

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**



UNIVERSITE ABOUBAKR BELKAÏD– TLEMCEN –  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE DE LA TERRE  
ET DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE  
Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement  
« LAMAABE »



# THESE

Présentée

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie

**Spécialité : Microbiologie**

**Par : Mme BENAÏSSA Asma**

**Thème**

**Effet inhibiteur de quelques extraits de plantes  
médicinales de l'Ouest d'Algérie sur des souches de  
*Pseudomonas aeruginosa* d'origines hospitalières**

Soutenue publiquement, le 26/06/2024 devant le jury composé de :

Président	BENDAHOU Mourad	Professeur	Université de Tlemcen
Directeur de thèse	KHADIR Abdelmounaim	Maitre de conférences A	Université d'Oran 1
Examineurs	HASSAINE Hafida	Professeur	Université de Tlemcen
	BEKHECHI Chahrazed	Professeur	Université de Tlemcen
	ABBOUNI BOUZIANE	Professeur	Université de Sidi Bel Abbès
	MAMI Anas	Professeur	Université d'Oran 1

*Année Universitaire : 2023 ~ 2024*

## Dédicace

*À mes très chers parents, piliers inébranlables de mon parcours scientifique, votre soutien indéfectible et votre amour inconditionnel ont été la pierre angulaire de mes réalisations. Chaque réussite est le reflet de vos valeurs et de votre dévouement.*

*À mon cher mari, compagnon précieux de ce voyage scientifique, tes encouragements constants et ta présence réconfortante ont éclairé les moments sombres de mes recherches. Ta foi en moi a été ma source d'inspiration la plus précieuse.*

*À ma très chère sœur, qui a toujours cru en moi et m'a encouragé à poursuivre mes rêves avec détermination. Ta confiance en mes capacités m'a donné la force nécessaire pour aller de l'avant.*

*À mes enfants, la prunelle de mes yeux, dont l'amour inconditionnel et le soutien inébranlable ont été ma motivation quotidienne. Chacun de mes efforts est dédié à votre avenir et à votre bonheur.*

*À mes chers frères, dont le soutien et les encouragements ont été une source de force et d'inspiration.*

*À ma famille et mes amis, je dédie ce travail avec gratitude et amour. Votre présence dans ma vie est mon plus grand trésor, et chaque réussite que je célèbre est également vôtre. Merci pour tout.*

## Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, sous la supervision de Monsieur **Khadir Abdeloumaim**, Maître de conférences de classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ahmed Ben Bella, Oran.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à Madame **Hassaïne Hafida**, directrice du laboratoire LAMAABE et professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen. Je suis reconnaissant envers elle de m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse au sein du laboratoire. Mes remerciements s'étendent également aux moyens matériels qu'elle a mis à ma disposition, contribuant ainsi de manière significative à la réussite de mes recherches. Je la remercie également pour avoir généreusement accepté d'examiner cette thèse.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude envers mon directeur de thèse, Monsieur **Khadir Abdeloumaim**. Son encadrement attentif et son soutien constant tout au long de ce projet ont été inestimables. Ses conseils éclairés, son expertise et son dévouement ont joué un rôle crucial dans la réussite de cette recherche.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au président, Monsieur **Bendahou Mourad**, professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen, pour avoir accepté avec bienveillance de présider le jury de cette thèse.

Mes sincères remerciements sont adressés à Madame **BEKHECHI Chahrazed**, professeur à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ma thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur **ABBOUNI Bouziane** Professeur Université de Sidi Bel Abbès, qui m'a fait l'honneur d'examiner cette thèse.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers le Professeur **MAMI Anas** de l'Université d'Oran pour

avoir aimablement consenti à évaluer cette thèse.

Je tiens à remercier le Professeur **CEYLAN Ozgur** (Responsable du laboratoire Programme de Contrôle et d'Analyse de la Qualité des Aliments, École Professionnelle Ula Ali Kocman, Université Mugla Sitki Kocman, Mugla.) qui m'a accueilli dans son laboratoire et a mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour l'accomplissement de cette thèse, je le remercie pour sa disponibilité sans limite et pour tous ses conseils.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance au Professeur **BOUSSELHAM Ammara**, chef du laboratoire de bactériologie du CHU de Tlemcen, pour avoir facilité mon accès à son laboratoire. Je remercie également tout le personnel pour leur accueil, leur soutien et leur gentillesse.

Je ressens une profonde gratitude envers Monsieur **BENBELAID Fethi**, docteur à l'Université de Biskra, pour son assistance dans ce travail, ainsi que pour sa disponibilité, ses conseils et sa collaboration.

Un remerciement spécial à **LATTI Nawel** pour son amitié, sa joie de vivre, son soutien et sa gentillesse. Sa capacité à me remonter le moral dans les moments difficiles a été inestimable. Merci pour tous les moments agréables que nous avons partagés.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers l'ensemble des membres du laboratoire LAMAABE, qu'il s'agisse des enseignants, des doctorants ou des ingénieurs. Nous avons partagé des moments précieux, que ce soit au cours de discussions scientifiques, de séminaires, de collaborations ou simplement lors de nos échanges informels. Ces interactions ont contribué à créer un environnement stimulant et convivial, favorable à l'épanouissement tant sur le plan académique que personnel.

Enfin, mes remerciements à tous ceux qui ont contribué, directement ou indirectement, à l'accomplissement de ce travail.

## Résumé :

*Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie nosocomiale réputée pour sa virulence et sa propension à développer une résistance aux antibiotiques, suscite l'intérêt croissant de la recherche de thérapies alternatives. Les huiles essentielles extraites de plantes médicinales émergent comme des candidates prometteuses grâce à leurs propriétés antimicrobiennes bien établies. Dans cette étude, cinq huiles essentielles (*Ammoides verticillata*, *Cistus munbyi*, *Origanum glandulosum*, *Thymbra capitata* et *Thymus lanceolatus*) provenant de plantes de l'ouest de l'Algérie ont été examinées pour leur activité antibactérienne contre des souches de *P. aeruginosa* résistantes aux antibiotiques. Les huiles essentielles, obtenues par hydrodistillation, ont fait l'objet d'une analyse approfondie de leur composition via la GC-MS. Les résultats de l'étude révèlent que les huiles essentielles de *Cistus munbyi* et de *Thymus lanceolatus* affichent une activité notable, avec des zones d'inhibition allant de 9 à 20 mm et des dilutions en bouillon efficaces entre 0,125 % et 1 %. En revanche, *Origanum glandulosum*, *Ammoides verticillata* et *Thymbra capitata* ont montré une activité moindre contre ces souches résistantes. L'huile essentielle de *Cistus munbyi* a démontré une réduction significative de la biomasse des biofilms de *P. aeruginosa* de manière dose-dépendante, présentant un potentiel antibiofilm prometteur. À la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle a éliminé les biofilms jeunes avec une moyenne de 63,52%, et a également montré une élimination significative des biofilms matures avec une moyenne de 47,39%. Les observations au microscope électronique à balayage ont confirmé une réduction marquée des biofilms traités par l'huile essentielle, dévoilant une architecture altérée et un rétrécissement cellulaire. À des concentrations sub-CMI, l'huile de *C. munbyi* a atténué les facteurs de virulence, dont la production de pyocyanine, la matrice d'exopolysaccharides (EPS) et la sécrétion de l'élastase LasA. De plus, une diminution significative de la communication cellulaire a été observée, évaluée par la réduction de la violacéine chez *Chromobacterium violaceum*. En résumé, l'huile essentielle de *Cistus munbyi* présente des effets anti-pseudomonas prometteurs, offrant un potentiel considérable pour atténuer la propagation des infections et contrer la résistance aux antibiotiques associée à *P. aeruginosa*.

**Mots-clés :** plantes médicinales, huile essentielle, *Pseudomonas aeruginosa*, résistance, biofilm.

## Abstract:

*Pseudomonas aeruginosa*, a highly pathogenic nosocomial bacterium known for its virulence and propensity to develop antibiotic resistance, is garnering increasing research interest in the quest for alternative therapies. Essential oils extracted from medicinal plants are emerging as promising candidates due to their well-established antimicrobial properties. In this study, the antibacterial activity of five essential oils (*Ammoides verticillata*, *Cistus munbyi*, *Origanum glandulosum*, *Thymbra capitata*, and *Thymus lanceolatus*) sourced from plants in western Algeria was evaluated against antibiotic-resistant *P. aeruginosa* strains. The essential oils, obtained via hydrodistillation, underwent comprehensive compositional analysis using GC-MS. The study findings reveal that essential oils from *Cistus munbyi* and *Thymus lanceolatus* exhibit significant activity, with inhibition zones ranging from 9 to 20 mm and effective broth dilutions between 0.125% and 1% against antibiotic-resistant *P. aeruginosa* strains. Conversely, *Origanum glandulosum*, *Ammoides*

*verticillata*, and *Thymbra capitata* displayed lower activity against these resistant strains. *Cistus munbyi* essential oil demonstrated a substantial, dose-dependent reduction in the biomass of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, indicating promising antibiofilm potential. At the minimum inhibitory concentration (MIC), it eradicated young biofilms with an average efficacy of 63.52% and exhibited significant elimination of mature biofilms with an average efficacy of 47.39%. Scanning electron microscopy observations confirmed a marked reduction in biofilms treated with the essential oil, revealing altered architecture and cellular shrinkage. At sub-MIC concentrations, *Cistus munbyi* oil attenuated virulence factors, including pyocyanin production, exopolysaccharide matrix formation, and LasA elastase secretion, with a notable decrease in cellular communication, as evidenced by reduced violacein production in *Chromobacterium violaceum*. In summary, *Cistus munbyi* essential oil demonstrates promising anti-pseudomonal effects, offering considerable potential to mitigate infection spread and counter antibiotic resistance associated with *Pseudomonas aeruginosa*.

**Key words:** medicinal plants, essential oil, *Pseudomonas aeruginosa*, resistance, biofilm

#### المخلص :

عصيات الزانفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*، بكتيريا مستشفوية خبيثة مشهورة بفعاليتها الضارة وميلها الى تطوير مقاومة للمضادات الحيوية، تثير اهتمام البحث المتزايد لايجاد علاجات بديلة. الزيوت الأساسية المستخلصة من النباتات الطبية تعد من الحلول الواعدة بفضل خصائصها المثبتة المضادة للميكروبات. في هذه الدراسة، تم فحص خمس زيوت أساسية (*Thymus*، *Thymbra capitata*، *Origanum glandulosum*، *Cistus munbyi*) مستخلصة من نباتات غرب الجزائر لتقييم فعاليتها النشطة ضد سلالات *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة للمضادات الحيوية. تم الحصول على الزيوت الأساسية، التي تم استخراجها بواسطة التقطير البخار، كما تم تحليل تركيبها تحليلًا شاملاً باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازية-الطيف الكتلي (GC-MS). كشفت نتائج الدراسة أن زيوت *Thymus lanceolatus* و *Cistus munbyi* أظهرت فعالية ملحوظة، مع مناطق تثبيط تتراوح بين 9 و 20 مم وتخفيفات فعالة في الوسط المغذي بين 0.125% و 1% ضد سلالات *Pseudomonas aeruginosa* المقاومة للمضادات الحيوية. على العكس من ذلك، أظهرت *Ammoides verticillata*، *Origanum glandulosum*، و *Thymbra capitata* نشاطاً أقل ضد هذه السلالات المقاومة. أظهر الزيت الأساسي *Cistus munbyi* تثبيلاً كبيراً في كتلة الأغشية الحيوية البكتيرية بطريقة تعتمد على الجرعة، مما يشير إلى إمكانيته الواعدة كعامل مضاد للأغشية الحيوية. عند التركيز الحد الأدنى المثبط (MIC)، قضت على الأغشية الحيوية الشابة بنسبة متوسطة تبلغ 63.52%، وأظهرت أيضاً القضاء الفعال على الأغشية الحيوية الناضجة بنسبة متوسطة تبلغ 47.39%. أكدت الصور الإلكترونية الماسحة الانخفاض الكبير للأغشية الحيوية للبكتيريا التي تم معالجتها بزيت الأساس، مع تغير في الهيكل البنوي وانكماش خلوي. في تراكيز الحد الأدنى المثبط (MIC)، قلل زيت *Cistus munbyi* من عوامل الفعالية أيضاً مثل إنتاج البيوسيانين وتكوين مصفوفة البولي ساكاريدات الخارجية وافراز الاستاز LasA. بالإضافة إلى ذلك، تم ملاحظة انخفاض كبير في التواصل الخلوي، كما يظهر من خلال الانخفاض الملحوظ في إنتاج الفيولاسين في *Chromobacterium violaceum*. في الختام، يظهر زيت *Cistus munbyi* الأساسي تأثيرات مضادة واعدة للزانفة الزنجارية، مما يعد بإمكانيات كبيرة لتقليل انتشار العدوى ومواجهة مقاومة المضادات الحيوية المرتبطة بـ *Pseudomonas aeruginosa*.

**الكلمات المفتاحية:** النباتات الطبية، الزيوت العطرية، الزانفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*، مقاومة، الغشاء الحيوي الرقيق

## Table des matières

Introduction .....	1
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	5
1.1. L'Histoire du Pigment Vert-Bleu et la découverte de <i>P. aeruginosa</i> .....	5
1.2. Caractéristiques de <i>P. aeruginosa</i> .....	6
1.3. L'Écologie et la Prévalence de <i>P. aeruginosa</i> .....	6
1.4. Epidémiologie de <i>P. aeruginosa</i> en Algérie .....	8
1.5.1. Infections des voies respiratoires.....	10
1.5.2. <i>P. aeruginosa</i> à l'origine d'infections des voies urinaires .....	11
1.5.3. <i>P. aeruginosa</i> à l'origine d'infections de la peau et des tissus mous.....	11
1.5.4. <i>P. aeruginosa</i> à l'origine d'une kératite bactérienne .....	13
1.6. <i>P.aeruginosa</i> et la résistance aux antibiotiques.....	14
1.6.1. Résistance intrinsèque aux antibiotiques.....	15
1.6.1.1. Perméabilité de la membrane externe .....	15
1.6.1.2. Systèmes d'efflux .....	15
1.6.1.3. Enzymes inactivant les antibiotiques .....	16
1.6.2. Résistance acquise aux antibiotiques .....	17
1.6.2.1. Résistance par mutations .....	17
1.6.2.2. Acquisition de gènes de résistance.....	17
1.6.3. Résistance adaptative aux antibiotiques .....	18
1.6.3.1. Résistance médiée par le biofilm .....	18
1.6.3.2. Cellules persistantes.....	18
1.7. Facteurs de virulences chez <i>P.aeruginosa</i> .....	19
1.7.1. Facteurs impliqués dans l'adhérence et la motilité de <i>P. aeruginosa</i> .....	20
1.7.1.1. Le flagelle.....	20
1.7.2. Les pili de type IV .....	22
1.7.2.1. Facteur d'attachement de type fimbriae (ou Cup).....	24
1.7.2.2. Le lipopolysaccharide (LPS) .....	25
1.7.3. Facteurs sécrétés .....	26
1.7.3.1. Exopolysaccharides.....	26
1.7.3.2. Alginate .....	27
1.7.3.3. PSL (locus de synthèse des polysaccharides) .....	27
1.7.3.4. Pel (Le polysaccharide pelliculaire).....	28
1.7.4. Protéases.....	28

1.7.4.1.	L'élastase.....	28
1.7.4.2.	La protéase alcaline.....	29
1.7.4.3.	La protéase IV .....	29
1.7.5.	Toxines.....	30
1.7.5.1.	Exotoxine A (ETA).....	30
1.7.5.2.	Exotoxine S (Exo S).....	30
1.7.5.3.	Exotoxine T (Exo T) .....	31
1.7.5.4.	Exotoxine U (Exo U) .....	31
1.7.5.5.	Exotoxine Y (Exo Y) .....	32
1.7.6.	Sidérophores.....	32
1.7.6.1.	La pyocyanine.....	32
1.7.6.2.	La pyoverdine .....	33
1.7.7.	Les biofilms.....	34
1.7.8.	Autres facteurs de virulence.....	36
1.8.	Systèmes de sécrétion chez <i>P. aeruginosa</i> .....	37
1.8.1.	Système de sécrétion de type I (T1SS).....	37
1.8.2.	Système de sécrétion de type II (T2SS) .....	38
1.8.3.	Système de sécrétion de type III (T3SS).....	39
1.8.4.	Système de sécrétion de type V (T5SS).....	40
1.8.5.	Système de sécrétion de type IV (T6SS).....	41
1.9.	Le Quorum sensing et la régulation des facteurs de virulences .....	42
1.9.1.	Systèmes de QS Acyl-Homosérine Lactone : Las et Rhl .....	43
1.9.2.	Le Système de QS Quinolone : Pqs .....	44
1.9.3.	Le Nouveau Système de QS : Iqs .....	44
2.	Les plantes médicinales.....	45
2.1.	Les Huiles essentielles.....	46
2.1.1.	La composition des Huiles essentielles.....	47
2.1.2.	Le mode d'action des huiles essentielles.....	48
2.1.3.	Activité antipseudomonal des HE et des substances naturelles.....	49
2.1.4.	Les plantes médicinales en Algérie.....	52
	<i>Ammoides verticillata</i> Desf. Briq.....	52
	<i>Cistus munbyi</i> Pomel.....	53
	<i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>Glandulosum</i> .....	54
	<i>Thymbra capitata</i> (L.) Cav .....	55
	<i>T. lanceolatus</i> Desf.....	56
	Matériels et Méthodes.....	58



1.	Lieu d'étude.....	59
2.	Prélèvements.....	59
1.	Souches bactériennes.....	59
1.1.	Isolement.....	59
1.3.	Les pré-cultures.....	60
1.4.	Les tests de sensibilité aux antibiotiques.....	60
1.5.	Détermination phénotypique de quelques facteurs de virulence.....	61
1.5.1.	Mise en évidence de la motilité.....	61
1.5.1.1.	Motilité en essaim (Swarming).....	61
1.5.1.2.	La mobilité à la nage (Swimming).....	61
1.5.2.	Production de la pyocyanine et de la pyoverdine.....	61
1.5.3.	Quantification de la pyocyanine.....	62
1.5.4.	Étude du pouvoir des souches isolées à former des biofilms.....	62
1.5.5.	Quantification du biofilm :.....	63
2.	Effet des huiles essentielles.....	64
2.1.	Plantes aromatiques.....	64
2.2.	Obtention des huiles essentielles.....	65
2.3.	Analyse chimique des huiles essentielles.....	66
2.4.	Activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	67
2.4.1.	Technique de diffusion en gélose.....	67
2.4.2.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	67
2.4.2.1.	Préparation du Réazurine.....	68
2.4.2.2.	Préparation de la Solution Mère et des Concentrations.....	68
2.5.	Effet des huiles essentielles sur les facteurs de virulences.....	69
2.5.1.	L'inhibition du QS.....	69
2.5.2.	Les types de mobilité.....	70
2.5.3.	Pyocyanine.....	70
2.5.4.	L'inhibition de la production des exopolysaccharides (EPS).....	70
2.5.5.	L'inhibition de la protéase LasA.....	71
2.5.6.	Biofilm.....	71
2.5.6.1.	Inhibition de la formation du biofilm.....	72
2.5.6.2.	Essai d'éradication de biofilm préformé.....	72
2.5.6.3.	Visualisation sur site des biofilms.....	72
2.5.6.4.	Visualisation du biofilm sous microscope électronique à balayage (MEB).....	73
	Résultats et Discussion.....	75
1.	Isolement et identification des souches bactériennes.....	76

1.1.	Répartition des souches par type de prélèvements .....	76
1.2.	. Répartition des souches par service .....	77
	Identification .....	78
2.	Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques.....	79
3.	Détermination phénotypique des facteurs de virulence.....	82
3.1.	Production de la pyocyanine et de la pyoverdine .....	82
3.2.	Quantification de la pyocyanine.....	82
3.3.	Les phénotypes de mobilité.....	84
3.4.	Caractérisation du pouvoir de formation du biofilm .....	86
4.	Composition chimique des huiles essentielles .....	87
4.1.	Activité antimicrobienne des huiles essentielles .....	92
4.2.	Biofilm.....	94
4.2.1.	Inhibition de la formation du biofilm.....	94
4.2.2.	L'éradication des biofilms préformés .....	95
4.2.3.	Visualisation sur site des biofilms .....	98
4.3.	Activité Anti-quorum sensing .....	100
4.4.	Inhibition des phénotypes de mobilités.....	102
4.5.	Inhibition de la production de la pyocyanie .....	104
4.6.	Inhibition de la production des EPS .....	105
4.7.	Inhibition de l'endopeptidase LasA .....	107
	Références bibliographiques .....	111
	<b>Annexe</b> .....	133
	Publications .....	138

## Liste des Figures

Figure 1 : Les mécanismes intrinsèques, acquis et adaptatifs confèrent une résistance aux antibiotiques chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (Lodise, 2016) .....	14
Figure 2 : Présentation schématique des principaux facteurs de virulence utilisés par <i>P. aeruginosa</i> lors d'infections respiratoires (Jurado-Martín et al., 2021).....	20
Figure 3: Représentation chimique de la structure de l'appareil flagellaire. (Bouteiller et al., 2021)....	21
Figure 4: Stades de développement du biofilm de <i>P. aeruginosa</i> (Thi et al., 2020).....	35
Figure 5 : Les systèmes de sécrétion chez <i>P.aeruginosa</i> . (De Sousa et al., 2021). .....	37
Figure 6 Mécanisme antibactérien des huiles essentielles (HE) (Angane et al., 2022).....	49
Figure 7 : La technique de Formation de biofilm en microplaque.....	63
Figure 8 : Plantes médicinales retenues. ....	65
<b>Photo 9</b> : Appareil type Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.....	66
Figure 10 : Conversion de la rézasurine en présence des bactéries vivantes.....	68
Figure 11 : microscope électronique à balayage à émission de champ JSM-7200F Schottky. ....	74
Figure 12 : Répartition des souches de <i>P. aeruginosa</i> par type de prélèvement .....	76
Figure 13 : Distribution des souches de <i>P. aeruginosa</i> selon le service et le sexe des patients .....	78
Figure 14 : Plaque API 20NE après 24 h d'incubation. ....	79
Figure 15 : Taux de résistance par antibiotique.....	80
Figure 16 : Répartition de la résistance selon les services. ....	81
Figure 17 : Production de la pyocyanine et de la pyoverdine.....	82
Figure 18 : Taux de production de pyocyanine. ....	84
Figure 19 : Les capacités des souches à la mobilité par swarming et par swimming .....	85
Figure 20 : Capacité des souches de <i>P.aeruginosa</i> à former un biofilm.....	86
Figure 21 : Pouvoir de formation du biofilm chez les souches isolées de <i>P. aeruginosa</i> .....	87
<b>Figure 22</b> : Les images de la microscopie optique de l'effet d'huile essentielle de <i>C.munbyi</i> sur formation de biofilm. ....	98
Figure 23 : Les images de la microscopie électronique à balayage de l'effet d'huile essentielle de <i>C.munbyi</i> sur formation de biofilm.....	99
Figure 24 : Effet de l'HE de <i>C.munbyi</i> sur la production de la violacéine.....	100
Figure 25 : Inhibition de la production de la violacéine chez <i>C. violaceum</i> CV026. ....	101
Figure 26 : Inhibition de la production de la pyocyanine.....	105
Figure 27 : Analyse quantitative de l'inhibition de l'EPS en mesurant l'absorbance à 490 nm. ....	106
Figure 28 : Inhibition de l'activité staphylolytique de LasA par différentes concentrations d'HE de <i>C.munbyi</i> . ....	107
Figure 30 : Les deux types de mobilité.....	134
Figure 31 : Effet de l'huile essentielle de <i>C.munbyi</i> sur les phénotypes de mobilité.....	136

