

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

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : 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'un
extrait brut bioactif de la souche
*Streptomyces D2***

Présenté par :

HAMMACHI Salma& KHENE Ilham

Soutenu le : 20 juin 2017

Devant le jury composé de :

Mme Saidani. K	MAA	présidente
Melle Yanat. B	MCB	Encadreur
Mme Souagui. S	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

*Remerciant tout d'abord Dieu tout puissant de nous
avoir donné la force de réaliser ce travail*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos
vifs remerciement à : Notre promotrice **DR YANAT**
qui a accepté de nous accueillir dans le laboratoire de
microbiologie. Nous lui témoignons, notre gratitude et
nos reconnaissances sans oublier **Melle DJINNI** qui nous
a prodigé de précieux conseils pour ses orientations.*

*Nous tenons à exprimer nos sentiments de
reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à
ce travail, qui nous ont appris beaucoup de choses et qui
nous ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin
de réaliser ce travail dans les meilleurs conditions.*

*Nous tenons à remercier les membres de jury, qui ont
évalué notre travail pendant notre soutenance.*

SALMA et ILHAM



DEDICACES

Nous dédient ce modeste travail :

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour.

A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles.

A mes parents pour leur amour et leur support continu.

A mes frères et toute ma famille, sans oublier les amis.

Que ce travail soit le témoignage sincère et affectueux de ma profonde reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi

SALMA ET ILHAM



Ce modeste travail est dédiée à :

***A** ma chère mère mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, à l'âge adulte, Je te dédie ce travail en témoignage mon éternelle reconnaissance et ma profonde admiration, mon père pour le respect que j'ai toujours eu pour vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

***A** mes très chère sœurs Ouardia, Siham, Rima et ma petite sœur Asma.*

***A** ma famille de grand jusqu' aux petit.*

***A** mon bras droit **FAHEM CHAOUI**, ton soutien moral, ta gentillesse sans égal, ta profond attachement m'ont permis de réussir et de finir mes études.*

***A** mes meilleures amies : Amel, Samira, Hanane, Tassadit et Ouiza*

***A** mon binôme Ilham avec qui j'ai partagé des moments forts Je lui souhaite bonne continuation et beaucoup de réussite.*

***A** tous mes amis(e), ils sont reconnaîtront sans que je les cite, à ceux là je tiens à les remercier de leur amitié. Et sans oublier nos souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

SALMA



J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

*A ceux qui ont été mon exemple de la réussite,
que j'aime et respecte, qui m'ont donné de
l'amour; de la tendresse, du soutien et de la
force, mes très chers parents **Khene Hadj** et
Belhaoia Rokia que Dieu vous protège et vous
prête une longue et heureuse vie*

*A mes chers sœurs Hayat, Imen et Hadjira et
mon frère Tahar qui m'ont soutenue sur tous
les plans, auxquels je souhaite de réussite et
tout le bonheur du monde*

*Je ne peux oublier de remercier
chaleureusement mes très chères
copines de chambre : Chaïma et Karima*

*A mes meilleures amies : Zahia, Widad, Katia
et Iman.*

toutes mes autres amies.

*A mon binôme Salma avec qui j'ai partagé des
moments forts Je lui souhaite bonne
continuation et beaucoup de réussite.*

ILHAM



Table des matières

Liste d'abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 1

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE:

I. Actinobactéries

1. Définition.....	3
2. Importance des actinobactéries.....	4
3. Le métabolisme des actinobactéries.....	4

II. *Pseudomonase aeruginosa*

1. Définition.....	6
2. Les facteurs de virulence	6
3. Pathogénicité de <i>Pseudomonase aeruginosa</i>	8
4. La résistance aux antibiotiques	8

III. Biofilms

1. Définition.....	8
2. Etapes de formation des biofilms.....	9
2.1 .Adhésion.....	10
2.2. Maturation	11
2.3. Détachement.....	11
3. Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens.....	12
4. Relation entre biofilm et virulence.....	12
5. Infections dues aux biofilms.....	13
6. La lutte contre les biofilm.....	13

PARTIE II. MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

1. Matériel analytique.....	14
2. Matériel biologique.....	14

II. Méthodes

1. Identification morphologique de la souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
❖ Repiquage de la souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
❖ Coloration de Gram.....	14
❖ Examen macroscopique des cultures.....	15
❖ Mini galerie biochimique.....	15
❖ Recherche de l'oxydase.....	15
2. Test de sensibilité aux ATB.....	15
3. Culture de la souche D2 et production des molécules actives.....	15
4. Extraction des molécules actives et obtention de l'extrait brut.....	15
5. Etude de l'activité antagoniste de l'extrait brut de l'isolat D2.....	16
6. Mise en évidence de l'activité antibiofilm de l'extrait brut méthanolique.....	17

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSION

I. Résultats

1. Identification morphologique de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2. Test de sensibilité aux ATB	22
3. Test d'activité antagoniste de l'extrait brut de l'isola D2.....	23
4.Mise en évidence de l'activité antibiofilm de l'extrait brut méthanolique.....	23

II. Discusion

Discussion.....	26
Conclusion	29
Références bibliographiques	
Annexe	

Liste des abréviations

Abbreviations	Significations
µl	microlitre
µm	micromètre
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHL	Acylhomoserine lactones
AI	Auto Inducteur
AK	Amikacine
ARN	Acide ribonucléique
ATB	Antibiotique
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Aztréonam
BN	Bouillon Nutritif
C	Cytosine
CAZ	Céftazidime
CIP	Ciprofloxacine
CLSI	Clinical Laboratory standards Institute
CSLM	Confocal scanning laser microscopy
CTX	Céfotaxime
CV	Cristal Violet
D	Dextrogyres
EPS	Exopolysaccharides
G	Guanine
GN	Gentamicine
GN	Gélose Nutritive
h	heur
I	Intermédiaire
IPM	Imipenème
LPS	Lipopolysaccharides
MEM	Meropénem
MH	Muller -Hinton
ml	millilitre

mm	millimètre
NIH	National Institutes of Health
nm	nanometer
NO	Oxyde Nitrique
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PBS	tampon phosphate salin
PH	Potentiel d'hydrogène
PI	Pipéracilline
PLP	Protéines de liaison aux Pénicilline
QS	Qorum Sensing
R	Résistante
S	Sensible
TCC	Ticarciline + Acide Clavulanique
TOB	Tobramycine
TSB	Tryptic Soja Bouillon
TSI	Triple sugar iron
UFC	Unité Formant Colonie

Liste des figures

Numéro de la figure	Titre	Page
Figure 1	Observation au microscope électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes du genre <i>Streptomyces</i> en sporulation	3
Figure 2	Aspect microbiologique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
Figure 3	Mécanisme de Quorum Sensing chez les microorganismes	7
Figure 4	Biofilm bactérien mixte	9
Figure 5	Étapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien	10
Figure 6	Représentation schématique des forces et des interactions mise en jeu lors de la formation d'un biofilm	10
Figure 7	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'extrait brut de l'isolat d'actinomycète sur milieu Muller-Hinton par la méthode des puits.	16
Figure 8	Culture des souches cible et étude de l'effet antimicrobien de l'extrait brut	18
Figure 9	Test de formation de biofilm et d'activité antibiofilm de l'extrait brut par technique de microplaque	19
Figure 10	Lecteur de microplaque « BioTeK »	20
Figure 11	Aspect microscopique de <i>P. aeruginosa</i> (grossissement 10*100)	22
Figure 12	Test de fermentation des sucres sur milieu TSI et test d'utilisation de citrate sur milieu Citrate de Simmons	22
Figure13	Test de recherche d'oxydase	22

Figure 14	Etude de l'activité antagoniste de l'extrait brut méthanolique de <i>P. aeruginosa</i> K1253	23
Figure 15	Résultats de l'observation visuelle de l'activité antibactérienne de l'extrait brut	24
Figure 16	Effet de l'extrait brut méthanolique de <i>streptomyces</i> D2 sur les biofilms formés par <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	25
Figure 17	Effet de l'extrait brut méthanolique de <i>streptomyces</i> D2 sur les biofilms formés par <i>P. aeruginosa</i> K1253	25

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre	Page
I	Nombre approximatif de métabolites secondaire produits par les actinobactéries	5
II	Principaux paramètres influençant l'adhésion des microorganismes aux surfaces	11
III	Résultats d'identification de la souche de <i>P. aeruginosa</i> .	21
IV	Profil de sensibilité aux antibiotiques de la souche étudiée (K1253)	23
V	Effet de l'extrait brut méthanolique de <i>Streptomyces</i> D2 sur les biofilms formés par <i>P. aeruginosa</i> K1253	Annexe III
VI	Effet de l'extrait brut méthanolique de <i>streptomyces</i> D2 sur les biofilms formés par <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	Annexe III
VII	Nombre approximatif de métabolites secondaire produits par les différentes groupes des microorganisme	Annexe IV
VIII	Diamètres (mm) des zones édités par le CLSI, 2015 pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Annexe V

INTRODUCTION

Introduction

Certains micro-organismes peuvent se développer sous deux formes: une forme libre ou planctonique, et une forme sessile ou attachée en biofilm (Clutterbuck et al. 2007). Les transitions entre ces modes de vie mettent en jeu des processus dynamiques et complexes. Un mode de vie planctonique permet aux microorganismes de proliférer et de coloniser de nouvelles niches environnementales. Puis, en s'attachant à une surface de façon irréversible, ces micro-organismes peuvent alors adopter une forme de vie sessile, qui est le mode de vie majoritaire des bactéries (Costerton et al, 1999).

Le mode de vie sous forme de biofilm protège les micro-organismes qui le constituent et leur confère de nombreux avantages (Jouenne, 2008). Parmi les quelle leur survie dans un environnement hostile et cela grâce à une plus grande tolérance aux biocides (antibiotique, désinfectant) et à la réponse immunitaire de l'hôte comparé aux bactéries sous forme libre. Les « National Institutes of Health ou Institut National de la Santé» (NIH) aux États-Unis estiment que plus de 75% des infections microbiennes chez l'homme (exemple : endocardite, fibrose kystique, infections associées aux soins) sont imputables à la persistance des bactéries sous forme de biofilm. Les biofilms peuvent se former au niveau de cathéters ou d'implants (valves cardiaques, hanches artificielles), et attaquer des tissus corporels comme les dents, les yeux, les poumons, les oreilles ou le tractus urogénital (Yannick et al, 2014).

Le biofilm s'avère être une structure complexe formée grâce à l'agglomération des microorganismes facilitée par les matières polymériques qu'ils excrètent. Dont de nombreuses bactéries, importantes sur le plan médical, qui ont fait l'objet d'études quant à leur capacité de former des biofilms. On peut citer par exemple des bactéries à Gram positif, comme *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis*, et des bactéries à Gram négatif comme *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Filloux et Vallet, 2003).

Ce dernier qui est retrouvé communément dans le sol, l'eau et l'environnement, Cependant, cette bactérie a aussi été connue pour causer des maladies d'assez graves chez les l'Homme celle-ci se manifestent par une inflammation généralisée des poumons, d'infection urinaires et des reins...ect. *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 et al, 2009).

De ce fait, les recherches actuelles visent à chercher de nouvelles molécules permettant d'interférer avec la formation d'un biofilm ou d'éliminer un biofilm (Landini et al ,2010).

La formation de biofilm est donc considérée comme un grand problème de santé publique car complique le traitement antibiotique de diverses infections bactériennes et favorise la persistance de bactéries multirésistantes.

