



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie moléculaire des microorganismes

Intitulé :

---

**Essai d'inhibition de la formation des biofilms chez les bactéries responsables d'infections nosocomiales : *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus***

---

Présenté et soutenu par : *ATTAR Sara Ghozlane*

Le : 01/07/2019

*LACHEHEUB Lydia Rachida*

**Jury d'évaluation**

**Présidente du jury :** *ABEDLAZIZ Widad* (Maître conférence «B» - UFM Constantine).

**Rapporteuse :** *BOUCHLOUKH Warda* (Maître Assistant «A» - UFM Constantine).

**Examinatrice :** *GACI Meriem* (Maître assistant «A» - UFM Constantine).

*Année universitaire  
2018 - 2019*

## **Remerciements**

*Nous remercions Allah tout puissant qui nous a donné le courage et la  
volanté et de nous avoir bénie pour la réalisation de ce modeste  
travail.*

*Nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice et  
directrice de mémoire M<sup>lle</sup> **Bouchloukh Warda**, Maître assistant A à  
l'UFM Constantine pour avoir accepté la charge de nous encadré.  
Nous vous remercions pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail  
et pour vos précieux conseils et remarques.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et  
notre profonde gratitude à Madame **Abdelaziz Widad**, Maître de  
conférence B à l'UFM Constantine, d'avoir bien accepté de présider ce  
jury.*

*Nous souhaitons exprimer notre gratitude à Madame **Gaci Meriem**,  
Maître assistant A à l'UFM Constantine, pour avoir exprimé son  
entière disponibilité à participer à ce jury et examiner ce mémoire.*

*Merci, à ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de  
près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du  
cœur.*

**MERCI**

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à mes plus chers êtres au monde*

*Tout d'abord à mes parents et spécialement à ma très chère mère  
LYNDA pour son chaleureux encouragement, sa tendresse, sa  
douceur, sa disponibilité et ses sacrifices durant toute ma vie.*

*A mon très cher père ABD ELHAKIM, pour son soutien, son aide, sa  
compréhension, son amour et ses sacrifices*

*A ma chère grand-mère MONIKA la plus douce et aimable*

*A mes chers frères Zinou, Zakí et Anís*

*A mes belles sœurs Imane et Sara*

*A mes adorables nièces Anía et Maya*

*Et a toute ma famille et mes amies*

*A mon groupe préféré BTS et tout ARMY sur terre*

*A mon binôme et ma sœur Lydia je la remercie pour le courage qu'elle  
m'a donné et tous les moments qu'on a passé ensemble,*

*Et a toute sa famille.*

*Ghozlane*

## *Dédicace*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que je dédie ce travail à :*

*Ma très chère grand-mère :*

*Tu es la preuve que l'amour éternel et inconditionnel existe vraiment. Que dieu vous accueille dans son éternel paradis. Repose en paix **mami***

*Ma chère mère : **Asma***

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés.*

*Mon cher père : **Tayeb***

*Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes sont-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite.*

*Recevez ce travail en signe de ma vive reconnaissance et mon profond amour. Puisse le tout puissant vous donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour.*

*Mes très chères sœurs : **Lina, Nada et Mélissa***

*En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent je vous souhaite un avenir plein de joie, de réussite et surtout de santé.*

*Mon binôme et ma sœur **Ghazlane** je la remercie pour le courage qu'elle m'a donné et tous les moments qu'on a passés ensemble, Et toute sa famille.*

*Lydia.*

## Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>i</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>

### **Partie I : Revue bibliographique**

#### **Chapitre I : Les infections nosocomiales**

<b>1. Définition</b> .....	<b>2</b>
<b>2. Fréquences et incidences</b> .....	<b>2</b>
<b>3. L'origine et les réservoirs des infections nosocomiales</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1. Les infections d'origine "endogène"</b> .....	<b>3</b>
<b>3.2. Les infections d'origine "exogène"</b> .....	<b>4</b>
<b>4. Mécanismes et modes de transmission</b> .....	<b>4</b>
<b>4.1. Mécanismes de transmission</b> .....	<b>4</b>
<b>4.2. Modes de transmission</b> .....	<b>5</b>
<b>5. Les microorganismes en cause des infections nosocomiales</b> .....	<b>5</b>
<b>5.1. Les principales bactéries</b> .....	<b>5</b>
<b>5.1.1. Les bactéries à Gram négatif</b> .....	<b>5</b>
<b>5.1.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	<b>5</b>
<b>5.1.1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i></b> .....	<b>6</b>
<b>5.1.2. Les bactéries à Gram positif</b> .....	<b>6</b>
<b>5.1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>6</b>
<b>5.2. Autres microorganismes</b> .....	<b>6</b>
<b>6. Les différents sites d'infection nosocomiale</b> .....	<b>7</b>
<b>6.1. Les infections du site opératoire</b> .....	<b>7</b>
<b>6.2. Les infections urinaires</b> .....	<b>7</b>
<b>6.3. Bactériémie nosocomiale</b> .....	<b>7</b>
<b>6.4. Infection respiratoire basse (pneumonie)</b> .....	<b>7</b>
<b>6.5. Autres infections nosocomiales</b> .....	<b>8</b>
<b>7. Les facteurs de risque des infections nosocomiales</b> .....	<b>8</b>

7.1. Les facteurs de risque liés au patient .....	8
7.2. Les facteurs de risque liés aux soins et aux interventions .....	8
7.3. Les facteurs de risque liés à l'agent infectieux .....	8
8. La prévention .....	9

## **Chapitre II : Généralités sur les biofilms**

1. Historique .....	10
2. Définition .....	10
3. Les étapes de la formation d'un biofilm .....	10
3.1. Adhésion réversible .....	11
3.2. Adhésion irréversible .....	11
3.3. Formation de micro-colonies .....	12
3.4. Maturation de biofilm .....	12
3.5. Détachement de bactéries .....	12
4. Structure et composition du biofilm .....	13
4.1. Les microorganismes .....	13
4.2. La matrice .....	14
4.3. L'organisation .....	14
5. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm .....	15
6. Régulation de la formation d'un biofilm .....	15
6.1. Le quorum sensing .....	16
6.2. Les molécules impliquées dans le quorum sensing .....	16
6.3. Rôle du quorum sensing .....	16
7. Les effets bénéfiques et néfastes des biofilms .....	16
7.1. Les effets bénéfiques .....	16
7.2. Les effets néfastes .....	17

## **Chapitre III : La lutte contre la formation de biofilms bactériens**

1. Résistance des bactéries au sein des biofilms .....	18
1.1. Résistance aux défenses de l'hôte .....	18
1.2. Résistance aux antibiotiques et désinfectants .....	19
2. Prévention et traitement des infections liées aux biofilms .....	20

2.1. Moyen de lutte contre la formation des biofilms .....	20
2.2. Techniques d'éliminations des biofilms .....	21

## Chapitre IV : La propolis

1. Définition .....	22
2. La récolte .....	22
2.1.La récolte par les abeilles .....	22
2.2.La récolte par les apiculteurs .....	23
3. La composition de la propolis .....	23
3.1.Les acides organiques .....	23
3.2.Les acides phénoliques .....	24
3.3.Les flavonoïdes .....	24
3.4.L'ester phényléthylique d'acide caféique (CAPE) .....	24
3.5.Autres composants .....	24
4. Les propriétés de la propolis .....	24
4.1.Activités antimicrobiennes .....	25
4.1.1. Activité antibactérienne .....	25
4.1.2. Activité antivirale .....	27
4.1.3. Activité antifongique .....	27
4.1.4. Activité antiparasitaire .....	27
4.2.Activité anti-oxydante .....	27
4.3.Activité anti-inflammatoire .....	27
4.4.Propriétés anti-tumorale .....	27
4.5.Autres activités de la propolis .....	28

## Partie II : Partie pratique

### Chapitre I : Matériel et méthodes

1. Souches bactériennes .....	29
2. Etude des possibilités d'inhibition de la formation de biofilm de <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i> .....	30
2.1. Effet de la propolis brute sur la formation du biofilm .....	31
2.1.1. Préparation des suspensions bactériennes initiales .....	31

2.1.2. Tests de formation de biofilms en tubes .....	31
2.1.3. Lecture .....	31
2.2.Effet de l'extrait éthanolique de propolis sur la formation du biofilm .....	32
2.2.1. Préparation de l'extrait éthanolique de propolis .....	32
2.2.2. Tests anti-biofilms .....	32
3. Traitement statistique des résultats .....	33

## Chapitre II : Résultats et discussion

1. Résultats de l'antibiogramme.....	34
2. Inhibition de la formation de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i> .....	35
2.1. Effet de la propolis brute .....	35
2.1.1. Effet de la PB sur la formation de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> .....	35
2.1.1.1. Effet de la PB sur l'adhésion des cellules sessiles de <i>P. aeruginosa</i> .....	35
2.1.1.2.Effet de la PB sur la croissance des cellules planctoniques de <i>P. aeruginosa</i> ..	37
2.1.2.Effet de la PB sur la formation de biofilms de <i>S. aureus</i> .....	39
2.1.2.1.Effet de la PB sur l'adhésion des cellules sessiles de <i>S. aureus</i> .....	39
2.1.2.2.Effet de la PB sur la croissance des cellules planctoniques de <i>S. aureus</i> .....	40
2.2. Effet de l'extrait éthanolique de la propolis .....	42
2.2.1. Effet de l'EEP sur la formation de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> .....	42
2.2.1.1. Effet de l'EEP sur l'adhésion des cellules sessiles de <i>P. aeruginosa</i> .....	42
2.2.1.2. Effet de l'EEP sur la croissance des cellules planctoniques de <i>P. aeruginosa</i> .....	43
2.2.2. Effet de l'EEP sur la formation de biofilms de <i>S. aureus</i> .....	44
2.2.2.1. Effet de l'EEP sur l'adhésion des cellules sessiles de <i>S. aureus</i> .....	44
2.2.2.2. Effet de l'EEP sur la croissance des cellules planctoniques de <i>S. aureus</i> ....	45
<b>Conclusion</b> .....	<b>46</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>47</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	



## Liste des abréviations

<b>AHL</b>	Acylhomosérines lactones
<b>AK</b>	Amikacine
<b>AKN</b>	Amikacine
<b>ATB</b>	Antibiotiques
<b>ATM</b>	Aztréonam
<b>AX</b>	Amoxicilline
<b>BN</b>	Bouillon nutritif
<b>CAPE</b>	Ester phényléthylique d'acide caféique
<b>CAZ</b>	Ceftazidime
<b>CHL</b>	Chloramphénicol
<b>CIP</b>	Ciprofloxacine
<b>CMEB</b>	Concentration Minimale d'Eradication du Biofilm
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CN</b>	Gentamicine
<b>CT</b>	Colistine
<b>CV</b>	Cristal violet
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DO</b>	densité optique
<b>ED</b>	Eau distillée
<b>EEP</b>	Extrait éthanolique de la propolis
<b>EPS</b>	Exopolysaccharides

<b>ET</b>	Ecart type
<b>FEP</b>	Cefepime
<b>FOS</b>	Fosfomycine
<b>IAS</b>	Infection associée aux soins
<b>IN</b>	Infection nosocomiale
<b>IPM</b>	Imipenème
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>M</b>	Moyenne
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ORL</b>	Oto-Rhino-Laryngologie
<b>P</b>	Pénicilline
<b>PB</b>	forme commercialisée de la propolis brute
<b>PIR</b>	Pipéracilline
<b>QS</b>	Quorum Sensing
<b>SFM</b>	Société Française de Microbiologie
<b>SXT</b>	Sulfamethoxazole + Triméthoprim
<b>TIC</b>	Ticarcilline
<b>TZP</b>	Pipéracilline + Tazobactam
<b>UV</b>	Ultraviolet

## Liste des figures

<b>Figure 01.</b>	Représentation des différentes étapes de développement d'un biofilm .....	13
<b>Figure 02.</b>	Mécanismes de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte .....	19
<b>Figure 03.</b>	Résistance des biofilms aux antibiotiques .....	20
<b>Figure 04.</b>	Effet des différentes concentrations en PB sur la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> .....	36
<b>Figure 05.</b>	Effet de la PB sur la croissance des cellules planctoniques de <i>P. aeruginosa</i> .	38
<b>Figure 06.</b>	Effet des différentes concentrations en PB sur la formation du biofilm de <i>S. aureus</i> .....	40
<b>Figure 07.</b>	Effet de la PB sur la croissance des cellules planctoniques de <i>S. aureus</i> .....	41
<b>Figure 08.</b>	Effet des différentes concentrations en EEP sur la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> .....	43
<b>Figure 09.</b>	Effet de l'EEP sur la croissance des cellules planctoniques de <i>P. aeruginosa</i>	44
<b>Figure 10.</b>	Effet des différentes concentrations en EEP sur la formation du biofilm de <i>S. aureus</i> .....	45
<b>Figure 11.</b>	Effet de l'EEP sur la croissance des cellules planctoniques de <i>S. aureus</i> .....	46

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01.</b>	Prévalence des infections nosocomiales par pays .....	03
<b>Tableau 02.</b>	Les différents composants de la matrice .....	14
<b>Tableau 03.</b>	Les principaux facteurs influençant la formation des biofilms .....	15
<b>Tableau 04.</b>	Effets de la propolis contre quelques bactéries à Gram positif et négatif .....	26
<b>Tableau 05.</b>	Antibiotiques testés sur <i>P. aeruginosa</i> .....	29
<b>Tableau 06.</b>	Antibiotiques testés sur <i>S. aureus</i> .....	30
<b>Tableau 07.</b>	Résultats de l'antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
<b>Tableau 08.</b>	Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
<b>Tableau 09.</b>	Effet de la PB sur la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> .....	36
<b>Tableau 10.</b>	Effet de la PB sur la croissance planctonique de <i>P. aeruginosa</i> .....	38
<b>Tableau 11.</b>	Effet de la PB sur la formation du biofilm de <i>S. aureus</i> .....	39
<b>Tableau 12.</b>	Effet de la PB sur la croissance planctonique de <i>S. aureus</i> .....	40
<b>Tableau 13.</b>	Effet de l'EEP sur la formation du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> .....	42
<b>Tableau 14.</b>	Effet de l'EEP sur la croissance planctonique de <i>P. aeruginosa</i> .....	43
<b>Tableau 15.</b>	Effet de l'EEP sur la formation du biofilm de <i>S. aureus</i> .....	45
<b>Tableau 16.</b>	Effet de l'EEP sur la croissance planctonique de <i>S. aureus</i> .....	46

## Introduction

Le mode de vie en biofilms offre de nombreux avantages pour la survie et la multiplication de l'écosystème bactérien. Néanmoins, les biofilms sont responsables d'infections chroniques et posent de nombreux problèmes dans le domaine médical. Ces infections sont d'autant plus difficiles à combattre que les bactéries associées en biofilms qui sont résistantes aux défenses de l'hôte et aux antibiotiques. De ce fait, l'éradication ou l'inhibition de la formation du biofilm reste un sérieux problème de santé publique (**Costerton et al., 1999 ; Bezoui, 2016**).

*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sont responsables d'un nombre croissant d'infections nosocomiales essentiellement chez des patients présentant une immunodéficience. Ces bactéries, en particulier les souches multirésistantes, peuvent causer des infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à leurs capacités à adhérer aux surfaces biotiques et abiotiques (**Chibi, 2015**).

Depuis l'antiquité, un intérêt accru a été porté sur des molécules d'origine naturelle ayant montré des propriétés antibactériennes et anti-biofilms notamment les produits de la ruche. Parmi ces produits, la propolis est définie comme un remède naturel. Elle est utilisée par l'abeille comme colle, enduit et antibiotique. Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels. Ces produits naturels leurs usage en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Ils sont considérés comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables. (**Bogdanov, 2016 ; Soltani, 2017**).

Dans cette optique, nous tenterons de tester et de rechercher, l'effet d'un produit naturel végétal, en l'occurrence de la propolis sur l'adhésion de *P. aeruginosa* et *S. aureus* et sur leurs capacités à former des biofilms.

## Chapitre I : Les infections nosocomiales

### 1. Définition

L'infection nosocomiale (IN) est une infection contractée dans un établissement de santé (hôpital, clinique ...), elle est aussi appelée infection associée aux soins (IAS). Elle est généralement acquise plus de 48h après l'admission, qu'elle soit ambulatoire ou hospitalière : au cours ou au décours d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) d'un patient, et qui se révèle après la sortie de l'établissement de soins, peut bien être une IN (**Jean, 2002 ; Menzinger et al., 2008**).

Si l'infection apparaît avant 48h après l'admission, on en déduit que l'infection était en incubation au moment de l'admission, donc elle n'est pas contractée dans l'établissement de santé. L'infection n'est pas considérée comme nosocomiale (**Kernane et al., 2013**).

Dans le cas d'une opération, l'infection peut être jugée nosocomiale dans un délai de 30 jours qui suivent l'admission dans l'établissement de santé. Pour toute mise en place d'une prothèse articulaire, matériel métallique de fixation ou de suture, ce délai peut aller jusqu'à 1 an (**Sumba, 2012**).

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les IN peuvent être décrites comme « *des infections survenant chez un patient au sein d'un hôpital ou d'un autre établissement de santé et chez qui cette infection n'était ni présente ni en incubation au moment de l'admission. Cette définition inclut les infections contractées à l'hôpital mais qui se déclarent après la sortie, et également les infections professionnelles parmi le personnel de l'établissement.* » (**OMS, 2008**).

### 2. Fréquences et incidences

Selon l'OMS les IN sont fréquentes dans le monde entier et touchent aussi bien les pays développés que les pays en développement. La fréquence globale des IN, mesurées par des études internationales, varie entre 5 et 10% des hospitalisés (**Vincent et al., 2008**).

Pour les pays développés, les IAS concernent 5 à 15% des patients et peuvent affecter 9 à 37% des patients admis en unités de soins intensifs. Un taux qui dépasse parfois 25% dans les pays en développement (**Motaouakkil et Aalloula, 2011**).

En Afrique, la prévalence des IN varie entre 10 et 60%, et en Algérie, après plusieurs investigations réalisées au niveau des secteurs de santé sur les IN donnent un taux de prévalence national de 15 % (**HuffPost Algérie, Radio Algérienne, 2018**).

**Tableau 01 : prévalence des infections nosocomiales par pays (Rossello *et al.*, 2010).**

Pays	Patients Infectés		Infections		Taux de prévalence <sup>a</sup> par hôpital (%)
	Nbre	Taux % (IC <sub>95</sub> %)	Nbre	Taux (%)	
<b>Algérie</b>	103	6.3 (5.2 -7.6)	127	7.9	2.1-13.0
<b>Egypte</b>	114	9.9 (8.3-11.8)	125	10.9	0.0-30.2
<b>Italie</b>	44	11.9 (8.8-15.6)	53	14.3	5.4-15.3
<b>Maroc</b>	18	6.7 (4.0-10.4)	18	6.7	0.0-24.7
<b>Tunisie</b>	134	11.0 (9.3-12.9)	160	13.2	6.8-14.9
<b>Total</b>	413	8.9 (8.1-9.8)	483	10.5	0.0-30.2

(<sup>a</sup> taux de prévalence des patients infectés, IC : intervalle de confiance)

### 3. L'origine et les réservoirs des infections nosocomiales

Les IN ont différentes origines, mais l'origine principale de la transmission des bactéries c'est le manque de la pratique d'hygiène (lavage des mains...) d'une part, et par le biais de la médecine spécifiquement la chirurgie d'une autre part. Ces infections peuvent être issues aux soins (sur cathéter), ou simplement contracter lors de l'hospitalisation (épidémie de la grippe) (**Belhaj Soulami, 2010**).

Le réservoir d'un microorganisme est défini comme le lieu habituel et permanent où un microorganisme persiste et se multiplie (**Lasheras et Monnin, 2008**).