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Structure et spécificité du substrat des systèmes actifs d'efflux à trois composants chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	16
Tableau 2 : Antiquorum sensing et mécanismes antibactériens d'action de certains composés naturels. ....	51
Tableau 3 : Les stations géographiques de récolte des plantes aromatiques. ....	64
Tableau 4 : Composition chimique des huiles essentielles. ....	90
Tableau 5 : L'effet inhibiteur des huiles essentielles étudiées contre les souches est exprimé par les zones d'inhibition de diamètre (ZI en mm $\pm$ SD) et les concentrations minimales inhibitrices (CMI en % v/v).....	92
Tableau 7 : Mesure quantitative de l'éradication des biofilms préformés (48 h) estimée par la coloration au cristal violet (mesure à 490 nm) .....	97
Tableau 8 : Inhibition de la production de violacéine chez <i>C. violaceum</i> CV12472 par l'HE de <i>C. munbyi</i> . ....	101
Tableau 9 : activité antiquorum sensing chez <i>C. violaceum</i> CV026 de l'HE de <i>C. munbyi</i> . ....	101
Tableau 10 : Effet de l'HE de <i>C. munbyi</i> sur la motilité par Swimming et par Swarming .....	103
Tableau 11 : Évaluation quantitative de l'inhibition de la pyocyanine (%). ....	105
Tableau 12 : Inhibition de l'activité staphylolytique de LasA par différentes concentrations d'HE de <i>C. munbyi</i> .....	135
Tableau 13 : caractères phénotypiques des souches de <i>P. aeruginosa</i> .....	137

## Liste des abréviations

**BPCO** : bronchopneumopathie chronique obstructive

**ECBU** : Examen Cytobactériologique des Urines

**eDNA** : ADN extracellulaire

**EPS** : Les exopolysaccharides

**ETA** : Exotoxine A

**Exo S** : Exotoxine S

**Exo T** : Exotoxine T

**Exo U** : Exotoxine U

**Exo Y** : Exotoxine Y

**FK** : fibrose kystique

**HCN** : cyanure d'hydrogène

**LCR** : liquide céphalorachidien.

**LPS** : le lipopolysaccharide

**OMS** : Organisation mondiale de la santé

**PAV** : pneumonie acquise sous ventilation mécanique

**Pel** : Le polysaccharide pelliculaire

**PN** : pneumonie nosocomiale

**PSL** : locus de synthèse des polysaccharides

**QS** : quorum sensing

**T1SS** : Système de sécrétion de type I

**T2SS** : Système de sécrétion de type II

**T3SS** : Système de sécrétion de type III

**T5SS** : Système de sécrétion de type V

**T6SS** : Système de sécrétion de type VI

## **Introduction**

L'essor de la résistance antimicrobienne et la prévalence croissante des maladies infectieuses représentent une menace sérieuse pour la santé publique à l'échelle mondiale. Un groupe particulièrement redoutable de pathogènes, regroupé sous l'acronyme "ESKAPE" (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp.*), émerge comme une préoccupation majeure. Parmi eux, *Pseudomonas aeruginosa*, en raison de sa résistance accrue aux médicaments et de sa virulence notoire, a suscité une attention particulière. Cette menace a incité l'Organisation mondiale de la santé à classer ces pathogènes, dont *P.aeruginosa*, comme des « agents pathogènes prioritaires », nécessitant une recherche intensive de nouvelles stratégies thérapeutiques et le développement de nouveaux antibiotiques (WHO, 2017).

*P. aeruginosa*, pathogène opportuniste polyvalent, occupe une position centrale dans les infections aiguës et chroniques, démontrant une adaptation remarquable à divers environnements tels que le sol, l'eau, les plantes et les humains, avec une tolérance aux températures allant de 4 à 42°C (Qin et al., 2022; Wu & Li, 2015). Cette bactérie à Gram négatif présente une résistance environnementale, survivant même sur des surfaces sèches en milieu hospitalier jusqu'à 6 mois (Diggle & Whiteley, 2020). Largement reconnue comme une bactérie nosocomiale, *P. aeruginosa* joue un rôle prédominant dans les infections nosocomiales, en particulier dans les unités de soins intensifs, avec une résistance notable à la plupart des antibiotiques et le développement de divers mécanismes de résistance. Les infections nosocomiales opportunistes touchent principalement des patients gravement malades ou immunodéprimés, engendrant des pathologies variées, représentant entre 10 et 20 % des cas nosocomiaux, avec une mortalité substantielle atteignant jusqu'à 50 % (Al-Hasan et al., 2008 ; Gómez et Prince, 2007 ; Carmeli et al., 1999;).

La complexité de traiter et d'éliminer *P.aeruginosa* est exacerbée par son inclination fréquente à développer une résistance aux médicaments et à coloniser de manière persistante les surfaces humides. Cette bactérie exploite une multitude de mécanismes de résistance intrinsèques et acquis, englobant l'inactivation des antibiotiques, la modification des cibles médicamenteuses, l'atténuation de la perméabilité membranaire, l'expression des systèmes d'efflux, la formation de biofilms, et le Quorum-Sensing (QS). Ces mécanismes, collectivement, contribuent significativement à la sensibilité nettement réduite de *P. aeruginosa* aux antibiotiques (Taylor et al., 2014). De plus, sa capacité à acquérir rapidement des gènes de résistance grâce à la

flexibilité de son génome renforce sa résistance aux antimicrobiens, y compris aux antibiotiques de dernière génération tels que les carbapénèmes, faisant de cette bactérie l'une des plus redoutables en termes de résistance aux médicaments. (Botelho et al., 2019).

Parallèlement, *P. aeruginosa* mobilise une diversité de facteurs de virulence qui coordonnent habilement différentes phases du processus infectieux, facilitant la progression de la maladie. Ces facteurs agissent en renforçant l'adhésion, modifiant la réponse immunitaire, contrecarrant la phagocytose, provoquant des dommages tissulaires, et garantissant la protection du pathogène contre l'action d'antimicrobiens variés (Jurado-Martín et al., 2021). La régulation globale de ces facteurs de virulence est assurée par des réseaux de contrôle complexes et interconnectés, sous l'influence de systèmes de signalisation coordonnés, avec le QS jouant un rôle central (Venturi, 2006).

Au début de l'infection, *P. aeruginosa* se trouve initialement en suspension sous forme planctonique. Cependant, à mesure que l'infection progresse, les colonies bactériennes transitent vers un mode de croissance en biofilm, un processus dynamique complexe se déroulant en plusieurs étapes. L'étape initiale de la formation du biofilm, appelée adhésion, requiert généralement différents compartiments structuraux, parmi lesquels les flagelles jouent un rôle crucial en assurant la motilité nécessaire à l'attachement, à la dissémination, à la colonisation de l'épithélium hôte, et à la transition de la phase planctonique au mode biofilm (Badal et al., 2020).

Une fois l'attachement établi, *P. aeruginosa* passe à un état d'attachement plus stable appelé irréversible, facilité par d'autres types de motilité de surface tels que la motilité twitching médiée par les pili de type IV, favorisant l'adhérence aux surfaces muqueuses et la colonisation subséquente, ainsi que le swarming, impliquant l'utilisation de flagelles et de tensioactifs (Burrows, 2012).

Après l'attachement irréversible, *P. aeruginosa* évolue vers la formation d'un biofilm mature. Au sein de ce biofilm, des microcolonies prolifèrent en produisant des substances polymères extracellulaires (EPS), complexes et principalement constituées de carbone, de protéines, de glycoprotéines et de matières nucléiques. Ces EPS agissent comme une matrice structurelle robuste, favorisant l'assemblage cellulaire, conférant une rigidité structurelle et maintenant l'architecture tridimensionnelle du biofilm. La sécrétion auto-induite de cette matrice polymère agit comme une barrière protectrice, permettant aux cellules du biofilm d'éviter les réponses

immunitaires de l'hôte et de résister aux traitements antimicrobiens jusqu'à 1000 fois plus efficacement que leurs homologues planctoniques. Ce mécanisme de tolérance aux antibiotiques lié aux biofilms peut contribuer à la chronicité des infections difficiles à traiter (Khalifa et al., 2011).

Ainsi, l'inhibition du biofilm et du QS, des processus cruciaux dans la maturation et la structure tridimensionnelle du biofilm, émerge comme une stratégie prometteuse pour le développement d'agents anti-infectieux. Ces agents ciblent les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* sans compromettre sa vitalité, évitant ainsi une pression sélective élevée pour le développement de la résistance, contrairement aux antibiotiques classiques (Brindhadevi et al., 2020). La phytothérapie, basée sur l'utilisation séculaire des plantes médicinales, offre une source riche en composés thérapeutiques, notamment les huiles essentielles (HE), reconnues pour leurs propriétés antimicrobiennes. Ces HE, issues principalement de plantes aromatiques, se distinguent par leur potentiel antimicrobien prometteur, comprenant des terpénoïdes tels que le p-cymène, le pinène, le limonène, le sabine, et le terpinène, ainsi que des phénylpropanoïdes comme l'alcool cinnamique, l'aldéhyde cinnamique, l'eugénol et le méthyl cinnamate, témoignant d'une complexité chimique fascinante (Masyita et al., 2022).

Des études démontrent les propriétés antimicrobiennes et antibiofilm des HE, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, contre divers champignons et bactéries pathogènes. Cependant, leurs potentiels antivirulents et anti-quorum sensing restent largement sous-exploités (Camele et al., 2019; Ganesh & Rai, 2018). L'exploration de ces aspects offre une avenue prometteuse pour contrer la résistance croissante aux antibiotiques en se concentrant sur les mécanismes de virulence bactérienne. Bien que les bactéries à Gram négatif, telles que *P. aeruginosa*, démontrent une moindre sensibilité aux HE par rapport à leurs homologues à Gram positif, certaines HE révèlent une activité notable contre *P. aeruginosa*. Les HE de *Cinnamomum cassia*, *Syzygium aromaticum*, *Anthemis nobilis*, ainsi que certaines espèces des genres *Thymus* et *Origanum*, se distinguent particulièrement dans cette lutte. Ces découvertes suggèrent des avenues prometteuses pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques contre les infections, notamment celles impliquant des agents pathogènes résistants tels que *P. aeruginosa*.

La médecine populaire et traditionnelle dans la région nord-ouest de l'Algérie témoigne d'une utilisation séculaire des HE pour traiter divers types d'infections, selon les revendications traditionnelles. Ce travail vise à explorer ces pratiques ancrées dans la culture locale en rapportant les constituants chimiques de cinq huiles essentielles, sélectionnées en fonction de



leur utilisation prépondérante par la population dans le traitement de différentes infections. L'analyse chimique sera réalisée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Parallèlement, dans le contexte de la recherche de solutions thérapeutiques alternatives, cette étude se concentre sur l'évaluation *in-vitro* des HE extraites de plantes locales sur des souches de *P. aeruginosa* d'origine hospitalière au CHU de Tlemcen. L'objectif central de cette étude consiste à explorer, pour la première fois, l'activité anti-quorum sensing et l'effet inhibiteur de l'HE extraite de la plante endémique *C.munbyi* sur des aspects spécifiques de la virulence des souches cliniques de *P. aeruginosa*, ainsi que sur des souches de référence. Cette exploration inclura l'évaluation de l'impact de l'HE de *C.munbyi* sur des paramètres cruciaux tels que la production de pyocyanine, la formation de biofilm, et la motilité de nage et d'essaim. Ces analyses seront complétées par l'utilisation d'une méthode de pointe, à savoir une analyse au microscope électronique à balayage (MEB).

Cette thèse est structurée en trois parties distinctes. La première section offre une synthèse bibliographique approfondie sur *P.aeruginosa*, mettant en lumière les infections associées à cette bactérie et les facteurs de virulence impliqués. L'accent est mis sur l'exploration des plantes médicinales comme source alternative pour lutter contre *P. aeruginosa*.

La deuxième partie présente les méthodes utilisées pour l'identification, la caractérisation des souches, ainsi que l'évaluation de la sensibilité aux huiles essentielles et l'atténuation des facteurs de virulence, incluant le (QS) et le biofilm.

Enfin, la troisième section expose les résultats obtenus au cours de cette étude et initie les discussions qui découleront des observations et des conclusions tirées de ces travaux

### **1. *Pseudomonas aeruginosa*.**

Les *Pseudomonas*, membres de la famille des *Pseudomonadaceae*, se caractérisent par des propriétés microbiologiques bien définies. Ce sont des bactéries à Gram négatif qui adoptent une forme de bâtonnet, affichant une motilité principalement assurée par la présence de flagelles. Sur le plan métabolique, elles sont classées parmi les bactéries aérobies, dépendant de l'oxygène pour leur croissance, et elles se distinguent par leur incapacité à former des endospores. De plus, ces bactéries sont dotées d'une activité positive pour l'enzyme catalase. Il convient de noter que des variations existent au sein des différentes souches de *Pseudomonas* en ce qui concerne leur réaction à l'oxydase, certaines étant positives tandis que d'autres sont négatives (De Sousa et al., 2021; Lister et al., 2009).

À ce jour, le genre *Pseudomonas* comprend une impressionnante diversité de plus de 200 espèces distinctes. Ce groupe hétérogène de bactéries joue un rôle significatif dans diverses affections humaines. Parmi ces espèces, *Pseudomonas aeruginosa* émerge en tant que pathogène humain le plus fréquemment isolé au sein du genre *Pseudomonas* (Lalucet et al., 2020; Parte, 2018).

#### **1.1. L'Histoire du Pigment Vert-Bleu et la découverte de *P. aeruginosa***

Tout au long de son parcours évolutif, l'apparition d'un pigment vert-bleu a occupé une position centrale dans le développement de *P. aeruginosa*. Cette bactérie opportuniste et pathogène a traversé différentes périodes, chacune étant associée intrinsèquement à sa capacité exceptionnelle de produire la pyocyanine, un pigment unique en son genre et qui a jeté les bases de nombreuses appellations historiques. Vers le 19<sup>e</sup> siècle, le botaniste allemand Walther Migula a jeté les prémices de cette nomenclature en identifiant des cellules mobiles accompagnées de spores, qui rappelaient le nanoflagellé *Monas* spp. Cette observation a contribué à l'émergence du terme "*Pseudomonas*", en raison de la ressemblance trompeuse avec ce nanoflagellé apparent, d'où le préfixe "pseudo" Migula (1900). Cependant, le véritable ancrage de l'appellation "*aeruginosa*" qui signifie en latin "vert-de-gris" remonte à 1872, quand Schroeter a noté la couleur des colonies cultivées dans certains milieux, évoquant la patine du cuivre, d'où la teinte verdâtre. Schroeter a associé ce qualificatif au genre *Bacterium*, donnant ainsi naissance à "*Bacterium aeruginosum*" (Hugh & Leifson, 1964).

L'année 1850 a marqué un jalon crucial, lorsque le chirurgien Charles-Emmanuel Sedillot identifia la relation entre la coloration des pansements chirurgicaux et un agent potentiellement transmissible (Lister et al., 2009). Vers 1860, les travaux de Fordos permirent l'extraction du pigment à l'origine de la coloration bleue, tandis que Lucke, en 1862, établit le lien entre ce pigment et les micro-organismes prenant la forme de bâtonnets (Pitt, 1998; Villavicencio, 1998). Ce n'est qu'en 1882 que *P. aeruginosa* fut isolée en culture pure à partir de plaies cutanées de deux patients présentant du pus vert bleuâtre, moment où Carle Gessard nomma l'agent bactérien en forme de bâtonnet responsable d'infections "*Bacillus pyocyaneus*" (Lister et al., 2009). Cependant, les recherches approfondies de Migula en 1894 révélèrent la distinction entre cette espèce bactérienne et le genre *Bacillus*, conduisant ainsi à l'appellation formelle "*P. aeruginosa*" (Moore & Flaws, 2011). Les investigations ultérieures menées par Freeman en 1916 apportèrent une compréhension plus élaborée des mécanismes d'invasion et de propagation de *P. aeruginosa*, éclairant son rôle en tant qu'agent catalyseur d'infections, qu'elles soient aiguës ou chroniques (Freeman, 1916).

## **1.2. Caractéristiques de *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* est un bacille non sporulé et dépourvue de capsule, mesurant 1 à 3 µm de long et 0,5 à 0,8 µm de large, dotée d'un flagelle polaire pour la mobilité. Il est oxydase et catalase positives, et peut utiliser les nitrates en l'absence d'oxygène grâce à son métabolisme aérobie facultatif. Sa température optimale de croissance est de 37°C, avec une division possible jusqu'à 42°C, et son temps de doublement *in vitro* est d'environ 40 minutes (Jakobsenet al., 2013).

## **1.3. L'Écologie et la Prévalence de *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa*, en tant que micro-organisme omniprésent étroitement associé à des milieux aqueux, occupe diverses niches écologiques liées à la distribution de l'eau, allant des mers aux rivières jusqu'aux réseaux domestiques. Il se distingue par sa capacité exceptionnelle à s'adapter à une vaste gamme d'habitats, incluant les rhizosphères des plantes, les animaux, les solutions désinfectantes et même les réservoirs de carburant d'avions à réaction (Trautmann, et al., 2005). Sa prévalence dans les écosystèmes aquatiques oligotrophes, caractérisés par une faible disponibilité en nutriments, suggère qu'il fait partie des micro-organismes les plus abondants de la planète. Cette aptitude à s'ajuster rapidement aux changements physicochimiques, conjuguée à sa mobilité et de sa tolérance à des températures allant de +4°C à +45°C ainsi que ses facteurs de virulence et à sa capacité à former des biofilms, lui confère un avantage

compétitif pour l'accès aux ressources, expliquant ainsi sa présence diversifiée dans de multiples habitats (de Sousa et al., 2021).

En milieu hospitalier, *P. aeruginosa* est fréquemment observé dans des sources telles que le matériel de thérapie respiratoire, les produits antiseptiques, les éviers et les piscines de physiothérapie. Sa persistance dans ces environnements médicaux met en évidence son adaptabilité et son potentiel en tant que pathogène opportuniste. Grâce à sa remarquable plasticité génomique, sa capacité d'adaptation exceptionnelle et à sa robuste capacité de survie, *P. aeruginosa* peut persister sur des surfaces sèches et inanimées en milieu hospitalier pendant des périodes allant de 6 heures à 6 mois (Spagnolo et al., 2021).

Bien que *P. aeruginosa* soit une bactérie d'origine environnementale, elle peut être présente de manière commensale dans la flore microbienne normale de l'homme. Les taux de colonisation observés dans des sites spécifiques varient, allant de 0 à 2 % pour la peau, de 0 à 3,3 % pour la muqueuse nasale, de 0 à 6,6 % pour la gorge, et de 2,6 à 24 % dans les échantillons fécaux (Lister et al., 2009; Morrison Jr & Wenzel, 1984). Cette colonisation peut parfois entraîner des infections communautaires typiques, notamment des infections cutanées et des tissus mous, comme la folliculite due à l'utilisation de jacuzzis, des kératites liées aux lentilles de contact, ainsi que des otites externes (Lyczak et al., 2000).

Cependant, il est important de noter que les taux de colonisation peuvent considérablement augmenter, dépassant parfois 50 %, lors d'une hospitalisation. Cela peut entraîner une grande variété de maladies, en particulier chez les patients ayant subi un traumatisme ou une altération des barrières cutanées ou muqueuses, par exemple, suite à une ventilation mécanique, une trachéotomie, l'usage de cathéters, une intervention chirurgicale ou des brûlures graves. Les individus dont le système immunitaire est affaibli présentent un risque accru de colonisation par *P. aeruginosa*. De plus, il a été démontré que la perturbation de la flore microbienne normale due à un traitement antimicrobien favorise également la colonisation par cette bactérie (Reynolds & Kollef, 2021).

Les infections nosocomiales engendrées par *P. aeruginosa* se caractérisent par leur tendance à présenter un caractère invasif, touchant diverses zones telles que la circulation sanguine, les voies urinaires, les sites chirurgicaux, et les voies respiratoires. Il est également remarquable que *P. aeruginosa* occupe une position significative dans plusieurs catégories d'infections nosocomiales. En effet, cette bactérie se classe au deuxième rang en ce qui concerne les pneumonies nosocomiales, au troisième rang pour les infections des voies urinaires, au quatrième rang pour les infections post-intervention chirurgicale, et se positionne en cinquième

position parmi les agents pathogènes les plus répandus à l'échelle mondiale. De plus, elle se classe au septième rang pour les cas de sepsis (Sathe et al., 2023).

Il est à noter que ces infections nosocomiales associées à *P. aeruginosa* sont relativement courantes, représentant entre 11 et 13,8 % de toutes les infections nosocomiales, avec un taux encore plus élevé, oscillant entre 13,2 et 22,6 %, chez les patients hospitalisés en unité de soins intensifs. Cette prévalence souligne l'importance continue de la recherche et de la prise de mesures efficaces pour atténuer ces infections nosocomiales à *P. aeruginosa* (Moore & Flaws, 2011).

#### **1.4. Epidémiologie de *P. aeruginosa* en Algérie**

La classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a identifié *P. aeruginosa* comme une priorité cruciale nécessitant le développement de nouvelles approches thérapeutiques (Tacconelli et al., 2018). Une étude épidémiologique multicentrique menée dans 19 pays du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord confirme que *P. aeruginosa* occupe une position centrale en tant qu'agent pathogène, notamment parmi les bactéries ESKAPE résistantes (Al-Orphaly et al., 2021).

Les travaux menés au cours de la dernière décennie sur l'épidémiologie de *P. aeruginosa* en Algérie soulignent son rôle préoccupant, en particulier dans les contextes hospitaliers et diverses infections. Les investigations réalisées dans différentes régions du pays fournissent des informations cruciales sur la prévalence et la distribution de cette bactérie.

Dans le nord-est de l'Algérie, une étude multicentrique menée par Mellouk et al., entre 2013 et 2015 révèle qu'au sein des 186 bacilles à Gram négatif examinés, 86,5% étaient des entérobactéries, comprenant *Escherichia coli* (29%) et *Klebsiella* spp. (29,5%), tandis que *P. aeruginosa* représentait 9,6% (Mellouk et al., 2017). Ainsi, une enquête de prévalence portant sur l'ensemble des malades hospitalisés dans l'unité de soins intensifs de l'hôpital Ibn Rochd à Annaba entre 2014 et 2016 a identifié *P. aeruginosa* dans 25% des 152 bacilles à Gram négatif (Toumi et al., 2018).