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif connues pour produire de nombreux métabolites secondaires notamment les antibiotiques, les antitumoraux, les enzymes et de ce fait elles paraissent être les meilleurs candidats dans la lutte antibiofilm. Par ailleurs, en effet actuellement, certaines équipes de recherche s'intéressent grandement à l'effet antibiofilm potentiel des extraits bruts ou les molécules pures issues des actinobactéries (Lam, 2006)

De là, dans le but de tester l'éventuelle effet d'un extrait brut méthanolique issu d'une souche de *Streptomyces sp* D2, sur la formation de biofilm de souche de *P. aeruginosa* par la méthode de microplaque en milieu liquide, un test d'activité antibiofilm a été effectué et évalué.

PARTIE I: SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. Actinobactéries

1. Définition

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positive avec une proportion de G+C élevée (>55 mol %) formant des colonies à la morphologie complexe (Colombié, 2005). Ils comprennent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* (bâtonnets ou rarement mycélium rudimentaire), ou très évoluées, comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant. La famille des actinobactéries est constituée d'une quarantaine de genres qui se distinguent les uns des autres essentiellement sur base de leur morphologie générale qui peut être extrêmement diversifiée, comme par exemple le bacille de Koch (*Mycobacterium tuberculosis*) et des bactéries filamenteuses comme dans les deux genres majeurs *Nocardia* et *Streptomyce* (Larpen et Sanglier, 1989).

Streptomyces

Le genre *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses, aérobies stricts, ayant une paroi de type I (LL-DAP) et formant des chaînes de spores non mobiles, saprophytes non pathogènes pour l'Homme mais pour les plantes et des animaux (figure 1). Les Streptomycètes sont des bactéries issues des échantillons de sols qui sont à la base de la recherche des métabolites secondaires, très importants d'un point de vue écologique comme d'un point de vue médical grâce au grand nombre d'antibiotiques qu'ils synthétisent (Larpen et Sanglier, 1989).

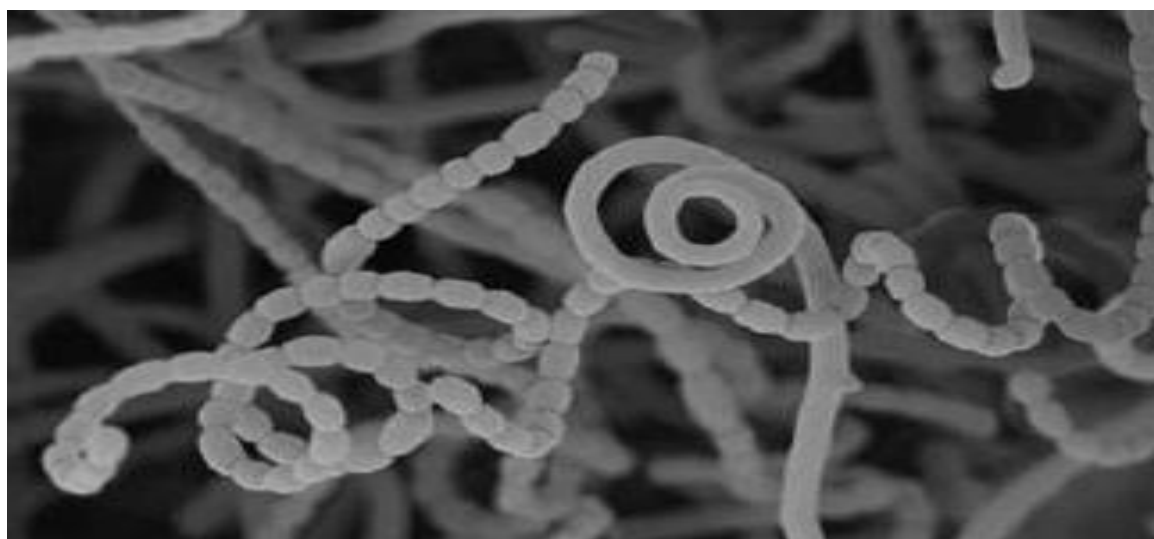


Figure 1 : Observation au microscope électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinobactéries du genre *Streptomyces* en sporulation (Belyagoubi, 2014).

2. Importance des actinobactéries

La principale raison derrière l'engouement pour les actinobactéries vient du fait qu'elles ont des rôles importants dans le sol et dans les interactions avec les plantes, (Conn, 2005), mais également dans la synthèse de nombreux métabolites d'intérêt biotechnologique. Il a été estimé que sur 16500 antibiotiques connus, 8700 (53%) sont produits par les actinobactéries dont 6550 (40%) par des espèces de *Streptomyces* (Choulet, 2006) (tableaux I). En plus de la production d'antibiotiques, les actinobactéries produisent un grand nombre d'autres métabolites secondaires dotés d'une large gamme d'activité, tels que des inhibiteurs d'enzymes, des immunosuppresseurs, des toxines,...etc. (Pizzul, 2006).

3. Le métabolisme des actinobactéries

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 grande 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 (Theilleux, 1993). En effet, la streptomycine fut le premier antibiotique ayant pour origine une souche de *Streptomyce*. D'après Tarkka et Hampp (2008), les métabolites secondaires des *Streptomyces* peuvent être séparés en quatre classes distinctes en fonction de leur activité biologique :

- Agents antagonistes, comportant des antibactériens, des antifongiques, des anti-protozoaires 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).

Tableau I : Nombre approximatif de métabolites secondaire produits par les actinobactéries (Kieser et al, 2000)

source	Métabolites bioactifs			Métabolites inactifs
	Antibiotique	Autre	Total	
Actinobactéries	7900(66%)	1220(40%)	9120(61%)	8000-10000
Total (micro-organisme)	11900(100%)	3000(100%)	14900(100%°	25000-40000

a. Antibiotiques

Les antibiotiques constituent la part la plus importante des applications industrielles des actinobactéries et principalement des *Streptomyces*. Ces molécules d'origine naturelle manifestent à faibles concentrations des activités biologiques particulièrement étudiées du fait de leur importance en thérapie humaine et vétérinaire (Coates et Hu, 2007).

Les antibiotiques sont soit bactéricides, c'est-à-dire capable de tuer les bactéries qui y sont sensibles, soit bactériostatiques, aptes à empêcher la multiplication des bactéries sans les tuer (Coates et Hu, 2007).

Parmi les antibiotiques produits par les *streptomyces* :

La streptomycine (groupes des aminoglycosides) $\Rightarrow$ produite par *Streptomyces griseus*, antibiotique à large spectre mais inactif sur les streptocoques et les anaérobies strictes.

Les chlorotétracyclines $\Rightarrow$ produite par *Streptomyces aureofaciens* antibiotique à large spectre actif sur les mycobactéries et les mycoplasmes (Larpent et Sanglier, 1989).

b. Enzymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinobactéries (Theilleux, 1993). En effet, ces derniers sont d'excellents producteurs d'enzymes telles que des protéases, des chitinases, des amylases (Vonothini *et al*, 2008).

II. *Pseudomonas aeruginosa*

1. Définition

Pseudomonas aeruginosa a été isolée pour la première fois en 1882 par Gessard. C'est un bacille à Gram négatif, non fermentaire (khalilzadeh, 2009). Elle mesure de 1 à 5µm de long et 0,5 à 1µm de large (Figure 2), Elle est capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C. *P. aeruginosa* est une bactérie aérobie et possède un métabolisme oxydatif (Vasil, 1986).

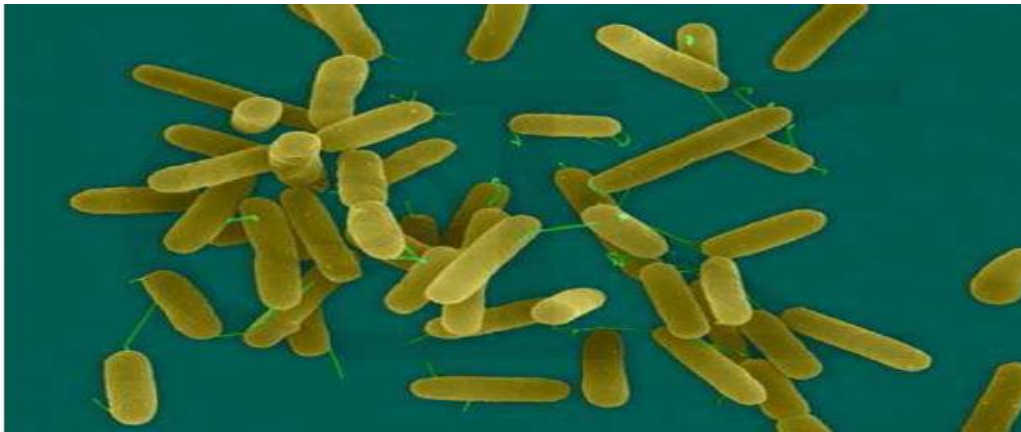


Figure 2 : Aspect microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* (Dubois, 2013).

2. Facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa possède de nombreux facteurs de virulence lui permettant de survivre dans divers environnements (Lazduski, 1988) tel que les adhésines, les pili, les toxines...etc. Autre que la forme planctonique, *P. aeruginosa* a une capacité de se développer sous forme de biofilm où elle présente une grande résistance face aux différents mécanismes de l'immunité de l'hôte et aux agents antimicrobiens, ce qu'il provoque des infections bactériennes aiguë et chronique. (Filloux et vallet, 2003).

a) Quorum Sensing

Le quorum sensing (QS) est un mécanisme lié à l'accroissement de la densité de la population bactérienne, qui conduit à l'augmentation de la concentration d'une molécule signal (AI) dans l'environnement extracellulaire. Quand la concentration d'une molécule signal tel qu'Acylhomoserine lactones (AHL) atteint un niveau seuil, capable d'activer la production des gènes cibles, cela induit la réponse correspondante aux signaux, comme la

production d'EPS (Alnnasouri, 2010) (Figure3).

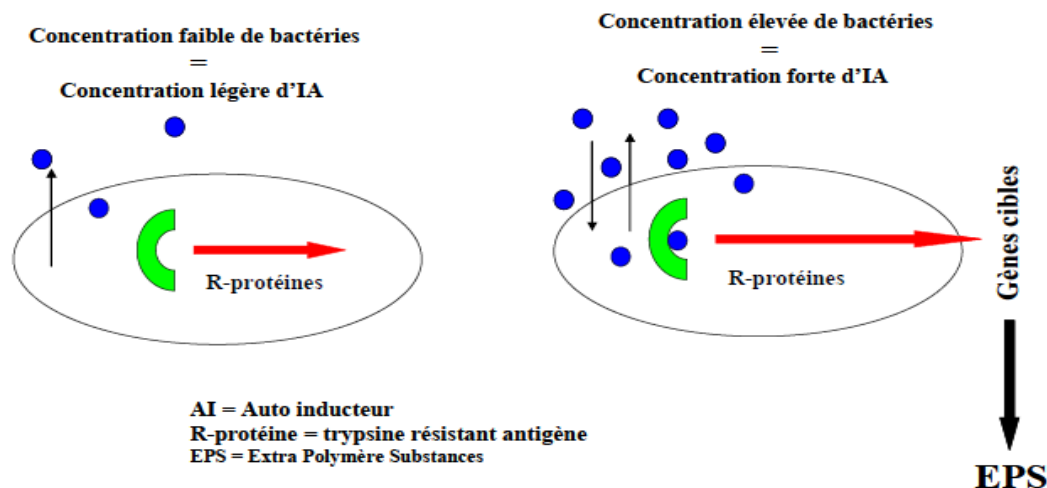


Figure 3 : Mécanisme de Quorum Sensing chez les microorganismes (Ronald et al. 1999)

b) Alginate

Il est connu depuis de nombreuses années que les isolats de *P. aeruginosa* sont fortement muqueux. La mucosité est due à la production d'alginate, un exopolysaccharide produit par *P. aeruginosa* qui est chargé négativement et qui se compose d'acides L-guluronique (G) et D-mannuronique (M) liés entre eux par des liaisons β -1.4. L'enrobage de la bactérie par une couche d'alginate a un rôle non seulement structural, mais également protecteur. Il a été montré par exemple que des souches non muqueuses forment des biofilms qui ont une résistance beaucoup plus faible. Ainsi que l'enveloppe bactérienne des bactéries à Gram négatif semblent également jouer un rôle particulier dans la formation du biofilm (Filloux et Vallet, 2003).

c) Lipopolysaccharides (LPS)

P. aeruginosa peut posséder deux types de LPS de petit poids moléculaire présentant une surface plus hydrophobe peuvent être importantes pour l'attachement sur différents types de surface selon qu'elle soit hydrophile ou hydrophobe (Filloux et Vallet, 2003).

d) Pyoverdine

La pyoverdine est un sidérophore, une petite molécule de chélation du fer de l'environnement nécessaire au métabolisme de *P. aeruginosa*. Elle joue un rôle régulateur

dans la sécrétion de certains facteurs de virulence (exotoxine A, des protéases) (Ben Haj Khalifa et al, 2011).