#### 3.1. Les infections d'origine "endogène"

Le malade s'infecte avec ses propres microorganismes, à la faveur d'un acte invasif, c'est-à-dire à travers les lésions des muqueuses, les lésions cutanées (plaies, brûlures, maladies de peau) ou /et en raison d'une fragilité particulière (**Ministère de la santé, 2010 ; SFAR, 2002**).

### 3.2. Les infections d'origine "exogène"

Dans ce cas les microorganismes responsables de l'IN ont pour origine d'un autre malade, la transmission étant le plus souvent manu portée entre les malades, les malades et les personnels ou par la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, équipements...). C'est le mode de transmission le plus fréquemment retrouvé lors d'épidémies (**Ministère de la santé, 2010 ; SFAR, 2002**).

## 4. Mécanismes et modes de transmission

### 4.1. Mécanismes de transmission

Les principaux mécanismes de transmission sont les suivants :

- **Les hétéro-infections ou croisées** : Cette infection résulte de la contamination d'un malade par les germes d'un autre malade.
- **L'auto-infection** : Le patient s'infecte par ses propres germes de sa flore originale ou de sa microflore remaniée. Les malades auto-infectés constituent une source importante de germes et sont souvent à l'origine d'hétéro-infection.
- **La xéno-infection** : dans ce cas les agents pathogènes sont transmis par des personnes venant de l'extérieur (personnel soignant, visiteurs, sous-traitants), et présentant eux-mêmes une pathologie infectieuse, déclarée ou en cours d'incubation.
- **L'exo-infection** : Elle est liée à des erreurs ou à des insuffisances dans les techniques d'asepsie (**Qassimi, 2010**).

### 4.2. Modes de transmission

Les fondamentaux modes de transmissions des IN dans les milieux hospitaliers sont les suivants :

- **Par contact direct** : la flore cutanée résidente ou transitoire présente sur les mains des soignants colonise ou infecte les patients (peuvent contenir 100 à 1000 bactéries/cm<sup>2</sup>). Mais il n'y a pas que les mains, il y a aussi :
  - La tenue vestimentaire des soignants.
  - La flore de l'environnement.
  - Plaie ouverte en contact avec des surfaces contaminées.
  - Flore des autres patients déposée sur des surfaces.
  - L'entourage direct du patient peut-être en cause (**Lasheras et Monnin, 2008**).



La flore résidente retrouvée constamment faite en général de bactéries inoffensives : *Microspores*, *Corynebacteries*, *Staphylococcus epidermidis*. Et une flore transitoire qui représente les germes de l'ambiance hospitalière (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*...) (Bouguenoun, 2017).

➤ **Par contact indirect** : Ce mécanisme est un mode de transmission fondamental des microorganismes dans lequel, les dispositifs médicaux, produits biologiques et les aliments peuvent servir des supports de contamination, distinguons ainsi :

- Les instruments de chirurgie.
- Le matériel destiné au sondage, aux injections...
- Les endoscopes, les stéthoscopes...

Ces objets peuvent avoir été contaminés par le personnel ou par les malades (Qassimi, 2010).

➤ **Les autres modes de transmission** :

- **Par gouttelette ou droplet (>5 µ)** : Ce sont des sécrétions du rhino-pharynx ou du tractus respiratoire, la source est alors proche du patient (Vincent *et al.*, 2008).
- **Par voie aérienne par droplet nuclei (<5 µ)**: Il s'agit de microorganismes sur support de poussière ou de cellules squameuses, la source peut être distante du patient (Vincent *et al.*, 2008).
- **La transmission par intermédiaire** : Dans ce cas le support est contaminé (nourriture, liquide de perfusion...) s'observe sporadiquement dans le cadre d'épidémies (Qassimi, 2010).

## 5. Les microorganismes en cause des infections nosocomiales

### 5.1. Les principales bactéries

Les bactéries se sont les microorganismes fondamentaux causant les IN, elles représentent 90% de l'étiologie des IN (OMS, 2008).

#### 5.1.1. Les bactéries à Gram négatif

##### 5.1.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* est une espèce classée dans les pathogènes opportunistes. Les infections pourront avoir une origine endogène ou exogène (Henri leclerc, 2002).

C'est un agent pathogène opportuniste essentiellement responsable d'IN. Une enquête méditerranéenne de prévalence en 2010, le classe comme étant le troisième principal agent des IN, juste après *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Amazian *et al.*, 2010).

#### 5.1.1.2. *Acinetobacter baumannii*

Les souches d'*A. baumannii* sont généralement responsables des IN dans des services accueillants des patients fragilisés, notamment les services de soins intensifs et de réanimation. On observe surtout des infections pulmonaires chez des patients sous ventilation assistée, des infections urinaires sur sonde et des infections liées aux cathéters avec risque de septicémie (O'Shea, 2012).

### 5.1.2. Les bactéries à Gram positif

Bien qu'il n'y ait aucune preuve directe, c'est évident que l'environnement des patients colonisés par des bactéries à Gram positif sert comme un réservoir potentiel de transmission croisée et par conséquent, une éventuelle possibilité des IN. Cependant, les *cocci* à Gram positif sont la cause de 30% des IN (Akoua-Koffi *et al.*, 2004 ; Berrebi, 2009).

#### 5.1.2.1. *Staphylococcus aureus*

Cette espèce est un pathogène nosocomial important, elle est responsable d'infections cutanées et muqueuses ainsi que des septicémies, le plus souvent acquises au cours des hospitalisations (Prescott et Pастey, 2010 ; Ghernaout-Benchouk, 2013).

*S. aureus* (plus précisément les résistantes à la méthicilline) est impliquée dans 30–40% des IN. Ces infections sont graves du fait de leur polymorphisme et de la multirésistance des souches (Berrebi, 2009).

### 5.2. Autres microorganismes

Les bactéries ne sont pas les seuls microorganismes responsables d'IN (OMS, 2008).

Les virus peuvent être la cause d'épidémiologie dans les hôpitaux, comme les virus grippaux ou les *entérovirus* (transmis par contact main-bouche et par voie féco-orale) (OMS, 2008).

Les champignons, notamment *Aspergillus* et *Candida*, peuvent provoquer des IN particulièrement chez l'immunodéprimé (OMS, 2008).

Pour les parasites, les plus rencontrés au cours des IN sont le *Plasmodium* lors des transfusions, *Sarcoptes scabiei* (agent de la gale) et le *Pneumocystis carinii* qui est un agent opportuniste responsable de pneumopathie nosocomiale en néonatalogie et chez les malades immunodéprimés (Puisieux *et al.*, 2012).

## 6. Les différents sites d'infection nosocomiale

Les recommandations de la cinquième conférence de consensus SFAR–SRLF sur la prévention des IN en réanimation ; classent ces infections en fonction des sites (**SFAR et SRLF, 2009**).

### 6.1. Les infections du site opératoire

Les infections du site opératoire sont considérées comme étant nosocomiales, si elles surviennent dans les 30 jours suivant l'intervention, ou dans l'année s'il y a eu mise en place d'un implant, d'une prothèse ou d'un matériel prothétique. Ces infections peuvent être superficielle, en affectant la peau (ou les muqueuses), ou profonde, en affectant les tissus ou les organes (**SFAR et SRLF, 2009**).

### 6.2. Les infections urinaires

Une infection urinaire est définie par une multiplication microbienne au sein des voies urinaires, elle résulte d'un déséquilibre entre les défenses naturelles de l'hôte et le pouvoir pathogène des agents infectieux (**Riegel, 2002 ; Pavese, 2003**).

Les infections urinaires nosocomiales occupent un grand rang dans l'ensemble des IN. Dans la plupart des cas, elles sont associées à la réalisation d'un acte de soins thérapeutique ou de diagnostic sur la sphère urogénitale (sondage vésical) (**Ben Arab et al., 2007 ; Espinassea et al., 2010**).

### 6.3. Bactériémie nosocomiale

La septicémie est habituellement secondaire à un foyer infectieux local mal soigné (infection respiratoire, urinaire...) et peut aussi être d'origine cutanée. L'utilisation de dispositif médical est associée à la plupart des cas des septicémies nosocomiales, que ce soient les dispositifs intra-vasculaires (comme les chambres de perfusion veineuse) ou les cathéters centraux ou périphériques (**SFAR et SRLF, 2009**).

### 6.4. Infection respiratoire basse (pneumonie)

Ces infections sont en majorité associées à la mise en place d'une ventilation mécanique. Ce qui constitue un réel fléau au sein des unités de soins intensifs (**SFAR et SRLF, 2009**).

## 6.5. Autres infections nosocomiales

Les infections décrites plus haut sont les quatre types les plus fréquents et les plus importants d'IN, mais il existe de nombreux autres sites potentiels d'infection, par exemple :

- Infections de la peau et des tissus mous : les plaies ouvertes (ulcères, brûlures, escarres) favorisent la colonisation bactérienne et peuvent conduire à une infection généralisée.
- La gastro-entérite est l'IN la plus fréquente chez l'enfant, avec un *rotavirus* comme principal agent pathogène. Dans les pays développés, *Clostridium difficile* est la cause principale des gastro-entérites nosocomiales chez l'adulte.
- Sinusites, autres infections de la sphère ORL, infections de l'œil et de la conjonctive.
- Endométrite et autres infections de l'appareil génital après l'accouchement (OMS, 2008).

## 7. Les facteurs de risque des infections nosocomiales

Les principaux facteurs qui favorisent les IN sont les suivants :

### 7.1. Les facteurs de risque liés au patient

- Sexe masculin.
- Age avancé  $\geq 65$  ans.
- Très jeune âge.
- Obésité, dénutrition.
- Immunodépression.
- Diabète-terrain défavorable.
- Les patients atteints d'une maladie sévère (Bouguenoun, 2017).

### 7.2. Les facteurs de risque liés aux soins et aux interventions

- Les gestes invasifs qui créent des brèches dans le revêtement cutané-muqueux ;
- La mise en place de matériel étranger qui permet la formation de biofilms ;
- La proximité d'autres malades infectés ;
- Le non-respect des mesures d'hygiène par le personnel en contact avec les malades (Nauciel, 2005).

### 7.3. Les facteurs de risque liés à l'agent infectieux

- Virulence.
- Résistance aux antibiotiques (Sumba, 2012).

## 8. La prévention

D'après l'OMS la prévention des IN nécessite un programme intégré, contrôlé, dont les éléments clés sont les suivants :

- Limiter la transmission d'agents microbiens de patient à patient pendant les activités de soins directs par le lavage adéquat des mains et le port de gants, et en observant des pratiques et stratégies d'asepsie, d'isolement, de stérilisation, de désinfection et de blanchisserie appropriées.
- Maîtriser les risques infectieux liés à l'environnement.
- Protéger les patients par l'usage approprié d'anti-infectieux à titre prophylactique, par l'alimentation et par les vaccinations.
- Limiter le risque d'infection endogène par la réduction des gestes invasifs et par la promotion d'un usage optimal des anti-infectieux.
- Surveiller les infections, identifier et maîtriser les flambées.
- Assurer la prévention des infections chez les membres du personnel.
- Renforcer les pratiques de soins et assurer la formation continue du personnel (OMS, 2008).

## Chapitre II : Généralités sur les biofilms

### 1. Historique

Antonie van Leeuwenhoek a visualisé des « animalcules » (bactéries) trouvées dans sa propre plaque dentaire (**Graves, 2004**).

Suivie des études faites par, le fondateur de la microbiologie marine, Claude E. Zobell a démontré en 1936 que les surfaces solides sont plus efficaces pour le développement des bactéries qui sont conservées dans un milieu nutritif dilué favorisant ainsi la formation de communautés bactériennes (**Costerton, 2004**).

Le terme « biofilm » a été utilisé pour la première fois par William Costerton en 1978 (**Costerton, 2004**).

### 2. Définition

Il est bien connu que le biofilm bactérien est un agrégat de microorganismes dans lequel les cellules sont collées les unes aux autres et/ou à une surface. Ces cellules adhérentes sont souvent intégrées dans une matrice autoproduite de substances polymériques extracellulaires (**Hall Stoodley et al., 2004**).

Il constitue le mode de vie majoritaire des microorganismes, par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement (**Van houdt and Michiels, 2005 ; Espinasse et al., 2010**).

Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de microorganismes (**Behlau and Gilmore, 2008**).

### 3. Les étapes de la formation d'un biofilm

Manque de nourriture, d'oxygène ou en présence des autres pressions environnementales, les bactéries s'organisent afin de former des biofilms. Ces derniers peuvent se développer sur des grandes 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 (**Talero, 2008 ; Vu et al., 2009**).

Différentes études montrent que les biofilms se forment de la même manière quel que soit l'environnement qu'ils colonisent (**Characklis, 1990**).

La formation d'un biofilm se fait selon cinq étapes (**Figure 01**).

### 3.1. Adhésion réversible

Cette étape fait intervenir un phénomène physico-chimique non spécifique, elle a lieu quelques minutes après l'exposition d'une surface solide et propre à un fluide contenant des microorganismes. Le transfert de ces derniers est le résultat de plusieurs phénomènes physicochimiques ou bien biologiques :

- Mouvements browniens ou transport diffusif.
- Sédimentation, qui est liée à la différence de gravité entre la cellule bactérienne et le fluide dans lequel elle se trouve.
- Transport convectif, dû aux caractères hydrodynamiques du fluide, c'est un régime d'écoulement turbulent favorisant l'adhésion en augmentant la probabilité de la rencontre entre une cellule bactérienne et une surface.
- Le chimiotactisme, l'ensemble de mouvements flagellaires (**Davey and O'Toole, 2000**).

On dit que c'est une « Adhésion réversible » car les cellules s'adsorbent sur une surface pendant un certain temps mais peuvent se détacher. Ce processus d'adhésion microbien aux surfaces est conditionné par un certain nombre de facteurs y compris :

- Les espèces de bactéries.
- La composition de la surface des cellules.
- La nature de la surface.
- Disponibilité des nutriments (**Bezoui, 2016**).

### 3.2. Adhésion irréversible

Dans un deuxième temps l'adhésion irréversible fait intervenir un phénomène biologique qui constitue une étape spécifique. La fixation devient irréversible en raison de la production d'exo-polysaccharides (EPS) par les bactéries et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes (**Høiby, 2011**).

Chez les bactéries à Gram négatif, les pilis des fimbriae interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface contrairement aux bactéries à Gram positif, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. Ces molécules d'adhésions permettent d'établir des contacts cellule-surface et des contacts cellule-cellule (Kolter, 2008).

### 3.3. Formation de micro-colonies

Une fois les bactéries adhèrent d'une manière irréversible à une surface et s'agrègent entre elles, ces microorganismes vont se multiplier lentement et produire encore des EPS afin de former des micro-colonies. Ces derniers vont recouvrir toute ou une partie de la surface (Jacobsen, *et al.*, 2008).

### 3.4. Maturation de biofilm

Dès que l'attachement au substrat devient irréversible, on atteint l'étape clés de la formation du biofilm. Cette étape est caractérisée par l'enchaînement de plusieurs phases de croissances, de multiplication et de maturation tout en secrétons des exo-polymère contribuant à la forte adhésion des cellules les unes aux autres d'une part et à la surface d'une autre part (Folkesson *et al.*, 2008).

### 3.5. Détachement de bactéries

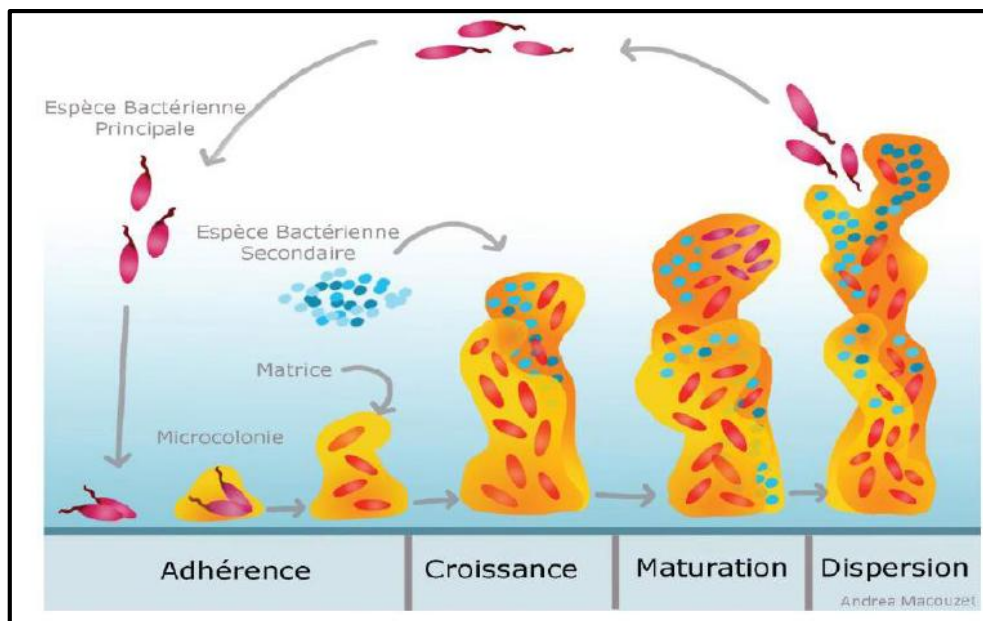
Grace à l'état biofilm les cellules bactériennes obtiennent de nombreux bénéfices mais le détachement s'avère nécessaire. Une fois les conditions environnementales sont défavorables les bactéries migrent afin de retrouver de nouvelles niches à coloniser et de promouvoir une diversité génétique. Lors de cette phase des formes planctoniques sont relarguées à l'extérieur (Woods *et al.*, 2007).

Le détachement s'effectue selon deux modes :

- Passivement via l'action du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve selon trois modes :
  - ✓ Erosion : détachement continue de cellules individuelles ou de petits agrégats.
  - ✓ Relargage : détachement massif et rapides d'une quantité importante de bactérie.
  - ✓ Abrasion : détachement par collision de particules.



- Ou bien activement initiée par les bactéries elles-mêmes afin de coloniser de nouvelles surfaces. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas. La libération active se fait en réponse à quelques conditions environnementales comme l'accumulation de déchets, la carence en quelques besoins nutritifs ou bien la limitation de surfaces (**Bezoui, 2016**).



**Figure 01** : Représentation des différentes étapes de développement d'un biofilm (**Yannick et al., 2014**).

#### 4. Structure et composition du biofilm

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les microorganismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent. Les microorganismes représentent seulement 2 à 15% de la biomasse du biofilm contrairement à la matrice qui représente 50 à 90% de la masse organique d'un biofilm (**Costerton, 2002**).

##### 4.1. Les microorganismes

Les biofilms sont généralement constitués de nombreux types de microorganismes : bactéries, protozoaires, algues, mycètes, chaque groupe exerçant des fonctions métaboliques spécialisées. Seuls quelques biofilms sont composés d'un seul type de microorganisme. Ce phénomène est lié aux conditions environnantes, plus souvent qu'à la nature même des microorganismes (**Branger et al., 2007 ; Alnnasouri, 2010**).

#### 4.2. La matrice

Le (tableau 02) récapitule les différents composants de la matrice.

**Tableau 02** : Les différents composants de la matrice (Sutherland, 2001).

Composant	Description
L'eau	Demeure le principal composant du biofilm (97%).
Exopolysaccharides (EPS)	Éléments structuraux majeurs de biofilm, représente jusqu'à 85% de la masse totale.
Organismes vivants	2 à 15 % généralement constitué de nombreux types de microorganismes.
Débris cellulaires	Protéines, acides nucléiques...
Déchets	Déchets issus du métabolisme cellulaire.

La matrice d'EPS, joue un rôle structural dans un biofilm, ces propriétés physico-chimiques sont variables d'un biofilm à un autre. Sa très forte teneur en eau permet à certains biofilms de lutter contre la dessiccation, les substances bactéricides et contre les bactériophages dans le milieu naturel (Costerton, 2002).

#### 4.3. L'organisation

Un réseau de canaux aqueux au sein du biofilm permet l'acheminement de l'oxygène et des nutriments entre les micro-colonies ainsi vers les régions les plus profondes, permettant aussi l'évacuation des déchets produits par ces organismes vivants (Nadji and Mizou, 2015).