À l'Hôpital Militaire MS Nekkache d'Alger, une étude sur les brûlures entre 2015 et 2018 indique que *P. aeruginosa* est la bactérie Gram-négative la plus fréquemment isolée, constituant 33,91% des 1 254 échantillons (A Tchakal-Mesbahi et al., 2021). Entre 2016 et juin 2018, dans l'étude menée par Bouharkat sur un total de 231 pieds diabétiques, 39,83 % étaient associés à des entérobactéries, avec *E. coli* étant le plus souvent isolé (19,91 %) suivi de *K. oxytoca* à 6,06 %. Les bacilles Gram négatif non fermentant représentaient 22,95 % des isolats, parmi lesquels 15,59 % étaient des souches de *P. aeruginosa* (Bouharkat et al., 2020).

En 2019 à Tizi-Ouzou, *P. aeruginosa* a dominé la prévalence des uropathogènes, représentant 12,21% des cas (Ait-Mimoune et al., 2022). De même, Aiza et ses collaborateurs ont démontré dans une étude menée à l'hôpital public d'Ain Defla entre 2016 et 2020 sur des patients présentant des plaies cutanées purulentes que *P. aeruginosa*, avec une fréquence de 23,45%, occupe la troisième position en tant qu'agent responsable d'infections. Cette position est précédée par *E. coli* (30,3%) et *K. pneumoniae* (25,52%), soulignant ainsi l'implication significative de *P. aeruginosa* dans ce type d'infections (Aiza et al., 2023).

Ces travaux ont également mis en lumière des niveaux élevés de résistance à divers antibiotiques, comprenant les  $\beta$ -lactamines, la ciprofloxacine, la colistine, la gentamicine, l'amikacine et la lévofloxacine (Bouharkat et al., 2020). De plus, une diversité génétique des mécanismes de résistance a été observée, englobant à la fois des gènes de résistance acquis tels que blaVIM et des mutations dans des gènes chromosomiques tels que oprD et ampC. La détection de plusieurs types de carbapénèmases, notamment blaVIM-2, blaVIM-4 et blaPSE-1, souligne la nécessité d'une surveillance continue et d'une stratégie de traitement adaptée (Al-Orphaly et al., 2021; Zaidi et al., 2020).

Les études, en particulier la recherche multicentrique dirigée par Seffraoui et al., (2014), ainsi que d'autres investigations, ont mis en évidence une tendance alarmante à la résistance aux carbapénèmes, caractérisée par des taux significatifs de résistance et la présence fréquente de gènes de carbapénémase au sein des isolats (Meradji et al., 2016).

L'identification de souches de *P. aeruginosa* portant des gènes de résistance tels que blaCTX-M2, blaTEM et blaPER souligne également l'importance de la résistance aux  $\beta$ -lactamines dans ce contexte spécifique. La prévalence élevée des mutations dans oprD est particulièrement préoccupante, étant associée à une résistance accrue aux carbapénèmes. Ces constatations soulignent la nécessité de stratégies intégrées visant à contrôler la propagation de la résistance aux antibiotiques et à guider les approches thérapeutiques de manière appropriée (Tchakal-Mesbahi et al., 2021; Moghnieh et al., 2018).

## **1.5. Les infections à *P aeruginosa***

### 1.5.1. Infections des voies respiratoires.

Le bacille pyocyanique vient en deuxième position, juste après *Staphylococcus aureus*, en ce qui concerne les infections respiratoires aiguës des voies respiratoires inférieures (Kollef et al., 2014). Ces infections sont souvent de nature grave et peuvent parfois nécessiter une assistance respiratoire mécanique. Parmi ces affections, la pneumonie nosocomiale (PN) et la pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAV) suscitent une préoccupation particulière, car elles représentent jusqu'à 22 % de toutes les infections nosocomiales (Reynolds & Kollef, 2021).

*P. aeruginosa* occupe une place importante dans les cas de PAV, étant responsable de 10 à 20 % des isolats avec des taux de mortalité estimés à 32 % à 42,8 %. Une étude multicentrique a même révélé que *P. aeruginosa* était la cause la plus fréquente de PAV dans le monde, représentant 26 % des cas. Les principaux facteurs de risque incluent la colonisation préalable par *P. aeruginosa* et une hospitalisation prolongée (Reynolds & Kollef, 2021).

Outre les infections aiguës, *P. aeruginosa* est également associée à des exacerbations plus fréquentes et à un taux de mortalité plus élevé chez les individus atteints de plusieurs maladies qui représentent un terrain favorisant sa colonisation, notamment la fibrose kystique (FK), la bronchectasie, bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la panbronchiolite diffuse (Nagaoka et al., 2019).

L'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de FK constitue actuellement la principale source de morbidité et de mortalité associées à cette maladie héréditaire (Streeter & Katouli, 2016; Lyczak, et al., 2000). *P. aeruginosa* est reconnu pour sa capacité à établir une colonisation persistante des voies respiratoires, engendrant des infections pulmonaires chroniques et une détérioration progressive de la fonction pulmonaire. Cette colonisation découle principalement de la pathogenèse de la FK, caractérisée par l'accumulation de mucus épais et visqueux dans les voies respiratoires, entraînant des obstructions et favorisant l'hypoxie (Jurado-Martín et al., 2021), créant ainsi un environnement propice à la colonisation des souches mucoïdes de *P. aeruginosa*. qui sécrètent de l'alginate pour se protéger des défenses immunitaires, notamment l'appareil mucociliaire, les cellules phagocytaires, les anticorps, et le système du complément (Lund-Palau et al., 2016; Magill et al., 2014)

Les patients atteints de BPCO présentent des symptômes similaires, notamment une altération de la clairance mucociliaire, facilitant la colonisation et l'infection par *P. aeruginosa*. La

pathogène de cette infection est complexe, impliquant divers facteurs de virulence, dont la formation du biofilm et la sécrétion des protéases extracellulaires, telles que l'élastase et la protéase alcaline, associées à des lésions pulmonaires, l'exotoxine A et l'exoenzyme S contribuant à la destruction pulmonaire, et la pyocyanine, qui influence la réponse immunitaire et l'apoptose des neutrophiles (Wavre-Oberhänsli & Nicod, 2010)

#### 1.5.2. Les infections des voies urinaires

*P. aeruginosa*, le troisième agent pathogène le plus courant après *E. coli* et *Proteus mirabilis* (Mittal et al., 2009), est largement impliqué dans les infections urinaires nosocomiales en particulier les infections urinaires associées aux cathéters. Il est responsable d'environ 10 % de toutes les infections urinaires associées aux cathéters et peut représenter jusqu'à 16 % des cas d'infections urinaires chez les patients en soins intensifs (Reynolds & Kollef, 2021). De plus, environ 13 % des infections à *P. aeruginosa* sont attribuables à des souches multirésistantes, ce qui présente un défi majeur en matière de traitement (Newman et al., 2017). Ces infections surviennent souvent après cathétérisme, instrumentation ou chirurgie, avec une prévalence élevée chez les patients atteints de maladies chroniques sous-jacentes. Les taux de mortalité peuvent atteindre 20 %, notamment en cas de maladies chroniques avancées et de traitement antimicrobien inadéquat (Bassetti et al., 2018).

Les sondes urinaires de points d'entrée pour la bactérie, favorisant la formation de biofilms sur leur surface. De plus, l'insertion du cathéter peut perturber les muqueuses, favorisant la colonisation bactérienne (Streeter & Katouli, 2016). La virulence de *P. aeruginosa* implique divers facteurs cellulaires comme l'alginate, le lipopolysaccharide (LPS), le flagelle, les adhésines pilus et non pilus ainsi qu'à des exoenzymes ou la sécrétion des facteurs de virulence comme la protéase, l'élastase, la phospholipase, la pyocyanine, exotoxine A, exoenzyme S, hémolysines (rhamnolipides) et sidérophores (Mittal et al., 2009). Par ailleurs, les infections multirésistantes sont liées à des coûts par patient considérablement accrus, pouvant atteindre jusqu'à 70 % de plus que ceux associés à une infection non résistante (Newman et al., 2017).

#### 1.5.3. *P. aeruginosa* à l'origine d'infections de la peau et des tissus mous.

*P. aeruginosa*, en tant que pathogène redoutable, est associé à diverses manifestations cliniques, principalement dans le contexte des infections de la peau et des tissus mous. Parmi ces infections, deux syndromes cliniques particuliers requièrent une attention particulière:



l'ecthyma gangrenosum et les infections consécutives à des brûlures graves (Bassetti et al., 2018).

L'ecthyma gangrenosum est une vascularite cutanée sévère, typiquement observée chez les patients neutropéniques. Elle se caractérise par des lésions cutanées initialement érythémateuses, indolores, évoluant rapidement vers des ulcères gangreneux douloureux, préférentiellement localisés dans les zones fessières et périnéales. Le diagnostic précoce implique des prélèvements d'hémocultures, des cultures d'exsudats, et des biopsies cutanées pour isoler *P. aeruginosa* ou d'autres agents pathogènes potentiels

En contexte d'infections liées aux brûlures, *P. aeruginosa* occupe une place centrale en tant qu'agent pathogène Gram négatif (Sader et al., 2021). Cette implication majeure découle de la gravité de l'état clinique des patients brûlés, de la résistance fréquente de *P. aeruginosa* aux antibiotiques, et de l'environnement humide caractéristique de ces patients qui favorise la prolifération de cette bactérie. Cliniquement, les infections cutanées causées par *P. aeruginosa* se manifestent par une coloration jaune ou verte distinctive et une odeur désagréable, avec un potentiel d'évolution vers une forme invasive, accompagnée de lésions cutanées bleu-violacées. Cette association est étroitement liée au risque de septicémie et de décès. Les cultures tissulaires et les écouvillonnages révèlent fréquemment la présence de *P. aeruginosa*, atteignant jusqu'à 57 % de positivité dans les infections par brûlure (Gang et al., 1999). De plus, environ 15 % des infections sanguines systémiques chez les patients brûlés sont attribuables à *P. aeruginosa*, et les souches multirésistantes de cette bactérie deviennent de plus en plus préoccupantes en tant que cause de décès, contribuant à environ 86 % des cas de septicémie en unités de soins intensifs pédiatriques pour brûlés (Bassetti et al., 2018).

*P. aeruginosa* déploie divers facteurs de virulence dans les infections associées aux brûlures. Les pili et les flagelles de cette bactérie revêtent une importance majeure dans la dissémination de l'infection. L'élastase, quant à elle, agit en dégradant les protéines de l'hôte et en altérant la membrane basale, favorisant ainsi la dissémination en éliminant les obstacles physiques qui normalement entravent la propagation de l'infection (Bejarano et al., 1989). Les protéases exercent des effets délétères sur la réponse immunitaire innée et acquise de l'hôte, notamment en inhibant le chimiotactisme des monocytes, ce qui peut compromettre l'élimination précoce de *P. aeruginosa* par phagocytose et la présentation ultérieures des antigènes bactériens au système immunitaire de l'hôte. En outre, la phospholipase C, la protéine de liaison à la

ferripyochéline, le LPS et les exoproduits sécrétés par l'appareil de sécrétion de type III sont également impliqués dans la pathogenèse de ces infections (Lyczak et al., 2000).

#### 1.5.4. *P. aeruginosa* à l'origine d'une kératite bactérienne

La kératite, une affection ophtalmologique caractérisée par une inflammation de la cornée, peut entraîner une perte de vision significative, en particulier dans les cas graves. Cette maladie peut avoir diverses origines, qu'elles soient infectieuses, résultant d'une infection microbienne, ou non infectieuses, telles que des dommages causés par un traumatisme oculaire, une exposition à des produits chimiques ou à la lumière ultraviolette (Hilliam et al., 2020).

La kératite microbienne, en particulier celle associée à l'utilisation de lentilles de contact, est souvent liée à *P.aeruginosa*. Cette bactérie est fréquemment isolée dans les prélèvements cornéens liés à l'utilisation inappropriée de lentilles. La kératite à *P.aeruginosa* se caractérise par des ulcères cornéens, une néovascularisation, une cicatrisation, et potentiellement une perte de vision, même avec une antibiothérapie appropriée (O'Callaghan et al, 2019; Fleiszig & Evans, 2002)

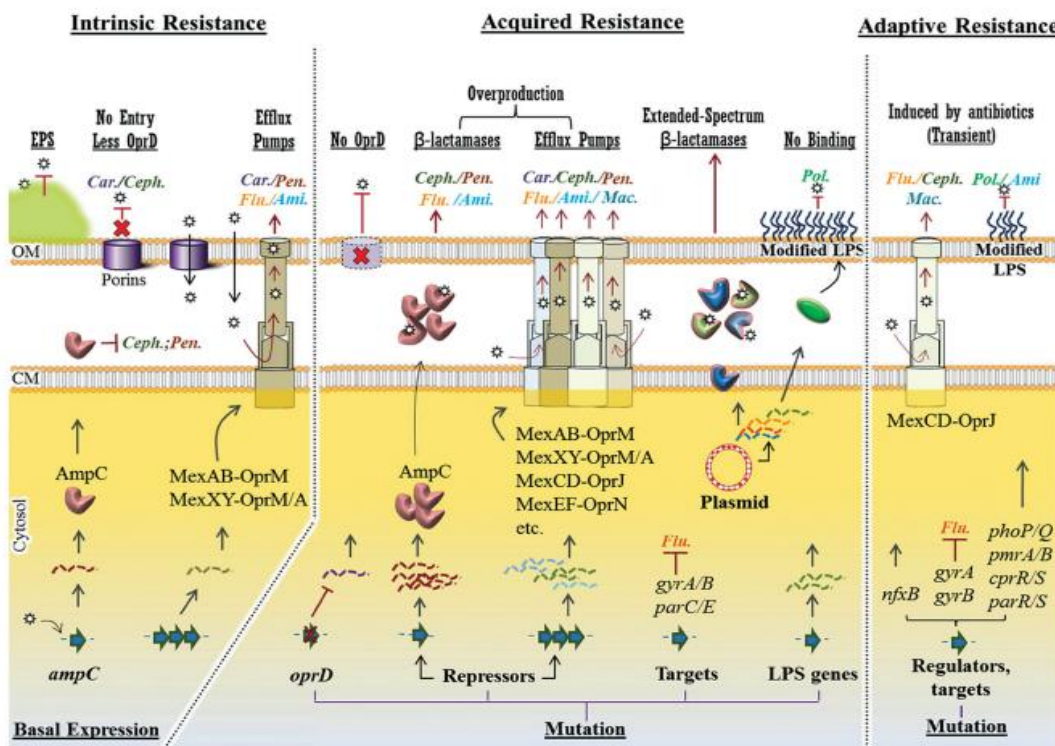
Les manifestations cliniques de la kératite à *P. aeruginosa* incluent un infiltrat diffus avec un œdème stromal péri-lésionné, des sécrétions muco-purulentes, un anneau immunitaire, un hypopion, une fonte stromale, et éventuellement un descémétocèle pouvant conduire à une perforation. Une caractéristique distinctive est la formation d'un abcès annulaire (Hilliam et al., 2020).

*P. aeruginosa* déploie plusieurs facteurs de virulence, tels que le glycocalyx, l'endotoxine, l'exotoxine, la protéase, les flagelles et les pili. Le glycocalyx favorise l'adhérence bactérienne et résiste à la phagocytose. L'endotoxine contribue à la pathogenèse en médiatisant l'adhérence et la survie intracellulaire, tout en stimulant les réponses inflammatoires et immunitaires de l'hôte. Les protéases de *P. aeruginosa*, dont la protéase IV et la petite protéase, jouent un rôle crucial dans la dégradation du tissu cornéen (Lyczak et al., 2000; O'Callaghan et al., 2019).

Les cas de kératite à *Pseudomonas* présentent un pronostic défavorable, surtout en l'absence d'un traitement précoce. Même après l'élimination rapide des bactéries par l'antibiothérapie, les produits bactériens et la réponse inflammatoire persistent, endommageant l'œil. Bien que les stéroïdes puissent atténuer la réponse immunitaire, aucun médicament n'inhibe efficacement l'activité des produits bactériens (O'Callaghan et al., 2019).

### 1.6. *P.aeruginosa* et la résistance aux antibiotiques

La prise en charge des infections à *P. aeruginosa* est complexe en raison de sa résistance, constituant un défi majeur dans le traitement de ces infections. Les mécanismes de résistance de *P. aeruginosa* sont généralement classés en résistance intrinsèque, acquise et adaptative (Figure 1), déployés par la bactérie pour contrer les attaques antibiotiques. La résistance intrinsèque comprend une perméabilité réduite de la membrane externe, l'expression de pompes d'efflux expulsant les antibiotiques et la production d'enzymes inactivant ces agents. La résistance acquise peut résulter du transfert horizontal de gènes de résistance ou de mutations génétiques. La résistance adaptative se manifeste par la formation de biofilms dans les poumons des patients, agissant comme une barrière de diffusion limitant l'accès des antibiotiques aux cellules bactériennes. De plus, des cellules persistantes multirésistantes peuvent émerger dans le biofilm, contribuant à des infections prolongées et récurrentes, notamment chez les patients atteints de mucoviscidose (Pang et al., 2019; Poole, 2011).



**Figure 1 :** Les mécanismes intrinsèques, acquis et adaptatifs confèrent une résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*. (Lodise, 2016)

Car = carbapénèmes ; Ceph = céphalosporines ; Pen = pénicillines ; Ami = aminoglycosides ; Flu = fluoroquinolones ; Mac = macrolides et Pol = polymyxines. CM = membrane cytoplasmique ; LPS = lipopolysaccharide ; OM = membrane externe.

### 1.6.1. Résistance intrinsèque aux antibiotiques

#### 1.6.1.1. Perméabilité de la membrane externe

Le traitement des infections à *P. aeruginosa* implique la nécessité pour la plupart des antibiotiques de traverser la membrane cellulaire pour atteindre le compartiment intracellulaire et exercer leur action. Cependant, la membrane externe de *P. aeruginosa* représente un obstacle majeur à cette pénétration. Sa perméabilité est remarquablement limitée, environ 12 à 100 fois inférieure à celle d'*E. coli*. Composée principalement de molécules phospholipidiques bicouches, de LPS et de porines incorporées dans des phospholipides, la membrane externe se compose de divers types de porines aux fonctions spécifiques. Ces porines, tels que les porines non spécifiques (OprF), les porines spécifiques (OprB, OprD, OprE, OprO et OprP), les porines fermées (OprC et OprH) et les porines d'efflux (OprM, OprN et OprJ), sont exploités par *P. aeruginosa* pour moduler la pénétration des antibiotiques, augmentant ainsi la résistance (Gul et al., 2023).

Certains exemples incluent OprF, qui favorise la formation du biofilm, assurant la protection contre les antibiotiques. Les mutations dans les porines spécifiques OprD entraînent une résistance aux carbapénèmes, présentant un défi majeur en clinique. La protéine OprH améliore la stabilité de la membrane externe et régule la résistance aux antibiotiques. Les porines d'efflux OprM, OprN et OprJ contribuent à l'élimination active d'antibiotiques tels que la tétracycline, la norfloxacine et les  $\beta$ -lactamines. Ainsi, la diversité et la sophistication des mécanismes de régulation des porines illustrent la complexité des adaptations de *P. aeruginosa* pour contrecarrer la pénétration des antibiotiques et accroître sa résistance (Pang et al., 2019).

#### 1.6.1.2. Systèmes d'efflux

Les pompes à efflux bactériennes, regroupées en cinq familles dont la Résistance-Nodulation-Division (RND), jouent un rôle crucial en expulsant les substances toxiques hors de la cellule. Chez *P. aeruginosa*, les protéines de la famille RND sont particulièrement significatives dans la résistance aux antibiotiques. Ces pompes comprennent des transporteurs membranaires cytoplasmiques, des protéines de liaison périplasmiques et des canaux poriques dans la membrane externe. Les composants des pompes RND de *P. aeruginosa* sont désignés par le terme "efflux multidrogue" (Mex) suivi d'une lettre, tandis que les porines externes sont appelées "Opr" suivies d'une lettre. *P. aeruginosa* possède douze pompes de la famille RND,

dont quatre (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY-OprM) contribuent à la résistance aux antibiotiques (Strateva & Yordanov, 2009), comme indiqué dans le Tableau 1.

**Tableau 1** : Structure et spécificité du substrat des systèmes actifs d'efflux à trois composants chez *Pseudomonas aeruginosa*.(Strateva & Yordanov, 2009)

Pompe de la membrane cytoplasmique	Lien périplasmique	Canal de la membrane externe	Substrat
MexB	MexA	OprM	Quinolones, macrolides, tétracyclines, lincomycine, chloramphénicol, novobiocine, $\beta$ -lactames sauf imipénem
MexD	MexC	OprJ	Quinolones, macrolides, tétracyclines, lincomycine, chloramphénicol, novobiocine, pénicillines sauf carbenicilline et sulbenicilline, cefépime, cefpirome, méropénem
MexF	MexE	OprN	Fluoroquinolones, carbapénèmes
MexY	MexX	OprM	Quinolones, macrolides, tétracyclines, lincomycine, chloramphénicol, aminoglycosides, pénicillines sauf carbenicilline et sulbenicilline, cefépime, cefpirome, méropénem

### 1.6.1.3. Enzymes inactivant les antibiotiques

Les antibiotiques contiennent fréquemment des liaisons chimiques telles que des amides et des esters, et les bactéries peuvent synthétiser des enzymes inactivant les antibiotiques (hydrolases) pour dégrader ou modifier ces composés, entraînant ainsi une résistance aux antibiotiques. *P. aeruginosa*, comme d'autres bactéries à Gram négatif, possède un gène ampC inductible codant pour une enzyme hydrolytique, la  $\beta$ -lactamase. Cette dernière peut rompre les liaisons amides des cycles  $\beta$ -lactames, neutralisant ainsi les antibiotiques de cette classe. Les  $\beta$ -lactamases sont classées en A, B, C et D en fonction de leurs séquences d'acides aminés. Les classes A, C et D agissent via un site actif contenant de la sérine, tandis que les  $\beta$ -lactamases de classe B sont des métalloenzymes nécessitant des ions zinc divalents pour leur activité. Certaines souches de *P. aeruginosa* produisent des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE), conférant une résistance notable à de nombreux antibiotiques  $\beta$ -lactamines, tels que les pénicillines, les céphalosporines et l'aztréonam (Pang et al, 2019).

La résistance aux aminosides chez *P. aeruginosa* résulte de divers mécanismes, incluant une perméabilité cellulaire réduite, un efflux accru, des altérations ribosomales et des modifications enzymatiques. Parmi ceux-ci, la modification enzymatique des groupes amino et glycosides dans la structure moléculaire des aminosides joue un rôle prépondérant. Trois types d'enzymes modifiant les aminosides ont été identifiés chez les bactéries : l'aminoside phosphotransférase (APH), l'aminoside acétyltransférase (AAC) et l'aminoside nucléotidyltransférase (ANT) (Ramirez & Tolmasky, 2010).

#### 1.6.2. Résistance acquise aux antibiotiques

En plus de sa forte résistance intrinsèque aux antibiotiques, *P. aeruginosa* développe une résistance acquise par des mutations ou l'acquisition de gènes via le transfert horizontal, favorisant les souches multirésistantes et compliquant l'éradication, conduisant à des infections persistantes (Munita & Arias, 2016).

