

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université A. MIRA - Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Spécialité Microbiologie Moléculaire et Médicale



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

**Etude de l'activité antibiofilm d'extraits  
bruts de souches d'actinobactéries vis- à-vis  
de *Pseudomonas aeruginosa***

Présenté par :

**Zinafi Nassima & Hafallah Ouafa**

Soutenu le : **23 Juin 2018**

Devant le jury composé de :

Mme. Souagui S  
Melle. Yanat B  
Mme. Balla N

MAA  
MCB  
MCA

Président  
Encadreur  
Examineur

**Année universitaire : 2017 / 2018**

## *Remerciements*

*Je tiens tout d'abord à remercier DIEU le tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui nous a donné la Force, la patience et nous a permis de mener à bien ce travail*

*Nous tenons à remercier notre promotrice Melle YANAT pour son encadrement, ses précieux conseils, et les encouragements qui nous ont permis de réaliser ce travail.*

*Nos vifs remerciements pour les membres de jury à commencer par Mme SOUAGUI qui nous a fait l'honneur de présider notre jury.*

*Mes très vifs remerciements vont aussi à Mme BALLA pour avoir contribué par sa participation à l'examen de ce travail.*

*Nous ne saurons terminer sans remercier toutes ces personnes qui sont dans l'ombre et dont la contribution à mon travail est non négligeable notamment Melle DJINNI, tout le personnel de laboratoire, de la bibliothèque et de l'administration.*



*Merci*

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A la mémoire de mes chers grands-parents, qu'Allah ait leurs âmes  
dans son vaste paradis.*

*A ma très chère mère*

*Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de  
tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager,  
ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à  
bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour  
exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me  
donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*A mon très cher papa*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et  
le respect que j'ai toujours eu pour toi.*

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation  
et mon bien être.*

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon  
éducation et ma formation.*

*A mes très chers frères et sœurs*

*Les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et  
l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec tous mes  
vœux de bonheur, de santé et de réussite. Je vous souhaite un avenir  
plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*A*

*Toute la promotion de MMM 2018*

*Tous mes proches de près et de loin*

*Nassima*

# *Dédicace*

*Je dédie ce travail*

*A mes chers parents ; symboles de sacrifice ; tendresse et d'affection.*

*Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et J'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours.*

*A mes chères sœurs et chers frères, pour leurs encouragements et tous les moments inoubliables que nous avons partagés ensemble.*

*A tous les membres de nos familles. A tous nos amis et nos collègues, ils trouveront ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.*

*A la mémoire des gens qui nous ont quittés.*

*Quafa*

## Sommaire

Liste des abréviations.

Liste des tableaux.

Liste des figures.

Introduction.....1

### *Partie I : Synthèse bibliographique*

#### **I. Actinobactéries**

<b>I.1. Généralités</b> .....	3
<b>I.2. Métabolisme des actinobactéries</b> .....	4
<b>I.2.1. Métabolisme primaire</b> .....	4
<b>I.2.2. Métabolisme secondaire</b> .....	4
<b>I.3. Importance des actinobactéries</b> .....	5

#### **II. *Pseudomonas aeruginosa***

<b>II.1. Généralités</b> .....	6
<b>II.2. Habitat</b> .....	6
<b>II.3. Taxonomie</b> .....	6
<b>II.4. Caractères bactériologiques</b> .....	7
<b>II.4.1. Caractères morphologiques</b> .....	7
<b>II.4.2. Caractères biochimiques et métaboliques</b> .....	7

<b>II.4.3.</b> Caractères cultureux .....	7
<b>II.5.</b> Caractères génomiques .....	8
<b>II.6.</b> Facteurs de virulence .....	8
<b>II.7.</b> Résistance aux antibiotiques.....	9
<b>II.7.1.</b> Résistance naturelle .....	9
<b>II.7.1.</b> Résistance acquise .....	9

### **III. Biofilm**

<b>III.1.</b> Définition.....	11
<b>III.2.</b> Etapes de formation de biofilm.....	11
<b>III.2.1.</b> Adhésion réversible .....	11
<b>III.2.2.</b> Adhésion irréversible.....	12
<b>III.2.3.</b> Formation de micro-colonies .....	12
<b>III.2.4.</b> Maturation du biofilm.....	12
<b>III.2.5.</b> Dispersion du biofilm .....	12
<b>III.3.</b> Le biofilm chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	13
<b>III.3.1.</b> La matrice du biofilm chez <i>P. aeruginosa</i> .....	13
<b>III.3.1.1.</b> Alginate.....	13
<b>III.3.1.2.</b> Psl .....	13
<b>III.3.1.3.</b> Pel .....	14
<b>III.3.1.4.</b> ADN extracellulaire.....	14
<b>III.4.</b> Infections dues aux biofilms .....	14
<b>III.5.</b> Relation entre biofilm et virulence .....	15
<b>III.6.</b> Les facteurs influençant la formation des biofilms .....	15

## *Partie II : Matériel et méthodes*

### **I. Matériel**

I.1. Matériel analytique .....	16
I.2. Matériel biologique .....	16

### **II. Méthode**

II.1. Extraction des molécules actives des souches de <i>Streptomyces</i> .....	17
II. 2. Détermination des (CMI) des extraits d'actinobactéries.....	18
II.3. Effet des extraits bruts d'actinobactéries sur la formation de biofilm par <i>P. aeruginosa</i> .....	20

## *Partie III : Résultats et discussions*

### **I. Résultats**

I.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des souches de <i>P. aeruginosa</i> pour les extraits brut E4 et S19.....	23
I.2. Mise en évidence de l'activité anti biofilm des extraits bruts vis-à-vis des souches de <i>P.aeruginosa</i> .....	24
I.2.1. Formation de biofilm .....	24
I.2.2. Activité antibiofilm de l'extrait brut E4 .....	25
I.2.3. Activité antibiofilm de l'extrait S19.....	25

### **II. Discussions**

Discussions.....	27
------------------	----

<b>Conclusion</b> .....	29
-------------------------	----

### **Liste des références bibliographiques**

### **Annexes**

### **Résumé**

## *Liste des abréviations*

<b>Abréviation</b>	<b>Signification</b>
<b>ADH</b>	Arginine d'hydrolase
<b>ADNe</b>	Acide désoxyribonucléique extracellulaire
<b>AK</b>	Amikacine
<b>ATB</b>	Antibiotique
<b>ATM</b>	Aztréonam
<b>CAZ</b>	Céftazidime
<b>CIP</b>	Ciprofloxacine
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CV</b>	Cristal violet
<b>DMSO</b>	Di-Méthyle Sulfoxyde
<b>Abs</b>	Absorbance
<b>EPS</b>	Extra-polymeric substance
<b>G</b>	Glucose
<b>GN</b>	Gentamicine
<b>I</b>	Intermédiaire
<b>IPM</b>	Imipenème
<b>LDC</b>	Lysine décarboxylase
<b>BMH</b>	Bouillon Mueller-Hinton
<b>ODC</b>	Ornithine décarboxylase
<b>ONPG</b>	Otho-Nitrophényl-Galacto-Pyranoside
<i><b>P.aeruginosa</b></i>	<i><b>Pseudomonas aeruginosa</b></i>
<b>PEL</b>	PELlicle locus
<b>PI</b>	Pipéracilline
<b>QS</b>	Quorum sensing
<b>R</b>	Résistante
<b>S</b>	Sensible
<b>TCC</b>	Ticarciline + Acide Clavulanique
<b>TSB</b>	Tryptic Soja Bouillon
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie



## *Liste des figures*

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	(a) Photographie au microscope électronique à balayage illustrant les chaînes de spores du genre <i>Streptomyces</i> (b) Aspect macroscopique d'une souche de <i>Streptomyces</i> .	3
<b>2</b>	Applications biotechnologiques des actinobactéries.	5
<b>3</b>	Aspect des colonies sur gélose ordinaire(a) et coloration de Gram (x1000) (b) de <i>P. aeruginosa</i> .	7
<b>4</b>	Biofilm de <i>P.aeruginosa</i> .	11
<b>5</b>	Représentation schématique des différentes étapes de formation de biofilm.	12
<b>6</b>	Détermination des CMI par la méthode de micro-dilution sur microplaque.	19
<b>7</b>	Protocole de la technique de quantification des biofilms sur microplaque.	21
<b>8</b>	Lecteur de microplaque (BIOTEK®).	22
<b>9</b>	Résultat des CMI des extraits bruts sur microplaque.	24
<b>10</b>	Effet de l'extrait brut E4 sur les biofilms formés par P.a 258 et P.a 893	25
<b>11</b>	Effet de l'extrait brut S19 sur les biofilms formés par P.a 258 et P.a893	26
<b>12</b>	microplaque de biofilm	26

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
<b>II</b>	Les mécanismes de virulence et les effets pathogènes induits par les principaux facteurs de virulence	10
<b>III</b>	Origines des souches cibles de <i>P. aeruginosa</i>	16
<b>IV</b>	Profil de résistance aux antibiotiques des souches de <i>P. aeruginosa</i>	17
<b>V</b>	Résultat des CMI des souches cliniques de <i>P. aeruginosa</i>	23
<b>VI</b>	Résultats du test de formation de biofilm pour les souches de <i>P. aeruginosa</i>	24

## Liste des annexes

<b>Annexe</b>	<b>Titre</b>
<b>Annexe I</b>	Matériels analytique
<b>Annexe II</b>	Solutions et milieux de cultures utilisés
<b>Annexe III</b>	Effet de l'extrait brut E4 sur les biofilms formés par <i>P.aeruginosa</i> Effet de l'extrait brut S19 sur les biofilms formés par <i>P.aeruginosa</i> .
<b>Annexe IV</b>	Diamètres (mm) des zones d'inhibition selon CLSI, 2015 pour <i>P. aeruginosa</i>

Dans l'environnement, les micro-organismes sont attachés à une surface organisée en communauté structurée et englobés dans une matrice d'exopolymères. Ce mode de développement, appelé biofilm, a pris une importance toute particulière lorsqu'il a été établi qu'il était impliqué dans un grand nombre d'infections bactériennes (Khalilzadeh, 2009). Les biofilms sont responsables d'un large éventail d'infections chez l'Homme. Ainsi, 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).

*Pseudomonas aeruginosa* est un bacille à Gram négatif non fermentaire occupant une place majeure et considérable dans les établissements de santé (Alyajouri, 2012). La pathogénie de *P. aeruginosa* est attribuée à la production d'un vaste arsenal de facteurs de virulence (membranaires et extracellulaires) agissant à différents niveaux au cours de l'infection, lui permettant de survivre aussi bien dans différents hôtes que dans l'environnement (Lazdunski, 1998). Ces facteurs de virulence sont impliqués dans les différentes étapes du processus d'infection permettant ainsi à *P.aeruginosa* de coloniser son hôte. Ce germe est retrouvé communément dans le sol, l'eau et l'environnement. Cependant, il est aussi connu pour causer des maladies assez graves chez l'Homme. Celles-ci se manifestent entre autres par une inflammation généralisée des poumons, des infections urinaires et rénales. *P. aeruginosa* est responsable de 60% des infections nosocomiales grâce à sa capacité à persister dans l'environnement hospitalier et ce notamment par la formation de biofilm (Cotton, 2009).

En effet, *P. aeruginosa* produit des agrégats structurés ou biofilms maintenus par une matrice protectrice (khalilzadeh, 2009).Le biofilm est important dans la pathogénie de cette bactérie car il lui permet d'échapper aux systèmes de défense de l'hôte et de résister aux antibiotiques mais aussi de persister sur les dispositifs médicaux implantables et de résister aux désinfectants constituant ainsi un réservoir de microorganismes, notamment dans les hôpitaux (Méar, 2014).

Les antibiotiques d'origine naturelle sont en grande partie produits par des actinobactéries. Ces micro-organismes sont des bactéries à Gram positif filamenteux à G + C élevé, et sont les plus largement distribués dans la nature, principalement dans le sol (Goodfellow et al., 2012). Parmi ces actinobactéries, le genre *Streptomyces* est une composante prédominante de la population microbienne dans les sols et est connu pour être commercialement et thérapeutiquement, une source majeure de métabolites secondaires importants (Bérdy, 2012). Il a été estimé qu'environ 45% des antibiotiques ont été isolés des

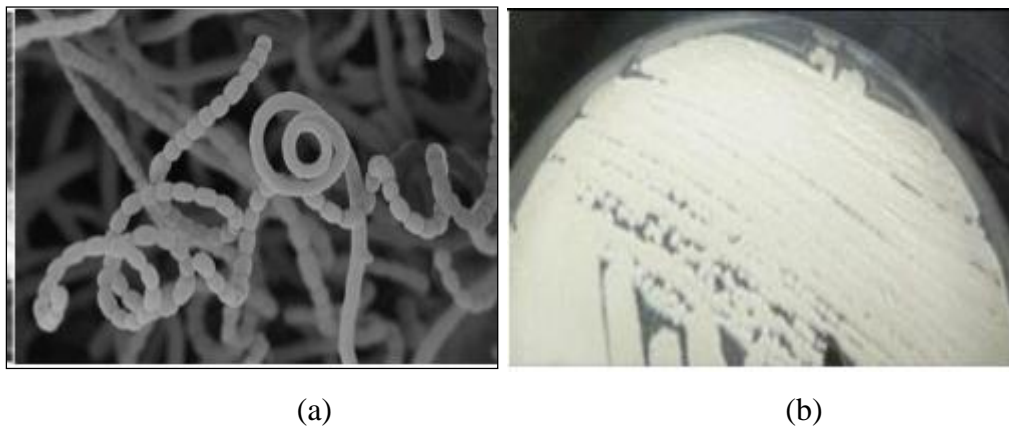
actinobactéries, et environ 75% des molécules bioactives provenant des actinobactéries sont produites par des espèces du genre *Streptomyces* (Solecka et al., 2012).