3. Patogénicité de *P. aeruginosa*

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. Elle 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 centrale et les structures osseuses (Ben Haj Khalifa et al, 2011).

4. Résistance aux antibiotiques

Plusieurs mécanismes de résistance sont impliqués dans la résistance de *P. aeruginosa*. Premièrement, elle porte génétiquement une résistance naturelle vis-à-vis des différentes familles d'antibiotiques grâce à sa capacité à produire des β -lactamases (enzymes dégradants les β -lactamines), imperméabilité membranaire ou système d'efflux (Hancock, 1998). De plus, au cours ces dernières années, on assiste à une émergence rapide de souches multi-résistantes de *P. aeruginosa* à travers le monde. Ces souches ont acquis une résistance à presque toutes les classes d'antibiotiques anti-*Pseudomonas* disponibles, y compris celles à large spectre telles que les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les aminosides et les fluoroquinolones, (Kollef et al, 2011).

III. Biofilms

1. Définition

Le terme biofilm a été proposé pour la première fois par John William Costerton (1978), qu'il l'avait défini comme étant des populations de microorganismes (mort ou vivants) adhérentes entre elles à des surfaces biotique comme les (cellules de la muqueuse) ou abiotiques telles que planchers ou équipements industriels, exposées à des environnements humides ou stérils formant des structures complexes (Saulou, 2009).

Au sein d'un biofilm, les cellules sont englobées dans une matrice extracellulaire hydratée, anionique, composée essentiellement d'exopolysaccharides, d'eau et de protéines qui confère une protection face aux variations des conditions environnementales (Saulou, 2009). Par ailleurs, les micro-colonies sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de

circulation permettant, d'une part, d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et, d'autre part, d'évacuer les déchets (Costerton et al, 1999). La structure du biofilms formé par *Pseudomonas* est représentée dans la figure 4.

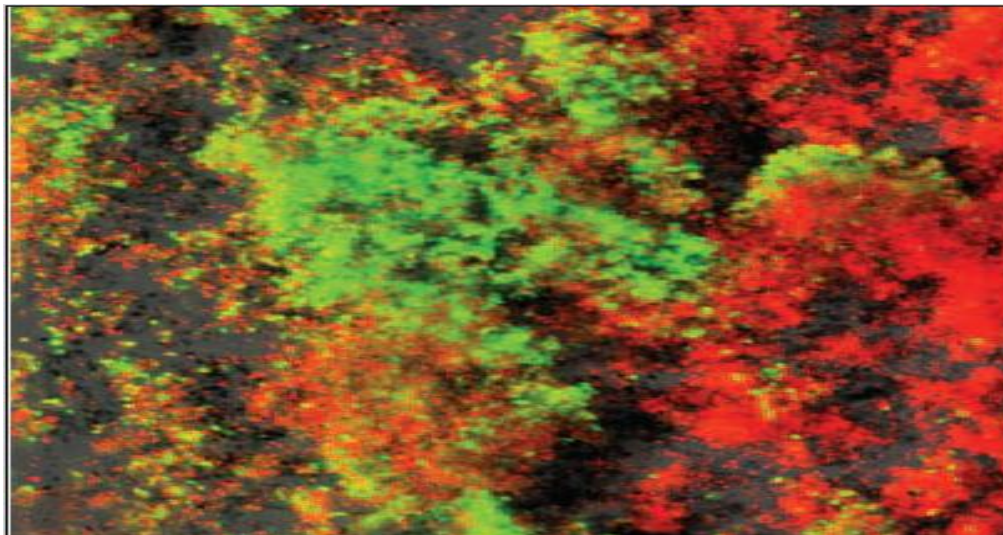


Figure 4 : Biofilm bactérien mixte (Filloux et Vallet, 2003). Les bactéries fluorescentes vertes ou rouges sont visualisées par l'utilisation d'un microscope confocal (CSLM). Les bactéries présentes dans le biofilm sont *P. putida* OUS82 (marquage Gfp) et *Pseudomonas* sp. B13 (marquage dsRed). D'autres espèces bactériennes sont également présente.

Le développement de l'architecture des biofilms bactériens est en grande partie lié à la production de la matrice extracellulaire par les bactéries du biofilm. Cette matrice inclut tous les éléments du biofilm autre que les microorganismes. Elle est essentiellement composée d'eau, de polymères polysaccharidiques sécrétés par les microorganismes, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur. Néanmoins, d'autres éléments peuvent également être retrouvés, tels que l'ADN, l'ARN, des lipides, l'aginate.... (Sutherland, 2001).

2. Etapes de formation des biofilms

La formation des biofilms est largement décrite dans la littérature (Kolter et Greenberg 2006). La généralisation des étapes de formations des biofilms reposent principalement sur les études menées sur *P. aeruginosa*, (Filloux et Vallet, 2003). Le biofilm peut se former très rapidement, en quelques heures; un bon exemple étant la plaque dentaire (Yannick et al, 2014), (Figure 5).

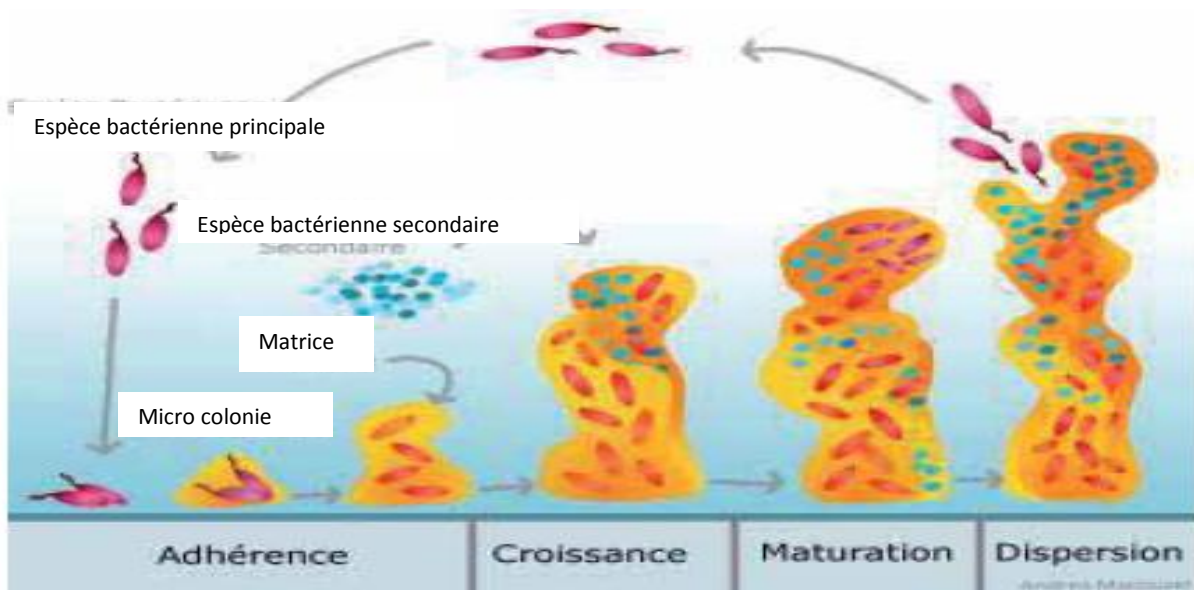


Figure 5 :  tapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien (Jacques et Tremblay 2010)

❖ Adhésion

Les bactéries doivent, dans un premier temps adhérer à une surface inerte ou vivante. Cette étape requiert généralement la présence de molécules ou de structures particulières à la surface de la bactérie (telles que fimbriae et flagelle) (Kaplan, 2010) (tableau II).

❖ Adhésion réversible

Ce type d'adhésion est dite réversible car elle est due aux liaisons chimiques non covalentes (force de Van der Waals, forces acide-base de Lewis et forces électrostatique) (De Almeida ,2010) (Figure 6).

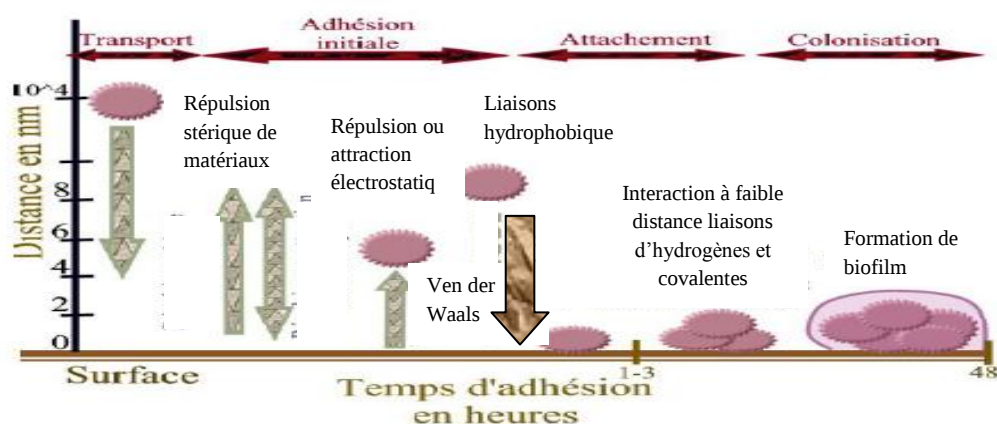


Figure 6: Représentation schématique des forces et des interactions mise en jeu lors de la formation d'un biofilm (Ploux et al ,2007).

❖ Adhésion irréversible

L'adhésion devient après irréversible grâce à l'expression d'un certain nombre de gènes. Chez *P.aeruginosa*, l'expression d'un gène promoteur *algC* dès que son adhésion en biofilm permet la formation de la matrice faite à la sécrétion d'une grande quantité d'exopolymères organiques (matrice extracellulaire) ce qui aide à la fixation des bactéries sur le support (Kolari, 2003).

Tableau II : Principaux paramètres influençant l'adhésion des microorganismes aux surfaces (Saulau, 2009).

Facteurs liés aux supports	Facteur liés aux microorganismes	Facteurs liée a l'environnement
• Contamination organique • Nature chimique de la surface • Charge de surface • Hydrophilie /Hydrophobe	• Concentration microbienne • Espèce • Composition et structure de la surface cellulaire • Caractéristique physico-chimique de la surface microbienne (charge /hydrophobie) • Phase de croissance (état physiologique) • Adaptation phénotypique	• Temps de contact • Température • Force ionique et nature des sels • pH • Concentration des éléments nutritifs • Conditions Hydrodynamique

2.2. Maturation

L'étape de maturation se traduit tout d'abord par une augmentation de la taille de la structure, en effet, les bactéries fixées vont augmenter leur nombre en se multipliant. Ce phénomène de croissance entraine la colonisation de la surface. Les bactéries vont former des agrégats portant le nom de micro-colonies qui ainsi formées vont sécréter une matrice extra cellulaire leur conférant une protection contre le stress (Danese et al, 2000).