##### 1.6.2.1. Résistance par mutations

Les changements mutationnels impactent l'absorption des antibiotiques, modifient les cibles et induisent la surexpression des pompes d'efflux et des enzymes inactivant les antibiotiques, permettant aux bactéries de survivre en présence d'agents antimicrobiens. Les mutations peuvent altérer l'expression ou la fonction des porines, réduisant la perméabilité membranaire et augmentant la résistance. Par exemple, le déficit en OprD chez *P. aeruginosa* confère une forte résistance aux carbapénèmes, comme l'imipénème. La surexpression de MexAB-OprM, due à des mutations génétiques des régulateurs transcriptionnels mexR, nalB, nalC ou nalD, accroît la résistance aux  $\beta$ -lactamines et fluoroquinolones. De même, la mutation du gène mexZ induit une surexpression de MexXY-OprM, conférant une résistance renforcée aux aminosides,  $\beta$ -lactamines et fluoroquinolones chez *P. aeruginosa* (Qin et al., 2022).

##### 1.6.2.2. Acquisition de gènes de résistance

Les gènes de résistance aux antibiotiques sont véhiculés par divers éléments génétiques comme les plasmides, transposons, intégrons et prophages, permettant un transfert horizontal entre différentes bactéries. Les mécanismes clés incluent la transformation, la transduction et la conjugaison. Par exemple, chez *P. aeruginosa*, six types de métallobêta-lactamases (MBL)

sont décrits, tels que l'imipénémase (IMP) et la métallo- $\beta$ -lactamase de Vérone (VIM), résistants aux  $\beta$ -lactamines. Ces gènes MBL sont associés à des éléments génétiques comme les intégrons et les plasmides, illustrant la diversité des mécanismes d'acquisition de la résistance chez *P. aeruginosa* (Pang et al., 2019).

### 1.6.3. Résistance adaptative aux antibiotiques

La résistance adaptative accroît la capacité bactérienne à survivre aux antibiotiques grâce à des altérations transitoires de l'expression génique ou protéique en réponse à un stimulus environnemental. Cette résistance, réversible à la suppression du stimulus, est bien caractérisée chez *P. aeruginosa* par des mécanismes tels que la formation de biofilm et la génération de cellules persistantes. Ces adaptations conduisent à des infections persistantes, particulièrement préoccupantes chez les patients atteints de mucoviscidose, soulignant l'importance de comprendre et de contrer ces mécanismes pour améliorer l'efficacité des traitements antibiotiques (Sandoval-Motta & Aldana, 2016; Taylor et la., 2014).

#### 1.6.3.1. Résistance médiée par le biofilm

Les biofilms, matrices bactériennes tridimensionnelles, jouent un rôle crucial dans la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa*. Outre les phénotypes cellulaires individuels, la formation de biofilm confère une tolérance au niveau de la population. Les mécanismes sous-jacents comprennent la prévention de la pénétration des antibiotiques, la modification du microenvironnement favorisant une croissance cellulaire lente, l'induction d'une réponse adaptative au stress et la différenciation cellulaire persistante. La caractéristique essentielle des biofilms est leur capacité à survivre à des concentrations élevées d'antibiotiques, principalement en restreignant la pénétration des antibiotiques dans le biofilm. Cela protège les bactéries en profondeur, limitant également l'accès aux nutriments et à l'oxygène, induisant ainsi une croissance plus lente. Cliniquement, les infections liées aux biofilms de *P. aeruginosa* sont fréquentes dans divers contextes, présentant des défis substantiels en raison de la difficulté à éliminer complètement ces structures bactériennes résilientes (Masák et al., 2014).

#### 1.6.3.2. Cellules persistantes

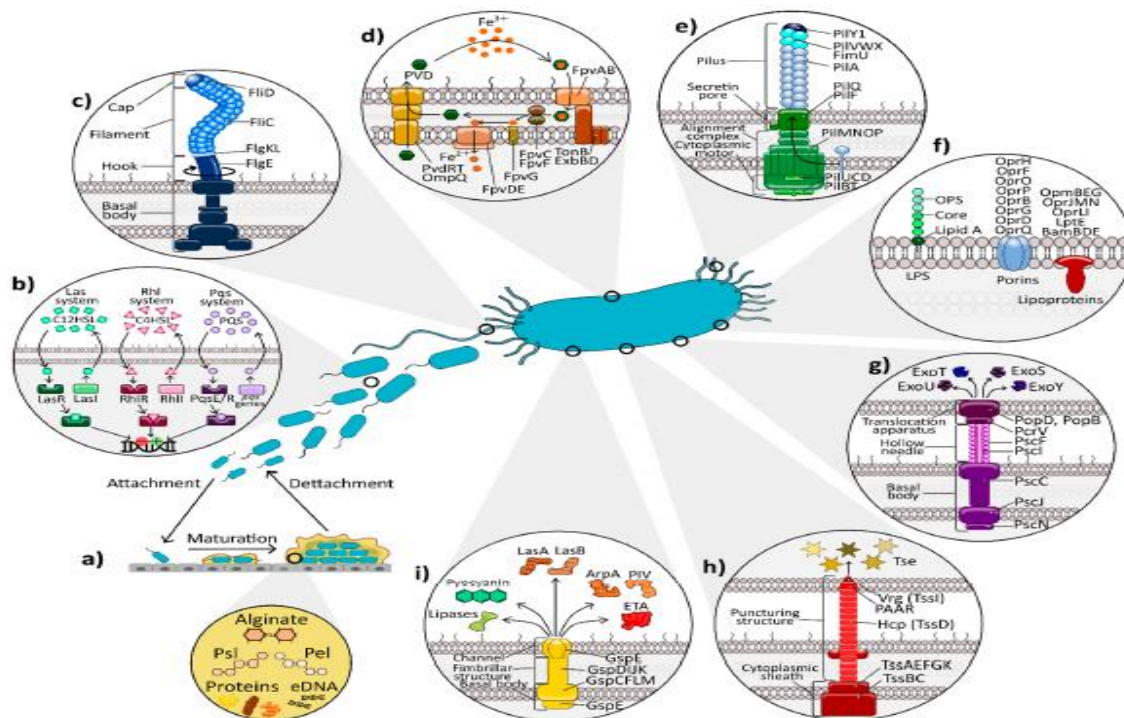
Les cellules persistantes, un phénotype bactérien tolérant aux antibiotiques, entrent en dormance métabolique mais redeviennent sensibles aux antibiotiques une fois les

concentrations antibiotiques sous le seuil minimal inhibiteur, rendant la population à nouveau sensible aux antibiotiques. Un obstacle majeur dans le traitement des infections à *P. aeruginosa* est la formation de ces cellules persistantes, variantes phénotypiques non génétiquement résistantes mais tolérantes aux antibiotiques. Leur persistance est transitoire et résulte de réponses hétérogènes à l'environnement. Comptant pour environ 1 % des cellules du biofilm, elles sont à croissance lente, inactives métaboliquement et très tolérantes aux antibiotiques. Bien que tuables par les antibiotiques, elles peuvent repeupler les biofilms en raison de leur état dormant, augmentant le risque d'infections récurrentes malgré leur faible occurrence (Tuon et al, 2022).

### **1.7. Facteurs de virulences chez *P.aeruginosa***

*P. aeruginosa* présente un vaste éventail de facteurs de virulence, tant cellulaires qu'extracellulaires, qui jouent un rôle crucial dans sa pathogenèse (Figure 2). Ces éléments sont soumis à une régulation complexe, orchestrée par des circuits et des systèmes de signalisation interconnectés, conférant ainsi à cet agent pathogène une remarquable plasticité. La virulence de *P. aeruginosa* se manifeste par sa capacité à infecter l'hôte, déclenchant des symptômes cliniques à travers des mécanismes tels que l'attachement bactérien, la colonisation, l'invasion, la perturbation des tissus, la suppression immunitaire, et l'épuisement des nutriments de l'hôte (Liao, Huang, Wang, Yao, & Lu, 2022).





**Figure 2 :** Présentation schématique des principaux facteurs de virulence utilisés par *P. aeruginosa* lors d'infections respiratoires (Jurado-Martín et al., 2021)

a) capacité de formation de biofilm et composition de la matrice extracellulaire des biofilms (exopolysaccharides, protéines et ADN extracellulaire) ; b) les trois principaux systèmes de détection de population (Las, Rhl et Pqs) ; c) les flagellines FliC et FliD incorporées dans la structure flagellaire ; d) la sidérophore pyoverdine en tant que système d'absorption du fer ; e) les pili de type IV (T4P) ; f) le lipopolysaccharide et les protéines de la membrane externe ; g) le système de sécrétion de type III (T3SS) et ses quatre principaux effecteurs ; h) le système de sécrétion de type VI (T6SS) ; i) le système de sécrétion de type II (T2SS) et les composés qu'il libère dans le milieu extracellulaire : enzymes lytiques (lipases, protéases et élastases (LasA et LasB)), exotoxine A (ETA) et pyocyanine

### 1.7.1. Facteurs impliqués dans l'adhérence et la motilité de *P. aeruginosa*.

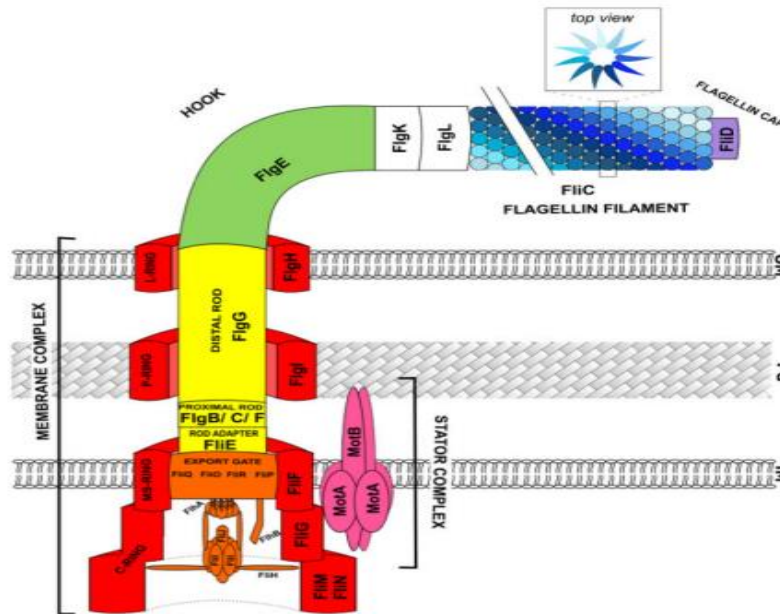
#### 1.7.1.1. Le flagelle

*P. aeruginosa* présente un flagelle polaire unique, constitué de plusieurs composants cruciaux pour sa motilité (Figure 3). Le flagelle se compose d'un filament hélicoïdal polymérisé, constitué de sous-unités protéiques appelées flagellines (FliC), disposées de manière hélicoïdale. La protéine (FliC) se caractérise par trois domaines distincts (D0, D1, D2) et se décline en deux sérotypes, Fli-a et Fli-b (Jurado-Martín et al., 2021; Song & Yoon, 2014).

Le filament est accompagné d'une protéine de coiffe spécifique au type (FliD), qui joue un rôle essentiel dans la structure. À la base du filament, le crochet (FlgE) est présent, ainsi que deux protéines de jonction filament-crochet (FlgKL) qui agissent comme un joint flexible, permettant de moduler l'angle de rotation du flagelle (Belas, 2014)

Le corps basal du flagelle comprend divers composants qui traversent les membranes externes et internes. Ces composants ancrent le flagelle à la membrane cellulaire, facilitent sa rotation,

et permettent la sécrétion des composants terminaux. Le rotor, composé de FliF et du cercle C (FliG, FliM, FliN), tourne grâce au stator (MotA et MotB), un canal ionique qui fournit l'énergie nécessaire à la rotation en permettant le passage des ions H<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup> (Bouteiller et al., 2021).



**Figure 3:** Représentation chimique de la structure de l'appareil flagellaire. (Bouteiller et al., 2021)

Les flagelles, en tant que dispositif de motilité, jouent un rôle polyvalent dans les processus bactériens, favorisant le déplacement, la chimiotaxie et l'adhésion bactérienne. Dans le contexte de *P. aeruginosa*, la régulation des flagelles par le c-di-GMP influence la formation du biofilm. Cette régulation, via FleQ et l'expression des gènes *pel*, contribue significativement au développement du biofilm, de la forme planctonique à la forme communautaire (Belas, 2014; Feldman et al., 1998).

Le flagelle, bien que principalement responsable de la motilité de nage dans des environnements aqueux "swimming", est également impliqué dans l'essaimage sur des surfaces solides "swarming". Son rôle crucial dans l'adhérence aux cellules épithéliales respiratoires est médié par la protéine FliC, qui agit comme un élément clé en se liant à divers composants membranaires comme les mucines respiratoires et le glycolipide asialoGM1.

En termes de virulence, le flagelle de *P. aeruginosa*, en interagissant avec des récepteurs tels que Toll-like, TR5 et TR2, déclenche une réponse inflammatoire cruciale. Cette immunogénicité élevée conduit à la production d'IL-8, IL-6 et mucine, soulignant l'importance du flagelle dans la virulence. Les préparations d'antigènes flagellaires, notamment un vaccin

cocktail intégrant la flagelline B, ont montré leur efficacité en générant une immunité protectrice (Haiko & Westerlund-Wikström, 2013; Khalifa et al., 2011; Adamo et al., 2004).

Lors d'infections aiguës, le flagelle de *P. aeruginosa* se révèle crucial pour la virulence en favorisant le chimiotactisme et la motilité. En revanche, dans le contexte des infections chroniques, notamment dans la mucoviscidose, le flagelle, très immunogène, subit une pression de sélection. Pour échapper à la réponse immunitaire, la bactérie s'adapte en privilégiant des variants dépourvus de flagelle. Ces souches, exemptes de flagelles, facilitent une implantation durable en résistant à l'évacuation par les phagocytes. La perte de motilité contribue également à la formation de biofilm, favorisant la persistance de *P. aeruginosa* dans l'hôte (Feldman et al., 1998).

Il est crucial de noter que, malgré le fait que 40 % des isolats de *P. aeruginosa* provenant de patients atteints de mucoviscidose ne produisent pas de flagelles, ce facteur de virulence est toujours considéré comme nécessaire à l'infection initiale de ces patients. La mobilité dans des milieux à faible viscosité reste dépendante du flagelle, soulignant ainsi son rôle pivot dans l'adaptation bactérienne au cours d'une infection chronique (Veesenmeyer et al., 2009).

#### 1.7.2. Les pili de type IV

Les pili de type IV (T4P) sont des structures cruciales chez *P. aeruginosa*, jouant un rôle essentiel dans sa virulence. Ces appendices filamenteux rétractables, localisés de manière polaire, agissent comme des adhésines majeures, essentielles pour l'adhésion aux cellules épithéliales. Leur présence n'est pas exclusive à *P. aeruginosa*, car ces pili sont également présents chez de nombreuses autres espèces bactériennes Gram négatif (Liao et al., 2022).

La famille T4P peut être subdivisée en deux groupes, les pili de type IVa (T4aP) et les pili de type IVb (T4bP), chacun caractérisé par des séquences de pilines spécifiques, des longueurs de peptides leaders distinctes et des différences mineures dans leur assemblage. Les T4aP, uniformes et largement distribués, se distinguent des T4bP, plus hétérogènes. Parmi les T4bP, la sous-famille Tad ou Flp pili, regroupe une classe monophylétique appelée "tight adherence pili". Ces pili sont composés principalement de copies répétées d'une protéine de 15 kDa appelée piline (Haiko & Westerlund-Wikström, 2013), la piline majeure PilA, ainsi que de pilines mineures telles que FimUPilVWXY1. Ces dernières, subdivisées en pilines mineures

centrales et non centrales, jouent des rôles essentiels dans la formation, la stabilisation, l'agrégation, l'adhésion et l'absorption de l'ADN (Burrows, 2012).

La structure de PilA comprend trois domaines distincts, notamment une région N-terminale hydrophobe conservée, une région centrale hypervariable et une région C-terminale semi-conservée contenant le domaine de liaison aux cellules épithéliales hôtes. La séquence signal de type III caractéristique est présente dans la région conservée des pili, partagée par les trois sous-groupes (Craig et al., 2019).

La structure des pili peut être divisée en sous-complexes tels que PilBTUCD, PilMNOP et PilQF, responsables respectivement du moteur cytoplasmique, de l'alignement de la membrane interne et du pore de sécrétine de la membrane externe. Bien que *P. aeruginosa* puisse présenter les trois types de T4P simultanément, chaque sous-type a son propre système d'assemblage distinct (Tuon et al., 2022; Jurado-Martín et al., 2021).

Le mouvement du pilus est orchestré par deux ATPases associées à la membrane cytoplasmique, PilB et PilT, qui respectivement polymérisent et dépolymérisent les sous-unités PilA à la base. De plus, la piline mineure PilY1 joue un rôle crucial en reconnaissant spécifiquement un récepteur hôte, liant l'intégrine en RGD- de manière dépendante du calcium. PilY1 est également impliqué dans l'expression, la stabilisation du T4P et pourrait agir comme un mécanosenseur de la virulence induite par l'attachement de *P. aeruginosa*, à l'instar d'autres pilines mineures (Jurado-Martín et al., 2021).

En collaboration avec le flagelle, les pili de type IV sont indispensables à la dispersion des bactéries. Leur implication dans les mobilités de type "twitching" et "swarming" facilite la répétition des phases d'extension, d'attachement et de rétractation, permettant une dispersion efficace sur les surfaces humides (Reynolds & Kollef, 2021; Khalifa et al., 2011).

La biogenèse et la fonction des pili de type IV impliquent la participation de plus de 40 gènes identifiés (Streeter & Katouli, 2016). La régulation de l'expression de ces pili est sous le contrôle du système à deux composants pilS et pilR. Ces pili jouent un rôle central en tant que médiateurs essentiels favorisant l'adhésion à divers types de cellules, facilitant ainsi l'agrégation bactérienne et la liaison à des tissus spécifiques, notamment aux surfaces muqueuses. Leur interaction avec la région glycosylée des glycosphingolipides asialo GM1 et asialo GM2, médiée par la partie C-terminale de la piline A, se révèle particulièrement notable lors de leur

présence à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Reynolds & Kollef, 2021; Streeter & Katouli, 2016; Khalifa et al., 2011).

Les pili de type IV sont impliqués dans la formation de biofilms, l'initiation de la phagocytose non opsonique, et la reconnaissance par les récepteurs phagocytaires (Urgancı et al., 2022). Leur importance dans l'expression de la virulence de *P. aeruginosa* est soulignée dans divers modèles infectieux. La production de pili lors du passage d'un attachement réversible à un attachement irréversible joue un rôle crucial dans le développement, l'agrégation des biofilms, et la formation de structures de capuchon de biofilm en forme de champignon. De plus, l'extrémité du pilus peut lier l'ADN, suggérant son implication dans la transformation naturelle et la formation du biofilm. Toute altération de ces pili entraîne une diminution de l'adhérence aux cellules épithéliales *in vitro* (Jurado-Martín et al., 2021).

#### 1.7.2.1. Facteur d'attachement de type fimbriae (ou Cup)

Les récents développements dans la compréhension des facteurs d'attachement de *P. aeruginosa* ont révélé l'identification d'un nouveau mécanisme crucial. Les pili de type fimbriae, assemblés par la voie "chaperone/usher/pathway" (Cup), ont été mis en évidence comme des éléments essentiels à la formation des biofilms et à l'adhérence aux surfaces abiotiques (Giraud & De Bentzmann, 2012).

Dans le cas spécifique de *P. aeruginosa*, trois systèmes Cup principaux, nommés CupA, CupB et CupC, ont été caractérisés. Récemment, deux autres systèmes, CupD et CupE, ont également été identifiés. Tous ces systèmes se présentent sous forme de clusters de gènes (Vallet et al., 2004).

La voie CupA a été particulièrement étudiée. Elle implique une protéine chaperonne (CupA2, A5) liant les sous-unités fimbriales (CupA1, A4) sécrétées dans le périplasme via le système Sec. La chaperonne facilite le repliement et la stabilisation des pili. Le complexe formé est ensuite transmis à la protéine usher oligomérique (CupA3), créant un pore dans la membrane extérieure et permettant l'assemblage final du pili à la surface externe de la bactérie.

Les fonctions des systèmes CupB, CupC, et CupE sont différenciées dans les interactions cellulaires, la formation de micro-colonies et la maturation des biofilms à différents stades de l'infection. La régulation de ces systèmes est étroitement liée à l'environnement, avec une activation génique en réponse à des conditions anaérobies, des températures basses, ainsi qu'à

des signaux de systèmes à deux composants (TCS) et de c-di-GMP. Les protéines de la famille des Histone-like Nucleoid Structuring (HNS) répriment leur expression. Notamment, l'expression de CupA est impliquée dans le développement d'un phénotype bactérien de type small-colony variant (SCV) auto-agrégatif, fréquemment observé dans les mucoviscidoses (Giraud & De Bentzmann, 2012; Vallet et al., 2001).

#### 1.7.2.2. Le lipopolysaccharide (LPS)

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des composants clés de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, particulièrement significatifs dans le contexte de *P. aeruginosa* en tant que facteurs majeurs de virulence. Ils sont associés à divers processus pathogènes, notamment la protection contre la lyse provoquée par le sérum de l'hôte et la médiation de l'endotoxicité (Khalifa et al., 2011).

Le LPS, en tant qu'endotoxine, peut déclencher une réponse immunitaire excessive, conduisant potentiellement au choc septique et à des issues graves, voire fatales. Dans les voies respiratoires, il stimule la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de mucine gélifiante, contribuant à la morbidité et à la mortalité chez les patients atteints d'asthme, de BPCO et de fibrose kystique (Thomsen et al., 2022).

En plus de son rôle dans la protection contre la lyse et son activité endotoxique, les LPS influent sur la réponse inflammatoire, interagissent avec le tissu hôte, et augmentent la perméabilité de l'épithélium des voies respiratoires. Cette augmentation de perméabilité est associée à l'induction d'une inflammation pulmonaire par la stimulation de cytokines telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6 et l'IFN- $\gamma$  (Jurado-Martín et al., 2021).

Les LPS de *P. aeruginosa* jouent également un rôle dans la résistance aux antibiotiques, influençant la formation de vésicules de la membrane externe et des biofilms. La capacité de *P. aeruginosa* à synthétiser différents types de LPS (A et B) avec des variations dans le squelette moléculaire, en particulier le lipide A, a des implications significatives pour son adaptation à diverses conditions de croissance (Huszczynski et al., 2019).

La structure du LPS comprend le lipide A, responsable de l'activité endotoxique, le cœur oligosaccharidique, et l'antigène O (O-polysaccharide), qui présente une grande variabilité et est immunogène. Les variations dans les chaînes polysaccharidiques de l'antigène O déterminent le sérotype de *P. aeruginosa*, ce qui en fait une cible potentielle pour

l'immunothérapie malgré les défis liés à la faible protection des vaccins basés sur les antigènes O (Huszczynski et al., 2019; Khalifa et al., 2011; Lam et al., 2011).

La présence de l'antigène O influence le phénotype de la bactérie, avec les souches "capsulées" (antigène O présent) montrant une virulence accrue par rapport aux souches "non capsulées" (antigène O absent) plus susceptibles à la lyse par le sérum humain. L'O-polysaccharide, s'étendant vers l'extérieur de la membrane externe, est impliqué dans diverses interactions hôte-pathogène, y compris la prévention de la destruction bactérienne, la protection contre le stress oxydatif, et probablement la stimulation de la NETose.