Actuellement, les chercheurs s'évertuent à isoler perpétuellement de nombreuses souches d'actinobactéries de divers milieux, surtout des milieux où les conditions sont particulières (sols salés, sols alcalins, sols acides, marais salants, sols pollués par du pétrole, etc.), en vue de découvrir de nouveaux taxons et également de nouvelles molécules bioactives ayant une activité antibactérienne et antibiofilm (Solecka et al., 2012). C'est dans cette optique que s'inscrit ce travail qui consiste à tester l'activité antimicrobienne et antibiofilm de deux extraits bruts produits par deux souches de *Streptomyces*, l'une isolée au niveau d'une station d'épuration de la wilaya de Bejaia et l'autre à partir du sol de sebkha située à Béni Abbas vis-à-vis de souches de *P.aeruginosa* et ce par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et par le test de l'activité anti-biofilm par la méthode de coloration au cristal violet sur microplaque.

## I. Les actinobactéries

### I.1. Généralités

Les actinobactéries sont parmi les microorganismes présentant un intérêt biotechnologique en particulier pour la production de molécules bioactives (Sabaou et al., 1998). Ils forment un groupe diversifié de bactéries à Gram positif filamenteuses, septées, ramifiées, organotrophes, hétérotrophe, aérobies stricts et micro-aérophiles. Leur coefficient de Chargaff (G+C%) est supérieur à 55%, généralement compris entre 60 et 75% (Larpent et sanglier, 1989). Appelées autrefois actinomycètes, terme utilisé pour la première fois par Bollinger en 1877, emprunté du grec « aktis » et « mykes » pour « champignons à rayons », explique que ces microorganismes ont d'abord été considérés comme des champignons en raison de leur capacité à former un véritable mycélium ramifié (Gottlieb et al., 1973). On rencontre des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres forment un mycélium du substrat bien développé et ramifié mais n'ont pas de mycélium aérien (*Micromonospora*) (Figure 1a) (Supong et al., 2013), et enfin des espèces organisées en mycélium végétatif et/ou en mycélium aérien comme ci-dessous pour le genre, *Streptomyces* (Figure 1b) (Belyagoubi, 2014).



**Figure 1** : (a) Photographie au microscope électronique à balayage illustrant les chaînes de spores du genre *Streptomyces* (b) Aspect macroscopique d'une souche de *Streptomyces* (Belyagoubi, 2014).

En culture solides, les actinobactéries forment en une semaine environ des colonies souvent pigmentées (gris, vert, rouge...) provenant de l'accumulation d'hyphe ramifiées à contours lisses ou échancrés à aspect compact, poudreux ou en chou-fleur (Kitouni, 2007).

Les actinobactéries sont capables de métaboliser plusieurs et différentes sources de carbone et d'énergie et croître dans des conditions très variées. Elles peuvent se développer dans des habitats très différents, et jouent un rôle important dans la fertilisation des sols. La taxonomie des actinobactéries est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. Avec les récentes éditions du manuel de taxonomie bactérienne, plusieurs formes bactériennes non mycéliennes sont affiliées aux actinobactéries sur la base de leurs parentés phylogénétiques. Selon la version 2012 du manuel de la systématique bactérienne, les actinobactéries sont rattachées au phylum Actinobacteria qui comprend 6 classes, 15 ordres, 43 familles et 203 genres (Goodfellow et al., 2014).

## **I. 2. Le métabolisme des actinobactéries**

### **I.2.1. Le métabolisme primaire**

Le métabolisme primaire des actinobactéries est semblable à celui des autres organismes. Les métabolites primaires ou généraux essentiels forment la structure cellulaire et permettent le fonctionnement du métabolisme général (Theilleux, 1993).

### **I.2.2. Le métabolisme secondaire**

Le métabolisme secondaire se différencie du métabolisme primaire par le fait qu'il concerne des métabolites non directement impliqués dans la croissance et la vie de l'organisme (Theilleux, 1993). De manière générale, le métabolisme secondaire est considéré comme l'ensemble des voies de synthèse de composés qui n'ont ensuite pas de fonctions apparentées dans le métabolisme cellulaire (Colombié, 2005).

La différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique. Un métabolisme secondaire se met en place donnant lieu à la biosynthèse de composés d'une extraordinaire diversité de structures et d'activités biologiques (Choulet, 2006).

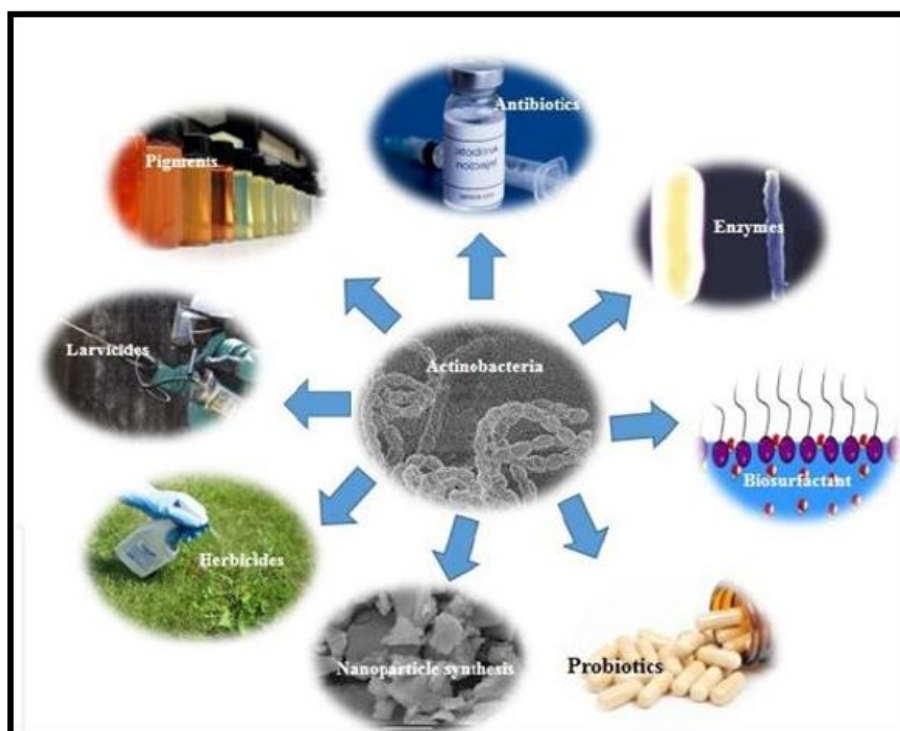
Deux des propriétés les plus significatives des actinobactéries sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs. En effet, la streptomycine fut le premier antibiotique ayant pour origine une souche de *Streptomyces*. D'après Tarkka et Hampp (2008), les métabolites secondaires des streptomycètes peuvent être séparés en quatre classes distinctes en fonction de leur activité biologique :

- ✓ Agents antagonistes, comportant des antibactériens, des antifongiques, des antiprotozoaires et même des antiviraux.
- ✓ Agents pharmacologiques tels que des anti-tumoraux et des inhibiteurs d'enzymes.
- ✓ Agents agrobiologiques tels que des pesticides et des herbicides.
- ✓ Composés à activité régulatrice, tels que des facteurs de croissance.

Ces propriétés traduisent la richesse tout à fait remarquable du métabolisme cellulaire de ce groupe microbien (Theilleux, 1993). La diversité métabolique de la famille des *Actinomycetaceae* est due à leur génome de grande taille qui renferme des centaines de facteurs de transcription contrôlant l'expression des gènes, leur permettant de répondre à des besoins spécifiques (Singh et al., 2006).

### I.3. Importance des actinobactéries

L'importance des actinobactéries a de tout temps été soulignée dans divers domaines : dans le domaine industriel, dans le domaine médical et vétérinaire, dans l'agriculture et l'agro-alimentaire, etc. (George et al., 2012 ; Solecka et al., 2012). Les actinobactéries, surtout celles qui ont une structure mycélienne, sont réputées pour la production d'antibiotiques, en particuliers le genre *Streptomyces* qui sécrète près de la moitié des antibiotiques naturels d'origine microbienne (Solecka et al., 2012), mais aussi d'autres genres que l'on retrouve peu fréquemment ou parfois même rarement (Tiwari et Gupta, 2011). D'autres molécules bioactives sont également sécrétées par ce groupe microbien, telles que les enzymes, les vitamines, les immunosuppresseurs, les insecticides, les herbicides, etc. (figure 2) (Genilloud et al., 2011).



**Figure 2** : Applications biotechnologiques des actinobactéries (Ranjani et al., 2016)



## II. *Pseudomonas aeruginosa*

### II.1. Généralités

*P. aeruginosa* a été isolé pour la première fois en 1882 par Gessard. Il l'a appelé *Bacillus pyocyaneus* du nom du pigment pyocyanique, diffusible dans le milieu extracellulaire et à l'origine de la coloration des cultures (Touati, 2013).

Il s'agit d'une bactérie opportuniste pratiquement inoffensive chez l'individu sain. Néanmoins, elle est responsable d'infections graves communautaires et surtout nosocomiales. Cette espèce, se distingue par sa grande adaptation aux différentes conditions environnementales, par sa capacité à acquérir des résistances aux antibiotiques (ATB) et par la diversité de ces facteurs de virulence (Mérens et al., 2013).

### II.2. Habitat

*P. aeruginosa* ou bacille pyocyanique est une bactérie ubiquiste, saprophyte dans les eaux douces et marines, dans l'air, dans les sols humides ou sur les végétaux. Elle est commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, mais aussi pathogène pour eux. Cette bactérie se rencontre dans l'environnement hospitalier au niveau du matériel médical ou chirurgical, et dans des solutions d'antiseptiques (Delarras, 2007).

### II.3. Taxonomie

Il s'agit d'une bactérie que l'on répertorie conventionnellement comme mentionné dans le tableau I.

**Tableau I** : Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* (Chaker, 2012)

Règne	Bacteria
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Aeruginosa</i>

## II.4. Caractères bactériologiques

### II. 4.1. Caractères morphologiques

*P. aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif, se présente sous forme de bacilles fines droites de 0,5 à 0,8  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 1,5 à 3,0 de longueur, se présentant de manière isolée ou groupée par deux ou en courtes chaînes, mobiles grâce à une ciliature mono triche, et dépourvu de spores et de capsule (Khalilzadeh, 2009).

### II.4.2. Caractères biochimiques et métaboliques

*P. aeruginosa* présente un métabolisme oxydatif (non fermentant), réduit généralement les nitrates au-delà des nitrites et produit de l'ammoniac à partir de la dégradation de l'acétamide (Delarras, 2007 ; Pecastaings, 2010).

Elle donne des réponses positives pour les tests : catalase, oxydase, Arginine d'hydrolase (ADH), citrate de Simmons, et la gélatinase et des réponses négatives pour les tests suivants : Lysine décarboxylase (LDC), Ornithine décarboxylase (ODC), indole,  $\beta$ -galactosidase (quelques souches hydrolysent l'ONPG au moyen d'une enzyme différente de la  $\beta$ -galactosidase) (Diarra, 2009 ; Touati, 2013).

### II.4.3. Caractères cultureux

Il s'agit d'une bactérie hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique, par conséquent, elle peut être isolée en culture sur milieu ordinaire ou sur milieu rendu sélectif par addition d'inhibiteurs tel que le cétrimide (Essoh, 2013).

Les cultures dégagent une odeur caractéristique de raisin ou seringa in vitro (Essoh, 2013) et il existe trois types de colonies de *P. aeruginosa* (figure 3) :

- ❖ **Les colonies larges** : sont grandes, rugueuses convexes et lisses.
- ❖ **Les colonies muqueuses** : sont bombées, opaques visqueuses, filantes ou parfois coulantes. Elles possèdent une pseudo-capsule constituée d'alginate.
- ❖ **Les colonies Sm (Small)** : sont rondes petites, convexes et lisses (Touati, 2013).