Le biofilm n'est pas un environnement homogène, car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments. Les agglomérations microbiennes au centre du biofilm sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (Roux and Ghigo, 2006).

Tous les biofilms n'ont pas la même épaisseur alors l'hétérogénéité des biofilms se décline à plusieurs niveaux :

- Hétérogénéité géométrique : épaisseur, rugosité de la surface et porosité du biofilm, surface du substratum recouverte par le biofilm microbien.

- Hétérogénéité chimique : diversité des solutés chimiques (nutriments, produit métaboliques, inhibiteurs...), variations de pH, diversité de réactions (aérobies/anaérobies, etc.).
- Hétérogénéité biologique : diversité des espèces microbiennes et de leurs distributions spatiales, différences d'activité (croissance cellulaire, production de substances polymériques extracellulaires, mort cellulaire, etc.) (Bezoui, 2016).

## 5. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm

Le (Tableau 03) résume les principaux facteurs influençant la formation des biofilms.

**Tableau 03** : Les principaux facteurs influençant la formation des biofilms (Donlan, 2002).

Propriété du substrat	Propriété du milieu aqueux	Propriété des cellules
✓ Texture, rugosité, présence d'aspérités.	✓ Vitesse du flux, présence d'un flux laminaire ou non.	✓ Hydrophobicité des cellules
✓ Hydrophobicité	✓ PH, Température	✓ Présences de fimbriae, flagelles.
✓ Présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface.	✓ Cation ( $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Na}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ ...) ✓ Source de Carbone. ✓ Disponibilité d'oxygène. ✓ Présence d'agent microbien.	✓ Rôle des structures polymériques extracellulaires d'exopolysaccharides

## 6. Régulation de la formation d'un biofilm

Le quorum sensing joue un rôle important dans le développement et la régulation de la formation des biofilms car au sein d'un biofilm, les microorganismes communiquent entre eux par des signaux de cellules à cellules (Tomlin and Mallot, 2005).

### 6.1. Le quorum sensing

Le Quorum Sensing (QS) est un mode de signalisation bactérien qui repose sur la production de petites molécules médiatrices appelées « auto-inducteurs » qui sont produites en phase de croissance bactérienne. Lorsque la concentration des auto-inducteurs atteint un seuil critique dans le milieu, ceux-ci pénètrent dans la cellule et interagissent avec un régulateur transcriptionnel qui permet l'expression de gènes spécifiques en réponse à la forte concentration de cet auto-inducteur (**Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Djelloul Daouadji, 2010 ; Pecastaings, 2010**).

### 6.2. Les molécules impliquées dans le quorum sensing

Le système QS est rencontré à la fois chez les bactéries à Gram négatif et positif. Chez les bactéries à Gram négatif, il implique la sécrétion de petites molécules dérivées d'acides gras. En général, on trouve des acylhomosérines lactones (AHL). Alors que chez les bactéries à Gram positif, il est basé sur la production de dérivés peptidiques dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés) (**Irie and Parsek, 2008**).

Un dernier type de molécules a été mis en évidence par **Bassler et al. (1994)**, mais sa structure n'a été connue qu'en 2001, il s'agit d'une furanone (ou AI-2) qui permettrait une communication inter-espèces, contrairement aux deux autres qui se limitent à l'intra-espèces. (**Schauder et al., 2001 ; Irie and Parsek, 2008**).

### 6.3. Rôle du quorum sensing

Le QS régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population et aussi en déterminant l'épaisseur de ce dernier. Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères ou certains facteurs de virulence extracellulaires. Les molécules du QS jouent aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme les protozoaires et aussi dans l'établissement d'antibiorésistance (**Queck et al., 2006**).

## 7. Les effets bénéfiques et néfastes des biofilms

### 7.1. Les effets bénéfiques

La surface de notre peau est recouverte d'un biofilm dont la présence engendre une compétition microbienne rendant plus difficile la colonisation par des organismes pathogènes (**Percival et al., 2012**).

Les biofilms gastro-intestinaux assurent également un rôle de protection et participent au processus de digestion (**Macfarlane et al., 2011**).

Les biofilms sont utilisés comme des procédés de bio-remédiation permettant la décontamination in-situ de l'environnement (eaux usées, métaux et metalloïde), et pour le traitement des eaux usées par exemple (autoépuration des lacs, système de boues activées dans certaines stations d'épuration) (Klein, 2011 ; Thibaut, 2014).

Ils jouent aussi un rôle clé dans la production et la dégradation de la matière organique, dans les cycles d'azote, de soufre, ainsi dans la dégradation des polluants (Marchall, 2010).

Ils sont très utiles dans le domaine agroalimentaire par exemple : La production d'éthanol dans des réacteurs (Alnnasouri, 2010).

### **7.2.Les effets néfastes**

Dans le domaine médical, de nombreuses infections persistantes sont liées au développement de biofilms (Marchall, 2010).

L'implantation des biofilms dans les réseaux de distribution d'eau est également un des problèmes importants rencontrés dans le maintien de la qualité de l'eau potable (Alnnasouri, 2010).

Dans les milieux industriels, un développement de biofilm peut engendrer des pertes de performance de procédés et perturbe le fonctionnement du système (Thibaut, 2014)

## Chapitre III : La lutte contre la formation de biofilms bactériens

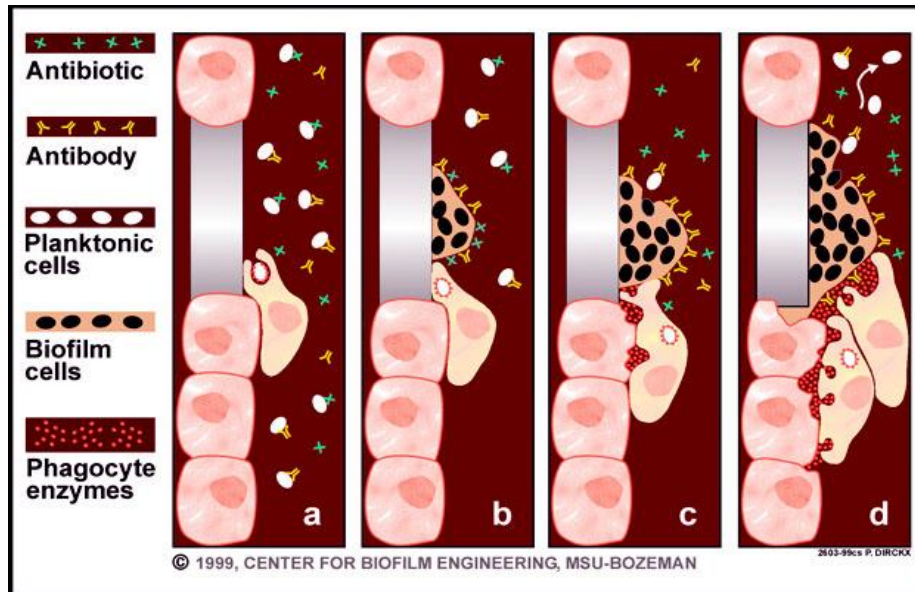
### 1. Résistance des bactéries au sein des biofilms

Le mode de vie sous forme de biofilm résiste mieux que son équivalent planctonique à plusieurs agressions extérieures comme les UV, les changements de pH, d'osmolarité, la prédation et les agents antimicrobiens. La croissance bactérienne en biofilm est accompagnée par une sécrétion d'une matrice exo-polymérique constituant une gangue stabilisatrice et protectrice (Sutherland, 2001).

#### 1.1. Résistance aux défenses de l'hôte

Les biofilms sont responsables d'infections chroniques et posent de nombreux problèmes dans le domaine médical (Figure 2). Les infections liées à des biofilms touchent majoritairement les personnes légèrement ou fortement immunodéprimés et impliquent souvent des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Costerton *et al.*, 1999).

Les infections causées par les biofilms se forment préférentiellement sur les surfaces étrangères ainsi que sur les tissus morts ou endommagés. Ces infections se développent progressivement et peuvent être lentes à produire des symptômes. Cependant, les infections issues des biofilms sont rarement résolues par les mécanismes de défense de l'hôte, même chez les personnes présentant des réactions immunitaires innées et adaptatives en bonne santé. Les réponses actives de l'hôte, telles que l'invasion des neutrophiles, peuvent même être préjudiciables, car ces cellules peuvent causer des dommages collatéraux au tissu hôte sain voisin. Les infections par biofilm ne répondent que de manière transitoire à l'antibiothérapie (John *et al.*, 2010).



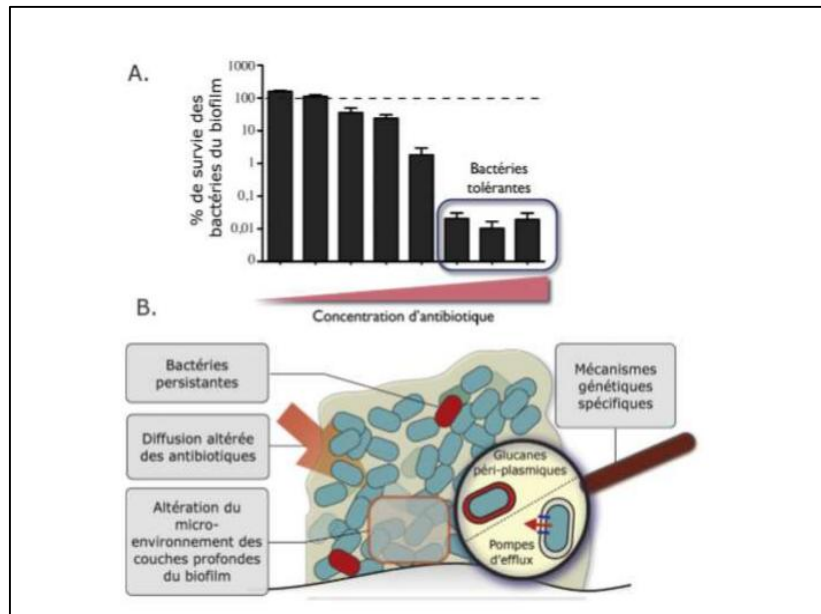
**Figure 02:** Mécanismes de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte (Costerton, 2007).

### 1.2. Résistance aux antibiotiques et désinfectants

Les bactéries, qui se trouvent au sein d'un biofilm, sont moins sensibles aux antibiotiques (ATB) et aux désinfectants que celles retrouvées à l'état planctonique (**Figure 03**). Les concentrations nécessaires pour inhiber les bactéries formant le biofilm peuvent être 10 à 1000 fois plus élevées que celles utilisées pour inhiber leurs homologues planctoniques (**Bridier et al., 2011**).

Le traitement ATB est absolument efficace contre les bactéries planctoniques libérées du biofilm mais non pas sur le biofilm lui-même car c'est difficile d'éliminer un biofilm complètement. Cette persistance peut être due à l'émergence de phénomènes de résistance bactérienne (**Bjarnsholt et al., 2005**).

Une souche bactérienne est définie comme étant résistante si sa croissance n'est pas inhibée à une concentration critique (CMI) d'antibiotiques. Le terme de résistance devrait être restreint à des mécanismes génétiquement transmissibles car les bactéries revenues à l'état planctonique retrouvent leur sensibilité initiale (**Daddi Oubekka, 2012**).



**Figure 03** : Résistance des biofilms aux antibiotiques (Lebeaux *et al.*, 2014).

**A.** Un biofilm est traité durant 24 heures avec des concentrations croissantes d'ATB bactéricide X. À partir d'une certaine concentration, le nombre de bactéries survivantes ne diminue plus. Il s'agit des bactéries tolérantes du biofilm.

**B.** Hypothèses expliquant le phénomène de résistance du biofilm vis-à-vis des antibiotiques.

## 2. Prévention et traitement des infections liées aux biofilms

Ces dix dernières années, les recherches concernant les moyens de lutte contre les biofilms se multiplient. Cette lutte est définie selon deux grands axes principaux :

- Empêcher la formation de biofilms.
- Détruire les biofilms lorsqu'ils sont déjà présents (BEZOUÏ, 2016)

### 2.1. Moyen de lutte contre la formation des biofilms

Afin de lutter contre la formation d'un biofilm quelques principes fondamentaux sont indispensables :

- **L'hygiène** : La pose d'implant doit se faire dans des conditions d'hygiène strictes, afin d'éviter au maximum toute contamination bactérienne, mais cette prévention n'est pas spécifiquement une mesure anti-biofilm en contexte opératoire. Néanmoins, c'est une limitation des risques de contamination du site opératoire (Lebeaux and Ghigo, 2012).



- **Les dispositifs imprégnés de substances hydrophiles :** L'adhérence bactérienne dépend des propriétés physicochimiques des matériaux constituant les implants, notamment leur hydrophobicité et les charges présentes à leur surface. Les dispositifs médicaux constitués de polymères hydrophiles à leur surface permettent de limiter l'adhérence des bactéries (**Francolini and Donelli, 2010**).
- **Les dispositifs imprégnés d'argent ou de substances antimicrobiennes :** L'adhérence bactérienne diminue sur matériel imprégné d'antibactériens car cela permet de libérer des agents antibactériens à une concentration élevée au niveau d'un site donné (**Perrigault, 2011**).
- **Les verrous d'agents chélateurs :** Le magnésium, le calcium et le fer ce sont des éléments indispensables à la croissance bactérienne. L'utilisation des verrous chélateurs permet d'inhiber la croissance bactérienne ainsi la formation du biofilm (**Donlan 2011 ; Lebeaux and Ghigo, 2012**).

## 2.2. Techniques d'éliminations des biofilms

Il est très difficile d'éliminer le biofilm une fois formé. Cependant, l'antibiothérapie à long terme est nécessaire lorsque l'ablation du dispositif est impossible (**Bezoui, 2016**).

- **Élimination mécanique du biofilm :** Un nettoyage mécanique est l'un des procédés les plus efficaces pour lutter contre les biofilms. Grâce aux forces appliquées, cela permet d'éliminer les microorganismes et les détacher de leurs supports (**Wanner O et Bauchrowitz M, 2006**).
- **Antibiothérapie :** L'antibiorésistance élevée est une qualité de premier ordre chez les biofilms. Actuellement de nombreuses recherches sont en cours afin de trouver le moyen de contrer cette qualité. Selon le mode de vie de chaque microorganisme la sensibilité aux antibiotiques va être différente. Cette sensibilité est mesurée selon la Concentration Minimale d'Eradication du Biofilm (CMEB) (**Lebeaux et al., 2014**). Au final le but de ses recherches est de trouver des moyens pour inhiber l'antibiorésistance des biofilms (**Daddi Oubekka, 2012**).
- **L'ablation du dispositif :** L'ablation du matériel implanté est souvent recommandée en cas d'infection mais cette décision peut causer des problèmes pour certains dispositifs (stimulateur cardiaque, prothèse orthopédique) vis-à-vis le patient (**Lebeaux and Ghigo, 2012**).

## Chapitre IV : La propolis

### 1. Définition

La propolis est une substance produite par les abeilles qui constitue un mélange de cire et de matériel botanique comme les bourgeons, les résines végétales. Elle est utilisée par les ouvrières pour colmater les trous et les fissures de leur ruche pour la protéger contre les conditions météorologiques défavorables et comme c'est une substance antiseptique, elle protège ainsi la ruche contre les contaminations bactériennes ainsi que les invasions étrangères (**Philippe 1999 ; Andelkovi B et al., 2016**).

### 2. La récolte

La propolis est le nom donné à la substance résineuse qui est collectée par les abeilles à partir de différentes parties des plantes (branches, fleurs, pollen, bourgeons) tout dépendant de la localisation géographique (**Burdock, 1998 ; Pereira et al., 1998**).

#### 2.1. La récolte par les abeilles

La récolte de la propolis varie en fonction de l'origine génétique des abeilles. Les caucasiennes (les abeilles grises) sont réputées pour en récolter de grandes quantités, par contre les abeilles Buckfast (dite aussi « Origine ») en récoltent très peu (**frère Adam., 1898-1996**).

Le comportement de récolte par les abeilles a été bien décrit. Le travail se fait en plusieurs étapes :

- a) La butineuse fait d'abord usage de ses antennes pour situer la partie la plus intéressante de la source, qu'elle attaque alors avec ses mandibules ; ensuite, tête redressée, elle se recule afin d'étirer le morceau de résine saisi jusqu'à ce qu'il soit transformé en un fil et que celui-ci se rompe.
- b) Elle travaille cette résine avec les mandibules et la prélève avec les pattes antérieures ;
- c) Elle la transfère de ses pattes antérieures aux pattes centrales.
- d) Enfin elle la transfère dans la corbeille située du même côté. Cette séquence se répète jusqu'à ce que la corbeille soit chargée.
- e) Après, l'abeille peut voler pendant quelques secondes au-dessus de la source de résine, puis atterrir à nouveau pour compléter chaque corbeille (**Castaldo et Capasso, 2002**).

Tout cela prend de sept minutes à une heure en fonction de la source et de la météo. Durant la saison, la récolte se fait de Mai à Novembre en zones tempérées. La récolte s'intensifie lorsque la collecte de nectar diminue en fin de miellée d'été. Les abeilles récoltent les résines végétales lors de journées ensoleillées, entre 10 h et 15 h 30, période pendant laquelle les résines sont plus malléables vu la température plus élevée (**Castaldo et Capasso, 2002**).

## **2.2. La récolte par les apiculteurs**

La propolis peut être récoltée selon des techniques diverses : Par raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche, de préférence à une température assez basse, la propolis, alors dure et friable, se détachant mieux ; Par des grilles spécialement conçues à cet effet. Ce procédé donne une propolis de meilleure qualité (**Debuyser, 1984**).

On élimine les déchets les plus grossiers et elle est ensuite dissoute à froid dans l'alcool éthylique à 70 % ce qui permet l'élimination de la cire (**Donadieu, 1981**).

## **3. La composition de la propolis**

Il existe plusieurs types de propolis dont la composition varie en fonction de la zone géographique de la ruche, des végétaux présents dans cette zone géographique, de la disponibilité des végétaux pendant la saison et de l'espèce de l'abeille (**Marcucci, 1999**).

L'origine botanique dont sera issue la propolis constitue le principal facteur responsable de sa composition spécifique. L'autre facteur sera les modifications générées à travers les sécrétions hypophrygiennes de l'abeille qui vont apporter d'autres éléments spécifiques (**Marcucci, 1999**).

De manière générale, la propolis est constituée de :

- 50 à 55% de résines et baumes.
- 30% à 40 % de cires.
- 5 à 10% d'huiles essentielles.
- 5% de pollen.
- 5% substances organiques et minérales diverses (**Marcucci, 1999**).

### **3.1. Les acides organiques**

Les acides organiques présents dans la propolis lui confèrent une grande partie de ces vertus : L'acide benzoïque est antiseptique, c'est un acide largement utilisé comme conservateur alimentaire sous le nom de code E210 (**Marcucci, 1999**).

Ces acides organiques sont présents également dans la propolis certains de ces dérivés comme l'acide hydroxy-4 benzoïque, l'acide métoxy-4 benzoïque, l'acide gallique et l'acide protocatéchique (Marcucci, 1999).

### 3.2. Les acides phénoliques

Ce sont des composants essentiels aux propriétés de la propolis : l'acide caféique possède un fort pouvoir antioxydant, l'acide cinnamique est antiseptique et antifongique, l'acide férulique est un puissant antioxydant et anti-inflammatoire. À noter la présence également des acides isoféruliques et p-coumarique (Marcucci, 1999).

### 3.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (flavones, flavonols, flavonones et les flavononol) sont des métabolites secondaires responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation. Cette action antioxydante permet de lutter efficacement contre les radicaux libres. En plus de leur fort pouvoir antioxydant, les flavonoïdes possèdent une activité antibactérienne. Ils forment une sous-classe des polyphénols (Tahira, 2010).

### 3.4. L'ester phényléthylique d'acide caféique (CAPE)

C'est un autre composant de la propolis, présente une propriété antioxydante encore plus efficace que les flavonoïdes. La CAPE présente également une activité anti-inflammatoire (Tahira, 2010).