Les modifications de l'O-polysaccharide affectent la taille des vésicules de la membrane externe et leur contenu protéique, avec des implications sur la formation de biofilms robustes, la morphologie cellulaire, et l'attachement aux cellules épithéliales bronchiques humaines (Jurado-Martín et al., 2021; Pier, 2007).

### 1.7.3. Facteurs sécrétés

#### 1.7.3.1. Exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) émis par *P. aeruginosa* jouent un rôle crucial en améliorant la tolérance bactérienne face à des conditions hostiles. En tant que composants essentiels des substances polymères extracellulaires dans les biofilms (Burrows, 2012), les EPS agissent comme adhésines, favorisant l'attachement initial, l'adhésion aux surfaces, et contribuant à la persistance bactérienne. Ces EPS servent d'échafaudage primaire du biofilm, assurant l'attachement initial, la protection contre les antimicrobiens, et la défense contre les réponses immunitaires. Chez *P. aeruginosa*, l'alginate, le Psl, et le Pel, trois polysaccharides extracellulaires, collaborent synergiquement pour former un biofilm robuste (Adamo et al., 2004; Al-Wrafiy et al., 2017). La synthèse de ces polysaccharides est régulée par le c-di-GMP, un second messager intercellulaire, avec des concentrations élevées favorisant leur production. Cependant, le mécanisme exact régulant la polymérisation des précurseurs de polysaccharides reste inconnu. Chaque polysaccharide est codé par un opéron distinct sur le génome, avec des fonctions spécifiques liées à leur contribution au biofilm constituent des macromolécules cruciales pour améliorer la tolérance bactérienne face à des conditions environnementales hostiles, comme la dessiccation, les agents oxydants, et les défenses immunitaires (Mann & Wozniak, 2012).

## 1.7.3.2. Alginate

L'alginate, ou exopolysaccharide mucoïde, émerge comme le composant prédominant des biofilms mucoïdes de *P. aeruginosa*, se présentant sous la forme d'une chaîne polymère aléatoire de haut poids moléculaire non ramifiée, chargée négativement (Mann & Wozniak, 2012). Composé d'acides L-gulonique (G) et D-mannuronique (M) liés par des liaisons  $\beta$ 1-4 (Burrows, 2012), l'alginate subit des modifications lors de son transfert périplasmique, telles que l'acétylation et l'épimérisation. Sa structure peut prendre trois configurations possibles, en blocs d'homopolymères (MMM) ou (GGG), ou en blocs d'hétéropolymères (MGMG) (Liao et al., 2022). En microscopie à force atomique, l'alginate FRD1 de *P. aeruginosa* apparaît comme un polymère mou et faiblement adhérent entourant les cellules (Al-Wrafy et al., 2017). Le gène *algD*, codant pour l'alginate dans un opéron de 12 gènes, est régulé par le système à deux composants AlgQ/AlgR1. Fonctionnellement, l'alginate contribue à la stabilité protéique, à la protection du biofilm, à la rétention d'eau et de nutriments (Mann & Wozniak, 2012). Dans les infections pulmonaires à *P. aeruginosa*, une forte production d'alginate rend les isolats pulmonaires particulièrement muqueux. En plus de sa contribution à la préservation de la structure du biofilm, l'alginate se lie aux antibiotiques aminoglycosides, comme la tobramycine, entravant ainsi leur pénétration dans le biofilm et renforçant la résistance aux antibiotiques (Goltermann & Tolker-Nielsen, 2017).

## 1.7.3.3. PSL (locus de synthèse des polysaccharides)

Le polysaccharide Psl, un pentasaccharide répétitif formé de résidus de D-mannose, L-rhamnose et D-glucose, est généré par un opéron de 12 gènes, principalement chez les souches obtenues de l'environnement (Mann & Wozniak, 2012; Freney et al., 2007). Il joue un rôle essentiel dans la fixation à la surface cellulaire, la communication intercellulaire, et la résistance aux attaques immunitaires en inhibant l'opsonisation. Cela conduit à une diminution de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les neutrophiles et à une réduction de la destruction par les phagocytes (De Sousa et al., 2021). Au sein de la matrice du biofilm de *P. aeruginosa*, le Psl constitue la première ligne de défense contre les antibiotiques, dévoilant des propriétés biochimiques diverses dès les premières étapes du développement du biofilm. Les analyses de coloration fluorescente et de microscopie confocale à balayage laser du biofilm *P. aeruginosa* PAO1 suggèrent que le Psl forme une matrice ressemblant à un tissu qui relie les cellules du biofilm (Badal et al., 2020; Adamo et al., 2004).



#### 1.7.3.4. Pel (Le polysaccharide pelliculaire)

Le polysaccharide pelliculaire (Pel) émerge comme un élément clé dans la formation du biofilm chez *P. aeruginosa* (Thi et al., 2020). Ce polymère cationique de N-acétyl-d-glucosamine et N-acétyl-d-galactosamine partiellement désacétylés, codé par l'opéron pelABCDEF (De Sousa et al., 2021), est un matériau matriciel riche en glucose. Lorsque l'opéron pel est actif, il génère une matrice glucose-sensible à la cellulase. Les systèmes Pel et Psl jouent un rôle essentiel dans les premières étapes du biofilm, Pel contribuant à l'attachement à la surface et au maintien de l'intégrité du biofilm, en particulier chez les souches non mucoïdes (Singh et al., 2021).

L'opéron pel se révèle nécessaire à la formation du biofilm sur certaines surfaces, comme démontré lors de comparaisons entre la souche PA14 de *P. aeruginosa* et le mutant pelA (Badal et al., 2020). Pel est responsable du biofilm pelliculaire à l'interface air-liquide en culture statique, favorisant la tolérance aux antibiotiques dans le biofilm. Les polysaccharides Pel interagissent avec l'ADN électronique, renforçant la structure du biofilm et conférant une résistance à la colistine. Contrairement à Psl, Pel n'est pas accessible aux cellules Pel négatives dans les biofilms et les populations non attachées (Thi et al., 2020).

#### 1.7.4. Protéases

##### 1.7.4.1. L'élastase

L'activité élastase de *P. aeruginosa* est orchestrée par l'action conjointe de deux enzymes protéolytiques, à savoir LasA et LasB. Ces élastases, sécrétées par T2SS, sont soumises à la régulation des systèmes de communication par quorum (QS) dont l'expression est régulée par le système LasI (Gul et al., 2023).

LasB, aussi connue sous le nom d'"élastase" ou "pseudolysine", est une métalloprotéase zinc-dépendante appartenant à la famille des thermolysines (Jurado-Martín et al., 2021). Sa forte activité protéolytique en fait la protéase la plus abondante, émergeant comme le principal facteur de virulence extracellulaire. En plus de son pouvoir élastinolytique, LasB perturbe les jonctions serrées épithéliales et clive diverses protéines hôtes telles que les protéines pulmonaires opsonisantes du surfactant (SP-A et SP-D), l'élastine, le collagène, et la fibrine (Gul et al., 2023).

LasB cible également des cytokines comme l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et le facteur nécrosant des tumeurs (TNF- $\alpha$ ), ainsi que les interleukines (IL-6 ou IL-2). Elle altère les immunoglobulines, les composants de l'inflammasome, inactivant des protéines telles que les IgA et IgG, ainsi que des composants du complément, entravant ainsi la clairance bactérienne. De plus, LasB dégrade la flagelline exogène, contournant la reconnaissance par le TLR5 et entravant l'activité des macrophages alvéolaires en régulant à la baisse la production de ROS et de molécules/recepteurs de l'immunité innée. Son impact sur la formation du biofilm est également noté par la régulation des rhamnolipides (Galdino et al., 2017).

LasA, ou staphylolysine, est une sérine protéase de *P.aeruginosa*, codée par le gène lasA. Elle provoque la lyse rapide de *S. aureus* en clivant le pont pentaglycine de sa paroi peptidoglycanique. Bien que son activité élastinolytique soit limitée, LasA renforce l'action d'autres protéases, notamment LasB. L'expression de LasA a récemment été associée à la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*, suggérant un rôle multifonctionnel dans la pathogenèse bactérienne (Strateva & Mitov, 2011 ;Galdino et al., 2017).

#### 1.7.4.2. La protéase alcaline

La protéase alcaline, ou aeruginolysine, une métalloendopeptidase zinc-dépendante de 50 kDa sécrétée par le T1SS et codée par le gène aprA, interagit avec diverses cibles, clivant notamment la fibronectine et la laminine, composants de l'endothélium. Elle dégrade les protéines du complément (C1q, C2, C3) et les cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6), entravant le chimiotactisme neutrophilique pour échapper à la phagocytose. (Laarman et al., 2012). En interférant avec la signalisation de la flagelline, elle empêche la reconnaissance par le TLR5, essentiel à l'immunité antibactérienne. Sa forme polymérique, cruciale pour la mobilité bactérienne, reste active, réduisant la clairance mucociliaire via l'activation d'ENaC. Impliquée dans les pneumopathies, elle contribue à la production de pyocyanine, attestant de son rôle pathogène, particulièrement dans les infections cornéennes chez *P. aeruginosa*.(Gul et al., 2023).

#### 1.7.4.3. La protéase IV

La protéase de type IV (lysyl endopéptidase ou protéine Prp), une sérine endoprotéase de 26 kDa, est sécrétée par T2SS et appartient à la famille des chymotrypsines S1. Codée par le gène piv, son expression est régulée par le système Las QS et le facteur sigma PvdS. Outre son rôle majeur dans la virulence cornéenne, elle joue un rôle crucial dans les kératites à *P. aeruginosa* et la pathogenèse pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. En dégradant

fibrinogène et protéines du surfactant, elle favorise l'invasion et l'endommagement tissulaire, inhibant l'agrégation bactérienne par le surfactant et augmentant l'apport bactérien aux macrophages alvéolaires. Elle entrave l'immunité en dégradant plasminogène, immunoglobuline, C1q, C3 et IL-22, perturbant la régulation de la défense des muqueuses et exacerbant les infections. Interférant avec la signalisation Toll et la production d'AMP, elle peut induire des hémorragies. Les protéases LasA, LasB, la protéase alcaline et la protéase IV semblent agir en synergie pendant l'invasion par *P. aeruginosa* (Engel et al., 1998; Liao et al., 2022).

#### 1.7.5. Toxines

##### 1.7.5.1. Exotoxine A (ETA)

L'exotoxine A (ETA) de *P. aeruginosa* émerge comme le facteur de virulence le plus toxique, présentant une DL50 de 0,2 mg chez la souris. Secrétée par le système de sécrétion de type 2 (T2SS) chez la plupart des isolats cliniques, cette ADP-ribosyl transférase est cruciale (Khalifa et al., 2011). Structuralement, ETA se divise en trois domaines majeurs et un sous-domaine mineur. Le domaine N-terminal favorise l'attachement aux cellules hôtes, le domaine intermédiaire démontre une activité de translocation membranaire, tandis que le domaine C-terminal constitue la fraction toxique. Un sous-domaine Ib mineur, entre les domaines II et III, peut être retiré sans perte d'activité toxique (Michalska & Wolf, 2015).

Lorsque libérée dans le milieu extracellulaire sous forme de pro-toxine inactive de 71 kDa, ETA se lie aux cellules hôtes via CD91 ou le récepteur  $\alpha$ 2-macroglobuline, entraînant son internalisation. À l'intérieur, des changements conformationnels se produisent, permettant à ETA d'exercer une activité nécrosante irréversible sur le site de colonisation. Son activité ADP-ribosylante inhibe la synthèse des protéines de l'hôte en inactivant le facteur d'élongation eucaryote 2 (eEF-2). ETA induit des dommages tissulaires, possède une activité immunosuppressive, active des caspases apoptotiques, inhibe la sécrétion d'IL-18 et diminue la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces mécanismes soulignent le rôle crucial d'ETA dans la pathogenèse de *P. aeruginosa* (Jurado-Martín et al., 2021).

##### 1.7.5.2. Exotoxine S (Exo S)

L'exoenzyme S (ExoS) de *P. aeruginosa*, libérée par le T3SS, est une cytotoxine bien caractérisée présente dans 58 à 72 % des infections à *P. aeruginosa*. Elle agit en se transloquant

dans le cytoplasme des cellules cibles et en sécrétant également dans le milieu extracellulaire. Cette protéine bifonctionnelle de 49 kDa (Frank, 1997) exerce une activité GAP spécifique des petites protéines G de la famille Rho, inhibant la mobilité et la phagocytose *in vitro* et *in vivo*. De plus, sa région C-terminale agit comme une ADP-ribosyltransférase des protéines de la famille Ras, perturbant le cytosquelette d'actine et induisant la mort cellulaire en 2 à 5 heures (Khalifa et al., 2011). ExoS modifie la réponse immunitaire, inhibe la synthèse de l'ADN, le trafic vésiculaire et l'endocytose, tout en inactivant les protéines de la famille ERM (ezrin, radixin et moesin). Enfin, ExoS active les voies TLR2 et TLR4, soulignant sa diversité de mécanismes contribuant à la virulence de *P. aeruginosa* (Jurado-Martín et al., 2021).

#### 1.7.5.3. Exotoxine T (Exo T)

L'ExoT, principale exotoxine des isolats cliniques de *P.aeruginosa* (92-100%), est une toxine bifonctionnelle de 53 kDa, similaire à ExoS. Dotée d'activités de protéine activatrice de GTPase (GAP) et de transférase d'adénosine diphosphate ribosyle (ADPRT), elle coopère pour entraver la phagocytose et perturber les barrières épithéliales. Le domaine GAP inactive les GTPases (Rac, Rho et Cdc42), perturbant le cytosquelette d'actine, inhibant la migration cellulaire et induisant l'arrondissement cellulaire. Ceci facilite la dissémination bactérienne en perturbant la barrière épithéliale. Contrairement à l'ExoS, l'ADP-ribosylation FAS-dépendante d'ExoT cible les protéines CrkI et II, cruciales dans la phagocytose, l'adhésion focale, la migration cellulaire, entraînant la mort cellulaire en 10 heures. De plus, l'ExoT stimule la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules tueuses naturelles dans les poumons, ajoutant une dimension immunologique à ses multiples mécanismes d'action (Horna & Ruiz, 2021).

#### 1.7.5.4. Exotoxine U (Exo U)

L'exoenzyme U (ExoU) de *P. aeruginosa*, une protéine de 74 kDa sécrétée par le T3SS, est présente dans moins de la moitié des isolats cliniques (24-42%) mais joue un rôle majeur dans la virulence (Javanmardi et al., 2019). Agissant comme une phospholipase A2, ExoU induit une mort nécrotique des cellules eucaryotes, favorisant la dissémination bactérienne en ciblant phagocytes et épithélium. Son activité lipolytique envers le surfactant pulmonaire contribue à la dissémination rapide. ExoU stimule une réponse pro-inflammatoire, augmentant la production d'eicosanoïdes et activant NF- $\kappa$ B, favorisant le recrutement de neutrophiles. Sa sécrétion seule par le T3SS induit la cytotoxicité, avec une virulence *in vivo* accrue. Avec une cytotoxicité 100 fois supérieure à ExoS, ExoU dégrade la membrane cellulaire une fois

transloquée dans le cytosol. Cette diversité d'actions souligne le rôle crucial d'ExoU dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* (Howell et al, 2013).

#### 1.7.5.5. Exotoxine Y (Exo Y)

ExoY, adénylate cyclase de 378 acides aminés (41,7 kDa), est présente dans 80 à 100% des *P. aeruginosa* analysés. Sa translocation dans les cellules cibles élève les niveaux d'AMPc, induit une expression génique différentielle, perturbe le cytosquelette d'actine, modifie la morphologie cellulaire en arrondissant les cellules, formant des trous intercellulaires, et accroît la perméabilité endothéliale (Khalifa et al., 2011). Cela entraîne une détérioration des cellules endothéliales pulmonaires et inhibe l'absorption bactérienne par la cellule hôte. L'activation de l'adénylate cyclase d'ExoY dépend de facteurs inconnus de la cellule hôte. ExoY contribue à l'évasion immunitaire en supprimant l'activation de TAK1. Cependant, son rôle global dans les pathologies de *P. aeruginosa* nécessite une exploration approfondie, les modèles *in vitro* et *in vivo* montrant seulement un effet mineur d'ExoY (Horna & Ruiz, 2021).

#### 1.7.6. Sidérophores

##### 1.7.6.1. La pyocyanine

La pyocyanine, un métabolite secondaire produit par *P. aeruginosa*, se distingue par sa couleur bleue et son activité redox. En tant que composé aromatique azoté appartenant à la classe des phénazines tricycliques, la pyocyanine existe sous forme de zwitterion, avec un groupe phénol lui conférant des caractéristiques faiblement acides (pKa de 4,9). À un pH physiologique, la pyocyanine peut être présente dans son état ionisé neutre (bleu) ou sous sa forme protonée chargée (rouge) en environnement acide (Hall et al., 2016) .

La combinaison de son faible poids moléculaire et de sa nature zwitterionique facilite la pénétration de la pyocyanine dans la membrane cytoplasmique de l'hôte. Le stress oxydatif induit par ce composé contribue à sa cytotoxicité envers les cellules hôtes. Bien qu'elle puisse traverser les membranes biologiques, la présence de pyocyanine dans la circulation systémique reste non signalée, limitant les rapports aux compartiments directement associés à l'infection (Liao et al., 2022).

Dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose et infectés par *P. aeruginosa*, la pyocyanine est abondamment récupérée. Ce métabolite joue un rôle crucial dans la virulence de *P. aeruginosa* en réprimant la réponse immunitaire de la cellule hôte, induisant l'apoptose des neutrophiles et augmentant la production d'interleukine IL-8. Les propriétés oxydoréductives de la pyocyanine sont également notables, avec une capacité à oxyder le glutathion et à inactiver la catalase, contribuant au stress oxydatif et à la nécrose du tissu respiratoire dans les cellules épithéliales respiratoires et les cellules endothéliales (Pier, 2007; Lau et al., 2004).

#### 1.7.6.2. La pyoverdine

La pyoverdine, en tant que sidérophore central pour *P.aeruginosa*, occupe une place prépondérante dans l'acquisition du fer, élément indispensable à la fonction cellulaire bactérienne. À un pH physiologique, la faible solubilité du fer crée une compétition acharnée entre l'hôte et le pathogène pour cet élément vital. Les pathogènes, dotés de systèmes sensibles, détectent les niveaux intracellulaires de fer faibles, stimulant ainsi la production de sidérophores pour assurer leur survie (Ghssein & Ezzeddine, 2022; Khalifa et al., 2011).

Découvertes pour la première fois en 1892, les pyoverdines ont été initialement désignées sous divers noms avant que leur rôle crucial dans le transport du fer ne soit fermement établi à la fin des années 1970 grâce aux travaux de Meyer et al., (Meyer & Abdallah, 1978). Ces composés fluorescents verts, caractéristiques des espèces du groupe I d'homologie de l'ARN de *Pseudomonas*, représentent environ 20 % des sidérophores microbiens (Schalk & Guillon, 2013)

Structurées autour de trois sites chélateurs bidentés, comprenant deux hydroxamates et un catéchol, les pyoverdines sécrétées par diverses souches présentent une diversité remarquable. En plus de leur rôle de sidérophores, elles agissent comme des molécules de signalisation, déclenchant la sécrétion de facteurs de virulence tels que l'exotoxine A et des protéases. Ces sidérophores entrent en compétition avec les protéines hôtes pour le fer, régulant ainsi la production d'exotoxine A, d'une endoprotéase PrpL, et de la pyoverdine elle-même.

La pyoverdine assume un rôle crucial en régulant la sécrétion de facteurs de virulence et participe activement à la formation du biofilm de *P. aeruginosa*, où le transport actif du fer chélaté agit comme un signal pour le développement du biofilm. De manière fascinante, les

pyoverdines peuvent être utilisées comme des "chevaux de Troie" pour administrer des antibiotiques à la bactérie, conduisant ainsi à sa mort (Ghssein & Ezzeddine, 2022).

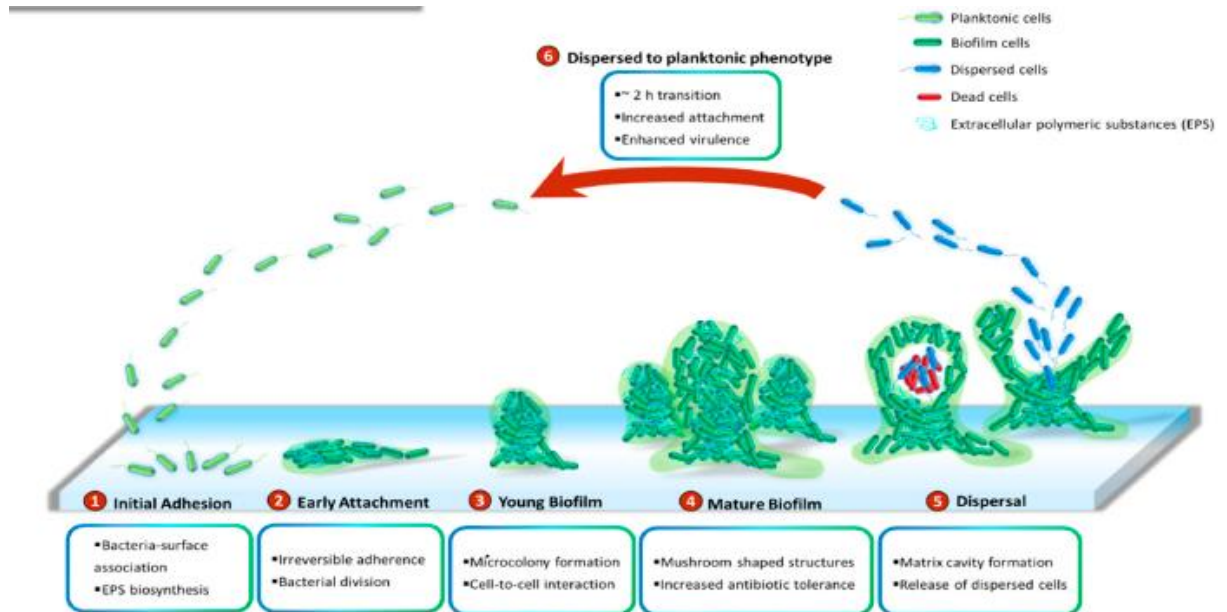
#### 1.7.7. Les biofilms

*P. aeruginosa*, réputée pour ses deux modes de vie distincts, planctonique en suspension liquide et sessile sous forme de biofilm sur des surfaces, adapte sa croissance en réponse à des environnements variés. Les biofilms de *P. aeruginosa* sont notoires pour leur résistance élevée aux antibiotiques, désinfectants et défenses immunitaires, conduisant à des infections chroniques récalcitrantes, constituant un défi médical majeur (Tuon et al., 2022; Brindhadevi et al., 2020).

La matrice extracellulaire des biofilms, constituée à plus de 50% d'EPS tels que l'alginate, Psl et Pel, ainsi que d'eDNA et de protéines, confère stabilité et protection. Les biofilms matures se caractérisent par des structures en forme de champignon "coiffé" et un réseau de canaux facilitant la distribution des nutriments et de l'oxygène, tout en éliminant les déchets (Jurado-Martín et al., 2021).