2.3. Détachement

Le détachement des bactéries du biofilm peut avoir lieu de deux manieres, passive ou active. En effet, il peut résulter d'un décrochage physique lorsque les forces sont supérieure à la résistance et à la cohésion du biofilm. Il peut également être déclenché par les

bactéries elles mêmes sous l'action de diverse signaux internes ou environnementaux (Coufort et al, 2007). La dispersion est souvent liée à des modifications dans l'apport en nutriments du biofilm, les fluctuations des concentrations locales d'oxygène ou l'augmentation d'oxyde nitrique (NO) (Kaplan et al, 2003).

3. Résistance des biofilms à divers agents antimicrobiens

Les biofilms retrouvés dans des environnements naturels ou industriels sont résistants aux bactériophages, aux amibes ainsi qu'aux biocides utilisés dans les procédés industriels (Costerton et al, 1999), ils permettent aux bactéries pathogènes de résister à la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que ces mêmes bactéries sous forme planctonique. En fait, les bactéries d'un biofilm peuvent être de 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens (Ceri, 2010).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la grande résistance des biofilms aux agents antimicrobiens (Ceri, 2010). Parmi ces facteurs, la matrice polymère qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens. Le métabolisme des bactéries formant le biofilm joue également un rôle très important. En effet, étant donné la faible concentration de certains nutriments et le gradient en oxygène, certaines cellules du biofilm seront peu actives métaboliquement et pourront même être sous forme dormante, ces cellules bactériennes dormantes sont d'ailleurs probablement responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms (Lewis, 2008). La proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise probablement le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques (Olson, 1999).

4. 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, 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).

5. Infections dues aux biofilms

Les infections liées à des biofilms touchent majoritairement les personnes immunodéprimés et impliquent souvent des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *P. aeruginosa* (Costeron et al, 1999). Les biofilms contribuent de manière très importante aux infections nosocomiales. En effet, ils ont la capacité de se développer sur divers instruments médicaux : sondes urinaires, cathéters veineux, tubes de ventilation artificielle, prothèses orthopédiques ...etc. 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 microorganismes pathogènes, contribue à la propagation des infections en milieux hospitaliers ou non hospitaliers, mais également dans les environnement agroalimentaires où les biofilms sont une source importante de nuisance (Dolan et Costerton, 2002).

6. La lutte contre les biofilms

Il existe différentes stratégies permettant d'inhiber la formation du biofilm (Yang et al, 2012). Celles-ci peuvent prévenir l'adhérence initiale du microorganisme, prévenir la croissance microbienne, empêcher la communication entre les cellules bactériennes, inhiber la synthèse de la matrice polymérique ou bien dégrader cette matrice. Le criblage à haut débit de banques de composés chimiques (naturels ou synthétiques) est utilisé afin d'identifier des produits capables d'interférer avec la formation d'un biofilm ou capables de disperser un biofilm existant (Landini et al, 2010).

Bien que la plupart de ces produits antibiofilm ne tuent pas les bactéries, elles peuvent toutefois les rendre plus susceptibles à l'action des agents antimicrobiens ou à la réponse immunitaire de l'hôte. La grande majorité de ces produits est toujours au stade expérimental (Davies et Marques, 2009).

PARTIE II : MATERIELS ET **METHODES**

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie I de l'université Abderrahmane Mira de Bejaia, pendant une période allant du mois de Février au mois de juin.

I. Matériel

1. Matériel analytique

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

2. Matériel biologique

Origine des souches utilisées

Deux souches de *P. aeruginosa* ont été sélectionnées dans cette étude dont la *P. aeruginosa* K1253 fait partie de la collection des souches cliniques de laboratoire d'analyse médicale « Moualek » à Bejaia, isolée à partir de prélèvement urinaire en février 2017 et la souche *P. aeruginosa* ATCC27853 fait partie des souches de référence de laboratoire de recherche de la faculté d'Abderrahmane Mira de Bejaia, les souches sont conservés sur gélose GN à 4°C.

De plus une souche d'actinobactérie (*Streptomyces sp* D2) d'origine du sol salin (sebkha) du sud Algérien Beni Abbes de la wilaya de Bichar a été utilisée comme une source de métabolites secondaires (extrait brut) pour tester son activité antibiofilm.

II. Méthodes

1. Identification morphologique de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* k1253

a) Repiquage de la souche de *P. aeruginosa* k1253

Le repiquage des souches consiste à les ensemercer par méthode des stries sur des milieux de gélose nutritive (GN) et incubé à 37°C pendant 24h et l'identification s'est basé sur les testes suivantes :

b) Coloration de Gram

La coloration de Gram permet non seulement d'observer la morphologie de cellules de *Pseudomonas* et leurs modes de regroupement, mais aussi de différencier ces bactéries à Gram négatif des bactéries à Gram positif.

c) Examen macroscopique des cultures

L'examen macroscopique des cultures est effectué sur milieu GN après incubation seules les colonies caractéristiques du genre *Pseudomonas* seront prises en considération.

d) Mini galerie biochimique :

- Test de fermentation des sucres sur milieu TSI
- Test de recherche d'utilisation de citrate sur milieu Citrate de Simmons

e) Recherche de l'oxydase

A l'aide d'une pipette pasteur, une partie de la culture est étalée sur un disque oxydase. La réaction est considérée comme étant positive après apparition d'une couleur violette.

2. Test de sensibilité aux antibiotiques

La détection des phénotypes de résistance des souches bactériennes isolées, a été réalisée en pratiquant la méthode de diffusion sur Muller Hinton (MH) et les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du CLSI 2015.

3. Culture de la souche de *Streptomyces* sp. D2 et production des molécules actives

Dans un but de production de molécules actives, la souche D2 est ensemencées en stries serrées sur 25 boîtes de Pétri contenant le milieu de culture Gausse. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 jours.

4. Extraction des molécules actives et obtention de l'extrait brut

L'extraction des composés actifs produits par isolat *Streptomyces* D2 a été réalisée par macération après 7 jours d'incubation à 28°C. En effet, le mycélium et les géloses sont découpés dans un contenant et un volume de 500 ml d'acétate d'éthyle est rajouté. Le mélange est par la suite laissé macérer sous agitation pendant une nuit à température ambiante.

L'extrait brut est récupéré puis filtré, à l'aide du papier Whatman N°1 puis évaporés à sec en utilisant un Rotavapor. L'extrait brut sec ainsi obtenu est récupéré dans un volume de 5 ml de méthanol, selon la solubilité des composés produits dans l'un ou l'autre des solvants organiques (Pimentel-Elardo et al, 2010).

La concentration massique d'extrait brut a été déterminée et le flacon est par la suite conservé à 4°C pour une utilisation ultérieure.

5. Etude de l'activité antagoniste de l'extrait brut de l'isolat D2

L'extrait méthanolique brut obtenu a fait l'objet d'un test d'antagonisme visant à tester leur activité antimicrobienne vis-à-vis de germe pathogène (*P.aeruginosa* K1253) préalablement ensemencés sur milieu Mueller Hinton à raison de 10^7 UFC /ml en utilisant la méthode des puits. Brièvement : des puits de 6mm de diamètre sont formés à l'aide d'un emporte-pièce puis un volume de 100 μ l de chaque extrait est introduit dans les puits et les deux solvants, méthanol et l'acétate d'éthyle considérés comme témoin négatif (Figure7).

Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion des substances actives puis incubées à 37°C pendant 24 h. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre des zones d'inhibition exprimées en millimètre autour des puits à l'aide d'un pied à coulisse.

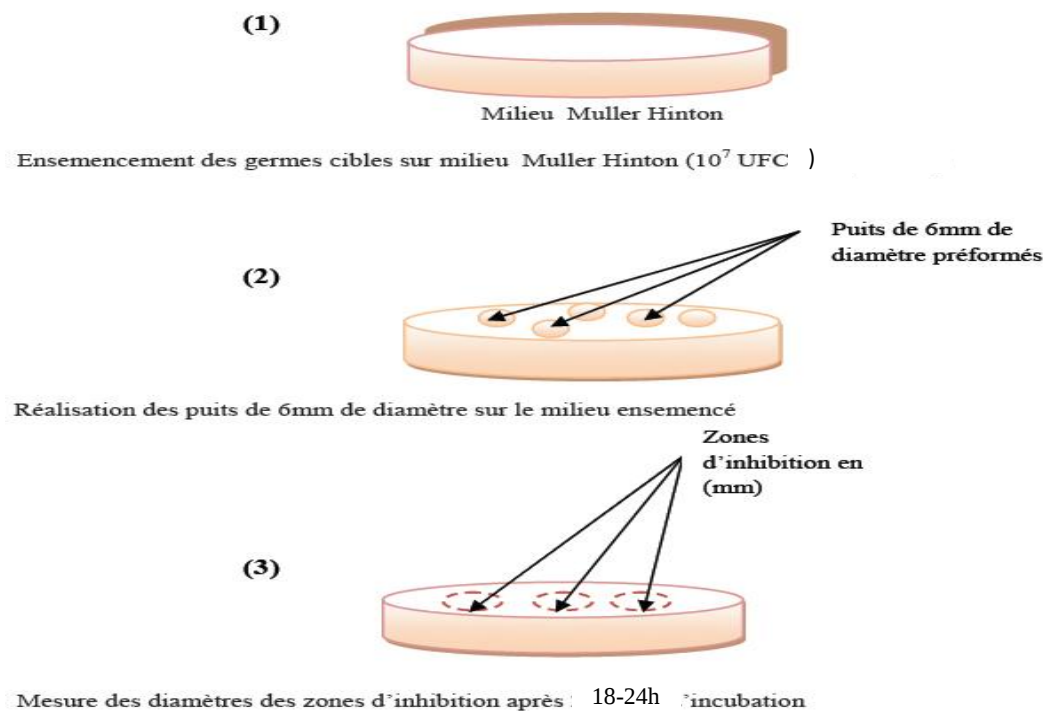


Figure 7 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'extrait brut de l'isolat D2 par la méthode des puits.

6. Mise en évidence de l'activité antibiofilm de l'extrait brut méthanolique

❖ Formation de biofilm: Principe

Le test de formation de biofilm sur microplaque est la technique la plus fréquemment utilisée pour la quantification de la formation de biofilm. Cette technique consiste à fixer les bactéries productrices de biofilm avec du méthanol et les colorer avec le cristal violet puis à libérer le colorant lié avec de l'acide acétique à 33% et en dernier, à mesurer la densité optique (DO) de la solution à 570 nm. Le test est dit standard car il permet de mesurer l'absorbance des bactéries attachées au fond et au parois des puits de la microplaque et les enregistrée par spectrophotométrie (Stepanovic et al, 2000).

❖ Etude de l'activité antibiofilm de l'extrait brut de la souche D2 sur microplaque

La détection de l'activité antibiofilm se fait en plusieurs étapes selon un protocole bien établie en utilisant des microplaques contenant 96 puits (figure 8 et figure 9). Le test utilisé est basé sur la formation de biofilm à l'interface solide-liquide et par l'addition d'extrait brut à différentes concentrations qui pourrait éventuellement avoir un effet antibiofilm. Ce test a été répété 7 fois afin de confirmer les résultats.

Jour1

- Inoculer les souches dans 3ml de TSB + 0,25% de glucose.
- Incuber toute la nuit à 37° sous agitation (Figure 8).