**Figure 3** : Aspect des colonies sur gélose ordinaire(a) et coloration de Gram (x1000) (b) de *P. aeruginosa* (Salton et Kim, 1996)

Leur température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C mais elles tolèrent aussi une température de 42°C. Aucune culture n'est obtenue à 4° C ou à 46° C (Khalilzadeh, 2009 ; Sausseureau, 2013).

La grande majorité des souches de *P. aeruginosa* synthétisent de la pyocyanine (bleu-vert), de la pyoverdine (jaune-verts) et plus rarement de la pyomélanine (brun-noire ou acajou) ou de la pyorubine (brun-rouge) (Sausseureau, 2013).

## II.5. Caractères génomiques

Le génome de *P. aeruginosa* a été entièrement séquencé en 2000, il s'agit de l'un des plus grands génomes bactériens connus avec 6,3 méga bases. Il est constitué d'une partie conservée qui représente jusqu'à 90% et d'une partie variable caractérisée par les échanges horizontaux de gènes (Essoh, 2013).

Le génome chromosomique code notamment pour la plupart des facteurs de pathogénicité et pour les multiples protéines, conférant la résistance aussi à différentes classes d'ATB. La proportion de gènes de régulations est la plus importante de tous les génomes bactériens séquencés connus. *P. aeruginosa* possède aussi de nombreux plasmides transférables par conjugaison ou par transduction. La taille, la complexité et la variabilité du génome de *P. aeruginosa* reflètent une évolution adaptative de l'espèce qui lui confère la capacité d'utiliser un grand nombre de composés organiques et ainsi de se développer dans de nombreuses niches écologiques même pauvres en nutriments (Filopon, 2005 ; Aissa, 2012).

## II.6. Les facteurs de virulence

*P. aeruginosa* est invasif en raison de la production de nombreux facteurs de virulence. Ces facteurs sont impliqués dans les diverses phases d'infection (Mesaros et al., 2007). On distingue 2 classes de types de facteurs de virulence :

- **Les facteurs de virulence associés à la bactérie** : le biofilm, les flagelles, les Pili de type IV, facteur d'attachement de type Fimbriae et le lipopolysaccharide (Didier, 2007).
- **Les facteurs de virulence sécrétés par la bactérie** : les toxines (exemple les exotoxines), les enzymes protéolytiques (élastases, protéase IV, protéase alcaline), enzymes lipolytiques (lipase, estérase et phospholipase C), rhamnolipides et chromophores (Kukavica-Ibrulj, 2007).

**Le quorum sensing (QS)** est considéré comme le principal mécanisme de régulation de la pathogénicité et de l'adaptation écologique chez *P. aeruginosa*. Ce système de régulation est fondé sur la capacité des bactéries à communiquer entre-elles, ce qui leur permet de

coordonner leur comportement et ainsi de fonctionner comme un organisme multicellulaire. La communication bactérienne repose sur la production de phéromones diffusibles, des N-acyl-homosérine lactones (AHL), qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné. A ce jour, trois systèmes du « *quorum sensing* » ont été caractérisés chez *P. aeruginosa* : il s'agit de LasR/LasI, de RhlR/RhlI et le2-heptyl-3- hydroxy-4-quinolone (Ben Hadj Khelifa et al., 2011).

L'ensemble des facteurs de virulence de *P.aeruginosa* sont rapportés dans le tableau II.

## II.7. Résistance aux antibiotiques

### II.7.1. Résistance naturelle

Les souches de *P. aeruginosa* sont naturellement résistantes à plusieurs classes d'antibiotiques telles que les aminopénicillines, les céphalosporines de première et de deuxième génération, le céfixime, le céfuroxime, le céfotaxime, le céftriaxone, l'ertapénème, la kanamycine, la tétracycline, le chloramphénicol, le triméthoprim et l'acide nalidixique (CASFM, 2015), et ceux en raison de plusieurs mécanismes intrinsèques: une production d'une  $\beta$ -lactamase chromosomique inductible de classe C (céphalosporinase) qui n'est pas inhibée par le clavulanate, une diminution de la perméabilité membranaire et aux quatre systèmes d'efflux multidrug connus: MexAB-OprM, MexXY/OprM(OprA), MexCD-OprJ, et MexEF-OprN qui confèrent à la bactérie une résistance naturelle de bas niveau à différentes classes d'antibiotiques incluant les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipénème(Chalhoub et al., 2017).

### II.7.1. Résistance acquise

*P. aeruginosa* peut acquérir une résistance aux antibiotiques à travers des mutations dans les gènes intrinsèques ou par acquisition horizontale à partir d'autres bactéries par le transfert de plasmides portant des gènes de résistance aux antibiotiques (Davies et al., 2010). Les mutations situées au niveau du système de régulation des gènes codant pour l'AmpC et des pompes d'efflux peuvent augmenter l'activité du promoteur déclenchant l'expression du gène et l'hyperproduction de ces protéines ayant pour conséquence une résistance de haut niveau aux antibiotiques (Blair et al., 2015).De plus, *P. aeruginosa* peut acquérir les gènes codant pour les  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) et les carbapénémases qui sont d'importance clinique non seulement à cause de leur activité d'hydrolyse d'une large gamme de  $\beta$ -lactamines (céphalosporines à large spectre, carbapénèmes), mais aussi pour leur forte dissémination à travers le monde (Moradali et al., 2017).

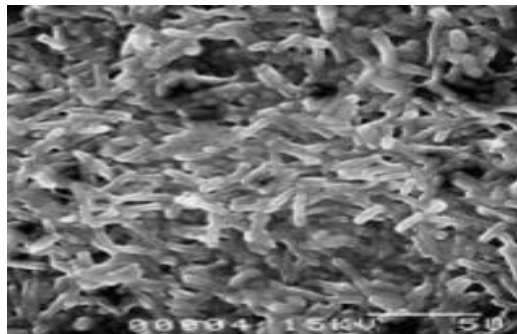
**Tableau II :** Les mécanismes de virulence et les effets pathogènes induits par les principaux facteurs de virulence (Ben Hadj Khalifa et al, 2011).

Facteurs de virulence	Mécanisme de virulence	Effet pathogène induit
Lipopolysaccharide (LPS)	Stimulation de la production de cytokines	Choc
Pili	Adhésion aux cellules épithéliales respiratoires	Pathogénicité respiratoire
Flagelle	Adhésion aux mucines Mobilité : rôle dans l'internalisation	Diffusion bactérienne
Alginate	Provoque le phénotype muqueux. Adhésion aux cellules trachéales. Inhibition de la phagocytose, de l'action des antibiotiques et de la réponse immunitaire	Pathogénicité respiratoire Résistance aux défenses de l'hôte (phagocytose) et aux ATB Responsable du caractère mucoïde des souches
Exotoxine A	Inhibition des synthèses protéiques des cellules Cibles	Mort cellulaire : nécrose tissulaire Rôle important dans la virulence
Exoenzyme S	Effet cytotoxique Prolifération des LT	Nécrose tissulaire Entraîne des lésions du glycopeptide, de lavimentine et des IgG et IgA
Exoenzyme U	Rôle anti-phagocytaire	Lésions des cellules épithéliales Responsable de bactériémie voire de choc Septique
Rhamnolipide	Effet détergent	Hydrolyse du surfactant
Elastases (LasA+LasB)	Dégradation de l'élastine, de la fibrine, de l'interféron, du complément et du collagène	Destruction des tissus contenant de l'élastine Rôle important dans la virulence
Pyocyanine Pyoverdine	Action bactéricide sur les autres bactéries. Augmentation de la libération d'élastase Inhibition des battements des cils Captage du fer Induisent la synthèse de radicaux libres	Favorise l'émergence du bacille pyocyanique. Diminution de la clairance des bacilles Rôle dans la survenue de vascularite d'artères pulmonaires
Lectines solubles	Inhibition des battements ciliaires des cellules pulmonaires	Pathogénicité respiratoire Rôle dans l'infection chronique
Phospholipase C	Effet cytolytique local	Lyse des cellules cibles Rôle dans l'infection aiguë et chronique
Protéase alcaline	Protéolyse	Rôle dans les infections cornéennes

### III. Le biofilm

#### III.1. Définition

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes (une ou plusieurs espèces), se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exopolysaccharides (EPS) adhésive et protectrice qu'ils sécrètent. C'est une structure vivante en perpétuel remaniement (figure 4). Il constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement (Behlau et Gilmore, 2008 ; Espinasse et al., 2010).



**Figure 4 :** Observation au microscope électronique à balayage d'un biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* CIP A 22 Après 72 heures de formation (Campanac *et al.* 2002)

#### III.2. Etapes de formation de biofilm

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement. Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces, incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, les canalisations des systèmes d'eau potable ou industriels ou sur tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques. Les différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quelque soit l'environnement qu'ils colonisent. La formation se fait généralement en cinq étapes (Haras, 2005) (Figure 5).

##### III.2.1. Adhésion réversible

C'est l'étape préliminaire de la formation de biofilm et le résultat de l'interaction entre les bactéries et un substrat solide (attractions correspondante aux forces de Van der Waals et des forces de répulsion électrostatiques). Les cellules s'adsorbent sur une surface pendant un certain temps, mais peuvent se détacher (Muller et Guaguere, 2014).

##### III.2.2. Adhésion irréversible

Dans un deuxième temps, l'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas, des



interactions fortes s'établissent entre la bactérie et la surface avec des liaisons de type hydrophobe (Bellifa, 2014).

### III.2.3. Formation de micro-colonies

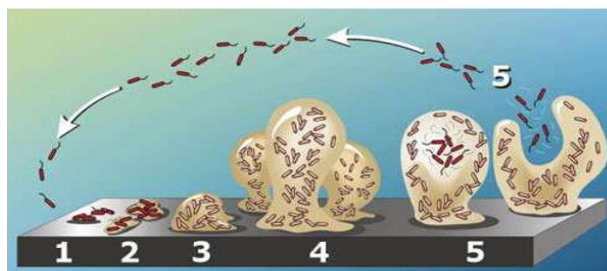
Une fois que la bactérie est irréversiblement adhérente à la surface, sa multiplication conduit à la formation de micro-colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface (Bellifa, 2014).

### III.2.4. Maturation du biofilm

C'est l'étape clé de la formation de biofilm. Elle est caractérisée par la sécrétion d'exopolymères contribuant, d'un côté, à la forte adhésion des cellules les unes aux autres et de l'autre, à la surface. Le biofilm grandit jusqu'à devenir macroscopique en condition optimales (Alnasouri, 2010).

### III.2.5. Dispersion du biofilm

Le détachement des cellules associées aux biofilms intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition ou modification de la nature des nutriments disponibles. Les bactéries peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement. Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement (Haras, 2005 ; Parot, 2007).



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

**Figure 5 :** Représentation schématique des différentes étapes de formation de biofilm (Besassier *et al.*, 2005)

## III.3. Le biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa*

### III.3.1. La matrice du biofilm chez *P. aeruginosa*

Chez *P. aeruginosa*, le biofilm est constitué de deux grands éléments : les microorganismes, organisés en microcolonies, et la matrice extracellulaire d'exopolymères qui représente 85% du volume total du biofilm et est constituée essentiellement de EPS

(Costerton et al., 1995). Cette matrice englobe d'autres molécules de nature organique et inorganique, jouant également un rôle dans la résistance aux stress environnementaux, par exemple l'ADN extracellulaire, les protéines et les rhamnolipides (Allesen-Holm et al., 2006 ; Pamp et Tolker-Nielsen, 2007). *P. aeruginosa* a la capacité de synthétiser au moins trois EPS : L'alginat, le Psl (Polysaccharide synthesis Locus) et le Pel (Pellicle locus) (Ma et al., 2009 ; Schurr, 2013).

#### III.3.1.1. L'alginat

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

#### III.3.1.2. Le Psl

Psl est constitué de mannose, de glucose et de galactose et contient également des traces de rhamnose, de xylose et de N-acétyl-glucosamine (Ma et al., 2007). Il est produit durant le mode planctonique où il intervient dans l'étape d'attachement initial des souches et la formation des micro-colonies (Ma et al., 2009). La présence de Psl au sein de la matrice extracellulaire augmente son élasticité et sa réticulation (Chew et al., 2014). Cette augmentation de la réticulation contribue à renforcer la structure de la matrice extracellulaire et à maintenir l'architecture du biofilm. Elle contribue également à la ségrégation de *P. aeruginosa* au sein d'un biofilm multi-espèces par formation d'une barrière physique (Chew et al., 2014). En plus de ses fonctions dans la structure du biofilm, le Psl agit comme un signal pour stimuler d'avantage de production de polysaccharides (Irie et al., 2012).