Bien que le développement des biofilms ait été associé à un programme génétique, des observations *in vitro* suggèrent une adaptation aux conditions nutritionnelles et environnementales. Les travaux de Klausen et al., (2003) démontrent que la disponibilité des nutriments influe sur la structure des biofilms, avec le glucose induisant des structures en forme de champignon et le citrate des biofilms plats. La diversité architecturale *in vitro* résulte de différences de mobilité liées aux sources de carbone, soulignant l'adaptabilité de *P. aeruginosa* aux divers milieux (T Rybtke et al., 2011).

Le développement du biofilm de *P. aeruginosa* se divise en quatre phases distinctes (Figure 4), chacune régulée par des mécanismes moléculaires complexes.



**Figure 4:** Stades de développement du biofilm de *P. aeruginosa* (Thi et al., 2020)

1. Adhérence initiale (Étape I) : Les cellules bactériennes adhèrent réversiblement à une surface via des appendices cellulaires tels que les flagelles et les pili de type IV. Une étude protéomique a démontré la spécificité des réponses bactériennes en fonction du matériau de surface (Guilbaud et al., 2017).
2. Attachement irréversible (Étape II) : Les cellules passent de l'attachement réversible à l'attachement irréversible, marquant le début du processus de formation du biofilm.
3. Formation de microcolonies (Étape III) : Après l'attachement, *P. aeruginosa* croît, produit des matrices extracellulaires, synthétise des canaux d'eau, et forme des microcolonies grâce à l'action des pili de type IV.
4. Maturation du biofilm (Étape IV) : Les microcolonies évoluent en structures tridimensionnelles en forme de champignon. La maturation implique la production de composants de la matrice extracellulaire, régulée par des sARN liés à c-di-GMP et le QS. La barrière polymérique rigide protectrice confère aux bactéries une meilleure adaptation et résistance environnementale, retardant la diffusion d'antibiotiques (Guilbaud et al., 2017).
5. Dispersion du biofilm (Étape V) : Au centre de la microcolonie, une cavité de matrice est perturbée par autolyse cellulaire, libérant des cellules dispersées. Cela conduit à la transition du mode de croissance sessile au mode planctonique (Ma et al., 2009).



6 L'Étape VI orchestre les mécanismes de détachement, tels que le détachement, l'érosion et la dispersion. Ce processus régulé est influencé par divers signaux environnementaux, tels que les nutriments, l'oxygène, le monoxyde d'azote (NO), et le pH, ainsi que par des produits chimiques comme les chélateurs de métaux, l'acide cis-2-décanoïque et l'anthranilate. Les changements soudains dans l'apport en glucose induisent la dispersion en réduisant le c-di-GMP intracellulaire, favorisant ainsi la production de flagelles. De plus, le monoxyde d'azote stimule l'activité de la phosphodiesterase, conduisant à une diminution du c-di-GMP et contribuant à la dispersion du biofilm (Thi et al., 2020).

Simultanément, les cellules entrent dans une phase de latence d'environ 2 heures, adoptant un phénotype planctonique. Ces cellules dispersées, hautement virulentes, se révèlent cytotoxiques, sensibles à la carence en fer, et présentent une virulence accrue envers les hôtes, marquant ainsi la conversion des infections chroniques en infections aiguës. L'endonucléase EndA, récemment identifiée comme essentielle à la dispersion du biofilm par dégradation de l'ADN extracellulaire, joue un rôle crucial (Cherny & Sauer, 2019). La structure des biofilms formés est également influencée par la motilité en essaim, générant des biofilms plats avec des bactéries très mobiles et des biofilms en forme de champignon avec des cellules peu mobiles, la vitesse de motilité étant spécifique au nutriment (Thi et al., 2020).

#### 1.7.8. Autres facteurs de virulence

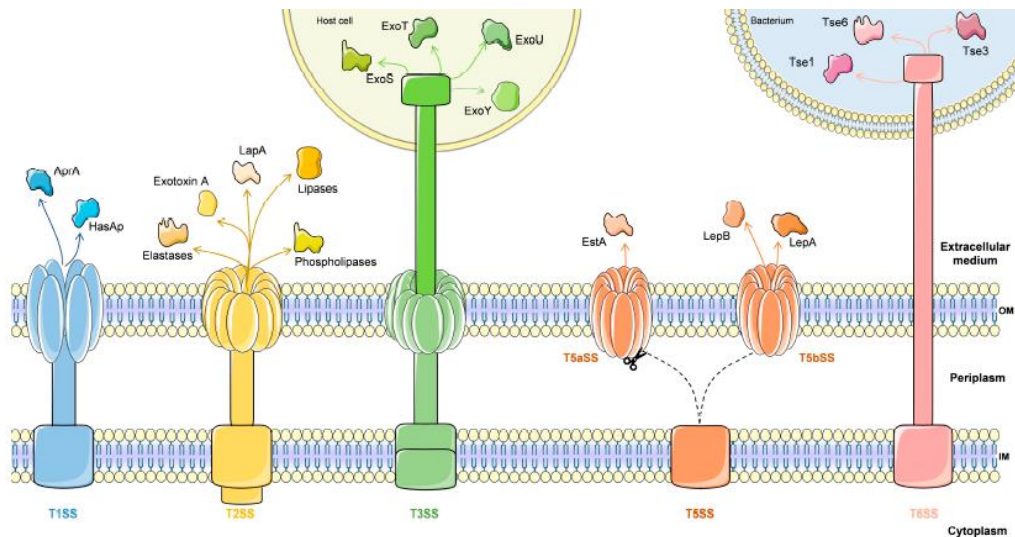
D'autres facteurs de virulence sont présents chez *P. aeruginosa*, tels que les rhamnolipides, glycolipides amphiphiles, agissent comme détergents sur les phospholipides du surfactant pulmonaire, favorisant la mobilité de type "swarming" et la constitution de biofilms. Les enzymes antioxydantes permettent à la bactérie de surmonter le stress oxydatif dans l'hôte, tandis que les lectines solubles jouent un rôle crucial dans la reconnaissance et l'adhésion, impactant les lésions pulmonaires aiguës. La pyochéline, sidérophore à faible affinité pour le fer, contribue à l'acquisition de nutriments essentiels (Khalifa et al., 2011).

L'ADN extracellulaire (eDNA) émerge comme un composant clé de la matrice des biofilms, influençant leur développement précoce et leur expansion motilité-médiée. Les biofilms

déficients en eDNA manifestent une sensibilité accrue aux détergents. *P. aeruginosa* se distingue également en synthétisant du cyanure d'hydrogène (HCN), un métabolite inhibiteur de processus cellulaires, notamment la respiration aérobie (Jurado-Martín et al., 2021).

### 1.8. Systèmes de sécrétion chez *P. aeruginosa*

Les infections graves causées par *P. aeruginosa* sont attribuables à ses exoenzymes, provoquant des lésions tissulaires en perturbant le cytosquelette et en clivant les immunoglobulines. En tant que bactérie Gram-négative, *P. aeruginosa* possède six systèmes de sécrétion de protéines (T1SS à T6SS), influant sur des processus physiologiques cruciaux tels que l'adhésion, la pathogénicité, et la survie (Figure 5). Ces systèmes sont classifiés en sécrétion en une étape (T1SS, T3SS, T4SS, et T6SS) et sécrétion en deux étapes (T2SS et T5SS), selon les voies de sécrétion des protéines de transport (Mann & Wozniak, 2012).



**Figure 5 :** Les systèmes de sécrétion chez *P.aeruginosa*. (De Sousa et al., 2021).

Cinq voies de sécrétion sont présentes chez *P. aeruginosa* : les systèmes de sécrétion de type III (T3SS) et de type VI (T6SS) transportent des protéines du cytoplasme bactérien au cytosol de la cellule cible. En revanche, les systèmes de sécrétion de type I (T1SS), de type II (T2SS) et de type V (T5SS) transportent des protéines du cytoplasme bactérien vers le milieu extracellulaire.

#### 1.8.1. Système de sécrétion de type I (T1SS)

Le T1SS est présent dans diverses bactéries, notamment *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Neisseria meningitidis* et *E. coli* (Thomas et al., 2014). Il englobe des protéines de transport majeures telles que les protéases et les lipases. La protéine substrat, caractérisée par un signal de sécrétion non clivé C-terminal, est reconnue par le transporteur ABC pour ATP-binding-cassette, facilitant ainsi son transfert direct du cytoplasme vers le milieu extérieur à travers les

membranes bactériennes internes et externes en une seule étape (Qin et al., 2022). Les données relatives au T1SS sont actuellement très limitées.

Chez *P. aeruginosa*, quatre systèmes de sécrétion de type I sont identifiés, le principal étant le système Apr avec la protéase alcaline comme substrat. Le système Has est impliqué dans l'acquisition du fer (De Sousa et al., 2021).

Le système de sécrétion Apr se compose de trois composants principaux : AprD (transporteur ABC) situé à la membrane interne, qui fournit l'énergie nécessaire au transport protéique, AprF (adaptateur), une protéine de la membrane externe formant le pore de sécrétion, et AprE (facteur de membrane externe), une protéine de fusion membranaire facilitant la fusion des membranes internes et externes. Ce système sécrète deux protéines, AprA (protéase alcaline) et AprX (protéine à fonction inconnue). Le système de sécrétion Has est composé de HasD (transporteur ABC), HasE (adaptateur), HasF (facteur de membrane externe) (De Sousa et al., 2021), participant à la régulation du fer en sécrétant l'hémophore HasAp, une protéine extracellulaire liant l'hème à l'hémoglobine (Strateva & Mitov, 2011). Le T1SS libère également le TesG, qui supprime l'afflux de neutrophiles pendant les infections chroniques (Jurado-Martín et al., 2021).

### 1.8.2. Système de sécrétion de type II (T2SS)

Le système de sécrétion de type II (T2SS) est une composante polyvalente des bactéries Gram-négatives, largement conservée, visant le transport de grandes protéines multimériques préalablement repliées dans le périplasma à travers la membrane externe (Qin et al., 2022). Ce processus en deux étapes inclut la délivrance dépendante de Sec ou la translocation de l'arginine jumelle Tat du cytoplasme vers le périplasma, suivi d'une sécrétion par le complexe T2SS dans l'espace extracellulaire. Les voies Sec et Tat régulent l'orientation des protéines vers le périplasma ou l'environnement extracellulaire (Naskar, Hohl, Tassinari, & Low, 2021).

Dans *P. aeruginosa*, deux types de T2SS distincts sont identifiés: le système Xcp, sécrétant diverses protéines, et le système Hxc, fonctionnant uniquement en conditions de croissance limitantes en phosphates, sécrétant une protéine spécifique, LapA. Le système Xcp est codé par 11 gènes organisés en deux opérons divergents, xcpP à Q et xcpR à Z, avec un 12ème gène, xcpA/pilD, situé au-delà (De Sousa et al., 2021).

Fonctionnellement, le T2SS contribue à la sécrétion de protéines telles que l'élastase (LasB, LasA), les phospholipases et les lipases (PlcN, PlcH, LipA et LipC), ainsi que l'exotoxine A

(ExoA) chez *P. aeruginosa*. Ces protéines jouent un rôle majeur lors de l'infection et représentent des cibles thérapeutiques potentielles (Qin et al., 2022; De Sousa et al., 2021).

### 1.8.3. Système de sécrétion de type III (T3SS)

Différentes toxines sont libérées dans l'environnement extracellulaire par *P. aeruginosa*, mais un ensemble spécifique est directement injecté dans les cellules hôtes à l'aide d'une seringue macromoléculaire connue sous le nom de système de sécrétion de type III (T3SS) (Veesenmeyer et al., 2009). Parmi les cinq systèmes de sécrétion identifiés chez *P. aeruginosa*, T3SS se démarque en tant que déterminant majeur de la virulence, associé de manière spécifique aux infections aiguës invasives et à une mortalité élevée chez les patients infectés. Son rôle crucial dans la pathogenèse a été établi à travers divers modèles animaux d'infections (Liao et al., 2022).

Le T3SS, agissant en tant que "injectisome" en forme de seringue à double membrane, forme un complexe d'aiguilles permettant l'injection de protéines effectrices du cytosol bactérien vers l'environnement extracellulaire. Une caractéristique fascinante réside dans son lien avec la machine d'assemblage flagellaire, renforçant le transfert de protéines effectrices vers le cytoplasme ou la membrane plasmique des cellules eucaryotes cibles. Ces mécanismes jouent un rôle significatif dans la capacité d'invasion et de colonisation bactériennes (De Sousa et al., 2021; Al-Wrafiy et al., 2017).

L'injectisome, composé d'au moins 20 protéines, se divise en deux parties distinctes :

- L'appareil de sécrétion transporte les effecteurs à travers les membranes bactériennes, comprenant une aiguille creuse (PscF), un corps basal avec ATPase cytoplasmique (PscN), anneau lipoprotéique IM (PscJ), et anneau de sécrétine oligomérisé à l'membrane externe (PscC).
- L'appareil de translocation transloque les effecteurs à travers la membrane de la cellule hôte, formé de deux protéines hydrophobes (PopB et PopD) constituant le pore de translocation, et de la protéine hydrophile essentielle, PcrV, favorisant l'assemblage et l'insertion corrects de PopB et PopD dans les membranes de la cellule hôte (Jurado-Martín et al., 2021).

La régulation du T3SS est un processus complexe qui opère à deux niveaux : la transcription des gènes T3SS et l'initiation de la sécrétion. Ces mécanismes sont activés au contact des

cellules hôtes, conduisant à une production importante de composants sécrétés de type III. Cette complexité se manifeste à travers trente-six gènes regroupés dans cinq opérons, soigneusement organisés dans le chromosome de *P. aeruginosa*. Ces gènes jouent un rôle crucial dans la biogenèse et la régulation de la machinerie sécrétoire-translocation de type III (Thi et al., 2020).

En parallèle, l'injectisome maintient une expression à des niveaux basaux, demeurant dans un état quiescent. Son activation survient lorsque divers signaux inducteurs, tels que les faibles concentrations de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire, le sérum-albumine/caséine, et le contact avec la cellule hôte via les pilines ou les flagelles, favorisent son expression. Ce processus est étroitement régulé par le principal régulateur ExsA. Ainsi, cette régulation précise garantit une activation sélective de la sécrétion de type III en réponse aux signaux appropriés, assurant l'efficacité du système lors de l'infection (Jurado-Martín et al., 2021; Pier, 2007).

Le T3SS libère des effecteurs de virulence, notamment protéines effectrices toxiques bien connues ExoU, ExoT, ExoS et ExoY, qui présentent une variabilité d'expression selon les souches, induisant une cytotoxicité à divers niveaux. Deux nouveaux effecteurs, PemA et PemB, ont été suggérés (Horna & Ruiz, 2021). En outre, d'autres protéines, telles que les protéines flagellaires, PilA, et la diphosphate kinase nucléaire, peuvent également être transloquées par ce système, contribuant ainsi à la complexité des interactions entre *P. aeruginosa* et les cellules hôtes (Jurado-Martín et al., 2021).

#### 1.8.4. Système de sécrétion de type V (T5SS)

Le système de sécrétion de type 5 (T5SS) de *P. aeruginosa*, également appelé système d'autotransporteur, constitue la machinerie de sécrétion la plus simple décrite à ce jour. Il agit comme une machine macromoléculaire sécrétant principalement des facteurs de virulence, ciblant les cellules eucaryotes et contribuant également à la formation de biofilm et à l'adhésion cellulaire (Al-Wrafy et al., 2017). Ce processus en deux étapes, similaire au T2SS, commence par le passage des protéines à travers la membrane interne via la machinerie d'exportation Sec, puis se poursuit par leur transport à travers un canal de la membrane externe formé par une protéine baril  $\beta$ . Les exoprotéines peuvent soit : rester associées à la membrane externe, soit être libérées dans le milieu extracellulaire après un clivage protéolytique (de Sousa et al., 2021).

Le T5SS se compose d'autotransporteurs (AT) et de systèmes de sécrétion partenaires (TPS), avec cinq sous-types (T5aSS à T5eSS) chez *P. aeruginosa* (Qin et al., 2022), exportant les

protéines à travers la membrane interne via la voie Sec. Il sécrète diverses protéines liées à la virulence et à l'adhésion bactériennes, dont EstA, TpsA et TpsB. EstA favorise la formation de biofilm en augmentant l'expression du rhamnolipide, tandis que TpsA et TpsB, en tant qu'exoprotéines de la membrane externe  $\beta$ -baril, participent à l'évasion immunitaire et améliorent l'adhésion bactérienne (Liao et al., 2022).

Récemment, *P. aeruginosa* a été démontré sécréter la protéine PlpD par l'intermédiaire du type T5dSS, induisant la destruction des lipides et contribuant à l'établissement d'une infection (Al-Wrafy et al., 2017).

#### 1.8.5. Système de sécrétion de type IV (T6SS)

*P. aeruginosa* abrite le système de sécrétion de type VI (T6SS), récemment découvert, jouant un rôle vital dans la virulence, l'interaction bactérienne et la compétition environnementale. Ce complexe en forme d'aiguille est largement répandu parmi les bactéries à Gram négatif. Les protéines sans peptide signal, Hcp (protéine corégluée à l'hémolysine) et VgrG (répétition valine-glycine), requièrent un T6SS opérationnel pour être libérées dans le milieu extracellulaire (Strateva & Mitov, 2011).

Hcp, de petite taille, forme des nanotubes à la surface des bactéries, facilitant le transport d'autres protéines effectrices dépendantes du T6SS. La structure cristalline de la protéine Hcp1 de *P. aeruginosa* révèle un anneau hexamère, similaire au domaine tubulaire de la queue du phage T4 (protéine gp19). La région N-terminale conservée des VgrG présente des similitudes avec les protéines du phage T4 (protéines gp5 et gp27). Les VgrG contiennent deux domaines liés aux protéines, évoquant les multimères gp5 et gp27 qui constituent la pointe de la queue du bactériophage utilisée pour percer l'enveloppe bactérienne et injecter de l'ADN dans le cytoplasme. Il est suggéré que les VgrG forment des complexes trimériques agissant comme dispositifs de perforation, favorisant le passage de protéines et de complexes macromoléculaires à travers les membranes (de Sousa et al., 2021).

Le génome de *P. aeruginosa* comporte initialement trois locus, nommés Hcp Secretion Island (HSI), qui abritent des gènes codant pour les composants du T6SS. Ces locus sont ensuite reclassifiés de HI-T6SS à HIII-T6SS, chacun contenant approximativement entre 15 et 20 gènes

(Zoued et al., 2014). Ces gènes sont impliqués dans des interactions avec d'autres bactéries et l'environnement, présentant des similitudes avec le système T3SS (Thomas et al., 2014).

L'appareil du T6SS, constitué de 13 composants centraux, se subdivise en une structure en forme de plaque de base, un tube interne gainé formé à partir de cette structure en forme de plaque de base, et un complexe transmembranaire. Au moins six protéines effectrices (Tse1-6) sont excrétées par le T6SS. Tse1 et Tse3 s'incorporent dans le périplasme et hydrolysent le peptidoglycane, entraînant ainsi la lyse des cellules bactériennes. Tse2 inhibe la croissance des cellules procaryotes et eucaryotes, tandis que Tse4, Tse5 et Tse6 agissent en tant qu'effecteurs antibactériens (Liao et al., 2022).

### **1.9. Le Quorum sensing et la régulation des facteurs de virulences**

Les facteurs de virulence sécrétés par *P. aeruginosa* sont régulés par des réseaux de contrôle complexes et étroitement interconnectés, orchestrés par un mécanisme de détection de densité cellulaire appelé "quorum sensing" (QS). Ce système implique la diffusion de petites molécules de signalisation entre les cellules, connues sous le nom d'autoinducteurs, qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression de divers facteurs de virulence et dans la formation de biofilms (Venturi, 2006).

Le mécanisme de QS chez *P. aeruginosa* est sensible à la densité de la population bactérienne et à sa capacité à interagir les unes avec les autres. Il repose sur la production de molécules diffusibles de N-acyl-homosérine lactone (AHL), qui reflètent la densité cellulaire dans leur environnement (Gökalsın et al., 2019). Lorsque ces molécules atteignent un seuil critique, elles se lient à des régulateurs transcriptionnels de type "R", déclenchant ainsi l'expression des gènes impliqués dans la pathogénicité, l'adaptation écologique, la régulation des facteurs de virulence, la formation de biofilms et la résistance aux antibiotiques (Khalifa et al., 2011).

*P. aeruginosa* dispose de quatre systèmes de signalisation auto-régulateurs qui sont étroitement imbriqués et qui influencent mutuellement leurs activités (Y Ramírez-Rueda & Salvador, 2020). Ces systèmes comprennent les réseaux Las (associé à l'élastase et à l'évasion immunitaire), Rhl (associé aux rhamnolipides et à la structure du biofilm), Pqs (Pseudomonas quinolone signal) et le Iqs (quorum sensing intégré) (Jurado-Martín et al., 2021; Sırıken, Öz, & Erol, 2021).

### 1.9.1. Systèmes de QS Acyl-Homosérine Lactone : Las et Rhl

#### Le système Las

Le système Las occupe une position prédominante dans cette hiérarchie en exerçant un contrôle positif sur l'expression des trois autres systèmes (Lee & Zhang, 2015; Qin et al., 2022). Parallèlement, le système rhl exerce une régulation négative sur le système pqs. Notamment, le système pqs a la capacité d'induire la synthèse de l'autoinducteur PQS, entraînant ainsi l'activation de la surexpression du système rhl. De manière similaire, le système Iqs exerce un effet stimulant sur Pqs (Gul et al., 2023; Jurado-Martín et al., 2021).

Le système Las, composé de LasI, une protéine synthétase, dirige la production de la N-(3-oxododécanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo C12-AHL) à une concentration seuil, activant le régulateur LasR correspondant (Ahmed et al., 2019). Cette activation déclenche l'expression des gènes responsables de la virulence, impliqués dans les infections aiguës et les dommages aux cellules hôtes, tels que la pyoverdine, la protéase alcaline, l'élastase Las A et Las B, ainsi que l'exotoxine-A (Ganesh & Rai, 2018). De plus, il induit la production de l'autoinducteur, créant ainsi une boucle d'autorégulation positive. Le système Las inhibe également la production d'exopolysaccharide Pel

En interaction avec les systèmes Rhl et Pqs, le système Las influence la formation du système T6SS, induit l'apoptose dans les cellules épithéliales des voies respiratoires tout en dégradant leurs jonctions serrées. L'autoinducteur 3-oxo C12-AHL contribue également à la survie bactérienne en provoquant la mort des cellules immunitaires de l'hôte. (Jurado-Martín et al., 2021).

Notamment, la pyocyanine et l'autoinducteur 3-oxo C12-AHL augmentent significativement le nombre de cellules persistantes au sein des populations de *P. aeruginosa*, potentiellement responsable de la résistance observée dans les infections chroniques (Tuon et al., 2022).