### 3.5. Autres composants

La propolis possède des lipides, des acides aminés en très grand nombre dont les huit acides aminés essentiels dont notre organisme a un besoin journalier indispensable, des substances minérales et des vitamines (DUDNIK, 2017).

La composition de la propolis est donc d'une incroyable richesse en éléments biologiques (plus de 300) mais, de ce fait même, extrêmement complexe (DUDNIK, 2017).

## 4. Les propriétés de la propolis

Depuis des millénaires, la propolis est utilisée sur le plan médical par l'homme. Un bon nombre de propriétés thérapeutiques sont confirmées par la littérature scientifique. Malgré les grandes différences de composition des différents types de propolis, elles ont toutes la même activité (Soltani, 2017).

#### 4.1. Activités antimicrobiennes

La propriété biologique la plus importante de la propolis est l'activité antimicrobienne car elle touche différents microorganismes tels que :

- Les bactéries ;
- Les virus ;
- Les champignons et ;
- Les parasites (**El housseini, 2013 ; Soltani, 2017**).

La propolis agit directement sur les microorganismes *in vitro* car *in vivo* elle stimule le système immunitaire en activant le mécanisme impliqué dans la lutte de ces microorganismes (**El housseini, 2013**).

##### 4.1.1. Activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne de la propolis est démontrée contre les deux types de bactéries : à Gram positif et à Gram négatif à la fois aérobies et anaérobies. C'est l'activité la plus élevée et la plus étudiée, car elle a été confirmée par de nombreuses études scientifiques (**Bankova, 2005 ; Bankova et al., 2007**).

La propolis est plus active contre les pathogènes à Gram positif malgré que de nombreuses bactéries à Gram négatif sont également inhibées (**Tableau 04**).

**Tableau 04 :** Effets de la propolis contre quelques bactéries à Gram positif et négatif.

Organisme	Gram	Commentaire	Référence
<i>Bacillus subtilis</i>	Positif	Détruite	Meresta, 1985
<i>Helicobacter pylori</i>	Négatif	Inhibée	Itoh et al., 1994 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
<i>Staphylococcus sp</i>	Positif	Inhibée	Tcherniak, 1973 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
<i>Escherichia coli sp</i>	Négatif	Inhibée	Simuth et al., 1986
<i>Streptomyces sp</i>	Positif	Inhibée	Simuth et al., 1986 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
<i>Salmonella</i>	Négatif	Potentiellement éliminée	Okonenko et col, 1986 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.
<i>Streptococcus sp</i>	Positif	Inhibée	Rojas et Cuetara, 1990 in Boudjreda, Bouras, Khadra et Kharroubi, 2013.

Les hôpitaux s'intéressent à la propolis comme étant un agent antimicrobien surtout avec l'augmentation de la résistance aux ATB car chaque type de propolis agit différemment sur l'activité bactérienne (Savka *et al.*, 2015). Par exemple : l'activité de la propolis de peuplier repose également sur l'action inhibitrice des molécules du QS (Soltani, 2017).

#### 4.1.2. Activité antivirale

L'action de la propolis contre les virus est bien démontrée et ce notamment la présence de flavonoïdes. Cette activité antivirale a été fortement documentée. En effet, les études ont montré que la propolis et/ou ses constituants étaient efficaces contre de nombreux virus : *Myxovirus*, *Poliovirus*, *Coronavirus*, *Rotavirus*, *HSV* et *Adénovirus* (**Gekker et al., 2005**).

#### 4.1.3. Activité antifongique

Des recherches récentes ont été faites sur la propolis. Ces recherches ont montré que la propolis a une activité antifongique importante, elle a été testée sur 40 souches de la levure *Condida* (**Koc et al., 2011**).

#### 4.1.4. Activité antiparasitaire

La propolis serait efficace contre la plupart des parasites. Elle pourrait agir comme agent protecteur contre les parasites intestinaux, comme *Schistosoma mansoni* (**Issa, 2007**).

#### 4.2. Activité antioxydante

La propolis est remarquable pour ses propriétés antioxydantes et qui est plus actif que le reste des produits de la ruche car c'est une substance qui est constitué principalement de nombreux composés antioxydants : vitamines E et C et des polyphénols. Son action favorable a été démontrée dans les affections hépatiques où les flavonoïdes s'opposent à l'oxydation des lipides (**Shinohara et al., 2002 ; Volpi and Bergonzini, 2006**).

#### 4.3. Activité anti-inflammatoire

L'effet anti-inflammatoire de la propolis est un mécanisme sensiblement proche de celui de l'aspirine. Les extraits aqueux montrent de meilleurs résultats et de nombreux flavonoïdes y coopèrent certainement (**Borrellif et al., 2002**).

#### 4.4. Propriétés anti-tumorale

**Orsolich (2010)**, a montré l'activité chimio préventive de la propolis dans les modèles animaux et les cultures cellulaires par :

- (i) Leur capacité à inhiber la synthèse d'ADN dans les cellules tumorales,
- (ii) Leur capacité à induire l'apoptose (mort cellulaire) des cellules tumorales et
- (iii) démontre leurs propriétés à activer les macrophages, par production des facteurs capables de réguler la fonction des lymphocytes B (cellules B), des lymphocytes T (cellules T) et des cellules « Natural Killer » (NK).

En effet, **Sforcin (2007)** avait déjà rapporté une stimulation de l'activité lytique des cellules NK contre les cellules tumorales par augmentation de la production des anticorps.

**4.5. Autres activités de la propolis**

De nombreuses autres propriétés biologiques et pharmacologiques de la propolis ont été décrites dans plusieurs études, y compris les propriétés régénératrices des tissus, les propriétés immunogènes. Des effets cardio-protecteurs, neuro-protecteurs ont également été rapportés (**Chopra *et al.*, 1995 ; Marcucci, 1995 ; Shimazawa *et al.*, 2005**).



## Chapitre I : Matériel et méthodes

Cette étude a été menée au sein de laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des Frères Mentouri Constantine 1.

### 1. Souches bactériennes

Ce travail a porté sur deux souches cliniques appartenant à deux espèces bactériennes à savoir *Pseudomonas aeruginosa* (bacille à Gram négatif) et *Staphylococcus aureus* (coque à Gram positif). L'isolement et la caractérisation de ces souches, après vérification de leur pureté, ont été faits selon les tests conventionnels (**Annexe 01**).

Les profils de sensibilité des souches étudiées, vis-à-vis les différentes familles d'antibiotiques (ATB), ont été aussi établies par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Mueller Hinton selon les recommandations de la Société Française de Microbiologie (**SFM, 2014**) (**Annexe 02**). Ainsi, les ATB testés sur *P. aeruginosa* et *S. aureus* sont respectivement rapportés dans les tableaux suivants selon leurs familles, leurs charges ainsi que leurs abréviations.

**Tableau 05** : Antibiotiques testés sur *Pseudomonas aeruginosa*.

N°	ATB	Abréviation	Charge (µg)	Famille
01	Ticarcilline	TIC	75	β-Lactamines
02	Pipéracilline	PIR	100	
03	Pipéracilline + Tazobactam	TZP	110	
04	Ceftazidime	CAZ	30	
05	Cefepime	FEP	30	
06	Aztréonam	ATM	30	
07	Imipénème	IPM	10	
08	Fosfomycine	FOS	200	Acides phosphoniques
09	Gentamicine	CN	15	Aminosides
10	Amikacine	AKN	30	
11	Ciprofloxacine	CIP	5	Quinolones
12	Sulfaméthoxazole + Triméthoprime	SXT	25	Sulfamides
13	Colistine	CT	50	Polymyxines
14	Chloramphénicol	CHL	30	Phénicolés

**Tableau 06 :** Antibiotiques testés sur *Staphylococcus aureus*.

N°	ATB	Abréviation	Charge (µg)	Famille
01	Pénicilline	P	10	β-Lactamines
02	Ceftazidime	CAZ	30	
03	Amoxicilline	AX	25	
04	Gentamicine	CN	10	Aminosides
05	Amikacine	AK	10	Quinolones
06	Ciprofloxacine	CIP	5	

## 2. Etude des possibilités d'inhibition de la formation de biofilm de *P. aeruginosa* et *S. aureus*

Cette étude s'intéresse à expérimenter les effets possibles d'un produit naturel végétal, généralement extrait après la récolte du miel, sur l'adhésion de *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Il s'agit de la propolis (substance produite par les abeilles). L'appréciation de la densité cellulaire fixée sur la surface du polystyrène est réalisée à l'aide de la méthode standard de coloration au cristal violet (CV) (Doganli *et al* 2016) Cette dernière mesure la quantité de biomasse à l'intérieur du biofilm puisque la coloration adsorbée est directement corrélée à la densité du biofilm formé. Le CV se lie aux molécules extracellulaires chargées négativement, tel que les molécules de la surface cellulaire ou les polysaccharides de la matrice exopolymérique des biofilms (Christensen *et al.*, 1985 ; Li *et al.*, 2003 ; Vieu, 2014).

Dans le cas d'une augmentation possible de l'adhésion bactérienne ou la croissance planctonique, les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'augmentation de biofilms. Il est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'augmentation (\%)} = \frac{\text{DO Test} - \text{DO Témoin}}{\text{DO Témoin}} \times 100$$

Dans le cas d'une éventuelle inhibition de la formation de biofilms ou de la croissance des cellules non fixées, les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage de réduction de biofilms. Il est calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage de réduction (\%)} = \frac{\text{DO Témoin} - \text{DO Test}}{\text{DO Témoin}} \times 100$$

## 2.1. Effet de la propolis brute sur la formation du biofilm

Une gamme de concentrations graduelles de ce produit a ainsi été testée pour l'étude de l'effet de la propolis brute (PB) (sous forme d'une poudre commercialisée) (**Annexe 03**) sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa* et *S. aureus*. La poudre de propolis a été aseptiquement ajoutée au bouillon Luria Bertani (LB) aux concentrations de : 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5 et 2% (masse/volume).

### 2.1.1. Préparation des suspensions bactériennes initiales

Afin de réaliser ce test, chaque souche bactérienne a été antérieurement ensemencée sur gélose Luria-Bertani (LB) (**Annexe 04**). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

Quelques colonies sont alors suspendues dans le milieu LB liquide (**Annexe 05**) ; exempte de propolis (LB Témoin) ou additionné de différentes concentrations de la PB (LB Test). Les densités optiques 600 nm (DO) des suspensions résultantes sont ajustées à la valeur de 0.20 à l'aide d'un spectrophotomètre « SHIMADZU UV-1280 ».

### 2.1.2. Tests de formation de biofilms en tubes

Les suspensions bactériennes ainsi préparées sont réparties dans des tubes en polystyrène de 5 ml à raison de 2 ml de suspension par tube. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h.

### 2.1.3. Lecture

Après incubation, les tubes sont retirés et l'absorbance de la culture bactérienne résultante est mesurée à 600 nm pour chacun des tubes. Ces derniers sont alors débarrassés de la culture bactérienne après rinçages successifs à l'eau distillée (ED).

La biomasse fixée sur les parois du tube (formation de biofilm) est révélée après coloration à l'aide d'une solution aqueuse de CV à 1 % (**Annexe 06**). Après un temps de contact de 1 heure du temps, l'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois du tube à l'ED (jusqu'à l'obtention des gouttes transparentes).

Le CV fixé sur les parois du tube est solubilisé à l'aide d'une solution constituée d'un mélange éthanol-acétone (75 : 25) (**Annexe 07**) pendant 1 heure. Puis l'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

## 2.2. Effet de l'extrait éthanolique de propolis sur la formation du biofilm

### 2.2.1. Préparation de l'extrait éthanolique de propolis

Plusieurs extractions utilisant différents solvants peuvent être réalisées à partir de la propolis. Un extrait alcoolique était fréquemment rencontré dans plusieurs travaux sur la propolis, il s'agissait de l'extrait éthanolique de propolis (EEP) réalisé avec de l'éthanol 95-96% (**Doganli, 2016**).

La préparation de l'EEP a été effectuée selon les étapes suivantes : (**Annexe 08**)

- Macération de 10g de propolis (sous forme d'une poudre commercialisée) dans 100ml d'éthanol à 96% suivie de plusieurs homogénéisations successives.
- Conservation du mélange propolis-éthanol pendant 5 jours à l'obscurité.
- Filtration du mélange avec du papier Wattman N°1 et récupération du filtrat.
- Concentration à l'aide d'un rotavapeur à 60°C sous vide et récupération de l'EEP (**Doganli, 2016**).

Afin de tester l'effet de l'EEP de propolis sur la formation de biofilms de PA et SA, cet extrait a été solubilisé dans le solvant diméthylsulfoxyde (DMSO) et ajouté à une gamme de concentrations croissantes allant de 0.2 , 0.8, 2, 10 et 20 mg/ml (**Doganli et al 2016**).

### 2.2.2. Tests anti-biofilms

Une suspension bactérienne est préparée dans un tube de bouillon nutritif (BN) (**Annexe 09**) à partir d'une culture de 24 heures sur LB agar. Cette suspension est ajustée à une DO 600 nm de 0,2 à l'aide d'un spectrophotomètre.

Des tubes tests ont été inoculés avec 2 ml de la suspension préparée et 200 µl de chaque concentration de l'EEP, préalablement solubilisée dans le DMSO. Des tubes témoins ont étéensemencés avec 2 ml de la suspension bactérienne et 200 µl de DMSO.

Après incubation à 37°C pendant 24 h, les tubes sont retirés et débarrassés de la culture bactérienne. L'estimation de la biomasse adhérente (intensité du biofilm formé) est obtenue après application du protocole de coloration au CV.

### 3. Traitement statistique des résultats

Les résultats de ces expérimentations ont été présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type ( $M \pm ET$ ).

Les moyennes sont comparées aux témoins à l'aide du test t de Student. Les différences ont été considérées comme :

- Significatives (\*) : comparant aux témoins pour une valeur de probabilité  $p < 0.05$ .
- Hautement significatives (\*\*): comparant aux témoins pour une valeur de probabilité  $p < 0.01$ .
- Très hautement significatives (\*\*\*) : comparant aux témoins pour une valeur de probabilité  $p < 0.001$ .

## Chapitre II : Résultats et discussion

### 1. Résultats de l'antibiogramme

La détection des phénotypes de résistance, des souches bactériennes étudiées, a été réalisée en pratiquant la méthode conventionnelle de diffusion des disques en milieu gélosé et les critères de lecture et d'interprétation sont ceux du SFM (SFM, 2014).

Les profils de résistances déterminés montrent que la souche PA présente une résistance vis-à-vis 06 ATB. Ces derniers appartiennent aux familles suivantes :  $\beta$ -Lactamines (TIC, PIR, TZP et IMP), les sulfamides (SXT) et les phénicolés (CHL) (Tableau 07) (Annexe 10). Les ATB faisant parties des familles : les  $\beta$ -Lactamines (ATM), les acides phosphoniques (FOS), les aminosides (CN, AKN), les quinolones (CIP) et les polymyxines (CT) sont les molécules les plus actives sur cette souche. Cette dernière montre également une sensibilité intermédiaire vis-à-vis la CAZ et le FEP.

**Tableau 07** : Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*

ATB	TIC	PIR	TZP	CAZ	FEP	ATM	IPM
PA	R	R	R	I	I	S	R
ATB	FOS	CN	AKN	CIP	SXT	CT	CHL
PA	S	S	S	S	R	S	R

(S : Sensible, I : Intermédiaire, R : Résistante).

A l'opposé, la souche SA apparait sensible à l'ensemble des ATB testés excepté la CAZ appartenant aux  $\beta$ -Lactamines (Tableau 08) (Annexes 11).

**Tableau 08** : Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*

ATB	P	CAZ	AX	CN	AK	CIP
SA	S	R	S	S	S	S

(S : Sensible, R : Résistante).

## 2. Inhibition de la formation de biofilms de *P. aeruginosa* et *S. aureus*

Cette étude vise à expérimenter les effets possibles de la propolis sur l'adhésion de *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Ce produit végétal naturel a été testé sous deux formes : la propolis brute (PB) et l'extrait éthanolique de la propolis (EEP).

L'évaluation de la biomasse adhérente en présence de la propolis, a été réalisée après 24 heures d'incubation des cultures effectuées dans des tubes en polystyrène suivant la technique standard de coloration au CV.

Le choix du polystyrène (matériau hydrophobe) en tant qu'un support pour l'adhésion et la formation de biofilm est justifié par le fait que les cellules bactériennes préfèrent pour leurs adhésions les surfaces hydrophobes au lieu de celles hydrophiles (Donlan, 2001 ; Donlan, 2002).

### 2.1.Effet de la propolis brute

L'effet de la PB sur l'adhésion a été étudié en fonction de concentrations croissantes en PB additionné directement dans le milieu de culture (LB) sous forme de poudre. Cette dernière a été aseptiquement ajoutée aux concentrations de : 0.02, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5 et 2% (masse/volume).

#### 2.1.1. Effet de la PB sur la formation de biofilms de *P. aeruginosa*

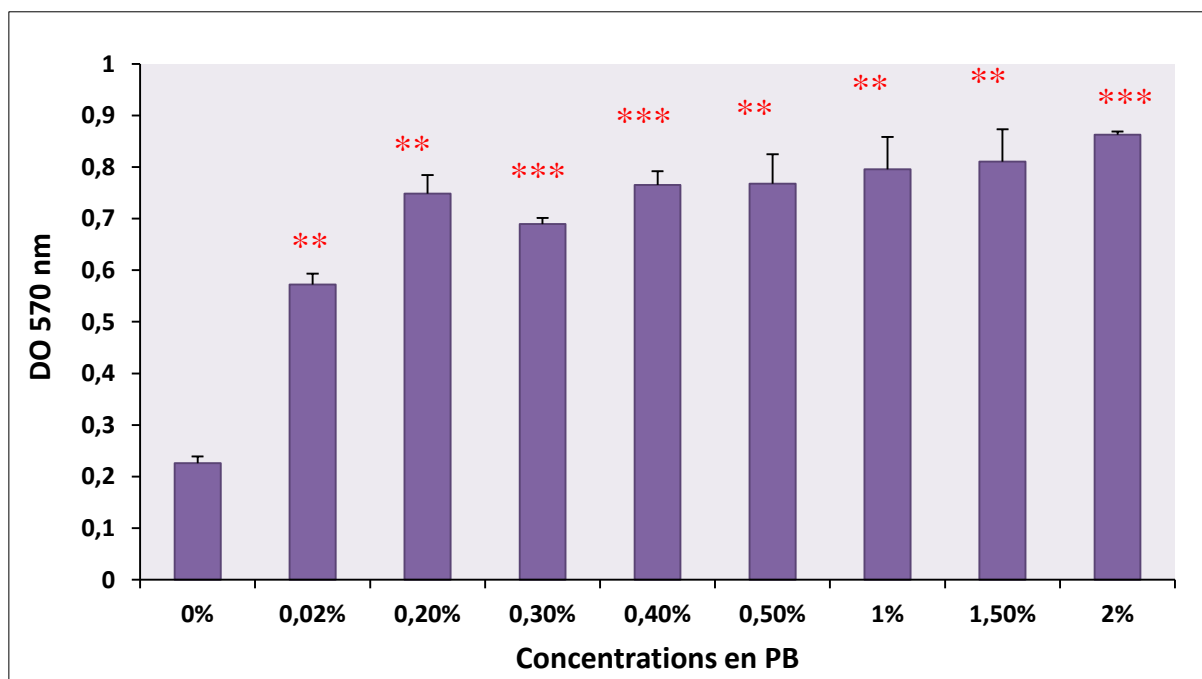
La formation de biofilm bactérien est toujours en transition entre deux formes ; la forme fixée (biofilm) et la forme libre (planctonique).

##### 2.1.1.1.Effet de la PB sur l'adhésion des cellules sessiles de *P. aeruginosa*

Les résultats obtenus, après 24 heures d'incubation en présence des différentes concentrations en PB sont présentées dans le (tableau 09) et illustrés par la (figure 04).