#### III.3.1.3. Le Pel

Pel est essentiellement composé d'un assemblage de polysaccharides riches en glucose et joue un rôle dans la densité cellulaire du biofilm et/ou de la compacité du biofilm (Ghafoor et al., 2011). La synthèse de Pel intervient plus spécifiquement lors des phases de maturation du biofilm. Sa capacité à interagir avec l'ADN extracellulaire composant la matrice favorise les interactions entre cellules bactériennes, aboutissant à une augmentation de la densité du



biofilm (Ghafoor et al., 2011). Pel aurait également la capacité d'interagir avec Psl : Ces interactions conduiraient à une augmentation des forces d'adhésion en certains points (Cooley et al., 2013). Il contribuerait également aux propriétés de résistance du biofilm contre les antibiotiques de type aminoglycosides (Colvin et al., 2011).

#### III.3.1.4. L'ADN extracellulaire

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

#### III.4. Infections dues aux biofilms

Les biofilms sont responsables d'infections chroniques et posent de nombreux problèmes dans le domaine médical. Les infections liées à des biofilms touchent majoritairement les personnes légèrement ou fortement immunodéprimées et impliquent souvent des bactéries commensales parmi lesquelles les souches de *P. aeruginosa*. Caractérisées par des symptômes qui surgissent de façon récurrente, elles contribuent de manière très importante aux infections nosocomiales. En effet, les biofilms ont la capacité de se développer sur divers instruments médicaux : Sondes urinaires, cathéters veineux, tubes de ventilation artificielle, prothèses orthopédiques etc... (Costerton et Greenberg, 1999). Dans la majorité des cas, la seule solution efficace est le retrait de l'instrument infecté. D'autre part, la contamination des systèmes de climatisation, de ventilation et de distribution d'eau par des biofilms abritant des micro-organismes pathogènes, contribue à la propagation des infections en milieux hospitaliers ou non hospitaliers, mais également dans les environnements agroalimentaires où les biofilms sont une source importante de nuisance (Donlan et Costerton, 2002).

#### III.5. Relation entre biofilm et virulence

Le lien entre la capacité d'une souche à former un biofilm et sa virulence est souvent présenté comme direct. Néanmoins, des études récentes ont mis en évidence que les signaux environnementaux réguleraient, de manière opposée, les capacités des bactéries à former un

biofilm ou à être virulentes. Ce mécanisme de régulation offrirait aux bactéries une plus grande adaptabilité vis-à-vis des stress environnementaux. Au cours de la phase planctonique d'infection, les bactéries libéreraient des facteurs de virulence et altéreraient les tissus de l'hôte. Une fois dans un environnement adapté, les bactéries pourraient s'implanter et persister sur une surface via l'expression de facteurs impliqués dans la formation de biofilms (Goodman et al., 2004). Ces résultats suggèrent que le biofilm joue un rôle dans la persistance des bactéries dans un environnement donné et non directement dans le mécanisme infectieux. Les biofilms constituent ainsi des réservoirs d'infections. Chez les personnes atteintes de mucoviscidose, par exemple, *P. aeruginosa* infecte les tissus pulmonaires. L'infection s'établit de manière chronique et conduit à des endommagements mortels du tissu pulmonaire. La persistance de l'infection serait liée à la présence de la bactérie sous forme de biofilms (Singh et al., 2000). La formation de biofilm mucoïde par *P. aeruginosa* est un indicateur de la progression de la maladie et sa persistance à long terme (McDaniel et al., 2015).

### III.6. Les facteurs influençant la formation des biofilms

Les mécanismes de formation des biofilms et leur organisation structurale résultent essentiellement d'interactions entre l'environnement, la flore microbienne et le matériau. Ils sont donc tributaires et influencent tout à la fois des paramètres propres à chacun des trois acteurs, notamment l'oxygénation, le pH, la température, l'accès à la lumière, la quantité de matières organiques en ce qui concerne l'environnement, la nature du matériau, la microstructure, l'état de surface pour le matériau, et le métabolisme, les polymères sécrétés et les interactions cellulaires pour les micro-organismes (Bellifa, 2014).

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de mycologie de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, pendant une période allant du mois de février au mois de mai. L'objectif de ce travail est d'étudier l'activité antibactérienne et antibiofilm de deux extraits bruts de souches de *Streptomyces* vis-à-vis de souches cliniques de *P. aeruginosa*.

## I. Matériel

### I.1. Matériel analytique

Le matériel, les milieux de culture et les solutions utilisées dans ce travail sont résumés dans les annexes I et II.

### I.2. Matériel biologique

#### ➤ Origine des extraits bruts

Les extraits bruts ont été extraits à partir de deux souches de *Streptomyces* :

- ❖ **Souche S19** : Isolée à partir d'une station d'épuration à Bejaia.
- ❖ **Souche E4** : Isolée à partir de sol salin (sebkha) du sud algérien à Béni Abbés de la wilaya de Bechar.

#### ➤ Origine des souches cibles utilisées

Les souches cibles utilisées dans cette étude sont des souches de référence et des souches cliniques de *P. aeruginosa* faisant partie de la collection du laboratoire de microbiologie de la faculté d'Abderrahmane Mira de Bejaia. L'origine de ces souches est résumée dans le Tableau III.

**Tableau III** : Origines des souches cibles de *P. aeruginosa*

Code	Date d'isolement	Nature du Prélèvement	Age du patient	Sexe du patient	Responsable de laboratoire
<b>P.a 258</b>	19-04-2017	Urine	Adulte	F	Dr Djama
<b>P.a 481</b>	09-04-2017	Pus	Enfant	F	Dr Lalaoui
<b>P.a 893</b>	15-03-2017	Urine	Adulte	M	Dr Lalaoui
<b>P.a 1253</b>	14-02-2017	Urine	Enfant	F	Dr Kebbiche
<b>P.a 7417</b>	23-03-2017	Urine	Adulte	M	Dr Djama

#### ➤ Profil de résistance des souches cibles

Les souches de *P. aeruginosa* ont été testées dans une étude antérieure quant à leur sensibilité aux antibiotiques. Les profils de résistance des souches sont représentés dans le tableau IV.

**Tableau IV** : Profil de résistance aux antibiotiques des souches de *P. aeruginosa*

Code	CAZ	TCC	PI	IPM	CIP	GN	ATM	TOB
P.a 258	R(6)	R(14)	R(6)	S (21)	R(6)	S (19)	S (26)	S (28)
P.a 481	R(6)	S (24)	S (31)	I (16)	S (38)	S (15)	S (30)	S (28)
P.a 893	I (17)	I (16)	S (25)	R(11)	S (25)	R(6)	S (25)	R(12)
P.a 1253	I (16)	R(6)	I (20)	I (17)	S (25)	S (19)	NT	S (28)
P.a 7417	S(19)	R(14)	S (22)	R(14)	S (22)	S (15)	S (23)	S(16)

**CAZ**: Céftazidime; **TCC**: Ticarciline + Acide Clavulanique; **PI**: Pipéracilline; **IPM**: Imipénème;

**CIP**: Ciprofloxacine ; **ATM** : Aztréonam; **TOB** : Tobramycine; **GN**: gentamicine

## II. Méthode

### II.1. Extraction des molécules actives des souches de *Streptomyces*

Après 7 jours d'incubation, l'extraction de molécule active est réalisée par macération. En effet, les mycéliums et les géloses sont découpés en petits morceaux de 1 cm<sup>2</sup> puis introduits dans un flacon additionné d'un volume de 250 ml d'acétate d'éthyle. Le mélange est mis à macérer sous agitation permanente durant toute une nuit à température ambiante.

L'extrait brut est obtenu après filtration avec du papier Wattman N°1, afin de séparer le solvant des blocs de gélose et du mycélium. Puis évaporés à sec en utilisant un Rotavapor.

L'extrait sec obtenu est récupéré dans du méthanol pour l'extrait brut S19 et dans du DMSO pour l'extrait brut E4 (Pimentel-Elardo *et al*, 2010). Puis la concentration massique de l'extrait brut est déterminée et le flacon est par la suite conservé à l'abri de la lumière à 4°C pour une utilisation ultérieure.

### II. 2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits vis à vis des souches de *P. aeruginosa*

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

Cette méthode est basée sur les étapes suivantes (figure 6) :

- **Standardisation de l'inoculum**

A partir d'une culture fraîche, quelques colonies ont été prélevées et mises en suspension dans de l'eau physiologique. La suspension bactérienne a été standardisée à l'aide d'un

Spectrophotomètre (VIS-723G) pour une DO de 0,08 à 0,1 à 630 nm correspondant à  $10^8$  UFC/ml. Par la suite, une dilution 1/10 a été réalisée.

- **Préparation de la microplaque**

Un volume de 50 µl de bouillon de Mueller-Hinton (MHB) ont été distribués dans les 96 microcupules que contient la microplaque.

- **Dilution**

A partir d'une solution mère de l'extrait brut (E4 à  $92,6 \cdot 10^2$  mg/L ; S19 à  $37 \cdot 10^3$  mg/L), 50 µl ont été prélevés puis mélangés aux 50 µl de MHB contenu déjà dans la première cupule. Par la suite, 50 µl du contenu de la première cupule ont été prélevés puis déposés dans la cupule adjacente et ainsi de suite. Ces dilutions permettent d'obtenir des concentrations décroissantes de l'extrait brut entre  $46,3 \cdot 10^2$  à 0,08 mg/l pour E4 et entre 18,5 à  $0,03 \cdot 10^3$  mg/l pour S19.

Une rangée de cupules ne contenant que du MHB est utilisée comme contrôle négatif afin de vérifier que le bouillon ne soit pas contaminé.

Des puits contenant du DMSO et du méthanol ont aussi été utilisés comme témoins afin de vérifier si ces deux solvants n'auraient pas une éventuelle activité inhibitrice.

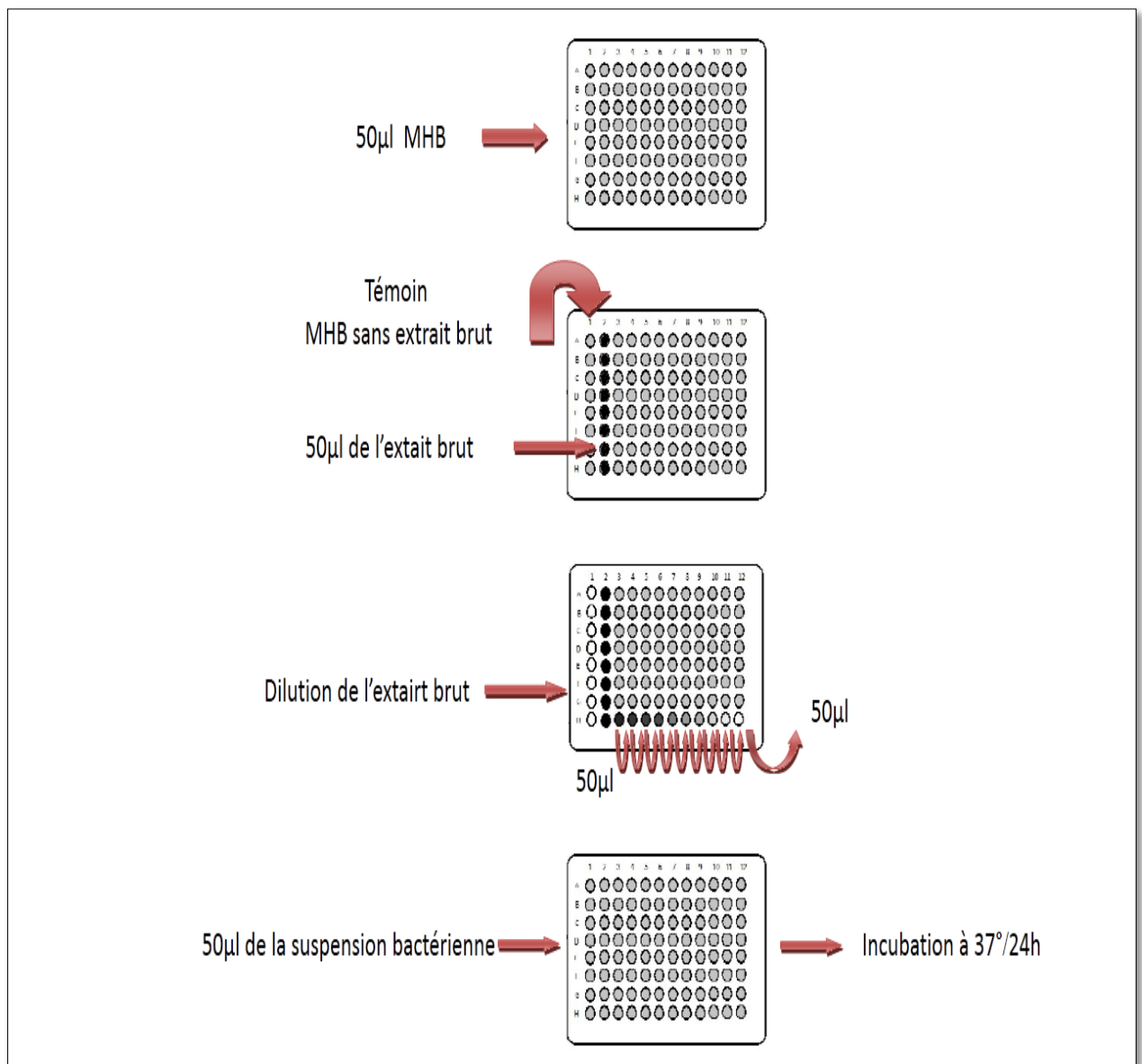
- **Ensemencement**

A partir de la suspension bactérienne standardisée à  $10^7$  UFC/ml, 50 µl ont été déposés dans toutes les cupules de la microplaque qui est ensuite incubée à 37°C pendant 18 h.