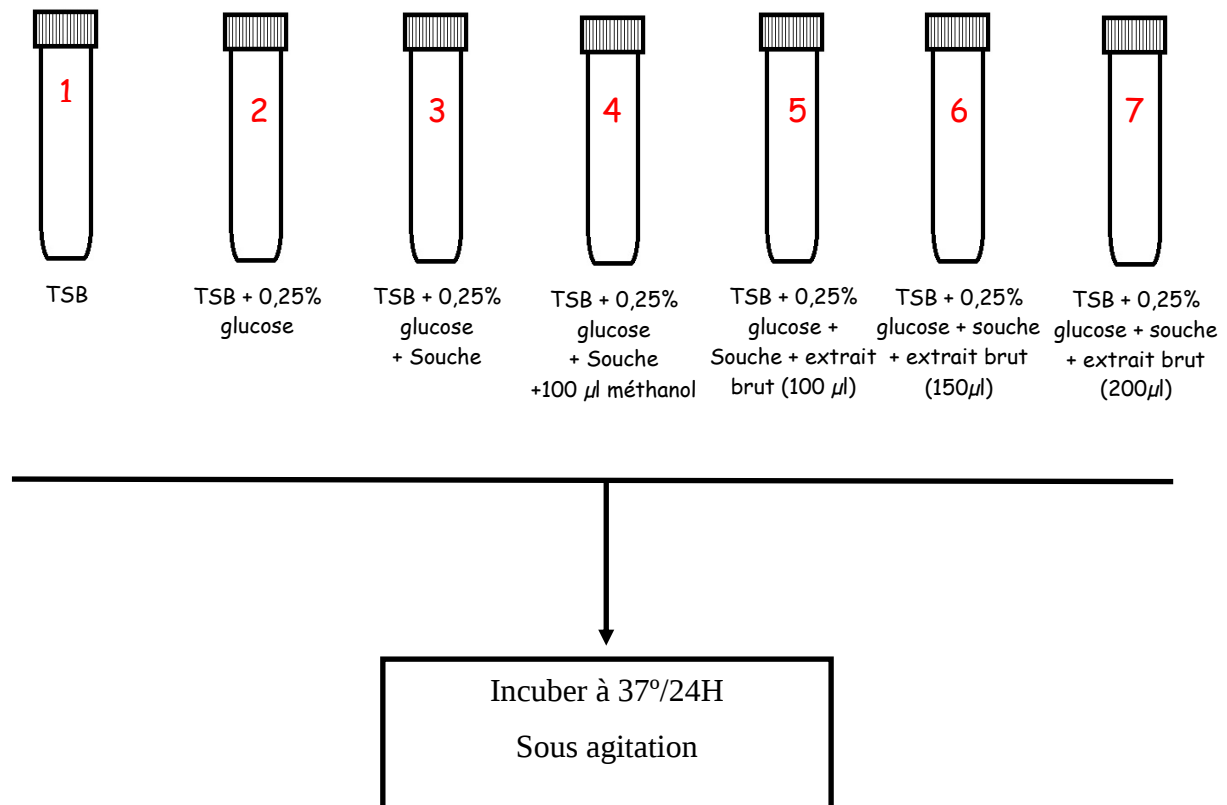
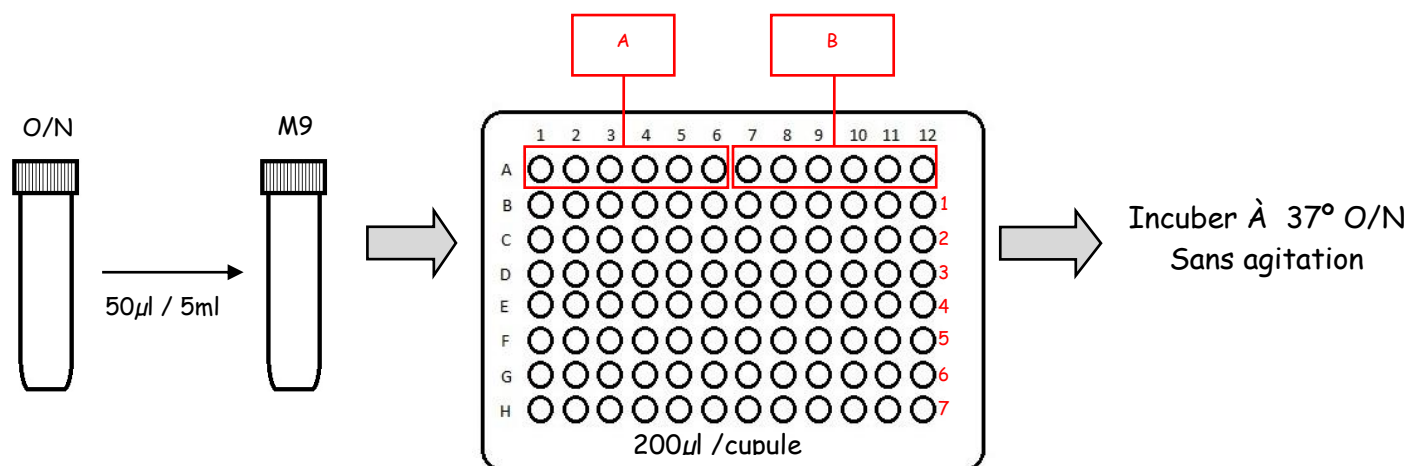


Figure 8: Culture des souches cible et etude de l'effet antimicrobien de l'extarrit brut

Jour 2

- Faire une dilution 1/100 de chaque inoculat dans le milieu M9 (50µl dans 5ml) et repartir 200µl dans chaque cupule de la microplaque (Figure 9).



- **A:** souche de reference de *pseudomonase aeruginosa* ATCC27853
- **B:** souche de *pseudomonase aeruginosa* K1253.

Figure 9: Test de formation de biofilm et d'activité antibiofilm de l'extrait brut par technique de microplaque.

Jour3

- Retirer le liquide contenu dans la microplaque, laver trois fois avec la solution PBS (annexe I)
- Ajouter 200 µl de Méthanol à 99% et incuber pendant 15min à température ambiante
- Retirer le métnanol et laisser sécher 15min à Température ambiante.
- Ajouter 200 µl de cristal violet à 2% et incuber 10 min à Température ambiante.
- Laver trois fois avec l'eau.
- Ajouter 150 µl d'acide acétique à 33% et incuber pendant 15min à température ambiante.
- La lecture se fait avec le lecteur de microplaque BioTeK(figure 10) à 570 nm .



Figure 10: Lecteur de microplaque « BioTeK »

PARTIE III : RESULTAS ET **DISCUSIONS**

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats et discussions relatifs à l'étude morphologique de la souche cible *Pseudomonas aeruginosa*, d'une part, et la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'extrait brut étudié obtenu à partir d'une souche d'actinobactérie d'origine tellurique, d'autre part. L'étude de l'activité antibiofilm de l'extrait brut à l'encontre du germe cible est par la suite présentée.

I. Résultats

1. Identification morphologique de la souche de *Pseudomonas aeruginosa*

L'appartenance de la souche K1253 à l'espèce de *Pseudomonas aeruginosa* a été confirmée. Le tableau III représente les résultats de l'identification.

Tableau III: Résultats d'identification de la souche de *P. aeruginosa*.

Type d'examen	Aspect des colonies
Examen microscopique	L'examen microscopique après coloration de Gram relève la présence des bacilles à Gram négatif, longs et fins à extrémité effilée (couleur rose) (Figure 11).
Examen macroscopique	Grandes colonies, convexes et lisses. Virage de la couleur de la gélose vers le vert dû à la production de pigments large sur gélose nutritive (GN).
Mini galerie biochimique	• La couleur rouge de milieu TSI ne change pas, donc la bactérie est considérée comme non fermentaire des sucres (Glucose, Saccharose et Lactose) (figure12). • L'apparition d'une couleur bleu sur milieu Citrate de Simon confirme que la bactérie utilise le Citrate comme seul source de carbone (Figure 12).
Test d'oxydase	Coloration violette, dû à la présence de l'enzyme oxydase, indiquant une réaction positive (Figure 13).

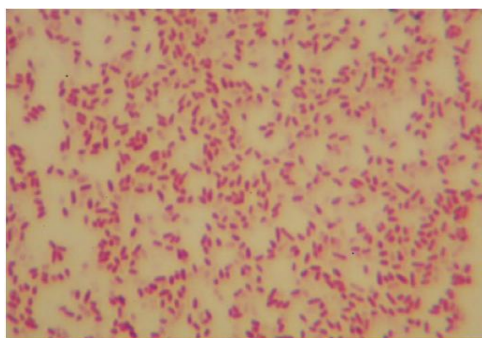


Figure 11 : Coloration de Gram
de *P.aeruginosa* (grossissement 10*100).

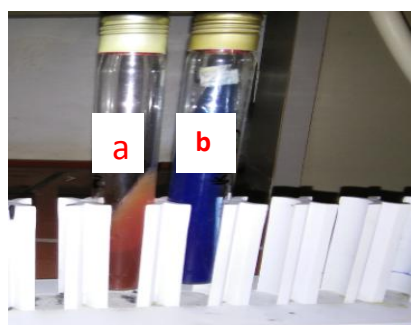


Figure 12 : **a :** Test de fermentation
des sucres sur milieu TSI, **b :** test
d'utilisation de citrate sur milieu Citrate
de Simmons

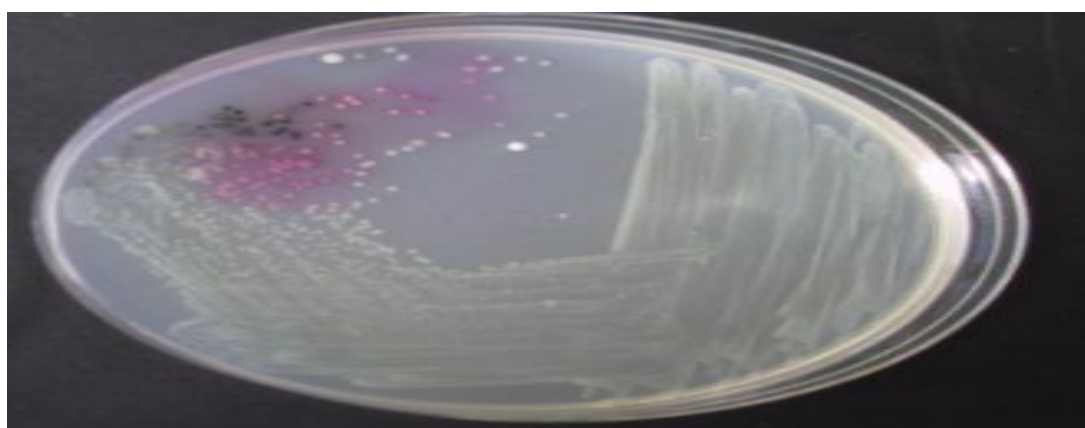


Figure13 : Test de recherche d'oxydase

2. Test de sensibilité aux antibiotiques

L'identification des souches de *P. aeruginosa* par les méthodes conventionnelles et la mise en évidence de leurs résistances aux antibiotiques ont révélé l'importance de la fréquence des souches multirésistantes à divers antibiotiques, spécifiquement aux B-lactamines.

Le profil de sensibilité aux antibiotiques de la souche de *P. aeruginosa* K1253 est représenté dans le tableau IV et comparé à celles de la CLSI 2015 (annexe V).

Tableau IV : Profil de sensibilité aux antibiotiques de la souche étudiée (K1253)

ATB	CAZ	CTX	MEM	TCC	PI	IPM	CIP	ATM	TOB	AK
Diamètre d'inhibition (mm)	16	16	40	6	20	17	25	25	12	29
Profil de résistance	I	I	S	R	I	I	S	S	R	S

CAZ : Céftazidime / **CTX** : Cifotaxime / **MEM** : Méropénème / **TCC** : Ticarciline + Acide Clavulanique / **PI** : Pipéracilline / **IPM** : Imipénème / **CIP** : Ciprofloxacine / **ATM** : Aztréonam / **TOB** : Tobramycine / **AK** : Amikacine.