**Tableau 09** : Effet de la PB sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa*

Concentrations en PB (%)	% d'augmentation de biofilm
0.02	153
0.2	231
0.3	205
0.4	238
0.5	239
1	251
1.5	258
2	281

**Figure 04** : Effet des différentes concentrations en PB sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa*

(Différence hautement significative : \*\*  $P < 0.01$ , Différence très hautement significative : \*\*\*  $P < 0.001$ ).



Une augmentation importante, excédant 100%, de la capacité d'adhésion des cellules bactériennes de PA est constatée en présence des différentes concentrations en PB additionnées dans le milieu de culture. Elle a été statistiquement hautement significative ( $P < 0.01$ ) pour les doses de : 0.02, 0.2, 0.5, 1 et 1.5 %. Par ailleurs, cette augmentation a été très hautement significative ( $P < 0.001$ ) pour les concentrations de 0.3, 0.4 et 2% (**Annexe 12**).

Cette augmentation s'explique certainement par l'enrichissement de milieu de culture en composants de PB. En effet, ces derniers semblent stimuler la formation de biofilm chez PA.

#### **2.1.1.2. Effet de la PB sur la croissance des cellules planctoniques de *P. aeruginosa***

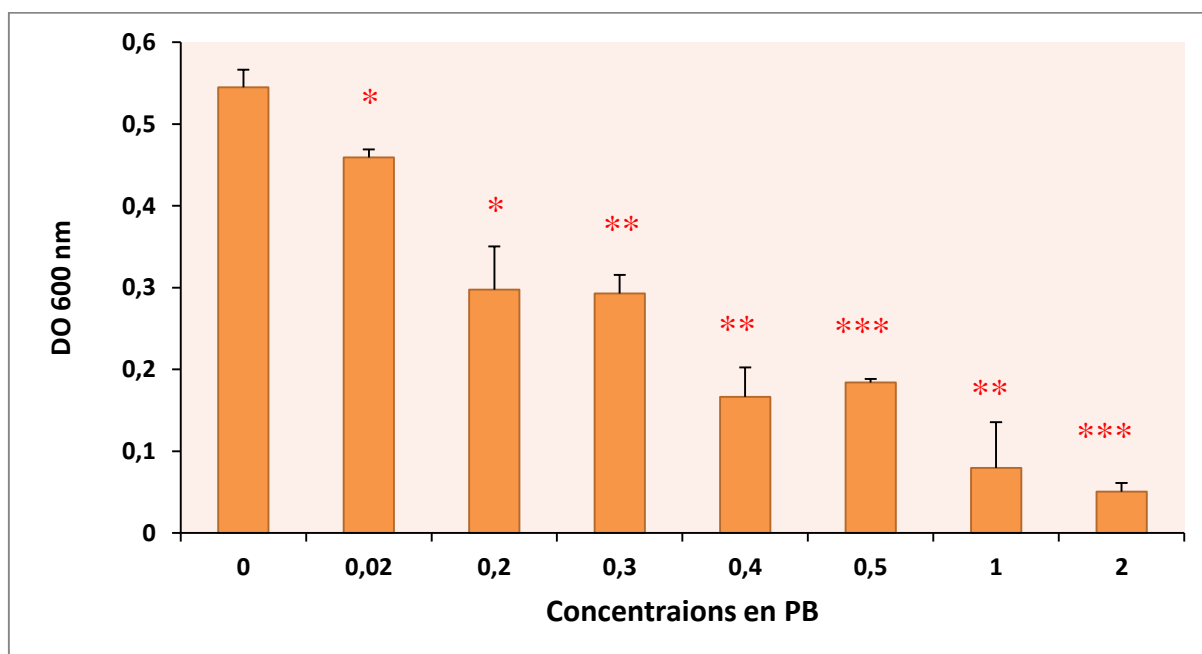
Afin d'évaluer la proportion de cellules planctoniques, non fixées, les valeurs de densités optiques sont mesurées à 600 nm. Cette mesure doit se faire avant l'élimination de la culture bactérienne, une étape essentielle avant d'entamer la coloration au CV.

La PB ne semble pas exhiber un effet stimulateur sur la multiplication des cellules planctoniques. Au contraire, on assiste à une inhibition de la croissance planctonique (**Tableau 10**) (**Figure 05**). Une réduction significative ( $P < 0.05$ ) de la croissance de la bactérie a été constatée après culture en présence de faibles concentrations en PB ; 0.02 et 0.2 %. De même, les valeurs obtenues ont révélé une diminution hautement significative ( $P < 0.01$ ) de la croissance après culture en présence de la PB aux doses de 0.3, 0.4 et 1%. Ces valeurs ont également montré une diminution très hautement significative ( $P < 0.001$ ) après culture en présence de fortes concentrations de la PB (0.5 et 2%) (**Annexe 13**). Le pourcentage d'inhibition le plus élevé a été enregistré pour la concentration la plus élevée à savoir 2%. Il a été de l'ordre de 91%.

Cet effet antibactérien est probablement dû à un effet inhibiteur de certains produits de PB. Il semble que c'est la somme des composantes de la propolis qui sont responsable de l'action antimicrobienne plutôt qu'individuelles (**Soltani, 2017**).

**Tableau 10** : Effet de la PB sur la croissance planctonique de *P. aeruginosa*.

Concentrations en PB (%)	% de réduction de cellules planctoniques
0.02	15.77
0.2	45.50
0.3	46.23
0.4	69.54
0.5	66.23
1	87.15
2	90.73



**Figure 05** : Effet de la PB sur la croissance des cellules planctoniques de *P. aeruginosa* (Différence significative : \*  $P < 0.05$ , Différence hautement significative : \*\*  $P < 0.01$ , Différence très hautement significative : \*\*\*  $P < 0.001$ ).

Il est bien connu que les cellules adhérentes aux surfaces solides ont des propriétés différentes de ceux des cellules planctoniques. En effet, les bactéries adhérentes sont exposées à des conditions environnementales différentes de celles trouvées dans la phase aqueuse (Teixeira and Oliveira, 2002).

## 2.1.2. Effet de la PB sur la formation de biofilms de *S. aureus*

### 2.1.2.1. Effet de la PB sur l'adhésion des cellules sessiles de *S. aureus*

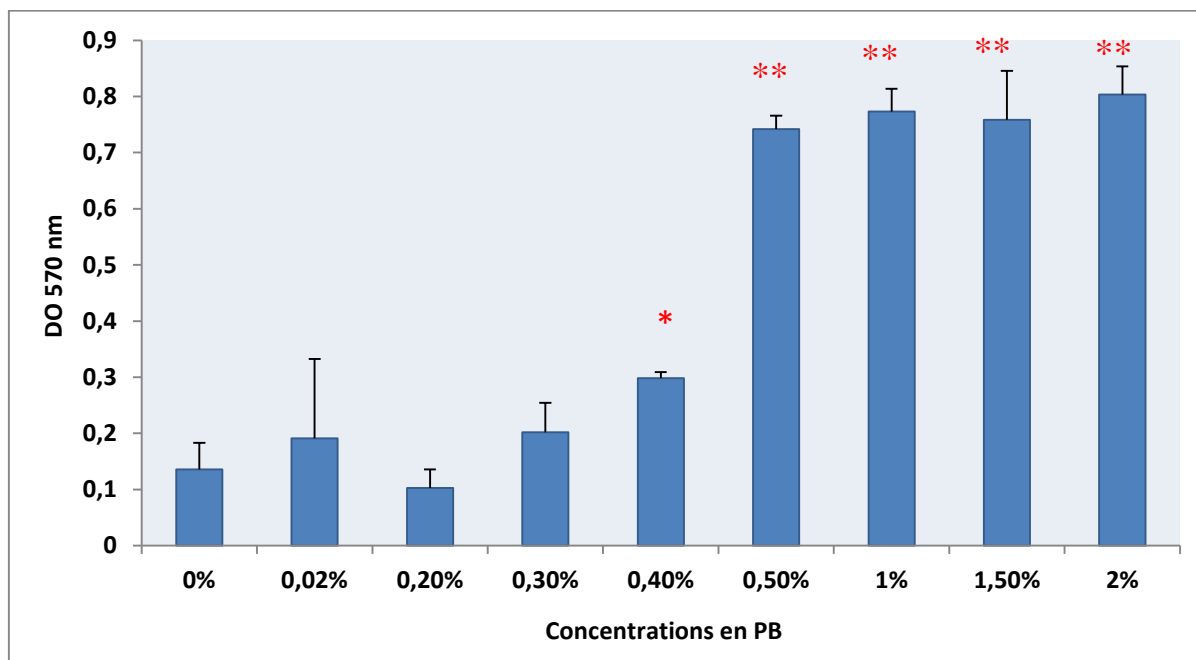
Les résultats mentionnés dans le (**tableau 11**) révèlent les pourcentages d'augmentation et de réduction de la formation du biofilm de SA sur polystyrène.

Il a été constaté que l'addition de PB dans le milieu de culture se traduit par une augmentation de la biomasse de SA (**Figure 06**), à l'exception de la faible dose de 0.2%. Cette dernière a provoqué une réduction de la formation de biofilm de SA. Celle-ci a été de l'ordre de 24.35%. L'analyse statistique des résultats a révélé une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) de l'adhésion pour la concentration de 0.4% et hautement significative ( $P < 0.01$ ) pour les fortes doses de : 0.5, 1, 1.5 et 2% (**Annexe 14**).

**Tableau 11** : Effet de la PB sur la formation du biofilm de *S. aureus*

(// : Absence d'augmentation, / : Absence d'inhibition)

Concentrations en PB (%)	% d'augmentation de biofilm	% de réduction de biofilm
0.02	40.95	/
0.2	//	24.35
0.3	49.07	/
0.4	119.92	/
0.5	447.60	/
1	470.47	/
1.5	459.40	/
2	492.98	/



**Figure 06 :** Effet des différentes concentrations en PB sur la formation du biofilm de *S. aureus*

(Différence significative : \*  $P < 0.05$ , Différence hautement significative : \*\*  $P < 0.01$ ).

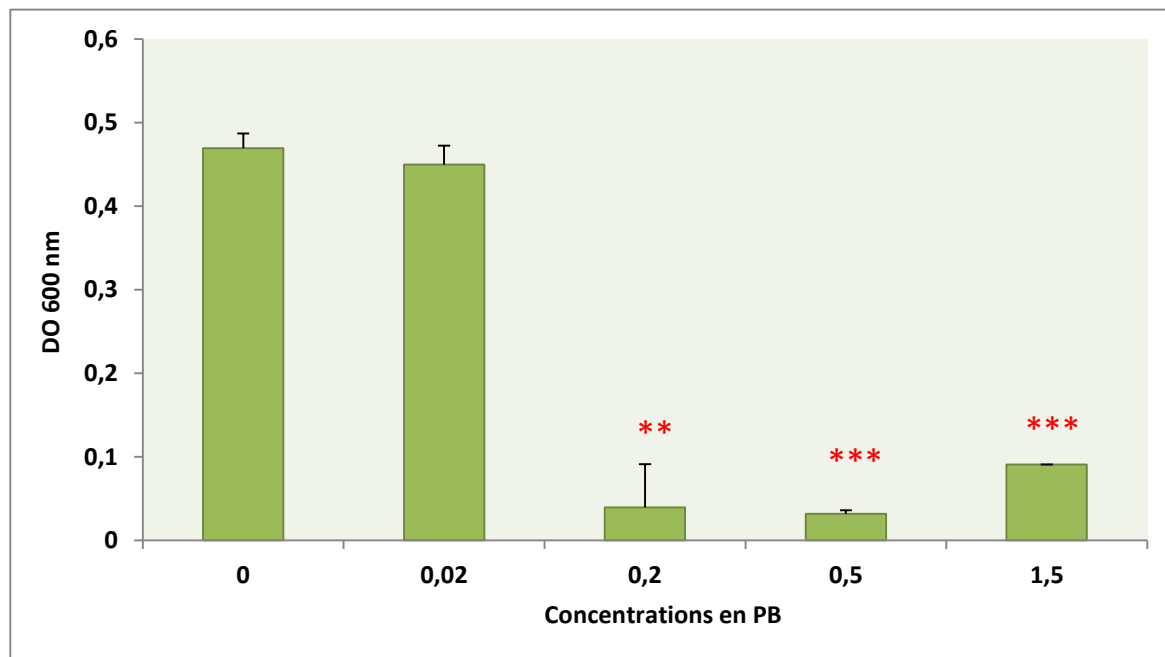
#### 2.1.2.2. Effet de la PB sur la croissance des cellules planctoniques de *S. aureus*

Les résultats mentionnés dans le (tableau 12) révèlent les pourcentages de réduction de cellules libres de SA.

**Tableau 12 :** Effet de la PB sur la croissance planctonique de *S. aureus*

Concentrations en PB (%)	% de réduction de cellules planctoniques
0.02	04.15
0.20	91.58
0.50	93.18
01.50	80.61

**Remarque :** Des concentrations ont été éliminé car les valeurs ont été négatives. Peut-être c'est des faux négative dû à l'incapacité du spectrophotomètre ou bien dû à la composition du milieu enrichit avec de la propolis.



**Figure 07 :** Effet de la PB sur la croissance des cellules planctoniques de *S. aureus* (Différence significative : \*  $P < 0.05$ , Différence hautement significative : \*\*  $P < 0.01$ , Différence très hautement significative : \*\*\*  $P < 0.001$ ).

L'addition de PB semble avoir un effet inhibiteur marqué sur la croissance cellulaire de SA (**Figure 07**). L'effet de la PB est fonction des concentrations ajoutées. Cependant, il semble plus accentué pour les concentrations 0.2 et 0.5 % avec lesquelles des pourcentages d'inhibitions de 91.58% et 93.18 % ont été obtenus respectivement dans le milieu LB (**Annexe 15**).

Il ressort de cette étude que la propolis brute est douée d'une activité antibactérienne intéressante contre les deux souches bactériennes étudiées. Seulement l'importance de cette activité varie en fonction de la concentration de PB testée et le Gram de la bactérie. En effet, le pourcentage de réduction des cellules planctoniques le plus élevé (93.18%) a été enregistré chez *S. aureus* pour la dose de 0.5 % de PB.

Ces observations sont en accord avec celles rapportées dans la bibliographie, qui indiquent que la propolis possède une propriété antibactérienne significative contre les bactéries pathogènes. Ils indiquent également que les bactéries à Gram positif sont les plus sensibles à l'action antimicrobienne de la propolis que les bactéries à Gram négatif (**Mirzoeva et al., 1997 ; Drago et al., 2000 ; Sforcin et al., 2000 ; Soltani, 2017**).

La propolis est le produit de l'abeille ayant l'activité antimicrobienne la plus élevée. Avec l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, un intérêt considérable des hôpitaux pour la propolis comme agent antibactérien est né ces dernières années. Il a été montré que la propolis possède des effets synergiques avec les antibiotiques. L'effet antibactérien de la propolis est bactéricide, par inhibition de leur mobilité (Soltani, 2017).

De plus, de nombreux travaux ont montré que les bactéries formants le biofilm peuvent devenir 10 à 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens que leurs homologues planctoniques de la même souche. Ce qui peut expliquer la résistance des biofilms en présence de la propolis en sa forme brute (Melchior *et al.*, 2006).

## 2.2.Effet de l'extrait éthanolique de la propolis

L'étude de l'influence de l'EEP sur l'adhésion a également été menée en présence de 05 concentrations de cet extrait additionnées dans le milieu BN à savoir : 0.2, 0.8, 2, 10 et 20 mg/ml.

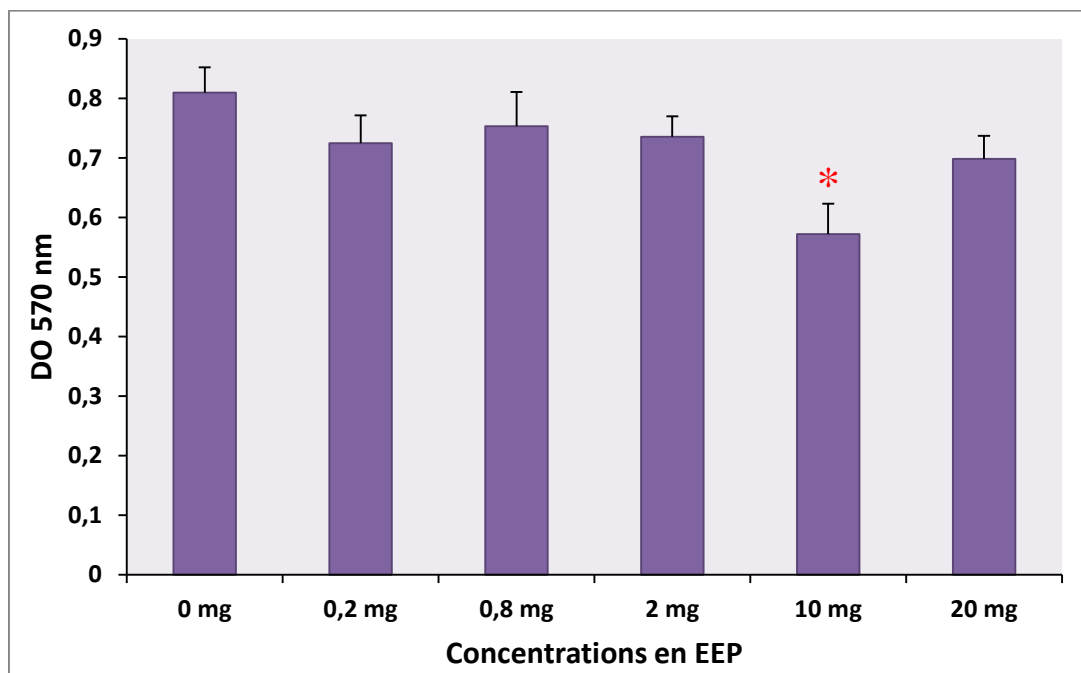
### 2.2.1. Effet de l'EEP sur la formation de biofilms de *P. aeruginosa*

#### 2.2.1.1.Effet de l'EEP sur l'adhésion des cellules sessiles de *P. aeruginosa*

L'addition de l'EEP à différentes concentrations semble avoir un effet inhibiteur marqué sur l'adhésion cellulaire de PA en milieu BN. Néanmoins, il semble plus marquer pour la concentration 10 mg/ml avec laquelle un pourcentage d'inhibition de 29.38% a été obtenu (Tableau 13) (Figure 08). En effet, une différence significative ( $P < 0.05$ ) a été notée pour cette activité anti-biofilm (Annexe 16).