#### Le système Rhl

Dans une configuration similaire, le récepteur cytoplasmique RhIR réagit à la molécule de signalisation C4-HSL synthétisée par RhII (Pearson et al., 1994), dictant une régulation étendue. Cette régulation s'étend à l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de rhamnolipides, de protéases alcalines (Bose et al., 2020), de sidérophores, de mobilités (J. Lee



& Zhang, 2015), ainsi que la sécrétion de la pyocyanine (Khalifa et al., 2011). En parallèle, LasR, identifié comme un régulateur central, exerce un contrôle crucial sur le gène lasB, responsable de la métalloprotéase élastase, et est essentiel pour la transcription des gènes aprA, lasA, et toxA, le positionnant comme un régulateur global des gènes de virulence dans *P. aeruginosa*. La coordination entre les systèmes las et rhl n'émerge pas de manière indépendante, mais plutôt dans une hiérarchie organisée avec une cascade de signalisation, permettant une réponse ajustée aux signaux environnementaux (Tuon et al., 2022; Jurado-Martín et al., 2021).

### 1.9.2. Le Système de QS Quinolone : Pqs

Le système Pqs, en utilisant des molécules de signal avec une structure de base de quinolone "heptyl-3 hydroxy-4 quinolone" synthétisées non-AHL, exerce une influence multi facette. Il déclenche la transcription de l'opéron pqsABCDE-phnAB (Bukvički et al., 2016). Les rôles variés du système Pqs incluent la production de la protéine PqsE, un acteur clé de la virulence en collaboration avec le système Rhl, impliqué dans la régulation de la synthèse de la pyocyanine. En outre, le système Pqs régule positivement l'expression des gènes associés à la carence en fer, aux pompes d'efflux liées à la résistance aux antibiotiques, à la biosynthèse du cyanure d'hydrogène, à la rhamnolipide, à l'élastase et à la chitinase extracellulaire. Il participe également à la médiation de la signalisation intercellulaire via le QS et est connecté aux systèmes LasI/LasR et RhlI/RhlR, influençant la production et la régulation des facteurs de virulence. La voie PQS est également impliquée dans des processus cruciaux tels que l'acquisition de fer, la médiation de la cytotoxicité, la biogenèse des vésicules de la membrane externe, l'induction du stress oxydatif, la réponse antioxydante, la libération d'eDNA pour la création de biofilms stables, et la modulation des réponses immunitaires de l'hôte en supprimant la sécrétion d'IL-2 et d'IL-12, et en stimulant la chimiotaxie des neutrophiles, la production de ROS et de TNF- $\alpha$  (Tuon et al., 2022; Jurado-Martín et al., 2021; Khalifa et al., 2011).

### 1.9.3. Le Nouveau Système de QS : Iqs

Le quatrième canal de communication par QS récemment identifié, le système Iqs, utilise le 2-(2-hydroxyphényl)-thiazole-4-carbaldéhyde comme signal et est étroitement associé au stress environnemental, bien que son récepteur cognitif demeure actuellement inconnu (Bukvički et al., 2016; Gökalsın et al., 2019). Les fonctions clés du système Iqs incluent la surveillance de la densité bactérienne et la détection de la limitation en phosphate, un stress fréquemment

rencontré lors d'infections, régulant ainsi la production de facteurs de virulence. En outre, le système Iqs exerce un contrôle partiel sur les fonctions du système Las, et son dysfonctionnement entraîne une réduction significative de la production des signaux PQS et de la N-butyrylhomosérine lactone (BHL), un autre autoinducteur du système Rhl. Cette perturbation conduit à une diminution de la production de pyocyanine, de rhamnolipides et d'élastases. Notamment, le système Iqs inhibe la croissance des cellules hôtes de manière dose-dépendante, en contournant la réparation des dommages à l'ADN de l'hôte et en stimulant l'apoptose (Jurado-Martín et al., 2021).

## **2. Les plantes médicinales**

Les disciplines de l'ethnobotanique et de l'ethnopharmacologie définissent les plantes médicinales comme des espèces utilisées dans la médecine traditionnelle pour leurs bienfaits thérapeutiques chez les humains et/ou les animaux. Malgré les progrès considérables de la médecine moderne, l'utilisation des plantes médicinales persiste depuis des siècles (Anand et al., 2019).

Sur les quelque 374 000 espèces végétales répertoriées, seules 28 187 sont utilisées à des fins médicinales. Cependant, cette utilisation est répandue à l'échelle mondiale pour soutenir les soins de santé primaires, notamment dans les régions où l'accès aux soins de santé conventionnels est limité. Environ 14 à 28 % des espèces végétales supérieures sont utilisées à des fins thérapeutiques, avec 74 % des composés bioactifs découverts grâce aux pratiques ethnomédicales (Vaou et al., 2021).

L'OMS reconnaît l'importance des plantes médicinales comme source potentielle de nouveaux médicaments, ayant enregistré plus de 20 000 espèces à ce jour. Plus de 80 % de la population mondiale utilise ces plantes comme source principale de soins de santé primaires (Anand et al., 2019; Nascimento et al., 2000).

La recherche dans ce domaine repose sur une combinaison de disciplines scientifiques telles que la botanique, la biologie végétale, la phytochimie, la pharmacologie et d'autres, avec pour objectif d'évaluer la qualité, l'efficacité et la sécurité des médicaments à base de plantes. De nombreux pays ont élaboré des réglementations pour encadrer l'utilisation de ces plantes, témoignant de leur reconnaissance croissante dans la médecine conventionnelle (Castronovo et al., 2021). Les dérivés de plantes, tels que les huiles essentielles et les produits phytochimiques, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes, jouent un rôle crucial dans les traitements

thérapeutiques. Des études récentes dans différents pays cherchent à prouver leur efficacité, exploitant les propriétés antimicrobiennes de nombreuses plantes, en particulier grâce à des composés du métabolisme secondaire, comme les composés phénoliques des huiles essentielles et les tanins (Nazzaro et al, 2013).

### **2.1. Les Huiles essentielles**

Les huiles essentielles (HE) sont des métabolites secondaires volatils des plantes, conférant à la plante une odeur distinctive et, parfois, un goût particulier (Baptista-Silva et al., 2020). Elles sont produites par plus de 17 500 espèces de plantes, réparties dans environ 60 familles d'angiospermes telles que les Alliacées, les Apiacées, les Astéracées, les Lamiacées, les Myrtacées, les Poacées et les Rutacées. Ces familles sont particulièrement réputées pour leur capacité à générer des huiles essentielles ayant une valeur tant médicinale qu'industrielle (Eslahi et al., 2017; Raut & Karuppayil, 2014). Bien que seulement environ 300 espèces soient commercialisées, les HE sont synthétisées dans le cytoplasme et les plastes des cellules végétales à travers deux voies : de l'acide mévalonique et de l'acide shikimique. Ces voies sont exprimées de manière constitutive par les plantes, tandis que d'autres mécanismes de défense peuvent les activer en réponse à des agents pathogènes ou à des stress biotiques ou abiotiques spécifiques (Wińska et al., 2019).

Les composés résultants sont stockés dans des structures sécrétoires complexes, telles que des glandes, des cavités sécrétoires et des canaux de résine, se manifestant sous forme de gouttelettes liquides dans différentes parties des plantes. Les épices et les fruits riches en HE sont d'excellentes sources d'éléments naturels possédant une activité contre les microorganismes d'intérêt agricole et sanitaire (Yamine et al., 2022).

Les HE sont obtenues à partir de plantes par diverses méthodes telles que l'hydrodistillation, la distillation à la vapeur d'eau, la distillation à sec ou la pression mécanique à froid. Les méthodes de laboratoire traditionnelles utilisent des dispositifs tels que l'appareil de distillation à la vapeur Clevenger, mais des améliorations ont été apportées pour surmonter les inconvénients de ces appareils. Des techniques modernes incluent l'utilisation de micro-ondes et l'extraction dans des fluides supercritiques. Les HE peuvent également être obtenues par fermentation, broyage, extraction ou hydrolyse, mais la méthode choisie peut influencer leur composition chimique (Wińska et al., 2019).

L'utilisation des HE remonte à des millénaires, servant non seulement d'ingrédients de parfums ou pour l'aromatisation des aliments, mais aussi en médecine populaire en raison de leurs nombreuses propriétés biologiques, notamment leurs qualités antimicrobiennes. Ces propriétés antimicrobiennes sont particulièrement cruciales dans le contexte actuel de la résistance croissante des microorganismes aux médicaments (Angane et al., 2022).

### 2.1.1. La composition des Huiles essentielles

Les HE sont des mélanges complexes de différents composés lipophiles à faible poids moléculaire, volatils et actifs. Ces mélanges multicomposants présentent une variabilité significative, avec certains composants actifs majeurs présents à des concentrations relativement élevées (entre 20 et 70 %), tandis que d'autres se trouvent à l'état de traces. L'analyse approfondie de ces huiles révèle la présence d'une diversité impressionnante, où jusqu'à 400 composés chimiques peuvent être identifiés, voire plus avec l'utilisation d'équipements analytiques sophistiqués et de méthodes de détection appropriées (Yammine et al., 2022; De Groot & Schmidt, 2016).

La composition chimique des HE et leur quantité extraite dépendent de divers facteurs tels que la période de récolte, le climat, le type de sol, la plante elle-même et la technique d'extraction employée. Ces constituants actifs, générés par différentes voies de biosynthèse, sont déterminants pour les propriétés biologiques des HE (García-Salinas et al., 2018; Eslahi et al., 2017).

Au sein des mélanges d'HE, les terpènes, formés par la combinaison d'unités d'isoprène, dominent en tant que composés chimiques prédominants. Leur synthèse se déroule dans le cytoplasme des cellules végétales par la voie de l'acide mévalonique à partir de l'acétyl-CoA. Ces terpènes, pouvant adopter des structures linéaires ou cycliques, comprennent les monoterpènes (10 atomes de carbone) et les sesquiterpènes (15 atomes de carbone) (Nazzaro et al., 2013).

Les monoterpènes et les sesquiterpènes, principaux constituants des HE, contribuent à leur volatilité et à leur odeur caractéristique. La modification chimique de ces composés, par réarrangement des squelettes carbonés ou oxydation, génère des terpénoïdes, incluant des alcools, des aldéhydes, des phénols, des éthers et des cétones. Ces transformations, couplées à l'intégration occasionnelle de groupes fonctionnels tels que le soufre ou l'azote au cours de la

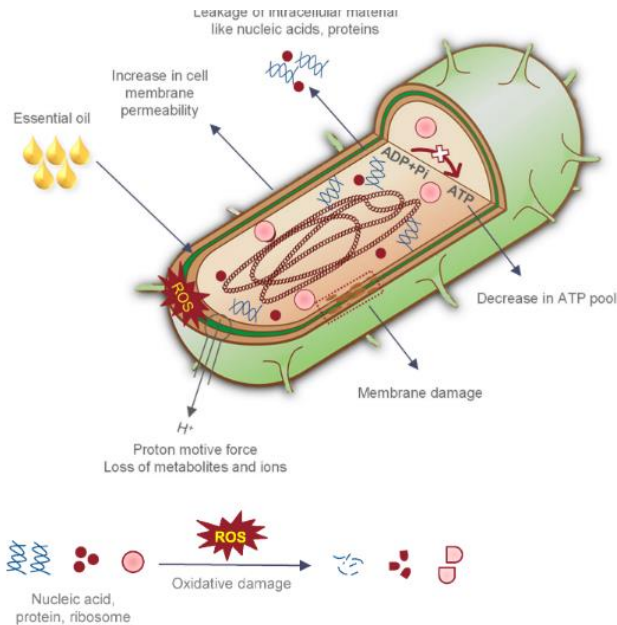
biosynthèse, ajoutent une diversité significative aux compositions des HE (Yammine et al., 2022).

La méthode de Chromatographie en Phase Gazeuse - Spectrométrie de Masse (GC-MS) est couramment préférée pour déterminer les constituants des huiles essentielles. Cette technique, à la fois simple, rapide et efficace, est largement utilisée dans l'analyse des composés présents dans ces huiles. Un rapport GC-MS fonctionne comme l'empreinte digitale d'un lot spécifique d'HE, fournissant des indications précieuses sur la pureté des huiles. Ainsi, les caractéristiques distinctives des huiles peuvent être déduites de leur composition chimique, établissant la qualité des HE (Aziz et al., 2018).

### 2.1.2. Le mode d'action des huiles essentielles

Les HE agissent comme des agents antimicrobiens complexes dont le mode d'action demeure largement incompris. Leur efficacité est attribuée aux composés chimiques naturels présents dans les plantes qui les produisent, soulignant l'importance de la composition et de la synergie végétale dans leur activité. Malgré leur efficacité contre certaines souches bactériennes telles qu'*E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus* et *Salmonella* spp. les HE peuvent être moins efficaces contre d'autres, comme *Pseudomonas* spp., en raison de mécanismes de résistance tels que la formation d'exopolysaccharides (Angane et al., 2022).

Le mécanisme d'action des HE repose sur leur composition chimique variée, agissant via une cascade de réactions impliquant différentes composantes cellulaires (Figure 6), souvent désignée sous le terme de "polyvalence des huiles essentielles". En général, les HE inhibent la croissance bactérienne et la production de métabolites toxiques, montrant une tendance à être plus efficaces contre les bactéries à Gram positif que contre celles à Gram négatif, en raison de différences dans les compositions membranaires. (Angane et al., 2022; Nazzaro et al., 2013).



**Figure 6** Mécanisme antibactérien des huiles essentielles (HE) (Angane et al., 2022)

L'activité antimicrobienne des HE est liée à leur capacité à pénétrer à travers les membranes bactériennes et à perturber les fonctions cellulaires essentielles. Les composés phénoliques des HE induisent une réponse antimicrobienne en modifiant la perméabilité des cellules microbiennes, endommageant les membranes cytoplasmiques, interférant avec le système de génération d'énergie cellulaire (ATP), et perturbant la force motrice des protons. Cette perturbation entraîne l'inhibition des propriétés fonctionnelles et la fuite du contenu cellulaire (Vaou et al., 2021; Akthar et al, 2014).

Les HE et/ou leurs composants influencent le profil d'acides gras de la membrane cellulaire en ciblant la voie de biosynthèse lipidique. Les composés phénoliques comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol modifient la composition des acides gras dans la membrane bactérienne, conduisant à des altérations structurelles observables par microscopie électronique à balayage. De plus, les HE affectent les enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras, augmentant la perméabilité de la membrane. Ces effets cumulatifs résultent en une perte de fluidité membranaire, une augmentation de la rigidité, compromettant ainsi l'intégrité de la membrane et la fonction cellulaire (Nazzaro et al., 2013).

### 2.1.3. Activité antipseudomonale des HE et des substances naturelles

Les HE provenant de diverses plantes médicinales ont démontré un effet inhibiteur significatif sur *P. aeruginosa*. Des études ont mis en évidence les propriétés inhibitrices des HE extraites

de plantes telles que *Apium graveolens*, *Carum nigrum*, *Juglans regia*, *Melaleuca alternifolia*, *Origanum vulgare*, *Pelargonium graveolens*, *Piper nigrum*, *Rosa spp.*, *Syzigium aromaticum*, *Tamarix boveana*, *Ziziphora clinopodioides*, *Thymus vulgaris*, et *Thymus sp.* (Raut & Karuppayil, 2014).

Cependant, il est important de noter que *P. aeruginosa* présente une certaine résistance à l'inhibition par les HE par rapport à d'autres bactéries. Dans cette optique, une stratégie prometteuse pour contrer son émergence et sa réémergence est de cibler à la fois les médiateurs du QS et les facteurs de virulence. Les agents anti-virulence, caractérisés par leur capacité à stopper l'infection bactérienne sans affecter la vitalité ni induire la mort de la bactérie, visent à accroître la sensibilité des bactéries pathogènes au système immunitaire de l'hôte, ce qui interrompt le processus infectieux. Cette approche pourrait être particulièrement efficace contre les infections causées par des bactéries multirésistantes, tout en minimisant le risque de développement de nouvelles résistances (Bouyahya et al., 2022; Li et al., 2022).

Les substances naturelles, dont les HE, agissent en ciblant les médiateurs de la communication intercellulaire à travers divers mécanismes d'action, notamment la dégradation, l'inhibition transcriptionnelle des molécules de signalisation QS, et la modulation du système de transport entre les milieux intracellulaire et extracellulaire (Chadha et al., 2022).

Diverses études ont validé l'efficacité de certains composés bioactifs issus de plantes médicinales (Tableau 2). Notamment, des HE telles que celles de *Cinnamomum zeylanicum*, *Melaleuca alternifolia*, *Cymbopogon martini*, *Origanum vulgare*, *C. aromaticum*, *Myroxylon balsamum* et *Thymus vulgaris* ont montré des propriétés significatives dans l'inhibition du QS et l'éradication du biofilm de *P. aeruginosa*. Par ailleurs, certaines HE, comme celles de *Citrus reticulata* et *Mentha piperita*, ont démontré une capacité spécifique à inhiber la formation du biofilm (Reichling, 2020).

**Tableau 2 :** Antiquorum sensing et mécanismes antibactériens d'action de certains composés naturels.

Molécules	Espèce bactérienne	Résultats clés	Références
Linalool	<i>P. aeruginosa</i>	-Endommagement de la chaîne respiratoire.	(Liu et al., 2020)
		-Destruction de l'intégrité de la membrane bactérienne Perturbation de la morphologie cellulaire normale	
Phytol	<i>P. aeruginosa</i>	-Augmentation du niveau intracellulaire de ROS.	(Lee et al., 2016)
		-Augmentation de l'épuisement transitoire du NADH	
		-Induction de dommages à l'ADN par le stress oxydatif.	
		-Induction de la dépolarisation de la membrane.	
Carvacrol	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10154	-Déclenchement de l'inhibition de la division cellulaire.	(Tapia-Rodriguez et al., 2017)
		-Inhibition de la formation du biofilm	
		-Réduction de la sécrétion de la pyocyanine et de la violacéine	
Eugenol	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10154	-Réduction de la formation du biofilm.	(Tapia-Rodriguez et al., 2019)
		-Réduction de la production de AHLs (autoinducteurs)	
		-Réduction de l'expression de LasR	
Eugenol	<i>C. violaceum</i> CV026	-Réduit la production de violacéine, d'élastase, de pyocyanine et la formation de biofilm.	(Zhou et al, 2013)
		-Réduction de la production d'AHL et de violacéine	
Quercétine	<i>C. violaceum</i> CV026	-Réduction de la production de violacéine, de la formation du biofilm, de la production d'EPS, de la motilité, et de la production d'alginate	(Gopu et al., 2015)
		-Inhibition de la formation du biofilm	
		-Inhibition de la motilité par "twitching"	
Quercétine	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	-Inhibition de la formation du biofilm	(Pejin et al., 2015)
		-Inhibition de la motilité par "twitching"	
		-Inhibition de la motilité par "twitching"	
Quercétine	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	-Inhibition de la formation du biofilm	(Ouyang et al., 2016)
		-Réduction des facteurs de virulence, y compris la pyocyanine, la protéase et l'élastase	
		-Réduction des niveaux d'expression des gènes <i>lasI</i> , <i>lasR</i> , <i>rhlI</i> et <i>rhlR</i>	
Taxifolin	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	-Réduction de la production de pyocyanine et d'élastase	(Vandeputte et al., 2011)
		-Inhibition de l'expression des gènes contrôlés par le QS	
Naringenin	<i>P. aeruginosa</i>	-Inhibition de l'expression des gènes régulés par le QS	(Hernando et al., 2020)
L'acide rosmarinique	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	-Inhibition du régulateur QS RhlR et de la (C4-HSL)	(Corral et al., 2016)
		-Induction d'une augmentation significative de la transcription médiée par RhlR par rapport à celle de C4-HSL	



		-Induction de l'expression des gènes dépendant du QS	
		-Inhibition de la formation du biofilm et de la production de facteurs de virulence (pyocyanine et élastase)	
Acide cinnamique	<i>P. aeruginosa</i> PAOI	Inhibe les facteurs de virulence dépendants du QS et la formation du biofilm	(Rajkumari et al., 2018)

#### 2.1.4. Les plantes médicinales en Algérie

L'Algérie, grâce à son climat varié propice au développement des plantes médicinales dans les régions côtières, montagneuses et même sahariennes, est considérée comme l'un des pays les plus riches en flore parmi les nations arabes, avec 3164 espèces végétales répertoriées. Sa flore se compose de 4000 taxons, répartis en 131 familles et 917 genres. La flore endémique nationale compte 464 taxons, dont 387 espèces, 53 sous-espèces et 24 variétés. Au nord de l'Algérie, on dénombre 407 taxons endémiques, comprenant 224 endémiques algériennes, 124 algéro-marocaines, 58 algéro-tunisiennes et une algéro-sicilienne. Cette diversité floristique est attribuable à la taille considérable et à la diversité climatique de l'Algérie, allant du climat méditerranéen au nord aux déserts du Sahara au sud (Catullo et al, 2011).

Le parc national de Tlemcen abrite une part significative de cette richesse floristique, avec 917 espèces répertoriées, représentant 31,6% de la flore nationale. Parmi celles-ci, 22 espèces sont protégées. La flore du parc est également caractérisée par la présence de 31 espèces endémiques, 38 espèces rares et 27 espèces très rares. Des études montrent que 109 espèces végétales appartenant à 54 familles sont utilisées par les populations locales pour traiter divers problèmes de santé. Les familles les plus courantes incluent les lamiacées, les astéracées et les rosacées, démontrant ainsi la richesse ethnobotanique de la région (Zatout et al., 2021).

##### *Ammoides verticillata* Desf. Briq

*Ammoides verticillata* Desf. Briq., communément appelée Ajowan (Bekhechi et al., 2010), Nounkha Taleb El Koubs ou Nûnkha, est une plante aromatique largement utilisée dans l'ouest algérien à des fins culinaires et thérapeutiques. Cette plante annuelle, spontanée et grêle, présente une ressemblance avec le persil sauvage. Appartenant à la famille des Apiaceae, cette plante filiforme présente des tiges ramifiées de 10 à 40 cm, sans rosette de feuilles basales. Les feuilles inférieures pétiolées sont caractérisées par de nombreux segments multifides verticillés, tandis que les feuilles supérieures pennatifides possèdent des segments linéaires. Les ombelles

principales portent de 8 à 15 rayons, et les fruits ovoïdes mesurent moins de 1 mm de long Elle se trouve naturellement dans les champs, les pelouses, les montagnes et les forêts en Afrique du Nord, en Ethiopie et en Turquie, et s'étend également dans la région méditerranéenne. *A. verticillata* est également cultivée dans des pays tels que l'Inde, l'Iran, le Pakistan, l'Afghanistan et l'Égypte (Daira et al., 2016; Quézel & Santa, 1962).

L'Ammoide, plante riche en HE extraites des parties aériennes, feuilles, fleurs et graines, est largement utilisée comme condiment et épice. Elle se distingue comme une ressource naturelle polyvalente, associant des qualités culinaires à des bienfaits thérapeutiques. Ses propriétés médicinales en font un remède polyvalent, efficace contre divers troubles respiratoires tels que le rhume, la fièvre, les migraines, les problèmes gastro-intestinaux et les infections rénales. Les graines agissent comme diurétique, analgésique, carminatif, anti-diarrhéique, antihistaminique, vermifuge et anti-asthmatique (Abdelli et al., 2021).