Les résultats du tableau montrent que la souche clinique *P. aeruginosa* K1253 présente une résistance aux antibiotiques de la famille des β -lactamines et une résistance diminuée aux familles de quinolones et des aminosides.

Selon les normes de la CLSI 2015, la *P. aeruginosa* ATCC27853 est classée parmi les souches sensibles à toutes les familles des ATB.

3. Etude de l'activité antagoniste de l'extrait brut de l'isolat de *Streptomyces* sp D2 à l'égard de *P. aeruginosa* k1253

Dans le but d'étudier la capacité de l'extrait brut à inhiber la croissance de *P. aeruginosa* K1253, un test d'antagonisme basé sur la méthode des puits a été réalisé. Le résultat obtenu est illustré dans la figure 14 qui montre clairement l'effet inhibiteur de l'extrait brut testé vis-à-vis de la souche cible *P. aeruginosa* K1253. En effet, le diamètre de la zone d'inhibition mesuré est estimé à 14 mm.

Cette souche est par conséquent retenue pour la suite de ce travail qui consiste en la mise en évidence de l'activité antibiofilm de l'extrait brut méthanolique.



Figure 14: Etude de l'activité antagoniste de l'extrait brut méthanolique à l'égard de *P. aeruginosa* K1253.

4. Mise en évidence de l'activité antibiofilm de l'extrait brut méthanolique

Dans le but de mettre en évidence l'effet antibiofilm de l'extrait brut méthanolique de la souche D2, l'activité inhibitrice de ce dernier à l'encontre du biofilm formé par *P. aeruginosa* a été réalisée.

Après incubation à 37 °C des tubes contenant le milieu TSB, l'observation visuelle confirme la sensibilité des souches tests (*P. aeruginosa* K1253 et *P. aeruginosa* ATCC27853) en présence de l'extrait brut méthanolique étudié. Ceci se traduit par la diminution du trouble de la suspension bactérienne avec l'augmentation de la concentration de l'extrait brut (figure15).

Par ailleurs, il est également à signaler que les résultats du tube D indiquent que le méthanol utilisé comme solvant lors de la reconstitution de l'extrait brut peut avoir plus ou moins un effet inhibiteur sur la croissance de *P. aeruginosa* comme illustré en Figure 17.

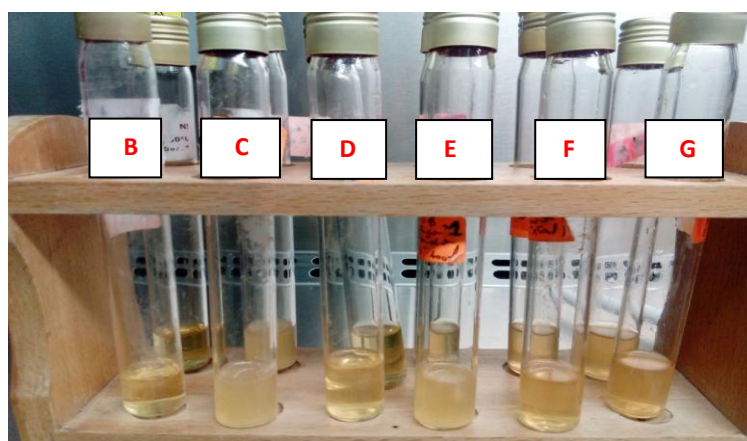


Figure 15: Résultats de l'observation visuelle de l'activité antibactérienne de l'extrait brut

Tube B : témoin négatif sans extrait brut et sans *P. aeruginosa* (TSB+Glucose) ; **Tube C :** témoin de contrôle avec *P. aeruginosa* et sans extrait brut ; **Tube D :** tube teste avec 100µl de méthanol et de *P. aeruginosa* ; **Tube E :** tube teste avec 100µl de l'extrait brut ; **Tube F :** tube teste avec 150µl de l'extrait brut ; **Tube G :** tube teste avec 200 µl de l'extrait brut.

L'activité antibiofilm de l'extrait brut de la souche d'actinobactéries : *Streptomyces* D2 a été testée contre les deux souches de *P. aeruginosa* (K1253 et ATCC27853) dans un système de formation de biofilm. Les absorbances indiquant la formation de biofilms et leurs inhibitions ont été mesurées après coloration au cristal violet par lecture sur spectrophotomètre (BioTeK) de la densité optique (DO) à 570 nm puis comparées au témoin (sans ajout de l'extrait brut). Les résultats obtenus sont consignés dans les figures 16 et 17.

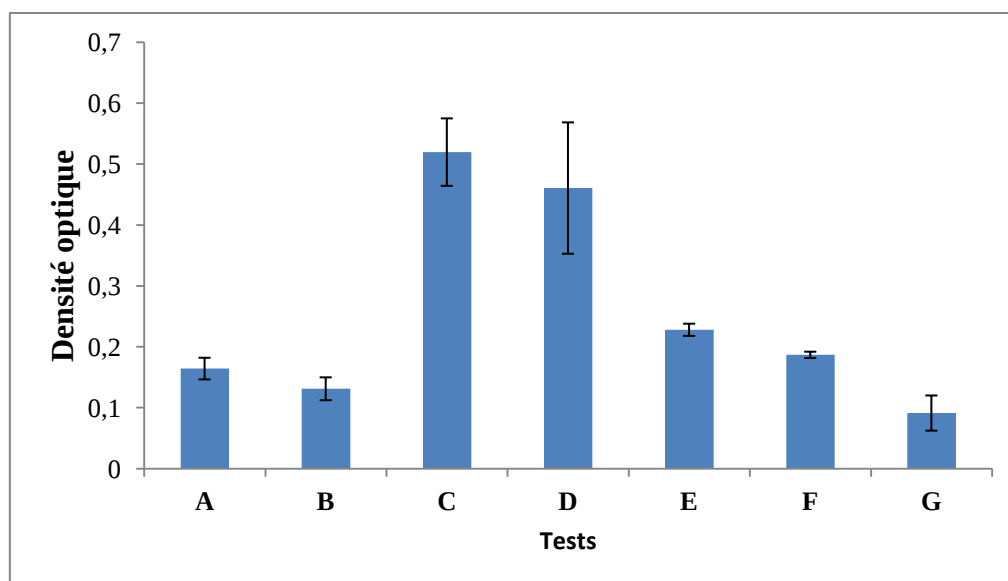


Figure 16 : Effet de l'extrait brut méthanolique de *Streptomyces* D2 sur les biofilms formés par *P. aeruginosa* ATCC27853.

Tube A : témoin négatif sans extrait brut et sans *P. aeruginosa* (TSB) ; **Tube B :** témoin négatif sans extrait brut et sans *P. aeruginosa* (TSB+Glucose) ; **Tube C :** témoin de contrôle avec *P. aeruginosa* et sans extrait brut ; **Tube D :** tube teste avec 100µl de méthanol et de *P. aeruginosa* ; **Tube E :** tube teste avec 100µl de l'extrait brut ; **Tube F :** tube teste avec 150µl de l'extrait brut ; **Tube G :** tube teste avec 200 µl de l'extrait brut.

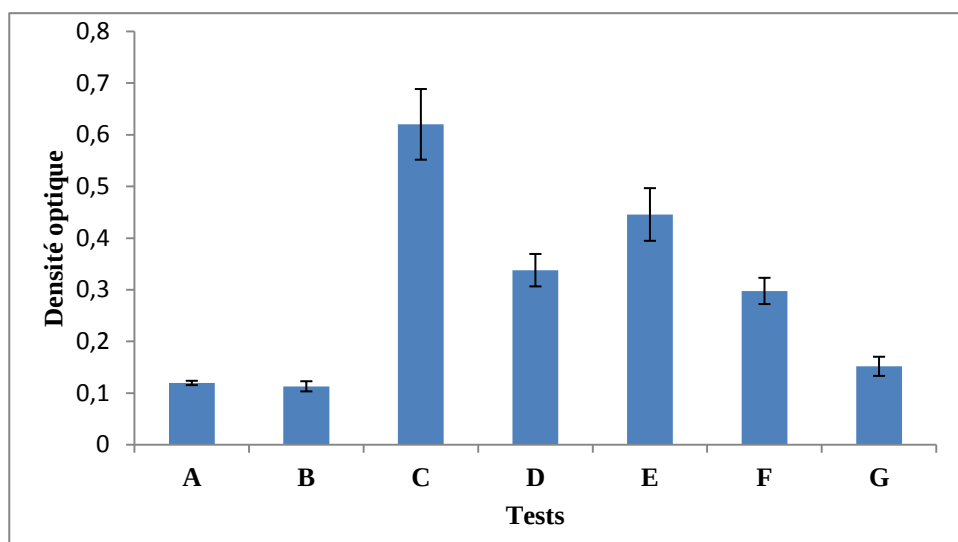


Figure 17 : Effet de l'extrait brut méthanolique de *Streptomyces* D2 sur les biofilms formés par *P. aeruginosa* K1253.

Tube A : témoin négatif sans extrait brut et sans *P. aeruginosa* (TSB) ; **Tube B :** témoin négatif sans extrait brut et sans *P. aeruginosa* (TSB+Glucose) ; **Tube C :** témoin de contrôle avec *P. aeruginosa* et sans extrait brut ; **Tube D :** tube teste avec 100µl de méthanol et de *P. aeruginosa* ; **Tube E :** tube teste avec 100µl de l'extrait brut ; **Tube F :** tube teste avec 150µl de l'extrait brut ; **Tube G :** tube teste avec 200 µl de l'extrait brut.

D'après les résultats obtenus, Il est clairement remarqué une diminution de la formation des biofilms par les souches cibles de *P. aeruginosa* (K1253 et ATCC27853.). En effet, la réduction de la formation des biofilms augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait brut méthanolique testé (100µl, 150 µl, 200µl) (Tubes E, F et G).

Par ailleurs, la lecture des résultats rapportés dans les figures 16 et 17 montre qu'en absence de souches cibles, *P. aeruginosa* K1253 et ATCC 27853 dans les tubes témoins négatif (A et B), les biofilms ne sont pas formés avec une valeur moyenne de densité optique de 0,12.

Parallèlement, après addition de concentrations croissantes en extrait brut (100µl, 150 µl et 200µl) en présence, d'une part, de la souche cible *P. aeruginosa* ATCC 27853, les valeurs de densités optiques enregistrées étaient de l'ordre de 0,22, 0,18 et 0,09 (tubes E, F et G) qui sont inférieures à celles rapportées pour la souche seule en absence d'extrait brut dont la densité optique relevée est de 0,52 (tube C) (Figure 16).

D'autre part, les absorbances obtenues en présence de la souche *P. aeruginosa* K1253 et des concentrations croissantes en extrait brut (100µl, 150 µl et 200µl), simultanément, étaient de l'ordre de 0,45, 0,30 et 0,15 (tubes E, F et G), respectivement, en comparaison avec la valeur obtenue en absence de l'extrait brut estimée à 0,62 (tube C) (Figure 17).

Ces résultats nous amènent à conclure que l'extrait brut méthanolique de l'isolat testé *Streptomyces* sp. D2 présente une activité antibiofilm non négligeable vis-à-vis, non seulement, de la souche sensible *P. aeruginosa* ATCC 27853, mais également, à l'encontre de la souche résistante *P. aeruginosa* K1253.

Il y'a, cependant, à signaler une légère activité antagoniste du méthanol utilisé à l'encontre des deux souches tests. En effet, cette activité a été décelée uniquement sur milieu liquide (sur tubes et sur microplaques) (tube D) et pas sur milieu solide (test des puits) réalisé au début de cette étude.