**Tableau 13** : Effet de l'EEP sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa*

Concentrations en EEP (mg/ml)	% de réduction de biofilm
0.2	10.49
0.8	06.97
2	09.19
10	29.38
20	10.49



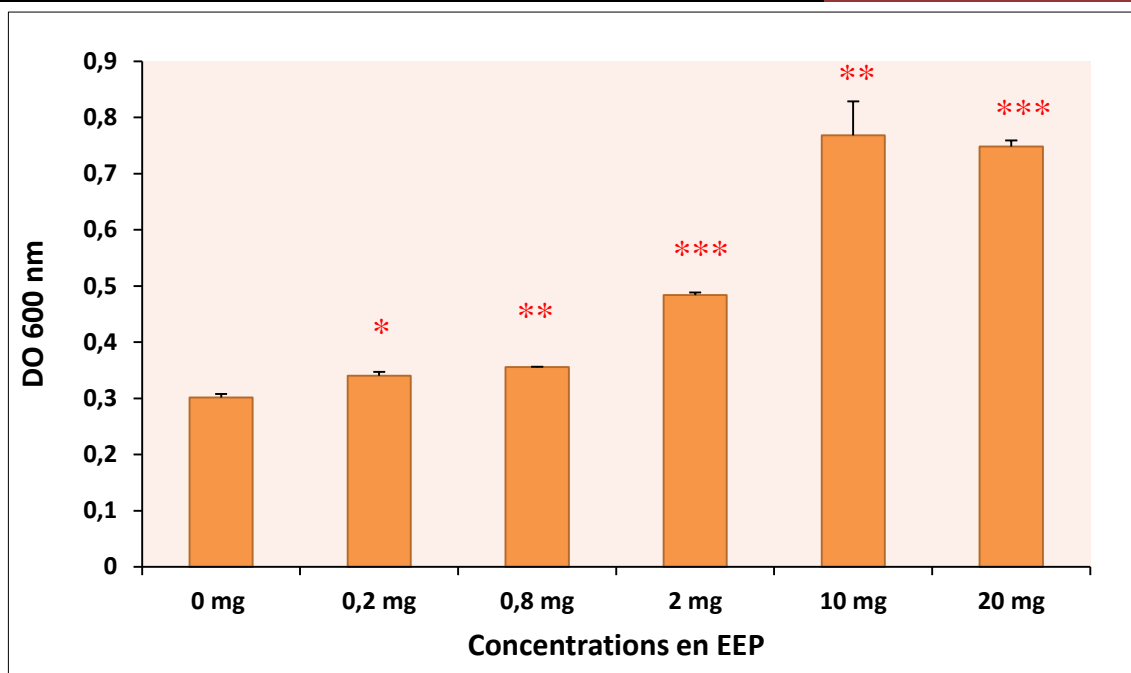
**Figure 08** : Effet des différentes concentrations en EEP sur la formation du biofilm de *P. aeruginosa* (Différence significative : \*  $P < 0.05$ ).

#### 2.2.1.2. Effet de l'EEP sur la croissance des cellules planctoniques de *P. aeruginosa*

L'action de l'EEP sur la croissance cellulaire de PA a également été suivie dans le milieu de culture BN. Les résultats obtenus sont présentés dans le (**tableau 14**) et illustrés par la (**figure 09**).

**Tableau 14** : Effet de l'EEP sur la croissance planctonique de *P. aeruginosa*

Concentrations en EEP (mg/ml)	% d'augmentation de cellules planctoniques
0.2	12.93
0.8	17.91
2	60.53
10	154.72
20	148.25



**Figure 09 :** Effet de l'EEP sur la croissance des cellules planctoniques de *P. aeruginosa* (Différence significative : \*  $P < 0.05$ , Différence hautement significative : \*\*  $P < 0.01$ , Différence très hautement significative : \*\*\*  $P < 0.001$ ).

Les résultats obtenus révèlent que l'effet inhibiteur de l'EEP sur l'adhésion de PA s'accompagne visiblement d'une augmentation de la densité cellulaire (phase planctonique) dans le milieu de culture. Celle-ci a été significative ( $P < 0.05$ ) pour la dose 0.2 mg/ml, hautement significative ( $P < 0.01$ ) pour 0.8 et 10 mg/ml et très hautement significative ( $P < 0.001$ ) pour les concentrations de 2 et 20 mg/ml d'EEP.

Le phénomène d'inhibition en présence de cet extrait a lieu seulement lors du développement du biofilm (**Annexe 17**).

## 2.2.2. Effet de l'EEP sur la formation de biofilms de *S. aureus*

### 2.2.2.1. Effet de l'EEP sur l'adhésion des cellules sessiles de *S. aureus*

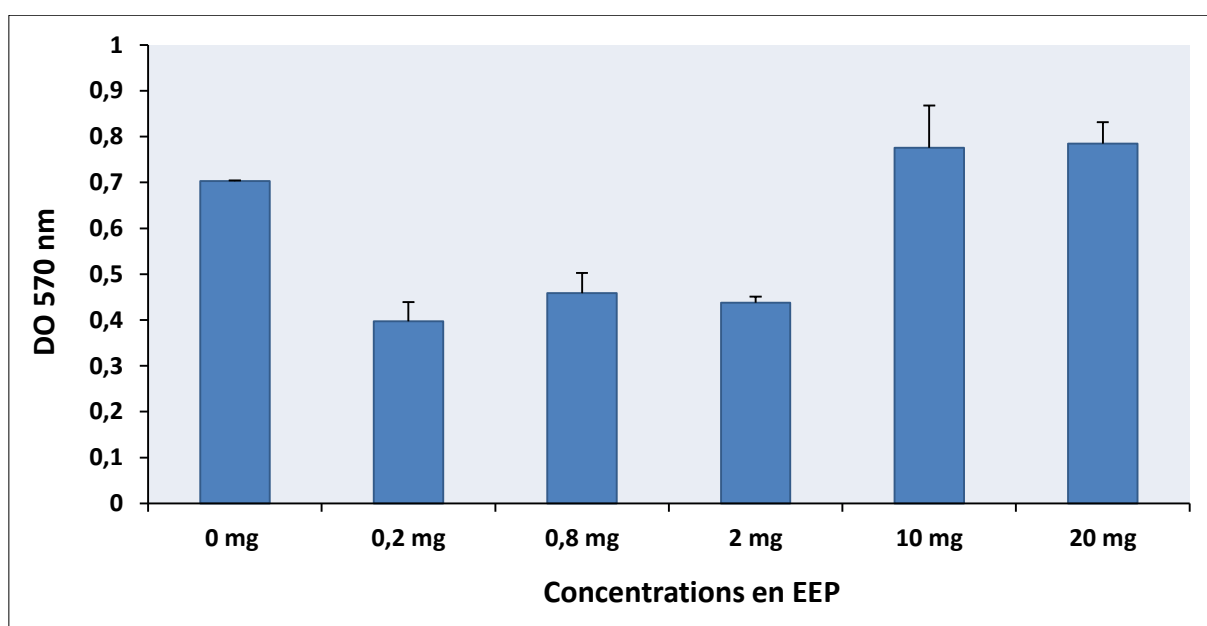
Une diminution de la capacité d'adhésion des cellules bactériennes, après ajout de l'EEP, est constatée pour les trois premières concentrations à savoir 0.2, 0.8 et 2 mg/ml (**Figure 10**). L'activité anti-biofilm la plus élevée est obtenue avec la première dose de l'EEP (43.45%) (**Tableau 15**).



**Tableau 15** : Effet de l'EEP sur la formation du biofilm de *S. aureus*

(// : Absence d'augmentation, / : Absence d'inhibition)

Concentrations en EEP (mg/ml)	% d'augmentation de biofilm	% de réduction de biofilm
0.2	//	43.45
0.8	//	34.70
2	//	37.69
10	10.31	/
20	11.66	/

**Figure 10** : Effet des différentes concentrations en EEP sur la formation du biofilm de *S. aureus*.

Par ailleurs, il a été également constaté que l'addition de fortes doses en EEP dans le milieu (à partir de 10mg et plus) se traduit par une augmentation qui ne dépasse pas les 12% de la biomasse de SA (**Annexe 18**).

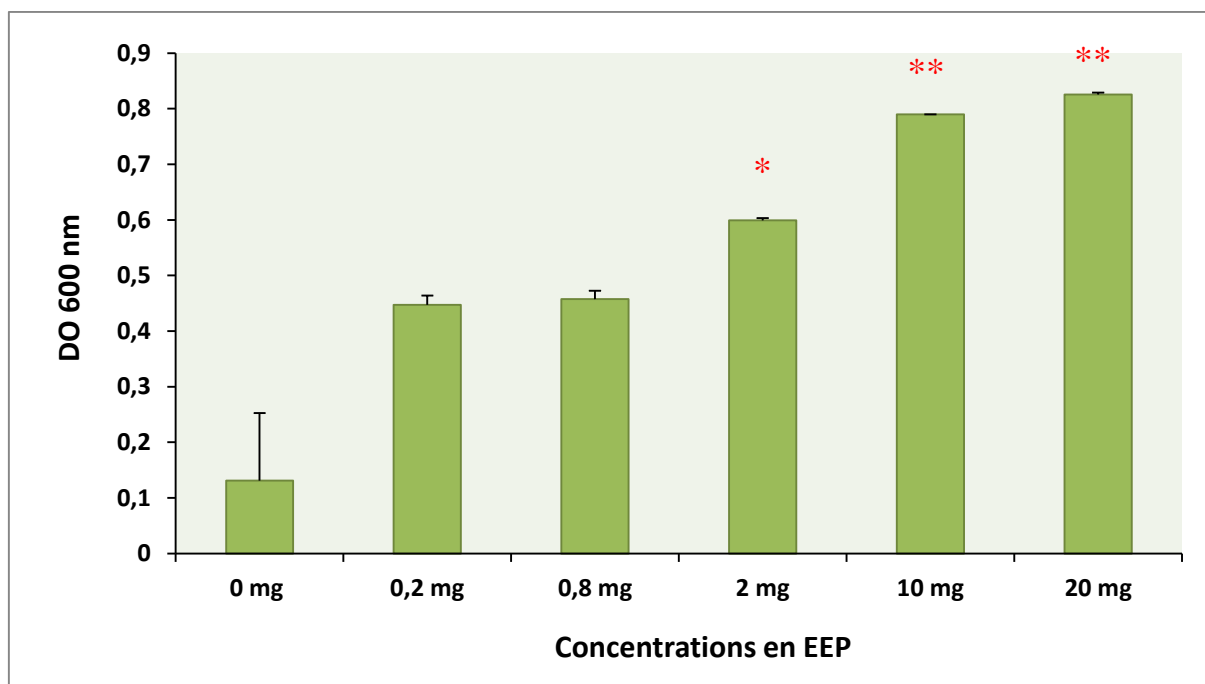
#### 2.2.2.2.Effet de l'EEP sur la croissance des cellules planctoniques de *S. aureus*

L'action de l'EEP sur la croissance cellulaire de *S. aureus* a également été suivie dans le milieu de culture BN. Les résultats obtenus sont présentés dans le (**tableau 16**) et illustrés par la (**figure 11**).

Les résultats obtenus révèlent une augmentation, dépassant 100%, de la densité cellulaire (phase planctonique) après addition de différentes doses de l'EEP au milieu BN. Cette augmentation a été statistiquement significative ( $P < 0.05$ ) pour la dose 2 mg/ml et hautement significative pour les doses 10 et 20 mg/ml (**Annexe 19**).

**Tableau 16** : Effet de l'EEP sur la croissance planctonique de *S. aureus*

Concentrations en EEP (mg/ml)	% d'augmentation de cellules planctoniques
0.2	241.22
0.8	249.23
2	357.25
10	503.05
20	530.15



**Figure 11** : Effet de l'EEP sur la croissance des cellules planctoniques de *S. aureus*  
(Différence significative : \*  $P < 0.05$ , Différence hautement significative : \*\*  $P < 0.01$ ).

Ce phénomène démontre, à l'instar de celui observé avec PA, que l'EEP n'affecte pas la croissance cellulaire mais interfère visiblement avec les mécanismes de fixation de la bactérie sur la surface du matériau (effet anti-biofilm). Ainsi, il semble, une fois encore que les cellules formant les biofilms exhibent un comportement différent comparé à celui des cellules libres (planctoniques) (**Donlan, 2001**).

Suivant les données de ce travail, et à l'inversé de la PB, l'EEP a montré une activité anti-biofilm contre les deux bactéries étudiées. Toutefois, cet extrait a été plus actif contre les bactéries à Gram positif. En effet, le taux d'inhibition de biofilm le plus élevé (43.45%) a été enregistré chez SA. Ces observations sont similaires à celles rapportés par **Laranjo et al. (2018)**. En effet, les auteurs ont démontré que l'EEP possède une activité anti-biofilm.

Par ailleurs, l'EEP n'a montré aucune influence sur la forme planctonique. Au contraire, il a stimulé la croissance cellulaire chez les deux bactéries. Plusieurs travaux ont décelé que l'EEP peut exhiber un effet antibactérien (**Baghdad, 2017**). A l'opposé, cette étude a révélé que l'EEP est doué d'une activité stimulatrice de la croissance bactérienne. La composition chimique de la propolis est très complexe et dépend de la flore dans les zones où elle a été récoltée. Par conséquent, les variations au niveau de l'activité antimicrobienne dépendent de l'origine de la propolis (**Bankova et al., 2000 ; Hégazi et al., 2000 ; Hégazi et Elhad, 2001**).

## Conclusion

À l'heure où les bactéries se font de plus en plus résistantes aux antibiotiques, et les médicaments se font de moins en moins efficaces et avec des effets secondaires, les molécules naturelles commencent à occuper une place de choix en thérapeutique. La propolis est un produit de la ruche bien peu connu et exploité localement, mais qui a toutefois été l'objet de beaucoup d'études à l'échelle internationale.

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à la recherche d'une activité anti-biofilm de la propolis, en appliquant la méthode de coloration au cristal violet des biomasses fixées sur tubes en polystyrène.

L'extrait éthanolique de la propolis, récoltée en Algérie, a présenté une activité anti-biofilm non négligeable contre deux bactéries pathogènes à savoir *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Les pourcentages d'inhibitions ont été variables en fonction de la concentration de l'extrait. Effectivement, les taux maximaux qui ont été obtenus pour ces deux bactéries sont respectivement 29.38 et 43.45%. Au contraire, la propolis brute a présenté une activité antibactérienne très importante. Cette forme brute a provoqué des réductions aux alentours de 90% chez les deux bactéries. La forme brute ainsi que l'extrait de la propolis ont été plus efficaces sur la bactérie à Gram positif que la bactérie à Gram négatif. En outre, cette étude nous a fourni des preuves que la propolis est un produit naturel complexe, dont leurs constituants semblent perturber et inhiber la formation de biofilms.

Ces résultats prometteurs ouvrent une nouvelle voie dans la recherche de nouveaux outils thérapeutiques pour l'inhibition de l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms en milieu médical. Il sera donc nécessaire d'identifier et d'isoler les composés bioactifs de la propolis et à tester séparément ou en combinaison avec d'autres médicaments, afin de les utiliser comme un traitement relativement peu coûteux de diverses pathologies nosocomiales.

## A

- Akoua-Koffi C., Guessenn N., Gbonon V., Faye-Ketté H., Dosso M. (2004).** La métricillino-résistance de *Staphylococcus aureus* isolés à Abidjan (1998–2001) : un nouveau problème en milieu hospitalier. *J. Méd. Maladi. Infec* ; 34 : 132–136.
- Alnnasouri M. (2010).** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat : en génie des procédés et des produits. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.
- Amazian K., Rossello J., Castella A., Sekkat S., Terzaki S., Dhidah L et al. (2010).** Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region. *East Mediterr Health. J.*; 16: 1070-1078.
- Andelkovi B., Vujisi L., ckovi I. V., Tesevi V., Vajs V., devac D G. (2016).** Metabolomics study of Populus type propolis. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; S0731-7085: 30493-9.

## B

- Baghdad H. (2107).** Etude de la composition chimique et evaluation biologique de la propolis de plusieurs regions de tlemcen. Mémoire de master : Chimie bio organique et thérapeutique. Tlemcen : Université de Tlemcen. P 34.
- Bankova V. (2005b).** Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*; 2: 29–32.
- Bankova V., Popova M., Trusheva B. (2007).** Plant origin of propolis: Latest developments and importance for research and medicinal use, In Marghitas, L A; Dezmiorean, D (eds) *Apicultura - De la stiinta la agribusiness si apiterapie*, Editura Academic Press, Cluj Napoca; 40-46.
- Bankova V S., de Castro., S L., Marcucci M C. (2000).** Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*; 31: 3–15.
- Behlau I., & Gilmore M S. (2008).** Microbial biofilms in ophthalmology and infectious diseases. *Arch Ophthalmol*;126: 1572-1581.
- Belhaj Soulami O. (2010).** Surcoute de l'infection nosocomiale en réanimation médicale au CHU ibn rochd (à propos de 10 cas). Thèse de doctorat : université sidi Mohammed ben Abdellah faculté de médecine et de pharmacie, Fès. N° 091 ; p : 38-39.
- Ben Arab N., Maaloul I., Hammami B., Marrakchi C H., Hammami A., Ben Jemaa M. (2007).** Les infections urinaires nosocomiales étude de 48 cas. *Tunis Infect.*;1(4):16-21.

- Berrebi W. (2009).** Diagnostics et thérapeutique de poche : Guide pratique du symptôme à la prescription. Ed. Estem. Paris. P882.
- Bezoui M. (2016).** Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine. Thèse de master : Pharmacie. Rabat : Université Mohammed V- Rabat. P 110.
- Bjarnsholt T., Jensen P O., Burmolle M., Hentzer M., Haagensen J A., Hougen H P., Calum H., Madsen K G., Moser C., Molin S., Hoiby N., and Givskov M. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* tolérance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology* (Reading, England); 151: 373-383.
- Bogdanov S. (2016).** Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review, *Bee Product Science*. P 6.
- Boudjreda I., Bouras N., Khadra H., Kharroubi M. (2013).** Effet de Antibactérien de la Propolis sur Certaines Espèces Bactériennes, Microbiologie Appliquée et Biotechnologie : Université de Mostaganem.
- Bouguenoun W. (2017).** Incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de Guelma. Thèse de doctorat : biochimie. Annaba : Université badji mokhtar-Annaba.p171
- Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007).** Quelques systèmes microbiens : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon. p131-164.
- Bridier, A., Dubois-Brissonnet F., Greub G., Thomas V., and Briandet R. (2011).** Dynamics of the action of biocides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*; 55: 2648-2654.
- Burdock G A. (1998).** Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.*; 36 :347-363

## C

- Castaldo S et Capasso F. (2002).** La propolis, un vieux remède utilisé dans la médecine moderne. *Fitoterapia* ; 73 Suppl. ; 1 : S1-S6.
- Chalvet de Rochermonteix A. (2009).** Les Biofilms et peaux. Thèse de Doctorat vétérinaire : Faculté de médecine de Créteil. Paris Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort. P147.
- Characklis W G. (1990).** Biofilm process. In Biofilms Edited by Characklis W G & Marshall K C. New York: Wiley. 195–231.
- Chibi A. (2015).** Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen. Mémoire de master : microbiologie, Tlemcen : université ABOUBEKR BELKAID Tlemcen, P 62.

- Christensen B B., Haagensen J A., Heydorn A., et Molin S. (2002).** Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl Environ Microbiol.*; 68 : 2495–2502.
- Costerton J W. (2004).** A short history of the development of the biofilm concept. Methods of studying biofilms. Ghannoum M & O'Toole GA Editors. Microbial biofilms, ASM Press, Washington, DC, pp 4-19.
- Costerton J W., Stewart P S., Greenberg E P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*; 284: 1318-1322.
- Costerton J W. (2007).** The Biofilm Primer. Springer-Heidelberg. Book spring series on biofilms. vol 1.
- Costerton J W., Dolan R M. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev*; 15: 167-193.

## D

- Daddi Oubekka S. (2012).** Dynamique réactionnelle d'antibiotique au sein des biofilms de staphylococcus aureus Apport de la microscopie multimodale. Thèse pour obtenir le grade docteur délivré par L'université Paris Sud XI Spécialité : Microbiologie. P 46.
- Davey ME., and O'Toole GA. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* ; 64 : 847–867.
- Djelloul Daouadji S. (2010).** Détection de biofilm a staphylocoques sur cathéters veineux. Mémoire de Magister : Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.
- Docteur Yves Donadieu. (1981).** Les produit de la ruche. *3ième Edition*.
- Doganli et al. (2016).** Antibiofilm activity and chemical contents of propolis samples from Manisa-Turkey. Faculty of science and art, department of biology. 44(4):505 -513.
- Doganli.G A. (2016).** Phenolic content and antibiofilm activity of propolis against clinical MSSA Strains. *ACG publication*.10 (5) :617-627.
- Donlan R M. (2001).** Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. *Clinical Infectious Diseases*; 33:1387– 1392
- Donlan R M. (2002).** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*; 8, 9: 881– 890.
- Donlan R M. (2011).** Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Clin Infect Dis* ; 52 : 1038-1045.
- Drago L., Mombelli B., De Vecchi E., Fassina M. C., Tocalli L., Gismondo M R. (2000).** In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *J. Chemotherapy*; 12: 390–395.