Une rangée de cupules ne contenant que du MHB est ensemencée et est utilisée comme témoin à fin de vérifier l'inoculum.

- **Lecture**

Après incubation, la CMI correspond à la concentration du premier puits à partir duquel aucun trouble à l'œil nu n'a été observé (Choukhou-Braham et al., 2010).



**Figure 6 :** Détermination des CMI par la méthode de micro-dilution sur microplaque.

### II.3. Effet des extraits bruts d'actinobactéries sur la formation de biofilm par *P. aeruginosa*

La détection de l'activité antibiofilm se fait en plusieurs étapes selon un protocole bien établi en utilisant des microplaques à fond plat contenant 96 puits. Le test utilisé est basé sur la formation de biofilm à l'interface solide-liquide et par l'addition de l'extrait brut à différentes concentrations qui pourraient éventuellement avoir un effet antibiofilm (figure 7) (Driche et al., 2017). Il est à noter que les souches cliniques de *P. aeruginosa* ont été testées au préalable pour leur capacité à produire un biofilm. Les souches ayant donné de meilleurs résultats ont été sélectionnés pour tester l'activité anti-biofilm. Ce test a été répété à trois reprises.

**Jour 1 :**

- Les souches ont été inoculées dans 10ml de Tryptic Soja Bouillon (TSB) supplémenté à 2,5% de glucose (TSBG) puis les suspensions ont été incubées à 37°C pendant 24H sous agitation.

**Jour 2 :**

- L'inoculum a été standardisé à  $10^8$  UFC/ml dans le milieu TSBG.
- Un volume de 200µl de la suspension bactérienne a été réparti dans chaque cupule de la microplaque.
- Deux concentrations de l'extrait brut (5, 23 et 46 mg/l pour E4 et 18,5 et 37 mg/l pour S19) ont été préparées et réparties dans une rangée de cupules contenant la suspension bactérienne.
- Une rangée contenant uniquement du TSBG est utilisée comme contrôle négatif et un autre contenant du TSBG + l'inoculum sans extrait brut est utilisée comme contrôle positif.
- La microplaque a été incubée à 37°C pendant 24h.

**Jour3**

- Le contenu dans la microplaque a été retiré puis un lavage avec 350µl d'eau distillée stérile a été réalisé 3 fois afin d'éliminer les bactéries planctoniques.
- La microplaque a été incubée à l'étuve à 60°C pendant 45min pour fixer le biofilm.
- Un volume de 200µl de cristal violet à 0,2% a été ajouté à la microplaque puis laisser à température ambiante pendant 15min.
- Un lavage à l'eau distillée stérile a été réalisé 3 fois afin d'éliminer toute trace de colorant non fixé.
- Un volume de 150µl d'une solution d'éthanol à 95% a été ajouté pour libérer le colorant fixé au sein des cellules emprisonnées dans le biofilm ainsi formé.
- L'absorbance de tous les puits est déterminée par l'intermédiaire d'un lecteur de microplaque BIOTEK à une longueur d'onde de 630 nm (figure 8).

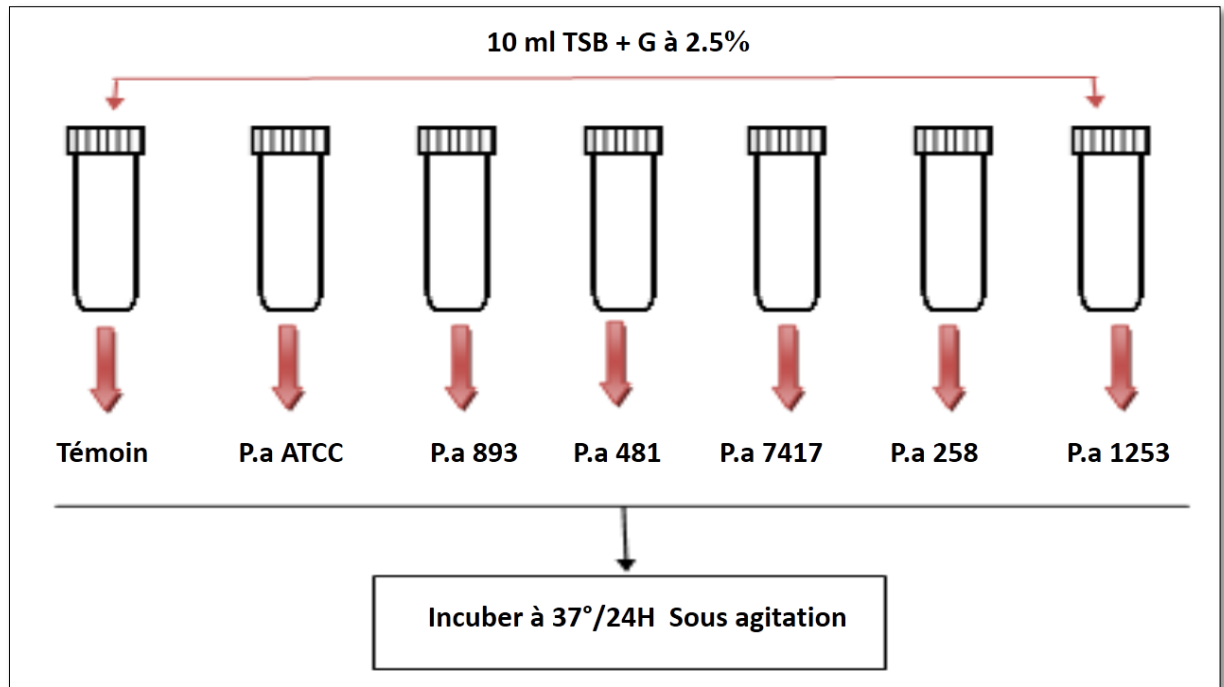


Figure 7a : Culture des souches cibles dans le milieu TSBG

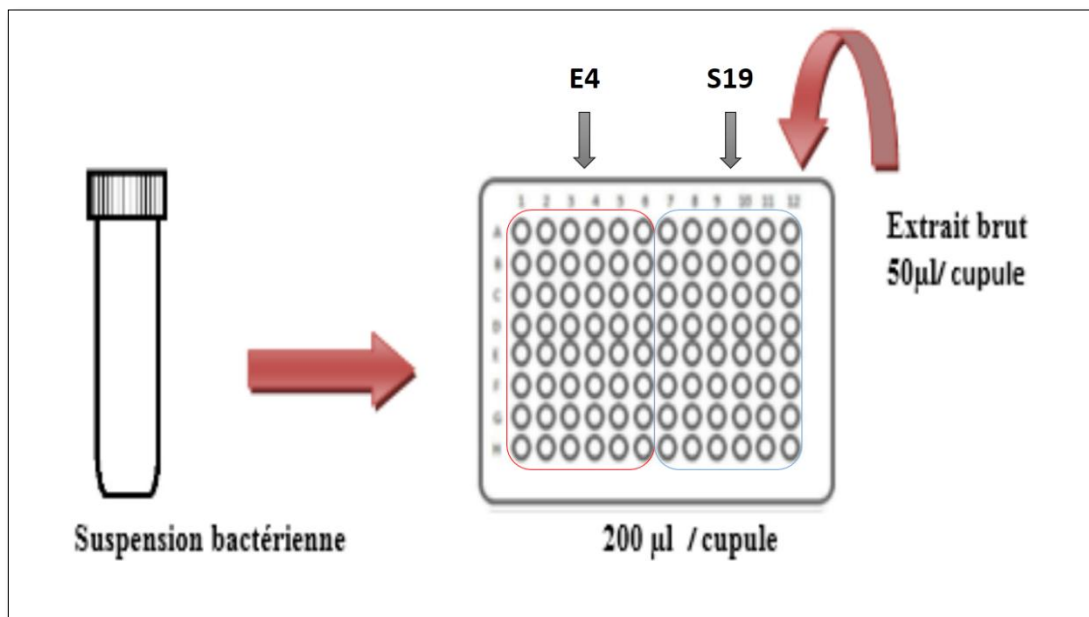
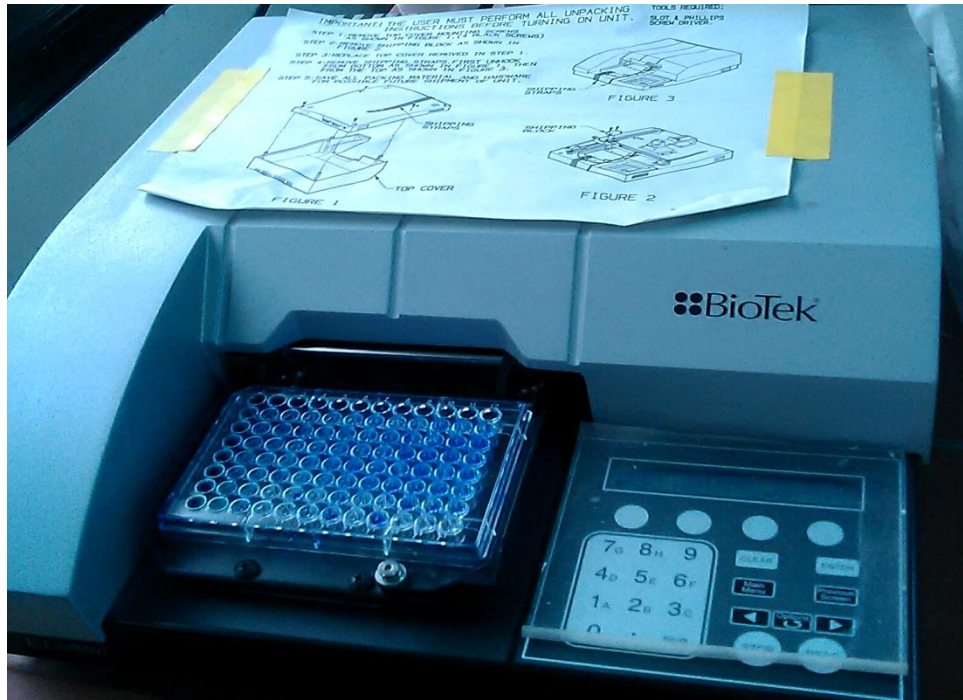


Figure 7b : Préparation de la microplaque

Figure 7 : Protocol de la technique de quantification des biofilms sur microplaque.





