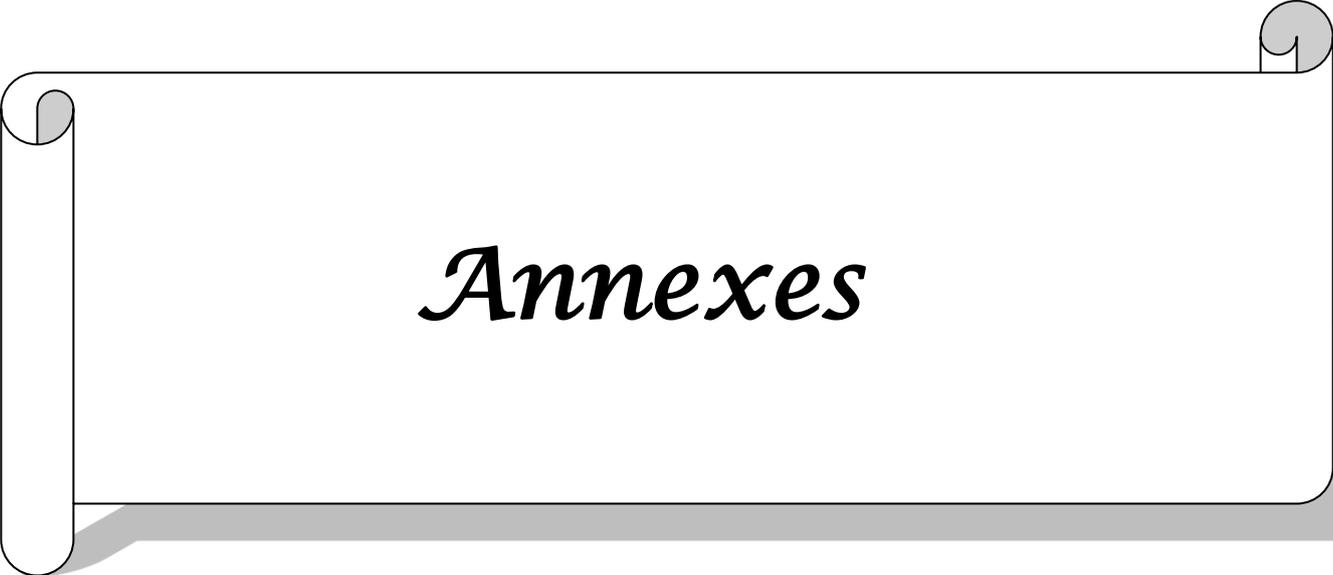
Résultats et discussion



Conclusion générale



*Références
bibliographiques*



Annexes