**Ducel G et al. (2002).** Guide pratique pour la lutte contre l'infection hospitalière. WHO/BAC/79.1.[en ligne] :

:[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69751/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002.12\\_fre.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69751/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.12_fre.pdf?sequence=1) page consultée le 26/02/2019

**DUDNIK A L. (2017).** Apithérapie en médecine bucco-dentaire. Thèse de doctorat : Odontologie. Nancy : Université de lorraine. P78.

## E

**El housseini N. (2013).** Intérêts et applications cliniques de la propolis en médecine bucco-dentaire. Thèse de doctorat : odontologie. France : université de Nantes. P108.

**Eric Debuysier. (1984).** La propolis. Thèse de doctorat pharmacie. *Université De Nante, Faculté de pharmacie.*

**Espinasse F., Page B., & Cottard-Boulle B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue Francophone des Laboratoires.* ; 426 : 51-63.

## F

**Folkesson A., Haagensen J A J., Zampaloni C., Sternberg C., and Molin S. (2008).** Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides. *Public Library of Science*; 3 (4): 1-11.

**Francolini I., & Donelli G. (2010).** Prevention and control of biofilm-based medical device related infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 59: 227-238.

## G

**Gheraout-Benchouk S. (2013).** Prévalence du portage nasal de *Staphylococcus aureus* : son rôle dans l'infection du site opératoire. Thèse de doctorat : Sciences médicales maladies infectieuses. Constantine : Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, 175p.

**Graves N. (2004).** Economics and preventing hospital-acquired infection. *Emerg Infect Dis.*; 10:561-566.

## H

**Hall-Stoodley L., Costerton J W., Stoodley P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*; 2: 95-108.

**Hegazi A G., Abd El Hady F K., Abd Allah F A. (2000).** Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z. Naturforsch. C.*; 55: 70–75.



**Hegazi A G., El Hady F K. (2001).** Egyptian propolis: 1-antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypt propolis. *Z. Naturforsch. C.*; 56: 82–88.

**Henri Leclerc, (2002).** Presse therm climat 2002 ; Bacteriologie de *Pseudomonas aeruginosa* Service de bactériologie. Centre hospitalier de Lille. ;139 : 9-13

**Høiby N., Ciofu O., Johansen H K., Song Z J., Moser C., Jensen P., and Bjarnsholt T. (2011).** The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Sciences*; 3 (2): 55-65.

**HuffPost Algérie/Radio algérienne. (2018).** Hôpitaux : Chaque année, 15% des patients en Algérie contractent des infections nosocomiales. 25/09/2018.[en ligne] [https://www.huffpostmaghreb.com/entry/hopitaux-15-des-patients-contractent-des-infections-nosocomiales-chaque-annee\\_mg\\_5baa1b87e4b0181540e05f36](https://www.huffpostmaghreb.com/entry/hopitaux-15-des-patients-contractent-des-infections-nosocomiales-chaque-annee_mg_5baa1b87e4b0181540e05f36) consulté le 27/02/2019

## I

**Irie Y., Parsek MR. (2008).** Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*; 322: 67- 84.

## J

**Jacobsen S M., Stickler D J., Mobley M L., & shitiliff M E. (2008).** Complicated Catheterassociated urinary tract infectious due to *Echerichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev.*; 21: 26-59.

**Jean C. (2002).** Les infections liées aux soins médicaux ; Adsp n° 38, p 23.

## K

**Kernane S., kanouche M. (2013).** Contribution à l'étude du dispositif algérien de lutte contre les infections nosocomiales : Cas des CHU de Béjaia et de tizi-ouzou. Mémoire de master : économie de la santé. Béjaia : université Abderrahmane Mira de Béjaia,61.

**Klein G. (2011).** Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat : microbiologie. Université de Bretagne occidentale : Bretagne.

**Kolter R., Lemon K P., Earl A M., Vlamakis H C., Aguilar C. (2008).** Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*; 322: 1-16.

## L

**Laranjo M., Andrade N., and Queiroga M C. (2018).** Antibiofilm activity of propolis extracts. Understanding microbial pathogens: current knowledge and educational ideas on antimicrobial research. 7, p1-8.

- Lasheras A., Monnin D. (2008).** Micro-organismes et voies de transmission.
- Lebeaux D., Ghigo J M., Belion C. (2014).** Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. *Journal des Anti infectieux* ; 16(3) : 112-121. <http://www.em-consulte.com/article/927225/tolerance-des-biofilms-auxantibiotiques%C2%A0-comprend> page consultée le : 26/02/2019
- Lebeaux D., Ghigo J M. (2012).** Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale. Institut Pasteur : Unité de Génétique des Biofilms, Département de Microbiologie. M/s n° 8-9, vol. 28.
- Li J., Johnson X D., Iazvovskaia S., Tan A., Lin A., Hershenson M B. (2003).** Signaling intermediates required for NF-kappa B activation and IL-8 expression in CF bronchial epithelial 128 cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*; 284(2): 307-315.
- M**
- Macfarlane S., et Dillon J F. (2007).** Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*; 102:1187-1196.
- Marchal M. (2010).** Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat : aspects moléculaire et cellulaires de la biologie. Université de Strasbourg, France.
- Marcucci M C. (1995).** Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*; 26(2):83-99.
- Melchior MB., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J. (2006).** Biofilms: A role in recurrent mastitis infections.; 171(3):398-407.
- Menzinger S., Schneider A., Tschopp C. (2008).** Immersion en communauté Infections nosocomiales. La lutte contre les infections nosocomiales, le groupe général de santé, Clinique Jouvénat, paris, in : <http://www.generale-de-sante.fr/clinique-jouvenet-paris/Nous-decouvrir/Certification-et-demarche-qualite/Lalutte-contre-les-infections-nosocomiales>, page consultée le 15/02/2013.
- Meresta L., & Meresta T. (1985).** An attempt to use propolis extract in the treatment of mastitis of cows., *Med Weter*; (41): 489-492 (in Polish), *Apic Abstr*; (1988) 39(3).
- Ministère du travail, de l'emploi et de la santé. (2010).** Infections Nosocomiales : Direction générale de l'offre de soins- Bureau qualité et sécurité des soins. P 3.
- Mirzoeva O. K., Grishanin R N., Calder P C. (1997).** Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res*; 152: 239-246.
- Motaouakkil S., Aalloula O. (2011).** Infections nosocomiales : L'affaire de tous, 2em Edit. [En ligne]. <http://www.doctinews.com/250-256.375>. Page consultée le 15/02/2019.

## N

**Nauciel C., Vildé JL. (2005).** Bactériologie médicale. 2<sup>ème</sup> édition. Ed. Masson. Paris. 259p.

## O

**O'Shea M K. (2012).** Acinetobacter in modern warfare. *Int. J. Antimicrob. Agents* ; 39 : 363-375.

**Organisation Mondiale de la Santé, prévention des infections nosocomiales. (2008).** 2<sup>ème</sup> Edition, Genève.

[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69751/WHO\\_CDS\\_CSR\\_EPH\\_2002\\_12\\_fre.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/69751/WHO_CDS_CSR_EPH_2002_12_fre.pdf?sequence=1) consulté le : 26/02/2019

## P

**Pavese P. (2003).** Infections urinaires nosocomiales : définition, diagnostic, physiopathologie, prévention, traitement. *Méd. Mal Infect* ; 33 : 266s-274s.

**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.

**Percival S L., Emanuel C., Cutting K F., Williams D W. (2012).** Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *International wound journal*; 9: 14-32.

**Pereira Dos Santos A C., Pinto J.N., Cardoso F R., De Aquino Neto M F., De Souza Ramos G M., Dellamora-Ortiz et E P., Dos Santos J. (1998).** High Resolu. Chromatogr.; 21:396-400.

**Pereira M., Norseil J N., Cardoso F R., Aquino Neto M F S., Ramos J. (2000).** Agric. Food. Chem.; 48: 5226-5230.

**Perrigault PF. (2011).** Catheters impregens. Chu Montpellier. [En ligne]. [www.institutmauricerapin.org/docs/Brochure-resumes.pdf](http://www.institutmauricerapin.org/docs/Brochure-resumes.pdf) .

**Philippe J. M. (1999).** Le guide de l'apiculteur. Troisième Edition EDISUD. P1087.

**Prescott L M. (2009).** MICROBIOLOGIE (2eme éd). FRANCE : De Boeck.

**Puisieux F., Simovic B. (2012).** Infections nosocomiales et leur prévention. In Puisieux F.(ed) Gériatrie. Ed. Lavoisier. Paris, p 150-162.

## Q

**Qassimi L. (2010).** Épidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation (Apropos de 147 cas). Thèse de doctorat : Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Fes (Maroc). 148p.

**Queck S-Y., Weitere M., Moreno AM et al. (2006).** The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environ. Microbiol.* ; 8 : 1017- 1025.

## R

**Riegel P. (2002).** Aspects bactériologiques des infections urinaires nosocomiales. *Méd. Mal. Infect.* ; 33 : 255s–265s.

**Risques et maîtrise des infections nosocomiales en réanimation : texte d'orientation SRLF/SFAR. (2005).** The risk for and approaches to control of nosocomial infections in ICUs: guideline from the SRLF/SFAR task force on nosocomial infections in ICUs. [En ligne]. P471.

[https://www.srlf.org/wp-content/uploads/2015/11/0510-Reanimation-Vol14-N6p463\\_471.pdf](https://www.srlf.org/wp-content/uploads/2015/11/0510-Reanimation-Vol14-N6p463_471.pdf)  
page consultée le : 22/03/2019.

**Roux A., Ghigo J-M. (2006).** Les biofilms bactériens présenté par communication. *Bull. Acad. Vét. France – Tome*; 159 (3) 261-268.

## S

**Schauder S., Shokat K., Surette M G., and Bassler B L. (2001).** The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. *Microbiol*; 41:463-76.

**SFAR : Société française d'anesthésie et de réanimation. (2002).** Recommandations des experts de la SRLF : Prévention de la transmission croisée en réanimation. *J. Réanim.* 11.

**SFAR-SRLF : Société française d'anesthésie et de réanimation et Société de réanimation de langue française. (2009).** 5e Conférence de consensus. Prévention des infections nosocomiales en réanimation -transmission croisée et nouveau-né exclus. *J. Ann. Fr. Anesth.*; 28: 912–920.

**Sforcin J M., Fernandes A Jr., Lopes C A., Bankova V., Funari S R. (2000).** Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* ; 73 :243–249.

**Société française d'anesthésie et de réanimation (Sfar), Société de réanimation de langue française (SRLF). (2009).** Prévention des infections nosocomiales en réanimation (transmission croisée et nouveau-né exclus) Prevention of hospital-acquired sepsis in intensive care unit (except cross transmission and neonate). P916.

**Soltani E K. (2017).** Caractérisation et activités biologiques de substances naturelles, cas de la propolis. Thèse de doctorat : en sciences, option génie des procédés pharmaceutiques, Université Ferhat Abbas Sétif 1.p 123.

**Sumba Harrison Suso M. (2012).** Coût de l'infection nosocomiale au CHU Hassan II de fes (apropos de 50 cas). Thèse de doctorat : Université sidi Mohammed Ben Abdellah, Fes (Maroc). P98.

**Sutherland I W. (2001).** The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*; 9: 222-227.

## T

- Tahira F. (2010).** Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of Propolis: A Critical Review. *Curr Nutr Amp Food Sci*; 6(3):186-99.
- Taloro., Kathleen., Park. (2008).** Foundation in Microbiology: Basic Principles, McGraw-Hill, New York. P 534.
- Teixeira P., and Oliveira R. (2002).** Metabolism of *Alcaligenes denitrificans* in biofilm vs planktonic cells. *Journal of Applied Microbiology*; 92: 256– 260.
- Thibaut S. (2014).** Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi espèces : de l'adhésion au biofilm mature. Thèse de doctorat : en génie des procédés. Université de Montpellier 2, France.
- Tomlin., Mallot RG. (2005).** Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of Burkholderia cenocepacia biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* ; 5208- 5218.

## V

- Van Houdt R., & Michiels C. W. (2005).** Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation. *Res Microbiol*;156: 626-633.
- Vieu G. (2014).** Diversité génétique des isolats de *Staphylococcus aureus* producteurs de toxine de Panton-Valentine isolés au CHU de Toulouse. Étude de 37 cas de patients à l'hôpital des enfants. Thèse de doctorat : pharmacie. Toulouse : Université Toulouse iii – Paul Sabatier.
- Vincent A., Saint G L., Laprugne-Garcia E. (2008).** Infections Associées Aux Soins définition, Fréquence et facteurs de risque. Saint Genis Laval. *CCLIN Sud-Est.* ;1-5.
- Vu B., Chen, M., Crawford, R J., and Ivanova E P. (2009).** Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules*; 14 (7):2535-2554.

## W

- Wanner O., Bauchrowitz M. (2006).** Les biofilms sont omniprésents. *EAWAG News* ; 60 :4-7.
- Woods E J., Clutterbuck AL., et al. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol. Mar 31* ; 121 (1-2) : 1-17.

## Y

- Yannick D N., Skander T., Mario Jacques H. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can. J. Veterinary. Res.*; 78:110-116.

**Annexes 01 : Identification des souches bactériennes**

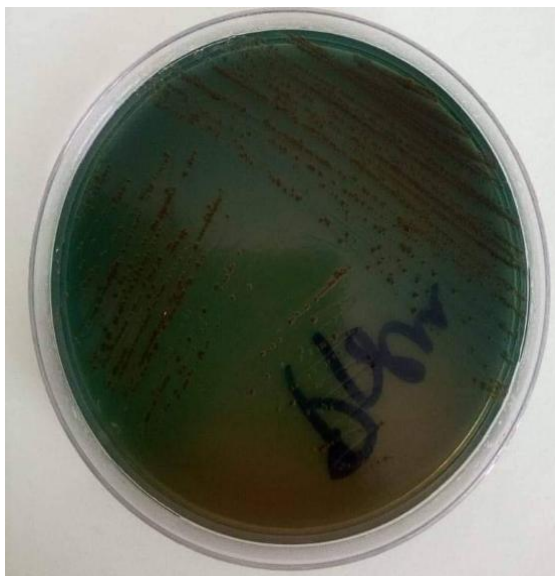
**Annexe 1.1. Aspect de colonies de *P. aeruginosa* :**



Milieu : Gélose Chapman



Milieu : Gélose nutritive



Milieu : Gélose Hektoen



Milieu : Gélose au sang cuit

Annexe 1.2. Aspect de colonies de *S. aureus* :



Milieu : Gélose nutritive



Milieu : Gélose Chapman

**Annexes 02 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition****Annexe 2.1.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *P. aeruginosa*

N°	ATB testés	Abréviation	Charge (µg)	Diamètre critique (mm)		
				R	I	S
01	Ticarcilline	TIC	75	≤15	16-23	≥24
02	Pipéracilline	PIR	100	≤14	15-20	≥21
03	Pipéracilline + Tazobactam	TZP	110	≤14	15-20	≥21
04	Ceftazidime	CAZ	30	≤14	15-17	≥18
05	Cefepime	FEP	30	≤14	15-17	≥18
06	Aztréonam	ATM	30	≤15	16-21	≥22
07	Imipenème	IPM	10	≤15	16-18	≥19
08	Fosfomycine	FOS	200	.....	.....	.....
09	Gentamicine	CN	15	≤12	13-14	≥15
10	Amikacine	AKN	30	≤14	15-16	≥17
11	Ciprofloxacine	CIP	5	≤15	16-20	≥21
12	Sulfaméthoxazole + Triméthoprime	SXT	25	.....	.....	.....
13	Colistine	CT	50	≤10	.....	≥11
14	Chloramphénicol	CHL	30	.....	.....	.....

**Annexe 2.2.** Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *S. aureus*

N°	ATB testés	Abréviation	Charge (µg)	Diamètre critique (mm)		
				R	I	S
01	Pénicilline	P	10	≤18	.....	≥19
02	Ceftazidime	CAZ	30	.....	.....	.....
03	Amoxicilline	AX	25	.....	.....	.....
04	Gentamicine	CN	10	≤12	13-14	≥15
05	Amikacine	AK	10	≤14	15-16	≥17
06	Ciprofloxacine	CIP	5	≤15	16-20	≥21

Tableau extrait du Document M100 – S24. Vol. 34, n°1. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth informational supplement.  
Extraits des recommandations 2014 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.



**Annexe 03 : La propolis en poudre commercialisée****Annexe 04 : Préparation de LB agar (Sigma-Aldrich) :**

- LB agar.....35g
- Eau distillée.....1000ml

**Annexe 05 : Préparation de LB broth (Sigma-Aldrich) :**

- LB broth.....20 g
- Eau distillée.....1000ml

**Annexe 06 : Cristal violet**

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

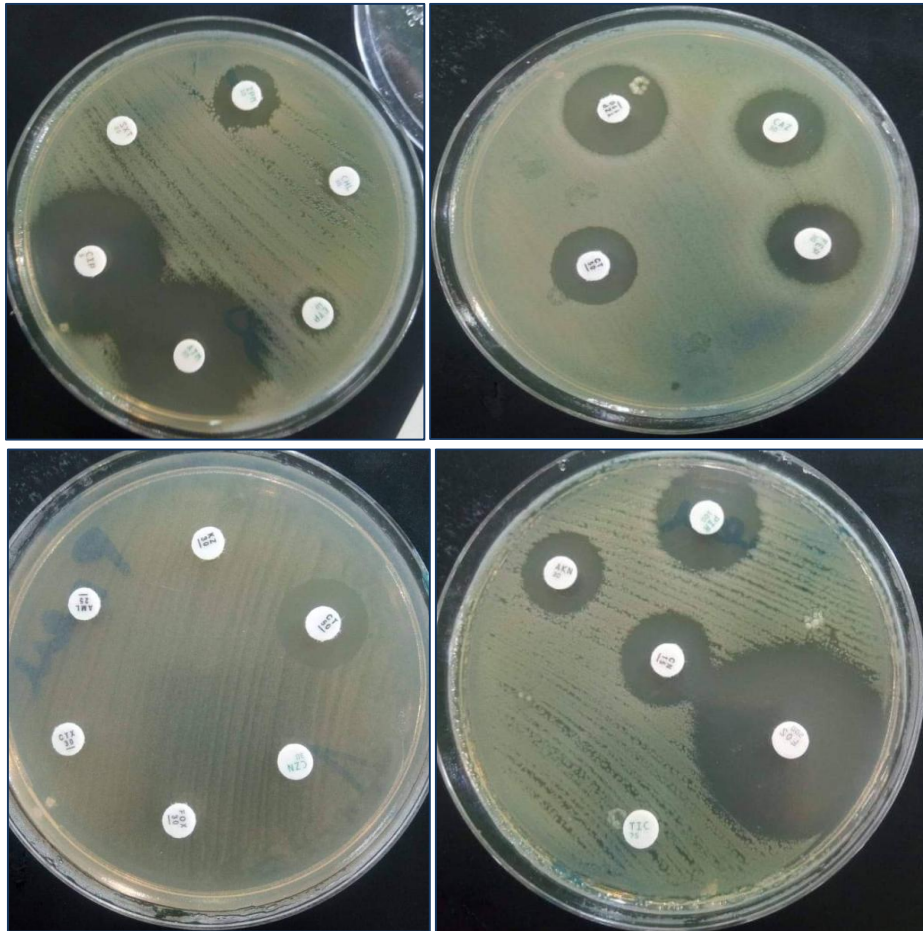
**Annexe 07 : Préparation de la solution Éthanol-Acétone (75 :25)**