**Figure 8 :** Lecteur de microplaque (BIOTEK®).

## I. Résultats

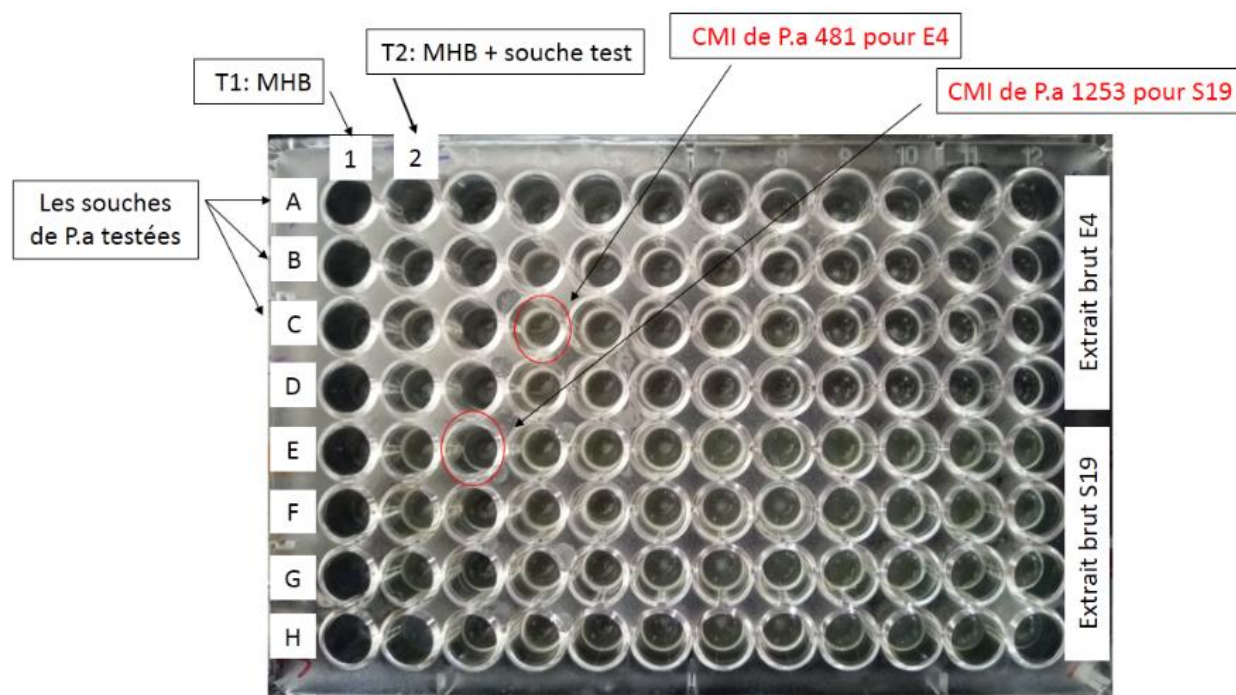
### I.1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des souches de *P. aeruginosa* pour les extraits bruts

Les résultats de la détermination des CMI des extraits bruts par la technique de microdilution en milieu liquide (MH) ont montré que les souches cibles de *P. aeruginosa* étaient relativement sensibles aux deux extraits bruts E4 et S19. Avec, toutefois, une meilleure activité antibactérienne pour l'extrait E4 (CMI de 5 à  $23 \cdot 10^2$  mg/l pour E4 contre 46 à  $92,5 \cdot 10^2$  mg/l pour S19). D'autre part, concernant les témoins contenant les solvants DMSO et le méthanol, aucune activité n'a été observée. Les résultats sont résumés dans le tableau V.

**Tableau V** : Résultat des CMI des souches cliniques de *P. aeruginosa*

Souche	CMI $\cdot 10^2$ mg/L	
	Extrait E4	Extrait S19
<b>P.a 481</b>	23	92,5
<b>P.a1253</b>	11.5	46
<b>P.a 258</b>	11.5	92,5
<b>P.a 893</b>	11.5	92,5
<b>P.a 7417</b>	5	46

Cette activité enregistrée contre les souches cliniques multirésistantes aux antibiotiques de *P. aeruginosa* suggère que les extraits E4 et S19 contiennent des composés bioactifs responsables de l'inhibition de la croissance de la bactérie testée avec un effet inhibiteur plus élevé sur la souche *P.aeruginosa* 7417.



**Figure 9** : Résultat des CMI des extraits bruts sur microplaque.

## I.2. Mise en évidence de l'activité anti biofilm des extraits bruts vis-à-vis des souches de *P.aeruginosa*

### I.2.1. Formation de biofilm

La capacité à former un biofilm a été testée pour les cinq souches cliniques de *P. aeruginosa*. Les absorbances indiquant la formation de biofilms ont été mesurées après coloration au cristal violet par le lecteur de microplaque (BioTeK). Les deux souches P.a 893 et P.a 258, ayant donné de meilleurs résultats (soit une DO 5 fois supérieure au contrôle), ont été retenus pour la suite du test d'activité antibiofilm (tableau VI).

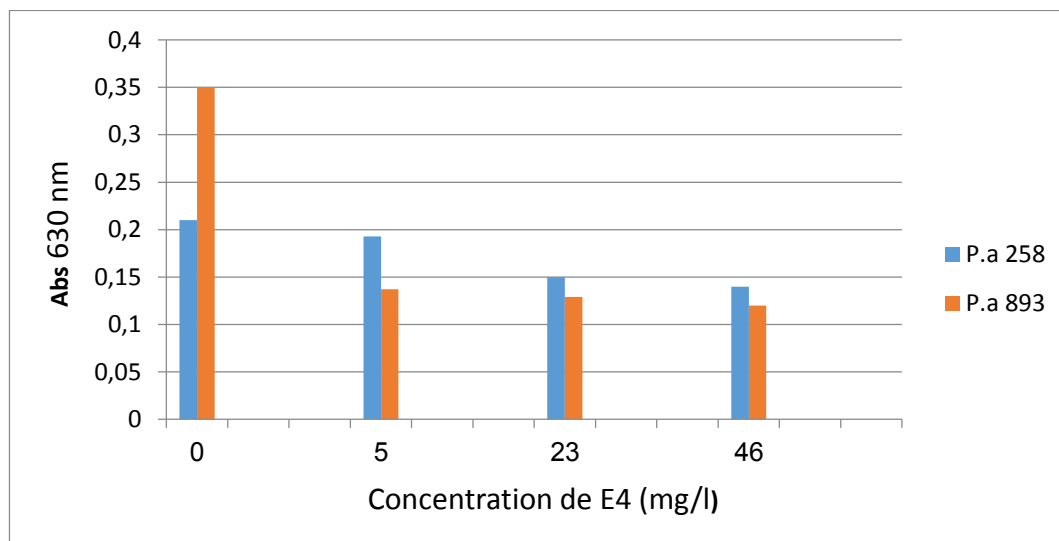
**Tableau VI** : Résultats du test de formation de biofilm pour les souches de *P. aeruginosa*

DO (à 630 nm)	Contrôle négatif	Souches				
		P.a 893	P.a1253	P.a 258	P.a 481	P.a 7417
	0,061	0,324	0,28	0,32	0,263	0,125

Les extraits bruts obtenus par macération E4 et S19 ont été testés quant à leur pouvoir anti-biofilm à l'égard de deux souches de *P. aeruginosa* (P.a 893 et P.a 268). Les résultats de la lecture de la microplaque sont donnés dans les figures 10 et 11.

### I.2.2. Activité antibiofilm de l'extrait E4

D'après les résultats obtenus, Il est clairement remarqué une diminution de la formation des biofilms par les souches cibles (P.a 258 et P.a 893). En effet, la réduction de la formation des biofilms augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait brut E4 (5mg/l, 23 mg/l et 46 mg/l) (figure 10).

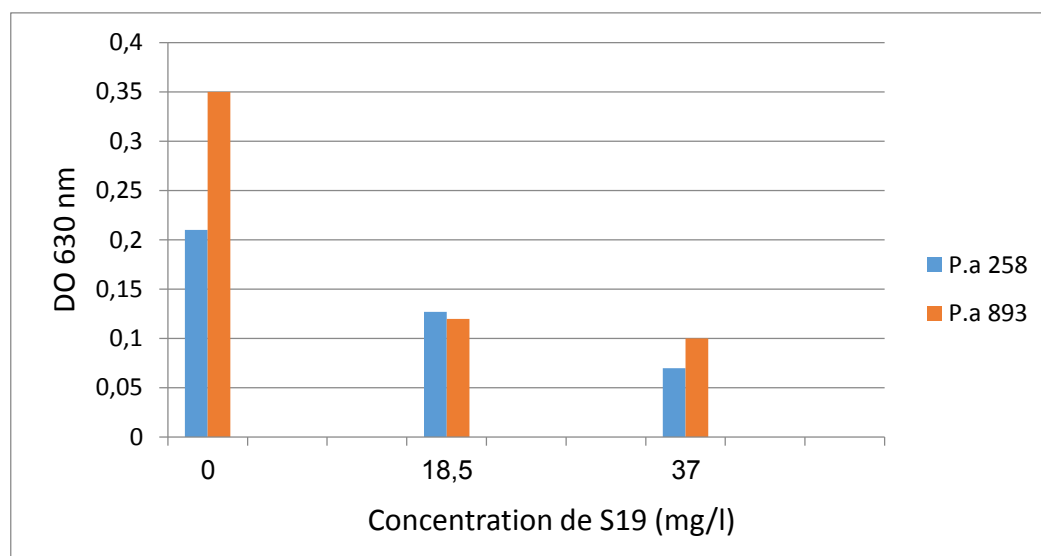


**Figure 10 :** Effet de l'extrait brut E4 sur les biofilms formés par P.a 258 et P.a 893.

Il est à noter que le taux de réduction de biofilm était de 28,5% pour la souche P.a 258 à partir de la concentration de 23 mg/l de l'extrait brut E4. Alors que pour la souche P.a 893, ce même taux était de 61% à partir de la concentration de 5mg/l.

### I.2.3. Activité antibiofilm de l'extrait S19

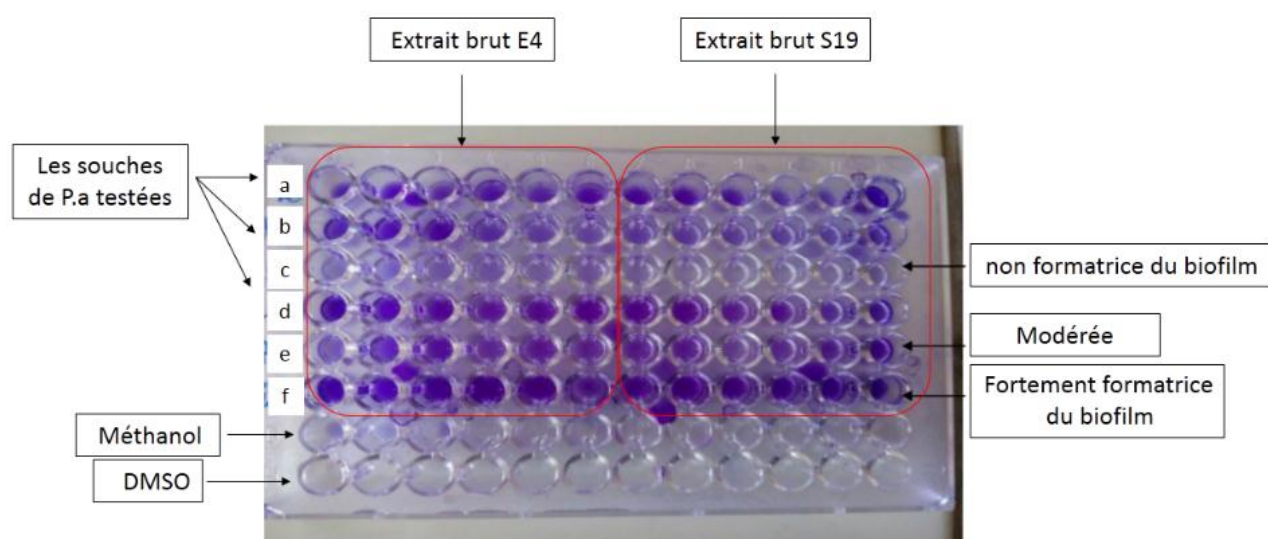
Selon la figure 11, on remarque une diminution de la formation des biofilms par les souches cibles (P.a 258 et P.a 893). En effet, la réduction de la formation des biofilms augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait brut S19 (18,5mg/l et 37mg/l).



**Figure 11** : Effet de l'extrait brut S19 sur les biofilms formés par P.a 258 et P.a893.

Le taux de réduction de biofilm enregistré était de 40% et de 66% pour les souches P.a 258 et P.a 893 respectivement à partir de la concentration de 18,5mg/l de l'extrait brut S19. Un taux de réduction plus élevé (67%) a été observé pour la souche P.a 258 à une concentration de 37mg/l.

L'ensemble de ces résultats nous amènent à conclure que les deux extraits bruts issus de souches de *Streptomyces* présentent une activité antibiofilm non négligeable vis-à-vis des deux souches cliniques et multi-résistantes aux antibiotiques de *P. aeruginosa*. De plus, il est à signaler qu'il n'y a aucune activité antibiofilm des solvants utilisés à savoir le méthanol et le DMSO à l'encontre des souches testées (figure 12).



**Figure 12** : microplaque de biofilm.

## II. Discussions

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales graves, d'infections potentiellement mortelles chez les personnes immunodéprimées et d'infections chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose, qui se caractérisent par la sécrétion de facteurs de virulence extracellulaires parmi lesquels la formation du biofilm constitué principalement d'alginate et qui protège la bactérie de la phagocytose, la déshydratation et des antibiotiques (Ben Hadj Khalifa et al., 2011). De plus, ce germe présente un niveau élevé de résistance aux antibiotiques en accumulant les mécanismes naturels et acquis. Des travaux menés en Algérie ont rapporté l'émergence de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* au cours de ces dix dernières années (Berrazeg et al., 2013; Mesli et al., 2013). Ceci reflète la problématique des souches multirésistantes, compliquant ainsi la prise en charge thérapeutique des patients.

De ce fait, la recherche de nouvelles molécules actives aussi bien sur la bactérie elle-même que sur les facteurs de virulence qu'elle produit reste une voie intéressante pour faire face à cette impasse thérapeutique. Les actinobactéries s'avèrent être une des sources les plus importantes de molécules bioactives en particulier le genre *Streptomyces*. A cet effet, notre étude avait pour objectif de tester l'effet antibactérien et antibiofilm de deux souches de *Streptomyces* isolées de deux sites particuliers, l'une à partir de sol saharien (E4) et l'autre de station d'épuration (S19) vis-à-vis de souches cliniques de *P. aeruginosa*.