II. 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).

Face à cette grande tolérance aux biocides et au système immunitaire, la découverte de nouvelles molécules inhibitrices fait l'objet de nombreuses études. L'ordre des actinomycetales représente l'une des sources les plus importantes de molécules actives (Lam, 2006). C'est dans cette optique que s'inscrit cette étude qui consiste à tester l'effet d'un extrait brut méthanolique d'une souche d'actinobactérie appartenant au genre *Streptomyces* : *Streptomyces* sp.D2 sur la formation de biofilms produits par deux souches de *P. aeruginosa*, l'une sensible ATCC 27853 et la seconde résistante K1253.

Les résultats des tests effectués ont montré une activité antibiofilm importante de l'extrait brut méthanolique testé comparé à une étude récente menée par Kim et al, (2012) qui 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* sont capables de produire des sidérophores de nature peptidiques ainsi que des molécules de nature protéiques ou péptidiques pouvant interférer dans la formation de biofilm par *P. aeruginosa* à travers la limitation d'accès aux atomes de fer.

Par ailleurs, Yannick et al, (2014) ont rapporté que la bromoageliférine, molécule d'origine marine de la famille des 2-amino-imidazoles a démontré une activité antibiofilm chez *P. aeruginosa* et d'autres bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif.

De plus, selon Boyd et Chakrabarty (1994), plusieurs enzymes se sont montrées efficaces à dégrader la matrice polymérique du biofilm, tel que l'alginate lyase qui est capable de dégrader l'alginate contenu dans la matrice du biofilm de *P. aeruginosa*. Ainsi que, Mann et al (2009) ont montré que l'ADNase quant à elle peut hydrolyser les acides désoxyribonucléiques contenus dans la matrice de certains biofilms. Donlan (2009) a également prouvé que les bactériophages produisent aussi certaines enzymes capables de dégrader les polysaccharides de la matrice et provoquer ainsi la dispersion du biofilms.

Davies et Marques (2009) ont identifié une petite molécule signal (acide *cis*-2-décénoïque) produite par *P. aeruginosa* capable d'inhiber le développement d'un biofilm et d'induire sa dispersion. Cette molécule s'est également montrée efficace contre des biofilms produits par d'autres bactéries à Gram-négatif, à Gram-positif et par des levures d'une part ainsi que certains acides aminés D (dextrogyres) produits par les bactéries (ex. *Bacillus*) et sont capables de disperser les biofilms produits par différentes bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif d'autre part. Ils ont récemment rapporté que certains polysaccharides bactériens

avaient la capacité d'inhiber la formation de biofilms chez un vaste spectre de bactéries et de champignons.

CONCLUSION

Conclusion

P. aeruginosa, une bactérie à Gram négatif, et elle est la cause majeure d'infections nosocomiales chez les patients immunodéprimés. De plus, *P.aeruginosa* est directement responsable du taux de mortalité élevé et précoce chez les patients atteints de mucoviscidose. Ces infections aggravées, dues au développement de biofilms de *P. aeruginosa* constituent actuellement un vrai problème de santé publique. Cette espèce fait l'objet d'études assez complètes et informatives sur les mécanismes moléculaires qui interviennent lors du développement d'un biofilm

Le processus de formation de biofilm chez les souches de *P. aeruginosa* est un facteur de virulence assez grave qui lui confère une résistance microbienne aux molécules constitue un problème important lorsqu'elle concerne des microorganismes pathogènes. Cette résistance se traduit par la capacité acquise d'un microorganisme à résister aux effets d'un agent chimiothérapeutique.

En effet, la médecine d'aujourd'hui doit faire face à la prise en charge des infections impliquant des biofilms dont la recherche de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressif pour l'hôte semble toujours indispensable. Les actinobactéries sont d'importants producteurs d'antibiotiques (75% par *Streptomyces*) et autres métabolites secondaires.

L'objectif de ce travail était de quantifier et caractériser la capacité des *P. aeruginosa* (K1253 et ATCC27853) à former des biofilms par technique de microplaque de 96 puits et d'évaluer l'activité antibiofilms de l'extrait brut méthanolique de *streptomyces sp* D2.

A la lumière de cette étude, l'extrait brut méthanolique de *Streptomyces sp* D2 a un effet inhibiteur sur la croissance (Test des puits) et sur la formation de biofilm (test des microplaques) chez les souches de *P. aeruginosa* de référence et d'origine clinique (K1253 et ATCC27853), ainsi que la souche testée *Streptomyces sp* D2 ayant présenté un effet antibiofilm intéressant peut être considéré comme une source alternative prometteuse, de molécules à activité antibiofilms et aux biocides chimiques.

De ce fait il en ressort un 'intérêt grandissant pour poursuivre les investigations au tour des axes suivants:

Conclusion

- ❖ Compléter ces résultats par des tests indispensables, notamment l'obtention de nombreux extraits bruts des autres isolats que l'espèce *Streptomyces sp* D2.
- ❖ Faire une étude complète sur les extraits pour pouvoir déterminer les conditions permettant une meilleure conservation de leurs activités et une meilleure action insitu (tels que le pH, élargir à d'autres solvants....etc).
- ❖ Elargir la gamme de germes cibles pour les souches étudiés
- ❖ Utiliser d'autres technique de formation de biofilms tel que la méthode en tube (TM), la culture sur Rouge Congo Agar (RCA) et le Biofilm Ring Test (BFRT).
- ❖ Etude des mécanismes d'affection de l'extrait brut sur la formation de biofilms.

LISTE DES BIBLIOGRAPHIES

Liste des bibliographies

A

1. Alnnansouri, M. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat(2010). Institut National Polytechnique de Lorraine, France.

B

2. Ben Haj Khalifa A., Moissenet D., Vu Thien H., Khedher M. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : mécanismes et modes de régulations. Ann Biol Clin; (2011) ; vol 69 n°4, p. 393-403.
3. Belyagoubi Larbi. Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, (2014) ; p. 143.
4. Boyd A, Chakrabarty AM. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Environ Microbiol.(1994); vol 60 , p. 2355–2359.

C

5. Ceri H, Olson ME, Turner RJ. Needed, new paradigms in antibiotic development. Expert Opin Pharmacother (2010); vol 11, p 1233– 1237.
6. Clinical and Laboratory Standard, Institution performance standard for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fifth Information supplement M100-S25-CLSI.Wayne.PA, 2015.
7. Coban A., Ciftci A., Onuk E., Erturan Z., Tanriverdi C.Y., and Durupinar B. Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. Microbiology Bul (2009); vol 43, p. 563-573.
10. Colombié V .Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur (2005).
11. Conn. V.M. Molecular Interactions of Endophytic Actinobacteria in Wheat and Arabidopsis. These de Doctorat. Flinders University(2005); Vol 612, p. 297
12. Coufort C, Derlon N, Ochoa-Chaves J, Liné A, Paul E. Cohesion and detachment in biofilm systems for different electron acceptor and donors. Water Science and Technology, (2007); vol 55; n°8, p. 421-428.

13. Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt D, Clegg PD, Cochrane CA, Percival SL. Biofilm and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* (2007), vol 121 n°1-2, p. 1-17.

D

14. Dairi T. Studies on biosynthetic genes and enzymes of isoprenoids produced by actinomycetes. *Journal of antibiotics* (2005); vol 58 n°4, p. 227-243.
15. Danese P.N; Pratt, L.A; et Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology* (2000); vol 182 n°12; p. 3593-3596.
16. Davies D.G. et al. Exopolysaccharide production in biofilms, substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* (1993), *Appl Environ Microbiol*, vol 59, p. 1181-1186.
17. Davies DG, Marques CNH. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol* (2009), vol 19; p. 1393–1403.
18. De Almeida Cournet A, Etude de la catalyse microbienne de la réduction électrochimique du dioxygène. Thèse de doctorat. Université de Toulouse (2010) ; vol 13 n°11 30-39, p. 12-18.
19. Djinni I. Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Bejaia (2009). Thèse de Magister. Université A. Mira, Bejaia.
20. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev* (2002), vol 15, p. 167-193.
21. Donlan RM. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol* (2009); vol 17, p. 66–72.
22. Dubois *Pseudomonas aeruginosa* : réservoir, virulence et résistance. Laboratoire de Microbiologie, UMR CNRS 5234 « Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité ». (2013).

E

23. Ennahar S, Aoude-Werner D, Assobhei O et Hasselaman C. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *Journal of applied Microbiology* (1998), vol 85, p. 521-526.

F

24. Filloux Alain and Vallet Isabelle, Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires, UPR 9027, IBSM/Cnrs,

31, Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France (Paris) (2003) ; vol 19 n°1, p. 77- 83.

G

25. Goodman AL, Kulasekara B, Rietscha A, Boyd D, Smith RS, Lory S, A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell*, (2004), vol 7, p. 45-754.

J

26. Costerton J W; Stewart P S et Greenberg E P « Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections » (1999), vol 284, n° 5418, p. 1318-1322.

27. Jacques M, Tremblay YDN. Les biofilms : s'en préoccupe-t-on assez dans l'industrie agroalimentaire? Centre québécois de valorisation des biotechnologies, Fiche Bio Tendance®; www.cqvb.ca (2010), p.10-7.

K

28. Kaplan J.B., Ragunath C., Ramasubbu N., Fine D.H. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity. *Journal of Bacteriology* (2003), vol 185, p. 4693- 4698.

29. Kaplan JB, Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* (2010), vol 89, p. 205–218.

30. Khalilzadeh P, Formation de Biofilm à *Pseudomonas aeruginosa*: évaluation d'inhibiteurs potentiels du Quorum Sensing. Thèse de doctorat d'Université de Toulouse, (2009), p. 25-33.

31. Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K F. et Hopwood D A, *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, UK (2000), p. 613.

32. Kolari M, Attachments mechanisms and properties of bacterial biofilms on non-living surfaces (2003), University of Helsinki, Finland, p. 9-13.

33. Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* (2010), vol 328, p. 627– 629.

34. Kollef K E., Schramm G E., Wills A R., Reichley R. M., Micek, S T. & Kollef, M. H. Predictors of 30-day mortality and hospital costs in patients with ventilator-associated pneumonia attributed to potentially antibiotic-resistant Gram-negative bacteria. (2008).*Chest* vol 134, p.281–287.

35. Kolter R, Greenberg EP Microbial sciences: the superficial life of microbe (2006).*Nature*, vol 441; n°7091.p.300-302.

L

36. Lacey J. Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med.* (1997), vol 4, p.113-121.
37. Lam K-S Discovery of novel metabolites from marin actinomycètes. *Ecol and Indus Microbial Technen* (2006).vol 9, p.245-251.
38. Landini P, Antoniani D, Burgess JG, Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbial Biotechnology.* , (2010), vol 86, p.813–823.
39. Larpent JP, Sanglier JJ. In: *Biotechnologie des antibiotiques*. Paris: Ed. Masson. (1989), p 481.
40. Larpent J. Introduction à la nouvelle classification bactérienne, les principaux groupes bactériens, (2000), p. 280.
41. Laura A. Cotton, Rebecca J. Graham and Rose J. Lee, The Role of Alginate in *P. aeruginosa* PAO1 Biofilm Structural Resistance to Gentamicin and Ciprofloxacin , *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)*, vol 13, p. 58-620.
42. Laurent Frédéric, biofilm bactérien, laboratoire de bactériologie, conférence sur internet extrait janvier(2012).
43. Lazdunski A ; Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aerugenosa* et leur régulation. *Med Mal Infect* (1988), p. 109-118.
44. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunology*. Thèse de Doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. (2008), vol 322 n°107–131, p. 174.
45. Loria R., Bukhalid R.A., Fry B A, Plant pathogenicity in the genus *Streptomyces*. *Plant Disease* (1986), vol 81n° 8, p. 836-846.