- Ethanol..... 75ml
- Acétone.....25ml

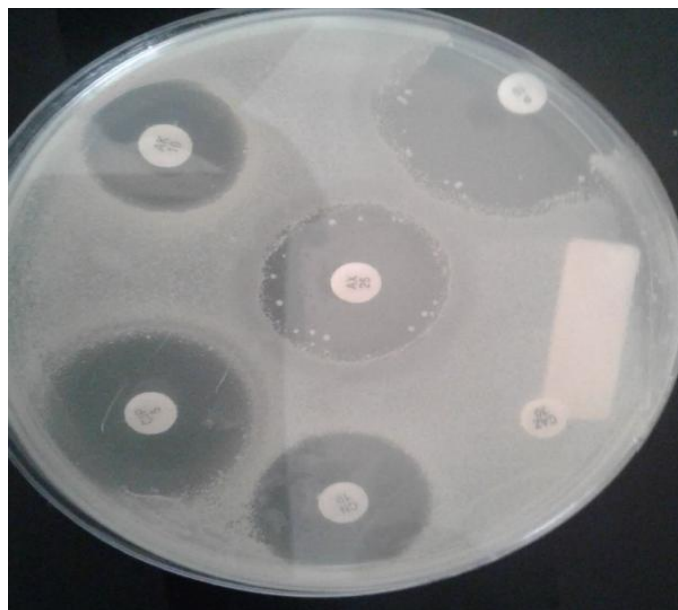
**Annexes 08 : Etapes de l'extraction****Annexe 8.1. Filtration de la propolis avec un papier wattman :****Annexe 8.2. Concentration au rotavapeur :****Annexe 09 : Préparation de bouillon nutritif BN**

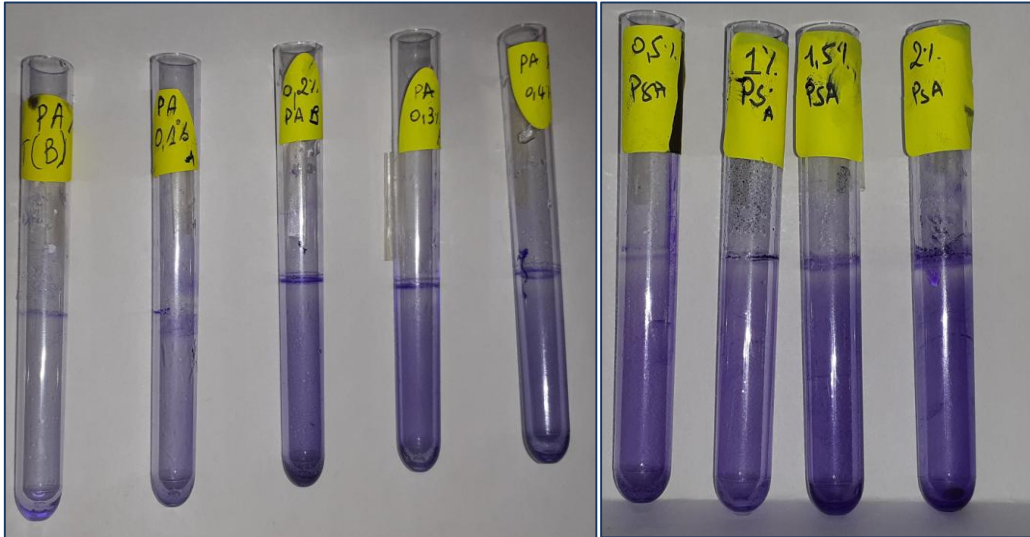
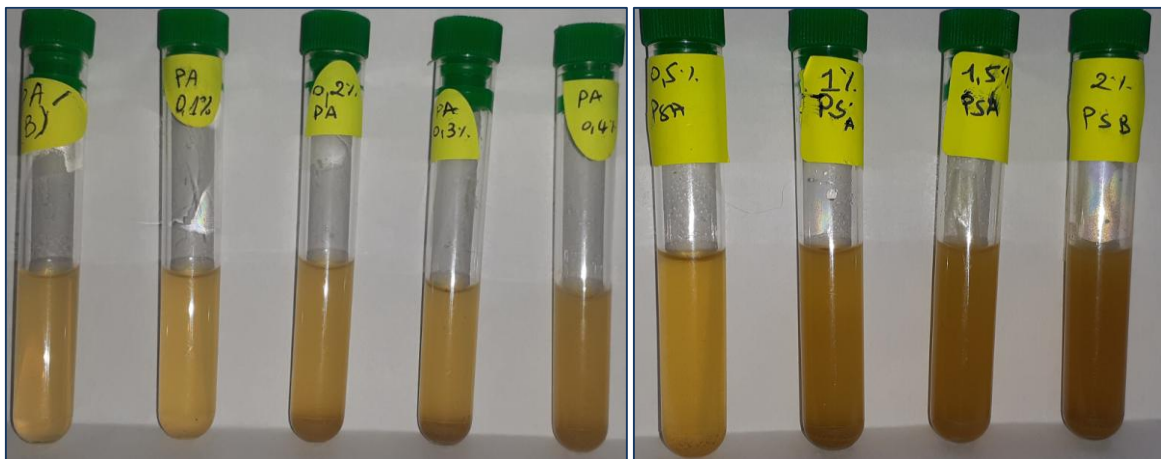
- BN .....13g
- Eau distillée.....1000ml

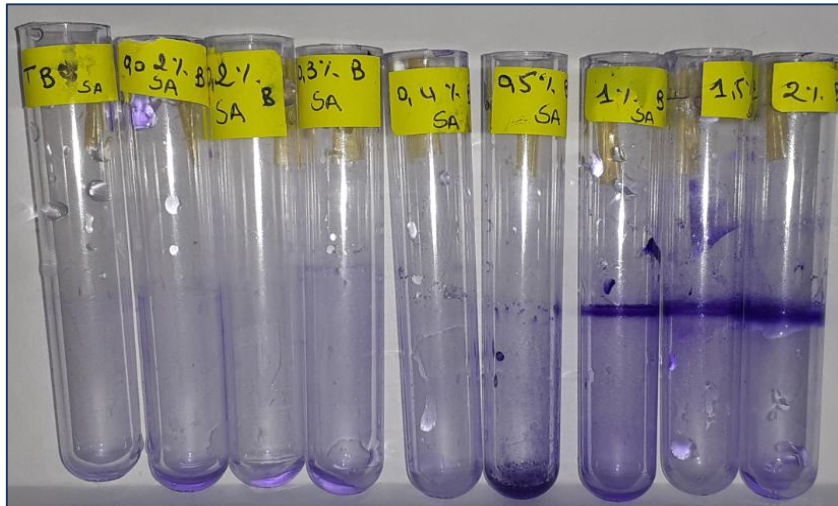
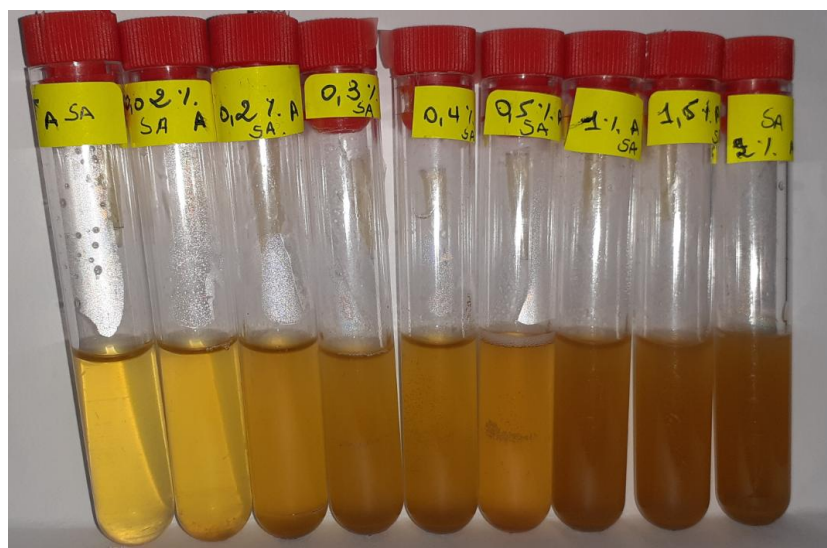
**Annexe 10 : Antibiogramme de *P. aeruginosa***

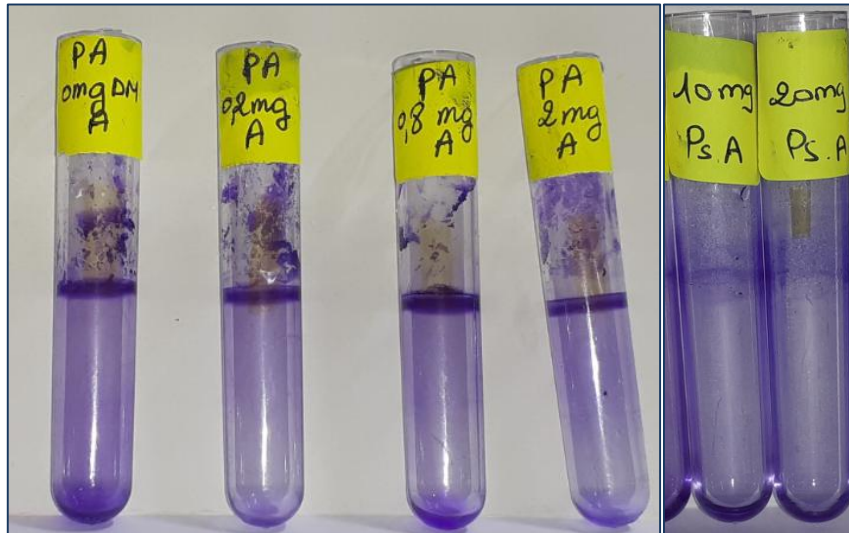
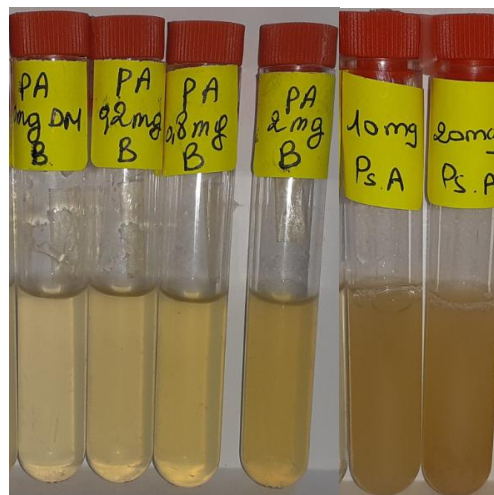


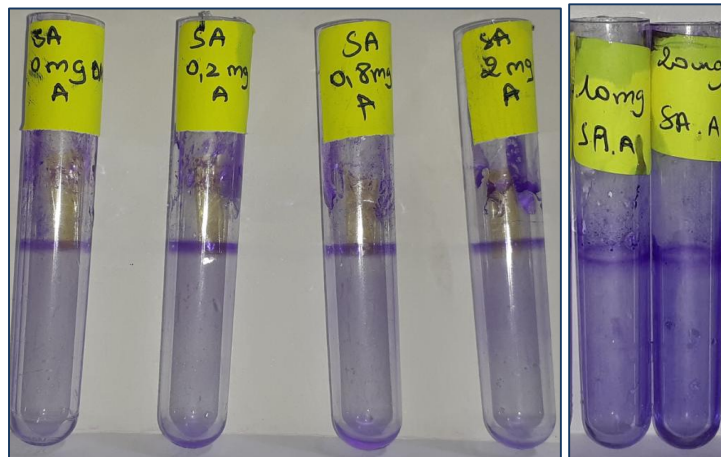
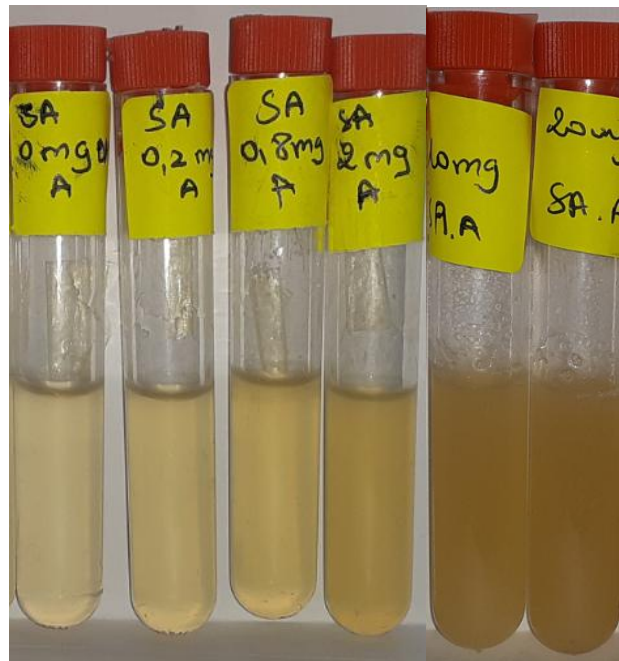
**Annexe 11 : Antibiogramme de *S. aureus***



**Annexe 12 : Résultats de la formation de biofilms chez *P. aeruginosa* après coloration au CV****En présence de PB :****Annexe 13 : Aspect des tubes après culture de *P. aeruginosa*****En présence de PB :**

**Annexe 14 : Résultats de la formation de biofilms chez *S. aureus* après coloration au CV****En présence de PB :****Annexe 15 : Aspect des tubes après culture de *S. aureus*****En présence de PB :**

**Annexe 16 : Résultats de la formation de biofilms chez *P. aeruginosa* après coloration au CV****En présence d'EEP :****Annexe 17 : Aspect des tubes après culture de *P. aeruginosa*****En présence d'EEP :**

**Annexe 18 : Résultats de formation de biofilms chez *S. aureus* après coloration au CV****En présence d'EEP :****Annexe 19 : Aspect des tubes après culture de *S. aureus*****En présence d'EEP :**

## Résumé

*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sont responsables d'un nombre croissant d'infections nosocomiales. Ces bactéries sont capables d'adhérer aux surfaces biotiques et inertes et de former des structures de biofilms. Leurs capacités à former des biofilms peuvent expliquer leurs résistances aux défenses de l'hôte et aux antibiotiques. De ce fait, l'éradication ou l'inhibition de la formation du biofilm reste un sérieux problème de santé publique. Dans cette optique, nous tenterons de tester et de rechercher, l'effet de la propolis sur l'adhésion de *P. aeruginosa* et *S. aureus* et sur leurs capacités à former des biofilms. Les résultats obtenus après 24 heures d'incubation ont montré, d'une part, que l'extrait éthanolique de la propolis a présenté une activité anti-biofilm contre les deux bactéries pathogènes à savoir *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Les pourcentages les plus élevés qui ont été enregistrés sont respectivement 29.38 et 43.45%. D'autre part, la propolis brute a présenté une activité antibactérienne. Cette forme a provoqué des réductions d'environ 90% chez les deux bactéries. En outre, les résultats indiquent que l'action inhibitrice de la forme brute de propolis ainsi que l'extrait éthanolique se traduisent respectivement par une action bactéricide et une inhibition de l'adhérence. Ces deux activités ont été plus efficaces sur les cocci à Gram positif. Ces résultats prometteurs ouvrent ainsi une nouvelle voie dans la recherche de nouveaux outils thérapeutiques pour l'inhibition de l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms en milieu médical.

**Mots-clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, biofilm, inhibition, propolis.



## **Abstract**

*Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are responsible for an increasing number of nosocomial infections. These bacteria are able to adhere to biotic and inert surfaces and form biofilm structures. Their abilities to form biofilms may explain their resistances to host defenses and antibiotics. As a result, the eradication or inhibition of biofilm formation remains a serious public health problem. In this perspective, we will try to test and investigate the effect of propolis on the adhesion of *P. aeruginosa* and *S. aureus* and their abilities to form biofilms. The results obtained after 24 hours of incubation revealed, on the one hand, that the ethanolic extract of propolis showed anti-biofilm activity against the two pathogenic bacteria, namely *P. aeruginosa* and *S. aureus*. The highest percentages recorded were 29,38 and 43,45% respectively. On the other hand, raw propolis has shown antibacterial activity. This form caused reductions of about 90% in both bacteria. In addition, the results indicate that the inhibitory action of the crude form of propolis and the ethanolic extract result in bactericidal action and inhibition of adherence respectively. Both activities were more effective on Gram-positive cocci. These promising results open a new approach in the search for new therapeutic solutions for the inhibition of bacterial adhesion and the formation of biofilms in the medical environment.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, biofilm, inhibition, propolis.

## ملخص:

هذه البكتيريا قادرة على التصاق بالسطوح الحيوية والخاملة وتشكيل هياكل الأغشية الحيوية. نفس قدرتهم على تشكيل الأغشية الحيوية بمقاومتهم لدفاعات العائل والمضادات الحيوية. كنتيجة لذلك، يظل القضاء أو تثبيط تشكيل الأغشية الحيوية مشكلة خطيرة تهدد صحة العامة. في هذه الدراسة، سوف نختبر مفعول العكبر على التصاق *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* بالأسطح وقدرتهم على تشكيل الأغشية الحيوية. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بعد 24 ساعة من الحضانة، من ناحية، قدم مستخلص العكبر الإيثانولي نشاط مكافحة الأغشية الحيوية ضد اثنين من مسببات الأمراض *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa*، من أعلى النسب التي تم حفظها على التوالي 29.38 و 43.45%. من ناحية أخرى، عرض العكبر الخام نشاط مضاد للبكتيريا. هذا النموذج قد تسبب في تخفيضات بما تعادل 90% لكل نوع من البكتيريا. وبالإضافة إلى ذلك، تظهر النتائج أن المفعول المثبط للعكبر الخام، وايضا مستخلص العكبر الإيثانولي تفسر على انها تمتلك مفعول مضاد للجراثيم ومثبط الالتصاق. هذين النشاطين كانا أكثر فعالية على البكتيريا الكروية موجبة الغرام. هذه النتائج جيدة وبالتالي تفتح مسار جديد في البحث عن أدوات علاجية جديدة لتثبيط انضمام البكتيريا وتكوين الأغشية الحيوية في بيئة طبية.

**الكلمات المفتاحية:** *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa*، الأغشية الحيوية، تثبيط، العكبر.

**THÈME : ESSAI D'INHIBITION DE LA FORMATION DES BIOFILMS CHEZ  
LES BACTÉRIES RESPONSABLES D'INFECTIONS NOSOCOMIALES :  
PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET STAPHYLOCOCCUS AUREUS.**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en biologie moléculaire des microorganismes

*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sont responsables d'un nombre croissant d'infections nosocomiales. Ces bactéries sont capables d'adhérer aux surfaces biotiques et inertes et de former des structures de biofilms. Leurs capacités à former des biofilms peuvent expliquer leurs résistances aux défenses de l'hôte et aux antibiotiques. De ce fait, l'éradication ou l'inhibition de la formation du biofilm reste un sérieux problème de santé publique.

Dans cette optique, nous tenterons de tester et de rechercher, l'effet de la propolis sur l'adhésion de *P. aeruginosa* et *S. aureus* et sur leurs capacités à former des biofilms.

Les résultats obtenus après 24 heures d'incubation ont montré, d'une part, que l'extrait éthanolique de la propolis a présenté une activité anti-biofilm contre les deux bactéries pathogènes à savoir *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Les pourcentages les plus élevés qui ont été enregistrés sont respectivement 29.38 et 43.45%. D'autre part, la propolis brute a présenté une activité antibactérienne. Cette forme a provoqué des réductions d'environ 90% chez les deux bactéries. En outre, les résultats indiquent que l'action inhibitrice de la forme brute de propolis ainsi que l'extrait éthanolique se traduisent respectivement par une action bactéricide et une inhibition de l'adhérence. Ces deux activités ont été plus efficaces sur les cocci à Gram positif.

Ces résultats prometteurs ouvrent ainsi une nouvelle voie dans la recherche de nouveaux outils thérapeutiques pour l'inhibition de l'adhésion bactérienne et la formation de biofilms en milieu médical.

**Mots clés :** *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, biofilm, inhibition, infections nosocomiales, propolis.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de la Microbiologie Générale, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Jury d'évaluation :

**Présidente du jury :** ABEDLAZIZ Widad (Maître conférence «B» - UFM Constantine),  
**Rapporteuse :** BOUCHLOUKH Warda (Maître Assistant «A» - UFM Constantine),  
**Examinatrice :** GACI Meriem (Maître assistant «A» - UFM Constantine).

**Date de soutenance : 01/07/2019**