L'étude de l'activité antibactérienne a révélé que les souches cibles étaient relativement sensibles à de fortes concentrations d'extraits bruts avec un effet inhibiteur remarquablement plus élevé pour l'extrait E4 (CMI  $\leq 23 \cdot 10^2$  mg/l) par rapport à l'extrait S19 (CMI  $\geq 46,3 \cdot 10^2$  mg/l). Une étude comparative menée par Aouiche et al (2012) a rapportée une activité antimicrobienne intéressante (CMI de 75mg/l) d'un extrait pur issu d'une souche d'actinomycète appartenant au genre *Streptomyces* isolée d'un échantillon de sol saharien de la région de Ghardaïa vis-à-vis d'une souche de *P.aeruginosa* IPA1 résistante aux antibiotiques (carbénicilline, gentamycine, néomycine et sulfamides).

Par contre, une étude sur l'activité antimicrobienne d'une souche de *Streptomyces* SM2/2GF isolée du sédiment de la lagune El-Mellah (El-Kala) a rapporté un résultat positif sur



une souche de *Pseudomonas alcaliphila* mais pas sur *P. aeruginosa* (Alliouch-Kerboua et al., 2015).

Dans notre étude, l'effet des extraits bruts sur la formation des biofilms par les souches de *P. aeruginosa* a été étudié. Les résultats ont prouvé que le taux de formation des biofilms a été diminué par l'augmentation de la concentration de l'extrait. On a enregistré un taux de réduction de biofilm de 28,5% pour la souche P.a 258 à partir de la concentration de 23 mg/l de l'extrait brut E4. Alors que pour la souche P.a 893, ce même taux était de 61% à partir de la concentration de 5mg/l. Egalement, le taux de réduction de biofilm enregistré était de 40% et de 66% pour les souches P.a 258 et P.a 893 respectivement à partir de la concentration de 18,5mg/l de l'extrait brut S19.

Une étude comparative menée par Kim et al, (2012) a démontré que les actinobactéries produisent une large variété d'agents actifs agissant comme inhibiteur de la formation de biofilms de l'espèce *P. aeruginosa* PAO1. En outre, cette étude suggère que les espèces appartenant à l'ordre des *Actinomycetales* ; en particulier le genre de *Streptomyces* est capable de produire des sidérophores de nature peptidiques ainsi que des molécules de nature protéiques ou peptidiques pouvant interférer dans la formation de biofilm par *P. aeruginosa* à travers la limitation d'accès aux atomes de fer.

De même, des études récentes ont montré que les processus d'acquisition du fer et de formation de biofilm sont intimement liés chez *P. aeruginosa* (Banin et al., 2005). En effet, *P. aeruginosa* capture les atomes des ions environnementaux avec deux sidérophores endogènes, la pyoverdine et la pyochéline (Michel et al., 2005). La pyoverdine est impliquée dans la maturation et le contrôle du biofilm, la communication entre cellules et la régulation de la virulence (Visca et al., 2007; Imperi et al., 2009), et la pyochéline contribue également à sa virulence (Cox, 1982).

Le QS est un processus par lequel les bactéries produisent et détectent des molécules de signal et ainsi coordonnent leur comportement d'une manière dépendante de la densité cellulaire. Bien qu'il reste beaucoup à apprendre sur l'implication du QS dans la formation, la maintenance et la dispersion des biofilms, les inhibiteurs de QS (QSI) ont été proposés comme agents antibiofilm prometteurs. Ainsi, Yuqi Du et al., (2018), a rapporté que Sept nouvelles  $\alpha$ -pyridones identifiées à partir des métabolites secondaires de *Streptomyces sp.* OUCMDZ-3436 isolée à partir de l'algue verte marine, *Enteromorpha prolifera* ont montré un effet inhibiteur sur l'expression du gène contrôlée par la détection du quorum chez *Pseudomonas aeruginosa* QSI-lasI.

## Conclusion

Au terme de cette étude, les deux extraits bruts des souches de *Streptomyces* issues d'environnements particuliers, à savoir le sol saharien de sebkha (souche E4) et la station d'épuration (souche S19), ont présenté une activité antibactérienne vis-à-vis des souches cliniques et multirésistantes de *P. aeruginosa* avec toutefois une meilleure activité pour l'extrait brut de la souche de *Streptomyces* isolée à partir du sol saharien algérien. De plus, ces deux mêmes extraits ont également présenté une activité antibiofilm avec des taux de réduction de formation de biofilm relativement élevé (de 28,5% pour la souche P.a 258 à partir de la concentration de 23 mg/l de l'extrait brut E4 et un taux de réduction de 63% a été rapporté pour la souche P.a 893. Alors que pour l'extrait S19, on a enregistré un taux de 40% et de 66% pour les souches P.a 258 et P.a 893 respectivement à partir d'une concentration de 18,5mg/l).

Ainsi, au vue de l'émergence actuelle de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques associés aux gènes de virulence chez les souches de *P. aeruginosa* ayant pour conséquence la complication de la prise en charge thérapeutique des patients, la recherche de nouveaux écosystèmes pour l'isolement d'actinobactéries est crucial pour la découverte de nouvelles espèces et/ou de nouvelles substances naturelles bioactives non toxiques pour l'hôte douées d'activité antibactérienne et antibiofilm.

Les résultats obtenus dans notre étude sont probants et méritent d'être plus approfondies. De là, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Les principales sont les suivantes :

- Détermination de la concentration minimale inhibitrice de biofilm.
- Purification et caractérisation structurale de chacune des molécules bioactives produite par le biais des techniques chromatographiques et spectrométriques.
- Etude de l'effet des extraits bruts qui ont montré un effet sur la formation de biofilm, sur la viabilité cellulaire et sur des biofilms établi et qui seront confirmés par des tests *in vivo* pour un intérêt thérapeutique.
- Des études de structure-activité sont encore nécessaires pour mieux assigner les caractéristiques structurelles essentielles responsables de l'activité antibiofilm.



- Rechercher les actinobactéries dans d'autres écosystèmes inexplorés afin d'augmenter les chances de trouver des molécules innovantes qui possèdent un potentiel important, en particulier le Sahara algérien.

### A

- Aissa K. (2012). Profil de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques aux services de réanimation à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V de rabat entre 2006 et 2010. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- faculté de médecine et de pharmacie, Rabat.
- Allesen-Holm M, Barken KB et Yang L. (2006). A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Molecular Microbiology*, 59 (4), 1114–1128.
- Alnnasouri, M. (2010). Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Aouiche, N. Sabaou, A. Meklat, A. Zitouni, F. Mathieu, A. Lebrihi, (2012). Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques, p.43-51.

### B

- Banin E, Vasil ML, Greenberg EP. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11076–11081.
- 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.
- Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat de Biologie. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Tlemcen, 90 p.
- Ben Haj Khalifa Anis, Didier Moissenet, Hoang Vu Thien, Mohamed Khedher (2011). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations, vol 69, P.395.
- Bessier R., Califano J., Carrette M. et Lombardo M. (2005). La lutte antibactérienne. *Université Nice Sophia Antipolis*.

### C

- Campanac C. (2002). Biofilms bactériens, intérêt dans l'évaluation de l'activité détergent, approche des facteurs impliqués dans la formation et la résistance finale. *Thèse, Université Paul Sabatier ; Toulouse ; France.*
- Chaker Hichem. (2012). Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites de tryptophane. Thèse de Doctorat. Ecole Doctorale ingénierie pour la santé, la Cognition et l'environnement, université de grenobol, P3.
- Chalvet de Rochemonteix A. (2009). Les biofilms et la peau. Thèse Pour le Doctorat vétérinaire. École Nationale Vétérinaire D'alfort Paris.
- Chérifa Alliouch-Kerboua, Djamila Gacemi Kirane et Bernard La Scola. (2015) Activité antimicrobienne d'une *Actinomycetale* isolée d'une lagune en Algérie, *Ann Biol Clin*, vol. 73, n° 2, p.176-179.
- Chew SC, Kundukad B, Seviour T, van der Maarel JRC, Yang L, Rice SA, Doyle P et Kjelleberg S. (2014). Dynamic remodeling of microbial biofilms by functionally distinct exopolysaccharides. *mBio*, 5(4), e01536-14.
- Choulet. F. (2006). Evolution du génome des Streptomyces : transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy 1, pp 210.
- Colombié.V. (2005). Description de la production de spiramycine par Streptomyces ambofaciens. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp174.
- Colvin KM, Gordon VD, Murakami K, Borlee BR, Wozniak DJ, Wong GCL, Parsek MR. 2011. The Pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 7(1), e1001264.
- Cooley BJ, Thatcher TW, Hashmi SM, L'Her G, Le HH, Hurwitz DA, Provenzano, Touhami A, Gordon VD. 2013. The extracellular polysaccharide Pel makes the attachment of *P. aeruginosa* to surfaces symmetric and short-ranged. *Soft Matter*, 9(14), 3871-3876.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE et al. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review Microbiology*; 49, 711-745.
- Costerton JW, Stewart PS, GREENBERG EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-1322.

- Cotton C. (2009).Epidémiologie des infections à Pseudomonas. Duacai, Valenciennes.
- Cox CD (1982) Effect of pyochelin on the virulence of Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun 36:17–23.

### D

- Das T, Kutty SK, Kumar N et Manefield M. (2013). Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. *PLoS One*, 8(3), e58299.
- Delarras, C. (2007). Pseudomonas et ex-Pseudomonas. Dans : Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition médicales internationales, Paris : Technique Et Documentation Lavoisier, Vol.1 : p339-340. ISBN-10 : 2743009454, ISBN-13 : 978-2743009458.
- 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.
- Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Driche El Hadj, Nasserline Sabaou, Christian Bijani, Abdelghani Zitouni, Frédéric Pont, Florence Mathieu et Boubekeur Badji.(2017). *Streptomyces* sp. AT37 isolated from a Saharan soil produces a furanone derivative active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*.
- Dubois. (2013).Pseudomonas aeruginosa : réservoir, virulence et résistance. Laboratoire de Microbiologie, UMR CNRS 5234 « Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité ».

### E

- Elyajouri A. (2012).Actualités des infections à Pseudomonas aeruginosa. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- Souissi faculté de médecine et de pharmacie – Rabat.
- Essoh C .Y. (2013).Étude épidémiologique de souches de Pseudomonas aeruginosa responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique. Thèse de doctorat. Université PARIS-SUD XI. Paris, Franc

### F

- Filopon D. (2005). Mécanismes de régulation impliqués dans la pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* : système de sécrétion de type III, Epigénèse et quorum sensing. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier – Grenoble I, France.
- Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(9), 623-633.

### G

- Ghafoor A, Hay ID et Rehm, BH. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and environmental microbiology*, 77(15), 5238-5246.
- Genilloud O., Gonzalez I., Alazar O., Martin J et Vicente F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 38:375–389.
- George M., Anjumol A., George G et Mohamed Hatha AA. (2012). Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *Afr J Microbiol Res.*, 6:2265–2271.
- Goodfellow M. (2012). Phylum XXVI. Actinobacteria phyl. nov. In: Goodfellow *et al.* (Editors). *Bergey Manual of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria*, second edition, vol. V, part A, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. pp. 1–28.
- Goodman AL, Kulasekara B, Rietsch A, Boyd D, Smith RS et Lorys (2004) A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell*, 7, 45-754.
- Gottlieb D. (1973). General consideration and implication of the *Actinomycetales*. In: *Actinomycetales characteristics and practical importance*. Edited by Sykes. G and F. Skinner. Academic Press. London, New York.

### H

- Haras D. (2005). Biofilms et altérations des matériaux : de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques* 93, 27–41 Hors-Série.

### I

- Imperi F, Tiburzi F, Visca P (2009) Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:20440–20445.

## Références bibliographiques

---

- Irie Y, Borlee BR, O'Connor JR, Hill PJ, Harwood CS, Wozniak DJ et Parsek MR. (2012). Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A*, 109(50): 20632-20636.

### K

- Khalilzadeh P. (2009). Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat d'Université de Paul Sabatier - Toulouse III. Toulouse.
- Kitouni M. (2007). Isolement de bactéries *Actinomycétales* productrices d'antibiotique à partir d'écosystèmes extrêmes. caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat de Microbiologie Appliquée. Université Mentouri-Constantine, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Constantine, 176p.
- Kukavica-Ibrulj I. (2007). Chapitre 1. Introduction. Collection mémoires et thèses électroniques .Université Laval. Québec, Canada.