M

46. Mann EE, Rice KC, Boles BR, et al. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*. 2009;vol 4 n°5822.
47. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology* (2006), 24 (1), p 25. *Microbes Nature*, vol 441, p. 300-302. *Microbial environment. Trends Microbiol*, vol 9, p.222 - 227.

O

48. Olson E et Rattzkin BPharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* (1999),vol 10, p. 525- 527.

P

49. Peeters E, Hans J. Nelis, Tom Coenye. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates (2008) *Microbiological Methods*, vol 72, p. 157–165.
50. Pimentel-Elardo, S.M.; Kozytska, S.; Bugni, T.S., Ireland, C.M., Moll, H., Hentschel, U. Anti-Parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. *Mar. Drugs* (2010). vol 8, p. 373–380.
51. Pizzul L, Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suede) (2006), p. 39.
52. Ploux L, Beckendorff S, Nardin M et Neunlist S, Quantitative and morphological analysis of biofilm formation on self-assembled monolayers. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* (2007), vol 57 n° 2, p. 174-181.

R

53. Rendueles O, Kaplan JB, Ghigo JM. Antibiofilm polysaccharides. *Environ Microbiol.* (2012), vol 10 n°1, p. 462- 2920.

S

54. Saulou C, Evaluation des propriétés antiadhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusion d'agent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma. (2009), Thèse de doctorat. Université de Toulouse, p.19-59.
55. Stepanovic, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M, Un test de plaque de microtitrage modifié pour la quantification de la formation de biofilm staphylococcique (2000) ;vol 40 n°2 ;p.175-9.
56. Sutherland E W The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment(2001). *Trends Microbial.* vol 9, p. 222-227.

T

57. Tarkka, M.T. Hampp, R. Root Inoculation with a Forest Soil Streptomycete Leads to Locally and Systemically Increased Resistance against Phytopathogens in Norway Spruce. *New Phytologist* (2008); vol 177; p. 965-976.
58. Theilleux J. Les actinomycètes in : *Microbiologie Industrielle, les microorganismes d'intérêt industriels. Techniques et documentation-Lavoisier* (1993), p. 425-481.

V

59. Vasil M L. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology (1986), vol 108, p. 800-805.

60. Ventre I., Goodman A L; Vallet-Gely I., Vasseur P., Soscia C., Molin S., Bleves S., Lazdunski A., Lory, S. & Filloux, A. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006),vol 103, p. 171-176.
61. Vonothini G; Murugan. M; Sivakumar K; and Sudha S Optimization of protease production by an actinomycete Strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond (2008). *Afr. J. of Biotech*, vol 7 n°18, p. 3225-3230.

Y

62. Yang L, Liu Y, Wu H, et al. Combating biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* (2012); vol 65;p. 146–157.
63. Yannick D.N. Tremblay, Skander Hathroubi, et Mario Jacques, Les biofilm bactérienne : leur importance en santé animal et en santé publique (2014) ; vol 78 n°2, p 110- 116.
64. 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.

Z

65. Zouaghi A, Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par *Streptomyces rimosus* (2007), Diplôme National d'Ingénieur. Université 7 Novembre de Carthage, Vol 13, p. 58-62.

ANNEXES

Annexe I

Milieu s de cultures utilisé :

- ❖ Milieu Chapman
- ❖ Gélose nutritive
- ❖ Mueller Hinton
- ❖ TSI
- ❖ Citrate de Simmons
- ❖ Milieu Gausse (Ivantiskaya et *al.* 1978).
 - Amidon20g
 - K₂HPO₄.....0.5g
 - KNO₃1g
 - MgSO₄ 7H₂O.....0.5g
 - FeSO₄ 7H₂O.....0.01g
 - Agar..... 20g
 - H₂O..... 1l
 - PH.....7.4±0
- ❖ Sel M9
 - Na₂HPO₄, 7H₂O64g
 - KH₂PO₄.....15g
 - Na Cl2.5g
 - NH₄C.....1 5g
 - H₂O1l
- ❖ M9
 - Sel M9 5%100ml
 - MgSO₄1ml
 - CaCl₂50µl
 - Glucose 20%..... 10µl
 - H₂O stérile390ml
- ❖ PBS :
 - KH₂PO₄ (0.14g/1L)
 - Na Cl8, 5g /1l
 - Na₂HPO₄0.79g /1l

- H₂O.....11
- ❖ TSB30g /1l
- ❖ Cristal Violet 2% (2g/100ml) (CV) est un colorant basique qui se lie sur les bactéries et les exopolysaccharides dans la matrice extracellulaire du biofilm (Peeters et al, 2008).
- ❖ Acide acétique 33%
- ❖ Méthanol pur

Annexe II

Matériels analytique

- ❖ Autoclave (BIOBASE)
- ❖ Bain-marie (GFL)
- ❖ Balance analytique (RADWAG référence : PS210/C/2)
- ❖ Bec Bunsen
- ❖ Bêchers
- ❖ Boites de pétri
- ❖ Ecouvillons
- ❖ Eprouvette
- ❖ Erlenmeyers
- ❖ Etuves à 37°C
- ❖ Flacons
- ❖ Four Pasteur à 180°C
- ❖ Micropipettes
- ❖ Microplaques de 96 puits
- ❖ Microscope optique (ZEISS)
- ❖ Pipettes Pasteur
- ❖ Plaque agitatrice (Raypa AG-5)
- ❖ Rotavapor (Büchi Rotavapor R-114)
- ❖ Spectrophotomètre (RAYLEIGH)
- ❖ Tube à essais
- ❖ Vortex (VELP scientifica)

Annexe III :

Tableau V : Effet de l'extrait brut méthanolique de *streptomyces* D2 sur les biofilm formés par *P. aeruginosa* K1253.

	1	2	3	4	5	6	Moyenne	Ecartype
A	0,117	0,12	0,122	0,118	0,126	0,114	0,1195	0.0041833
B	0,12	0,119	0,126	0,103	0,105	0,105	0,113	0.00981835
C	0,538	0,691	0,681	0,642	0,535	0,634	0,62016667	0.06839712
D	0,362	0,302	0,373	0,357	0,333	0,3	0,33783333	0.03139055
E	0,367	0,44	0,478	0,483	0,407	0,499	0,44566667	0.05098889
F	0,301	0,311	0,292	0,295	0,255	0,332	0,29766667	0.02540604
G	0,175	0,147	0,137	0,135	0,175	0,141	0,15166667	0.01853285

Tableau VI : Effet de l'extrait brut méthanolique de *streptomyces* D2 sur les biofilms formés par *P. aeruginosa* ATCC27853

	1	2	3	4	5	6	Moyenne	Ecartype
A	0,18	0,175	0,178	0,141	0,17	0,143	0,1645	0.01776232
B	0,118	0,133	0,142	0,16	0,129	0,106	0,13133333	0.05537659
C	0,477	0,492	0,538	0,476	0,514	0,622	0,51983333	0.0557659
D	0,331	0,424	0,541	0,565	0,558	0,346	0,46083333	0.10781357
E	0,224	0,234	0,245	0,218	0,228	0,22	0,22816667	0.1004822
F	0,186	0,182	0,184	0,193	0,194	0,183	0,187	0.00521153 6
G	0,054	0,073	0,106	0,112	0,13	0,074	0,0915	0.0288704

Annexe IV

Tableau VI: Nombre approximatif de métabolite secondaire produit par différents groupes des microorganismes (Keiser et al.2000)

Source	Métabolites bioactifs			Métabolites inactifs
	Antibiotiques	Autres	Total	
Non-actinomycète	1400(12%)	240(9%)	1640(11%)	2000-5000
Actinomycète	7900*(66%)	1220*(40%)	9120*(61%)	8000-10000
Champignons	2600(22%)	1540(51%)	4140(28%)	15000-25000
Total (micro-organisme)	11900(100%)	3000(100%)	14900(100%)	25000-40000
Lichen	150	200-500		1000
Algue	700	800-900		1000-2000
Plantes Supérieurs	5000	25000-35000		500000-800000
Animaux Terrestres	500	10000-15000		200000-
Animaux marin	1200	1500-2000		300000
				2000-3000

Annexe V

Tableau VIII : 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
Beta-lactamines	Piperacillin	PI	100µg	≥21	15-20	≤14
	Ticarcillin-clavulanate	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
Aminoglycosides	Gentamicin	GN	10µg	≥15	13-14	≤12
	Tobramycin	TOB	10µg	≥15	13-14	≤12
	Amikacin	AK	30µg	≥17	15-16	≤14
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	CIP	5µg	≥21	16-20	≤15

Résumé

L'objectif principal de cette étude est de tester l'activité antibiofilm d'un l'extrait brut méthanolique produite par la famille des actinobactéries : *Streptomyces sp* D2 après avoir sélectionné deux souches de *P. aeruginosa* (K1253 et ATCC27853) qui sont sensibles à l'extrait brut des actinobactéries d'après le test d'activité antagoniste (méthode des puits) et qui sont capables de produire les biofilms sur le système de microplaque de 96 puits. Dans cette étude, la méthode de microplaque basée sur la coloration par le cristal violet, la technique la plus utilisée dans le contexte de formation de biofilms a été utilisée pour déterminer l'activité antibiofilm de l'extrait brut testé. Nous avons détecté un effet inhibiteur non négligeable de l'extrait brut méthanolique testés sur les biofilms formés par les deux souches cibles de *P. aeruginosa* ce qui confirme que la famille des actinobactéries jouent un rôle potentiel dans la lutte contre les biofilms.

Most clés: Biofilms, *P. aeruginosa* ; Extrait brut, Activité antibiofilm, *Streptomyces*

Abstract

The main objective of this study is to test the antibiofilm activity of a methanolic crude extract produced by the actinobacterium family *Streptomyces sp* D2 after having selected two strains of *P. aeruginosa* (K1253 and ATCC27853) which are sensitive to the crude extract of the actinobacteries according to the antagonistic activity test (well method) and which are capable of producing the biofilms on the 96-well microplate system. In this study, the microplate method based on crystal violet staining the most used technique in the context of biofilm formation was used to determine the antibiofilm activity of the crude extract tested. We have detected a non-negligible inhibitory effect of the methanolic crude extract tested on the biofilms formed by the two target strains of *P. aeruginosa* which confirms that actinobacteria play a potential role in the fight against biofilm.

Key words: Biofilms, *P. aeruginosa*; Crude extract, Antibiofilm activity, *Streptomyces*

ملخص

الهدف الرئيسي لهذه الدراسة هو اختبار النشاط المضاد للبيوفيلم للمستخرج الميثانولي الخام التي تنتجها عائلة *Streptomyces sp* D2: actinobactéries بعد اختيار اثنين من سلالات *P. aeruginosa* (K1253 و ATCC27853) التي تعتبر حساسة للمستخرج الميثانولي الخام من actinobactéries وفقا لاختبار النشاط الحيوي والتي قادرة على إنتاج البيوفيلم على نظام الصفيحة. في هذه الدراسة، تم استخدام أسلوب التلوين القائم على الصفيحة مع الكريستال البنفسجي، والأكثر استخداما في سياق تشكيل البيوفيلم واستعملناها لتحديد النشاط المضاد للبيوفيلم للمستخرج الميثانولي الخام المختبر. قمنا بالكشف عن تأثير كابح بشكل كبير للمستخرج الميثانولي الذي تم اختباره على البيوفيلم التي شكلتها اثنين من سلالات *P. aeruginosa* مؤكدا أن أسرة acténobactéries تلعب دور محتمل في مكافحة بيوفيلم.

كلمات مفتاحية: البيوفيلم *P. aeruginosa*، المستخرج الميثانولي الخام، النشاط المضاد للبيوفيلم، *Streptomyces*