### L

- Larpent JP, Sanglier JJ. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Edition : Masson. Paris : 481p.
- Lazdunski A ; Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* et leur régulation. *Med Mal Infect* (1988), p. 109-118. LECHEVALIER A.H., 1981- Introduction to the order Actinomycetales, vol 2. Springer-Verlag Edition Berlin : 1915-1922

### M

- Ma L, Lu H, Sprinkle A, Parsek MR et Wozniak DJ. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactos and mannose-rich exopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8353-8356.
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K et Wozniak DJ. 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*, 5(3), e1000354.
- McDaniel, C.T., Panmanee, W. et Hassett, D.J. (2015). "Un aperçu des infections dans les voies respiratoires de la fibrose kystique et le rôle des conditions environnementales sur la formation et la viabilité du biofilm de *Pseudomonas*

*aeruginosa* », dans Fibrose kystique dans la lumière de la nouvelle recherche, éd. D.Wat (InTech), 171-198.

- Méar J-B. (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.
- Mérens A., Jault P., Bargues L et Cavallo J.-D. (2013). Infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Résumé. Elsevier Masson SAS.
- Mesaros N. *et al.* (2007). *Pseudomonas aeruginosa* : Résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. 126, 8 : 305-316.
- Michel L, Gonzalez N, Jagdeep S, Nguyen-Ngoc T et Reimann C (2005) PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Mol Microbiol* 58:495–509
- Muller A. et Guaguere E. (2014). L'Antibiothérapie n'est pas la seule source d'antibiorésistance : notion de biofilm. *Conflits AFVAC. Médecine interne / maladies infectieuses*. Paris - la Défense.

### P

- Pamp SJ et Tolker-Nielsen T. (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189(6), 2531-2539.
- Park. J.O; El-Tarabily. K.A; Ghisalberti. E.L; and Sivasithamparam. K. (2002). Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 361–365.
- Parsek MR et Tolker-Nielsen T. (2008). Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6), 1-7.
- Parot S. (2007). Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes. Thèse de doctorat. L'institut national polytechnique de Toulouse, France.
- Pecastaings S. (2010). Apport de modèles de biofilms à *Pseudomonas aeruginosa* et *Legionella pneumophila* à la maîtrise de la qualité microbiologique des réseaux d'eaux minérales naturelles. Thèse de doctorat. Université de Toulouse.

- Pimentel-Elardo, S.M, Kozytska,S, B Bugni, T.S, Ireland, C.M, Moll, H.et Hentschel. (2010). U. Anti- Parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Mar. Drugs* vol 8, p. 373–380.

### R

- Ranjani Anandan, Dhanasekaran Dharumadurai et Gopinath Ponnusamy Manogaran. (2016). An Introduction to Actinobacteria Department of Microbiology, School of Life Science, Bharathidasan University, Tiruchirappalli, Tamil Nadu, India,vol , p. 13.
- Ryder C, Byrd M et Wozniak DJ. 2007. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion Microbiology*, 10(6), 644-648.

### S

- Sabaou N, Boudjella H, Bennadji A, Moustefaoui A, Zitouni A, Lamari L, Bennadji H, Lefévre G et Germain P. (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. 9 (2), 147-153.
- Salton, M.J.R., Kim et K.S.(1996). Structure. *Baron's Med. Microbiol.(Baron S et al, eds.)*, 4th ed., Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.
- Saussereau E. (2013).Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité. Thèse de doctorat d'Université Pierre et Marie Curie. Paris VI.
- Schurr MJ. (2013). Which Bacterial Biofilm Exopolysaccharide is Preferred, Psl or Alginate?. *Journal of Bacteriology*, 195(8), 1623-1626.
- Singh PK, Schaefer AL , Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ et Greenberg EP (2000) Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, 407, 762-764.
- Singh, S.L, Baruah. I; aet Bora. T.C. (2006). Actinomycetes of lake Loktat Habitat: Isolation and screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnol*, 5 (2),217-221.
- Solecka J, Zajko J, Postek M et Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Central European of Journal Biology*. 7(3), 373-390.
- Stapper AP, Narasimhan G, Ohman DE, Barakat J, Hentzer M, Molin S, Kharazmi A, Høiby N, et Mathee K.( 2004). Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, 53(7), 679-690.



### T

- Theilleux J. (1993). Les actinomycètes in : Microbiologie Industrielle, les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier, Tech et Doc, V 612p, pp.
- Tiwari K., Gupta RK. (2011). Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel Antibiotics. Crit Rev Biotechnol., 32:108–132.
- Touati M. (2013). Antibio-résistance des bacilles à Gram négatif non fermentants isolés au niveau des services de réanimation - CHU Annaba. Thèse de doctorat. Université Badji Mokhtar-Annaba.

### V

- Visca P, Imperi F et Lamont IL (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. Trends Microbiol 15:22–30.

### Y

- Yong-Guy Kim, Jin-Hyung Lee, Chang-Jin Kim, Jae-Chan Lee, Yoon Jung Ju, Moo Hwan Cho , Jintae Lee, Antibiofilm activity of *Streptomyces* sp. BFI 230 and *Kribbella* sp. BFI 1562 against *Pseudomonas aeruginosa* (2012), vol 96, p.1607–1617
- Yuqi Du, Jian Sun, Qianhong Gong, Yi Wang, Peng Fu et Weiming Zhu J. (2018). Agric. Food Chem. New Pyridones with Quorum Sensing Inhibitory Activity from Diversity- Enhanced Extracts of a Marine Algae-Derived *Streptomyces* sp.

## Annexe I

### Matériels analytique

- Autoclave (BIOBASE)
- Bain-marie (GFL)
- Balance analytique (RADWAG référence : PS210/C/2)
- Barreaux magnétiques
- Bec Bunsen
- Bêchers
- Boîtes de pétri
- Eprouvette
- Erlenmeyers
- Etuves à 37°C et à 60°C
- Flacons
- Four Pasteur à 180°C
- Micropipettes(500 et 1000µl)
- Microplaques de biofilm de 96 puits
- Microscope optique (ZEISS)
- Pipettes Pasteur
- Plaque agitatrice (Raypa AG-5)
- Spectrophotomètre (RAYLEIGH)
- Tube à essais
- Vortex (VELP scientifica)

**Annexe II**

**Solutions et milieux de cultures utilisés :**

- Gélose nutritive.
- Mueller Hinton Agar
- Eau physiologique.
- TSB .....30g /1l
- Glucose à 2.5%..... 2g / 10ml
- Cristal Violet à 0. 2%.
- MHB
- Méthanol pur
- DMSO
- Extrait brut E4
- Extrait brut S19

### Annexe III

**Tableau VII:** Résultats de lecture de microplaque après coloration au cristal violet de l'extrait E4.

Concentrations de E4 (mg/L)												
Souches	0			5			23			46		
<b>P258</b>	0,2	0,213	0,24	0,2	0,222	0,222	0,2	0,189	0,222	0,131	0,147	0,154
<b>Moy</b>	0,21			0,21			0,2			0,14		
<b>Ecart type</b>	0,020404248			0,024785749			0,016802778			0,011789826		
<b>P893</b>	0,348	0,353	0,352	0,138	0,134	0,14	0,13	0,125	0,134	0,122	0,112	0,127
<b>Moy</b>	0,35			0,137			0,129			0,12		
<b>Ecart type</b>	0,002645751			0,00305505			0,00450925			0,007637626		

**Tableau VIII:** Résultats de lecture de microplaque après coloration au cristal violet de l'extrait S19.

Souches	0			18,5			37		
<b>P258</b>	0,2	0,213	0,24	0,129	0,127	0,127	0,075	0,062	0,075
<b>Moy</b>	0,21			0,127			0,07		
<b>Ecart type</b>	0,020404248			0,001154701			0,007505553		
<b>P893</b>	0,348	0,353	0,352	0,129	0,119	0,121	0,1	0,1	0,11
<b>Moy</b>	0,35			0,12			0,1		
<b>Ecart type</b>	0,002645751			0,005291503			0,005773503		

## Annexe IV

**Tableau IX** : Diamètres (mm) des zones édités par le CLSI, 2015 pour *P. aeruginosa*.

Familles d'antibiotiques	Antibiotiques testées	Signe	Charge des disques	Diamètre critiques mm		
				S	I	R
<b>Beta-lactamines</b>	Piperacillin	PI	100µg	≥21	15-20	≤14
	Ticarcillinclavulanate	TCC	75/10µg	≥24	16-23	≤15
	Ceftazidime	CAZ	30µg	≥18	15-17	≤14
	Imipenem	IPM	10µg	≥19	16-18	≤15
	Aztreonam	ATM	30µg	≥22	16-21	≤15
	Meropenem	MEM	10µg	≥19	16-18	≤15
<b>Aminoglycosides</b>	Gentamicin	GN	10µg	≥15	13-14	≤12
	Tobramycin	TOB	10µg	≥15	13-14	≤12
	Amikacin	AK	30µg	≥17	15-16	≤14
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacin	CIP	5µg	≥21	16-20	≤15

## Résumé

L'objectif principal de cette étude était de tester l'activité antibactérienne et antibiofilm de deux extraits bruts (E4 et S19) issus de souches d'actinobactéries appartenant au genre *Streptomyces*, isolées à partir de sol salin (sebkha) du sud algérien à Béni Abbés de la wilaya de Bechar et une station d'épuration à Bejaia respectivement, vis-à-vis cinq souches cliniques et multirésistantes de *P.aeruginosa*

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des deux extraits bruts testés a été réalisée par la technique de microdilution dans des microplaques à fond incurvé. Tandis que, l'étude de l'activité antibiofilm a été réalisée par la méthode de microplaque basée sur la coloration par le cristal violet.

Les résultats ont montré que les souches cibles de *P. aeruginosa* étaient relativement sensibles aux deux extraits bruts E4 et S19 avec, toutefois, une meilleure activité antibactérienne pour l'extrait E4. De plus, les extraits bruts ont révélé un effet inhibiteur non négligeable à de faibles concentrations sur les biofilms formés par les souches de *P.aeruginosa*.

Il en ressort que la famille des actinobactéries issues d'environnements particuliers joue un rôle potentiel dans la lutte contre les biofilms.

**Mots clés :** *P.aeruginosa*, Extrait brut, *Streptomyces*, activité antibactérienne, activité antibiofilm.

## Abstract

The main objective of this study was to test the antibacterial and antibiofilm activity of two crude extracts (E4 and S19) from strains of actinobacteria belonging to the genus *Streptomyces*, isolated from saline soil (sebkha) from southern Algeria in Beni Abbes wilaya of Bechar and a wastewater treatment plant in Bejaia respectively, against five clinical and multi-resistant strains of *P.aeruginosa*

The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the two crude extracts tested was carried out by the micro-dilution technique in microplates with a curved bottom. While, the study of antibiofilm activity was performed by the microplate method based on crystal violet staining.

The results showed that the target strains of *P. aeruginosa* were relatively sensitive to both crude extracts E4 and S19 with, however, better antibacterial activity for the E4 extract. In addition, the crude extracts revealed a significant inhibitory effect at low concentrations on biofilms formed by *P. aeruginosa* strains.

It appears that the family of actinobacteria isolated from particular environments play a potential role in the fight against biofilms.

**Key words:** *P. aeruginosa*, crude extract, *Streptomyces*, antibacterial activity, antibiofilm activity.

## ملخص

كان الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو اختبار النشاط المضاد للجراثيم والمضاد الحيوي لمستخلصين اثنين (E4 و S19) من سلالات بكتريا الأكتين التي تنتمي إلى جنس *Streptomyces* المعزول من التربة الملحية (sebkha) من جنوب الجزائر في ولاية بني عباس في بشار و محطة معالجة مياه الصرف الصحي في بجاية على التوالي، ضد خمسة سلالات سريرية ومقاومة متعددة من الزائفة الزنجارية تم تنفيذ تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط (MIC) للمستخلصين الخامين المختبرين بواسطة تقنية التخفيف الدقيقة في الصفائر ذات القاع المنحني. في حين، تم تنفيذ دراسة نشاط مضاد حيوي بواسطة طريقة الصفيحة الدقيقة على أساس تلوين البنفسجي الكريستال.

وأظهرت النتائج أن السلالات المستهدفة من الزائفة الزنجارية حساسة نسبيا لكل من المستخلصات الخام E4 و S19، مع ذلك، أفضل فعالية مضادة للجراثيم لمستخلص E4. بالإضافة إلى ذلك، كشفت مستخلصات الخام عن تأثير مثبط كبير عند التركيزات المنخفضة على الأغشية الحيوية التي شكلتها سلالات الزائفة الزنجارية.

يبدو أن عائلة البكتيريا المعزولة من بيئات معينة تلعب دورا محتملا في مكافحة الأغشية الحيوية.

الكلمات المفتاحية: الزائفة الزنجارية، مستخلص خام، *Streptomyces*، نشاط مضاد للجراثيم، نشاط مضاد حيوي.