Son large spectre d'efficacité antimicrobienne et antifongique souligne son utilité dans divers contextes médicaux. Concernant sa composition, l'HE d'*A. verticillata* varie, avec une prédominance de hydrocarbures monoterpéniques et monoterpènes oxygénés. Les principaux constituants incluent le carvacrol, le thymol qui offre des propriétés pharmacologiques distinctes tout en ajoutant des caractéristiques olfactives et gustatives, le limonène, le p-cymène et le  $\gamma$ -terpinène. Des études spécifiques ont identifié le thymol comme composant majeur, atteignant jusqu'à 45,77%, avec d'autres monoterpènes tels que le p-cymène, le limonène et le  $\gamma$ -terpinène (Attou et al., 2019). Des variations dans les composants, comme l'isothymol, ont également été observées, soulignant la diversité de la composition chimique de l'HE d'*A. verticillata* (Bekhechi et al., 2010; Kambouche & El-Abed, 2003).

#### *Cistus munbyi Pomel*

*Cistus munbyi Pomel*, appartenant au genre *Cistus L.* de la famille des *Cistaceae*, est une espèce rare et endémique, confinée principalement en Afrique du Nord, spécifiquement dans le nord-ouest de l'Algérie et le nord-est du Maroc. En tant qu'espèce pionnière du genre *Cistus*, *C. munbyi* prospère dans des zones dégradées proches des côtes, caractérisées par des sols infertiles. Avec des branches rectilignes atteignant 50 à 100 cm de hauteur, elles portent des feuilles ridées poussant enchevêtrées. La pollinisation croisée entre espèces donne naissance à des fleurs hermaphrodites, actinomorphes et hypogynes, avec trois à cinq sépales opposés aux pétales (Quézel & Santa, 1962).

La coloration des pétales varie du blanc au violet/rose foncé, avec une tache rouge foncé à la base de chaque pétale dans certaines espèces, les rendant courantes en tant que plantes ornementales. Les membres du genre *Cistus*, y compris *C. munbyi*, possèdent des tiges visqueuses et des feuilles produisant une oléorésine parfumée, contribuant ainsi à leur appréciation dans l'industrie de la parfumerie. Les caractéristiques botaniques distinctes de *C. munbyi*, telles que les pédoncules, les pédicelles et les sépales soyeux-villosités et argentés, servent de clés d'identification pour cette plante (Benbelaïd et al., 2017; Papaefthimiou et al., 2014).

Sur le plan historique, les plantes de ciste ont été utilisées en médecine traditionnelle pour traiter divers maux tels que les infections cutanées, les plaies, les douleurs d'estomac, la gastrite, les ulcères, les problèmes rénaux et l'inflammation. La résine, connue sous le nom de "ladano", était également réputée pour ses propriétés aromatiques et médicinales. Reconnu en médecine populaire et traditionnelle, le genre *Cistus* est utilisé sous différentes formes, notamment des extraits et des infusions, en raison de ses propriétés pharmacologiques, anti-infectieuses et antimicrobiennes (Zalegh et al., 2021). Des études sur les espèces de *Cistus* ont révélé la présence de 111 composés phytochimiques aux activités biologiques, avec une grande variété de métabolites secondaires (Tomou et al., 2022)

*Cistus munbyi*, également appelé "Chaboba elfediya", est largement utilisée par les populations locales, en particulier contre diverses maladies infectieuses, notamment les infections pulmonaires. Bien que les études sur *C. munbyi* soient rares, l'HE de cette plante, principalement composée de monoterpènes, notamment d'hydrocarbures et d'oxygénates avec le Terpinen-4-ol (23,75%) comme composé majoritaire, présente une forte activité antimicrobienne contre toutes les souches, qu'il s'agisse de bactéries Gram-positives, Gram-négatives ou de levures. En plus de son efficacité, l'HE de *C. munbyi* présente une antimicrobienne qui peut être attribuée à sa composition chimique spécifique (Benbelaïd et al., 2017).

#### *Origanum vulgare ssp. Glandulosum*

L'*Origanum vulgare ssp. glandulosum* (Desf.) Ietswaart, une sous-espèce de *Origanum vulgare*, est une plante spontanée endémique d'Afrique du Nord, spécifiquement de l'Algérie et de la Tunisie. Appartenant à la famille des Lamiacées, le genre *Origanum* compte environ 38

espèces répandues dans les régions méditerranéennes, euro-sibériennes et irano-sibériennes. Selon la classification morphologique d'Ietswaart, *Origanum vulgare* est divisé en six sous-espèces (Bendahou et al., 2008 ; Mechergui et al., 2016), parmi lesquelles l'*Origanum glandulosum* se distingue par ses tiges dressées et ses épis denses de fleurs blanches regroupées étroitement. La corolle présente une lèvre inférieure notablement plus longue que la lèvre supérieure (Quézel & Santa, 1962).

L'HE d'*O. glandulosum* est largement utilisée pour aromatiser le poisson, la viande, les légumes et le vin (Padulosi, 1997), et elle est également employée en médecine traditionnelle pour traiter une gamme de troubles, tels que les troubles respiratoires, les maux d'estomac, les règles douloureuses, la polyarthrite rhumatoïde, les troubles nutritionnels et les problèmes urinaires (Martins et al., 2014). Les parties aériennes de la plante sont principalement utilisées, et les formes de consommation varient en fonction des symptômes, incluant le thé ou la teinture pour les troubles respiratoires et digestifs, ainsi que la décoction ou l'infusion pour leurs propriétés expectorantes, antiseptiques, digestives et antispasmodiques (Soltani et al., 2021)

L'HE d'*O. glandulosum* est composée d'une grande variété de composants volatils et non volatils, notamment des monoterpènes monocycliques, des monoterpènes acycliques, des monoterpènes bicycliques et des sesquiterpénoïdes. La composition chimique varie selon le chémotype, avec des études suggérant que le carvacrol (Belhattab et al., 2005) ou le thymol (Semra et al., 2013; Sari et al., 2006) pourraient être les composants principaux, tandis que le p-cymène a été identifié comme principal dans certaines régions (Mechergui et al., 2010).

Des études ont également évalué l'activité antimicrobienne de l'HE contre différentes bactéries pathogènes. Plusieurs mécanismes d'activité ont été proposés, notamment l'inhibition des enzymes bactériennes, des pompes d'efflux, des effets sur la membrane cytoplasmique et la concentration d'ATP, ainsi que des propriétés antibiofilm (Soltani et al., 2021).

#### *Thymbra capitata* (L.) Cav

L'espèce *Thymbra capitata* (L.) Cav., également connue sous les noms de *Thymus capitatus* Hoffm. & Link, *Coridothymus capitatus* (L.) Rchb. F. Solms et *Satureja capitata* (L.) Cav., est un arbuste vivace et ornemental appartenant à la famille des Lamiacées. Cette plante, endémique de la région méditerranéenne, est largement répartie dans des régions telles que

l'Albanie, l'Algérie, la Corse, la Grèce, l'Italie, le Liban, la Syrie, le Maroc, la Tunisie, la Turquie, et d'autres (Bouyahya et al., 2020).

La description botanique de *T. capitata* la décrit comme un sous-arbuste très ramifié, mesurant entre 20 et 50 cm de hauteur, avec des feuilles verticillées, sessiles, caduques en cas de sécheresse, et légèrement ciliées à la base. Ses fleurs rose clair, tachetées de mauve, sont regroupées en capitules denses ovoïdes, se distinguant des autres thyms par la forme dorsalement aplatie du calice (Quézel & Santa, 1962).

La composition phytochimique de *T. capitata* a fait l'objet d'études approfondies, révélant plus de 90 composés, notamment des flavonoïdes, des terpénoïdes, et des acides phénoliques. Les HE de *T. capitata*, dominées par les terpénoïdes carvacrol et thymol, présentent différents chémotypes majeurs, tels que le carvacrol, le thymol, et le thymol/carvacrol, variant en fonction des régions géographiques et des caractéristiques des plantes (Saoulajan et al., 2022).

Sur le plan des utilisations traditionnelles, *T. capitatus* est largement employé dans la médecine traditionnelle pour traiter diverses affections, dont les troubles gastro-intestinaux, les maladies cardiaques, l'indigestion, le diabète, la dermatite, la grippe, le cancer, les infections respiratoires, l'asthme, la toux, les maladies de la peau, et l'infertilité chez les femmes. De plus, il est utilisé comme analgésique et sédatif (Bouyahya et al., 2020; Marino et al., 2020).

Des études ont démontré les activités antibactériennes et antifongiques des HE et extraits de *T. capitata*. En particulier, l'HE de *T. capitata* a montré une activité anti-quorum sensing contre *P. aeruginosa*, soulignant son potentiel dans la lutte contre les infections bactériennes (Qaralleh, 2019). Elle a également exhibé une activité antibiofilm contre plusieurs bactéries (Saoulajan et al., 2022).

#### *T. lanceolatus* Desf

L'espèce *T. lanceolatus* Desf., communément appelée "Zaatar" à Tlemcen et "Zaater el maize" à Tiaret en Algérie, est un thym endémique de la région. Cette plante pousse naturellement dans les pelouses et les rocailles montagneuses de Tlemcen et de Tiaret, se distinguant par ses feuilles longues lancéolées et ses grandes fleurs roses en inflorescence (Khadir et al., 2013; Nouasri et al., 2015).

Au sein du genre *Thymus*, les thymus, dont *T. lanceolatus* Desf., sont largement cultivés en Algérie. Outre leur utilisation commune comme agents aromatisants, condiments, et épices, les thymus sont également reconnus pour leurs propriétés médicinales. Les thymus sont souvent utilisés dans des tisanes pour traiter diverses affections telles que les infections bronchiques, pulmonaires, digestives et urinaires. De plus, ces plantes présentent des propriétés spasmolytiques, antitussives et expectorantes (Nouasri et al., 2018).

*T. lanceolatus* Desf. est particulièrement renommé en médecine traditionnelle dans certaines régions, grâce à ses effets anti-infectieux et antidiabétiques. La plante est couramment utilisée pour la préparation de tisanes et pour aromatiser, contribuant également à l'hygiène de la viande, en particulier de la volaille (Benbelaïd et al., 2013).

Des études sur la composition chimique des thymus algériens, dont *T. lanceolatus* Desf., ont révélé que le thymol et le carvacrol sont des métabolites secondaires typiques. Des recherches spécifiques sur l'HE de *T. lanceolatus* ont montré une richesse en thymol, définissant un chémotype spécifique. Cette HE a démontré des activités antimicrobiennes potentielles contre différentes souches résistantes, confirmant ainsi son intérêt dans le domaine médical (Nouasri et al., 2015).

Des analyses plus approfondies, telles que celles de Khadir et al., ont confirmé la richesse en thymol de l'HE de *T. lanceolatus*, soulignant également son puissant potentiel antioxydant et antimicrobien, en particulier contre les bactéries Gram-positives (Abdelmounaim Khadir et al., 2016).

# **Matériels et Méthodes**

## **1. Lieu d'étude**

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou Bekr Belkaid à Tlemcen, ainsi qu'au Laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Tlemcen, une institution publique de 800 lits. L'analyse des HE a été effectuée au laboratoire CPN de l'Université de Corse France, tandis que l'étude de l'activité anti-Quorum Sensing a été menée au Laboratoire Programme de Contrôle et d'Analyse de la Qualité des Aliments de l'École Professionnelle à l'Université Mugla Sitki Kocman, en Turquie

## **2. Prélèvements**

Les souches de *P. aeruginosa* ont été isolées à partir de patients des différents services du CHU Tlemcen. Sélectionnées parmi les prélèvements cliniques positifs, entre janvier 2019 et novembre 2021, ces souches ont été caractérisées dans le cadre d'une démarche centrée sur le dépistage de *P. aeruginosa*. Les échantillons cliniques, provenant de patients présentant des signes d'infections, incluent diverses sources telles que le sang, l'urine, les plaies, le liquide céphalorachidien et le liquide pleural.

### **1. Souches bactériennes**

#### **1.1. Isolement**

Les souches de *P. aeruginosa* ont été isolées par le personnel hospitalier, puis celles identifiées comme *P. aeruginosa* ont été transférées sur gélose inclinée et incubées à 37 °C pendant 24 heures. Par la suite, elles ont été acheminées au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE). Le ré-isolement des souches de *P. aeruginosa* a été réalisé en les repiquant sur gélose Cétrimide (Sigma) et en les incubant pendant 24 heures à 37 °C, conformément à la méthode de Brown et Lowbury (1965). Les colonies présentant une pigmentation verte ou rose ont été repiquées sur le même milieu pendant 24 heures à 37 °C, puis sur MacConkey pendant 24 heures à 42 °C.

#### **1.2. Identification**

Les techniques standards d'identification des espèces *P. aeruginosa* se basent sur des caractères morphologiques (bacille à Gram négatif avec une mobilité polaire), culturels (pigmentation verte sur gélose Cétrimide, odeur fruitée de raisin) et biochimiques (présence de cytochrome oxydase) (Freney et al., 2007).



L'identification des souches a été effectuée en utilisant des tests conventionnels, principalement basés sur le comportement enzymatique des souches, ainsi que par l'utilisation des galeries API 20NE (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Les souches ont été conservées à -80 °C à partir d'une culture pure en fin de phase exponentielle de croissance dans un milieu composé d'un mélange de Bouillon cœur-cerveau (Conda Pronadisa™, Espagne) et de 30 % de glycérol (Biochem®, Canada).

### 1.3. Les pré-cultures

Les pré-cultures sont préparées en ensemençant directement les colonies purifiées provenant du souflier dans des tubes contenant 5mL du bouillon Cœur-Cerveau (Conda Pronadisa™, Espagne), puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Les conditions de culture pour les pré-cultures sont rigoureusement identiques à celles requises pour les cultures principales.

Après l'incubation, les suspensions sont vigoureusement agitées à l'aide d'un vortex, puis diluées en vue de la standardisation. L'inoculum est ajusté de manière à obtenir une turbidité standard conforme aux exigences du test envisagé.

### 1.4. Les tests de sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été évaluée selon la méthode conventionnelle de diffusion des disques sur milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH). Les critères de lecture et d'interprétation ont suivi les directives du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) basées sur les recommandations européennes établies par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (EUCAST, 2020), disponibles sur le site [www.sfm.asso.fr](http://www.sfm.asso.fr). Quinze antibiotiques ont été soumis aux tests, notamment la Ticarcilline (TC) (75 µg), la Ticarcilline+acide clavulanique (TTC) (75/10 µg), la Pipéracilline (PRL) (75 µg), la Pipéracilline+tazobactam (TZP) (75/10 µg), la Ceftriaxone (CAZ) (30 µg), l'Aztréonam (ATM) (30 µg), l'Imipénème (IMI) (10 µg), la Méropénème (MRP) (10 µg), Levofloxacin (LEV) (30 µg), la Tobramycine (TOB) (10 µg), la Gentamicine (CN) (15 µg), la Ciprofloxacine (CIP) (5 µg), l'Ofloxacine (OFX) (5 µg), la Netelmicine (NET) et la Céfipime (FEP) (30 µg).

## **1.5. Détermination phénotypique de quelques facteurs de virulence**

### **1.5.1. Mise en évidence de la motilité**

La présence de deux formes de motilité, à savoir la nage (swimming) et l'essaim (swarming), a été évaluée. Chaque isolat a été soumis à ce test à trois reprises. Par conséquent, un critère de distinction basé sur un diamètre de 1 cm de motilité a été établi pour différencier les souches très mobiles (> 1 cm) des souches moins mobiles (< 1 cm).

#### **1.5.1.1. Motilité en essaim (Swarming)**

Des boîtes de Pétri contenant du milieu Tryptone, constitué de 1% de peptone (p/v) supplémenté de 0,5% (p/v) de D-glucose, d'agar et de NaCl chacun, ont été inoculées ponctuellement avec des bactéries à l'aide d'un cure-dent stérile, puis incubées pendant 24 heures à 37 °C. La motilité a été évaluée qualitativement en observant la formation d'une zone turbide circulaire générée par les cellules bactériennes migrantes à distance du point d'inoculation. L'étendue de la motilité en essaim a été déterminée en mesurant la zone d'essaim ( $\mu\text{m}^2$ ) à l'aide du logiciel ImageJ (Bose et al., 2020).

#### **1.5.1.2. La mobilité à la nage (Swimming)**

Dans la mobilité à la nage swimming, les procédures étaient les mêmes que celles du test du swarming, à l'exception de la composition du milieu de nage, qui était constitué de 1,0% de tryptone, 0,5% de NaCl et 0,3% d'agar (Vrenna et al., 2021).

### **1.5.2. Production de la pyocyanine et de la pyoverdine**

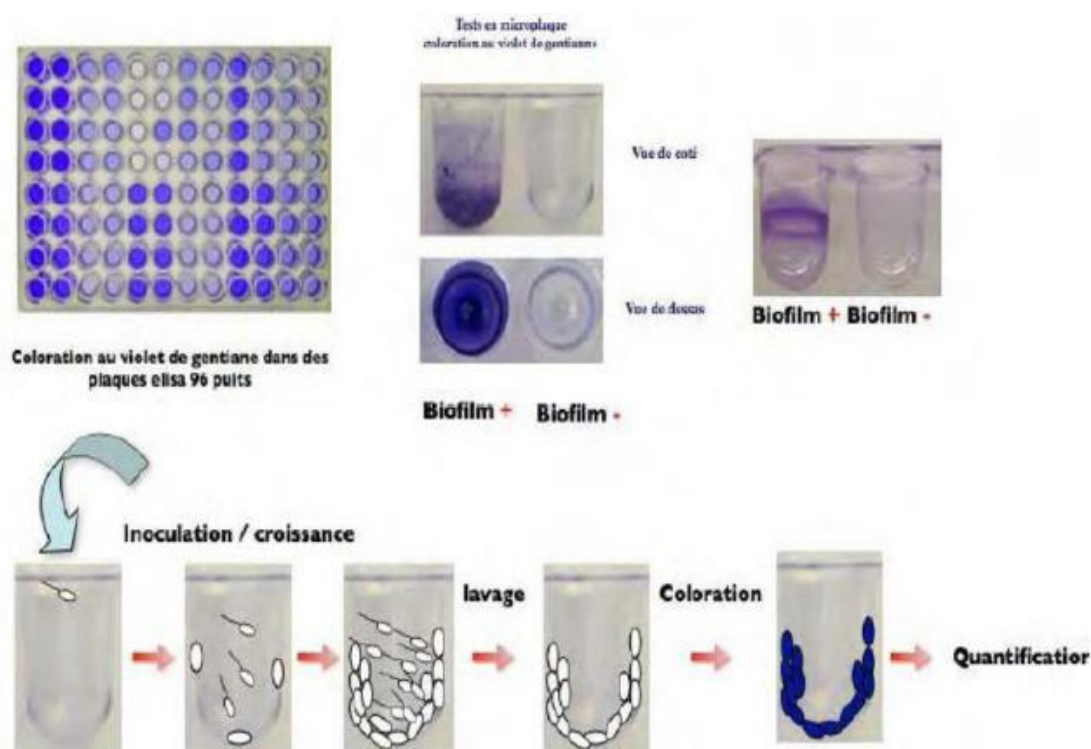
Afin de mettre en évidence la production successive des souches de pyocyanine et de pyoverdine, les milieux King A et King B ont été employés. Le milieu King A révèle la présence de pyocyanine, se traduisant par une coloration verdâtre, tandis que le milieu King B révèle la présence de pyoverdine, donnant une teinte jaune caractéristique. Des colonies soigneusement isolées ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et ensemencées en stries serrées à la surface de chaque milieu. Par la suite, ces tubes ont été placés dans une étuve à 37°C pour une incubation de 1 à 3 jours (Delarras, 2007).

### 1.5.3. Quantification de la pyocyanine

La caractérisation et la quantification de la production de pyocyanine des souches de *P. aeruginosa* ont été réalisées conformément à la méthode décrite par (Essar, et al, 1990). Les cellules bactériennes ont été inoculées dans un bouillon de *Pseudomonas* (PB) contenant 20 g de Bacto-Peptone, 1,4 g de MgCl<sub>2</sub> et 10 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> par litre d'eau distillée, puis incubées pendant 72 heures à 37 °C. Les surnageants, dépourvus de cellules et obtenus par centrifugation à 10000 g pendant 15 minutes, ont été extraits avec 3 mL de chloroforme, puis soumis à une re-extraction dans 1 ml de HCl 0,2 M afin d'obtenir une solution allant du rose au rouge foncé. La concentration relative de pyocyanine a ensuite été mesurée de manière spectrophotométrique à 520 nm. Les concentrations, exprimées en microgrammes de pyocyanine produits par millilitre de surnageant de culture, ont été déterminées optiquement en multipliant la densité optique (DO) à 520nm (DO520) par 17,072 (Essar et al., 1990; Kurachi, 1958)

### 1.5.4. Étude du pouvoir des souches isolées à former des biofilms

L'évaluation du potentiel des souches isolées à former des biofilms a été réalisée en utilisant la méthode de coloration au cristal violet Figure, comme décrit par (O'Toole, 2011). Cette approche permet une évaluation quantitative de la formation de biofilms en mesurant la densité du biofilm formé, directement corrélée à la coloration adsorbée par le cristal violet (Pantanella et al, 2013).



**Figure 7 :** La technique de Formation de biofilm en microplaque

Les souches bactériennes ont été cultivées dans des tubes de bouillon de Müller-Hinton pendant 24 h, puis ajustées à une DO de 0,08 à 600 nm. Des dilutions appropriées ont été préparées pour obtenir une concentration finale de  $5 \times 10^5$  UFC/ml. Ensuite, des microplaques à 96 puits en polystyrène transparent ont étéensemencées avec 200  $\mu$ l de chaque suspension bactérienne. Des puits témoins remplis de bouillon stérile ont également été inclus.

Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24 heures sans agitation, favorisant ainsi la formation de biofilms. Après l'incubation, le contenu de chaque puits a été soigneusement retiré, et les puits ont été lavés à l'eau distillée stérile pour éliminer les bactéries non adhérentes.

Les biofilms formés ont été ensuite colorés avec une solution aqueuse de cristal violet à 0.1 % et incubés à température ambiante pendant 10 à 15 minutes. Après l'incubation, l'excès de colorant a été éliminé, et les puits ont été rincés à l'eau distillée stérile pour éliminer le cristal violet non lié.

#### 1.5.5. Quantification du biofilm :

La quantification du biofilm a été réalisée en mesurant l'absorbance à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques EL $\times$  808™. Le cristal violet lié au biofilm a été dissous en ajoutant 200  $\mu$ L d'acide acétique à 30 % dans l'eau dans chaque puits, suivi d'une incubation de 30 min.

L'absorbance à 630 nm a été enregistrée, fournissant ainsi une mesure quantitative de la densité du biofilm formé par chaque souche. Chaque souche a été testée en triplicata pour garantir la reproductibilité des résultats.

Enfin, les souches ont été classées en tant que productrices de biofilm faibles, modérées ou fortes en utilisant les critères établis par (Stepanović et al., 2000), basés sur les valeurs d'absorbance. Cette classification permet une évaluation précise du potentiel de chaque souche à former des biofilms, une caractéristique cruciale dans la virulence et la persistance des infections bactériennes (O'Toole, 2011).

## 2. Effet des huiles essentielles

### 2.1. Plantes aromatiques

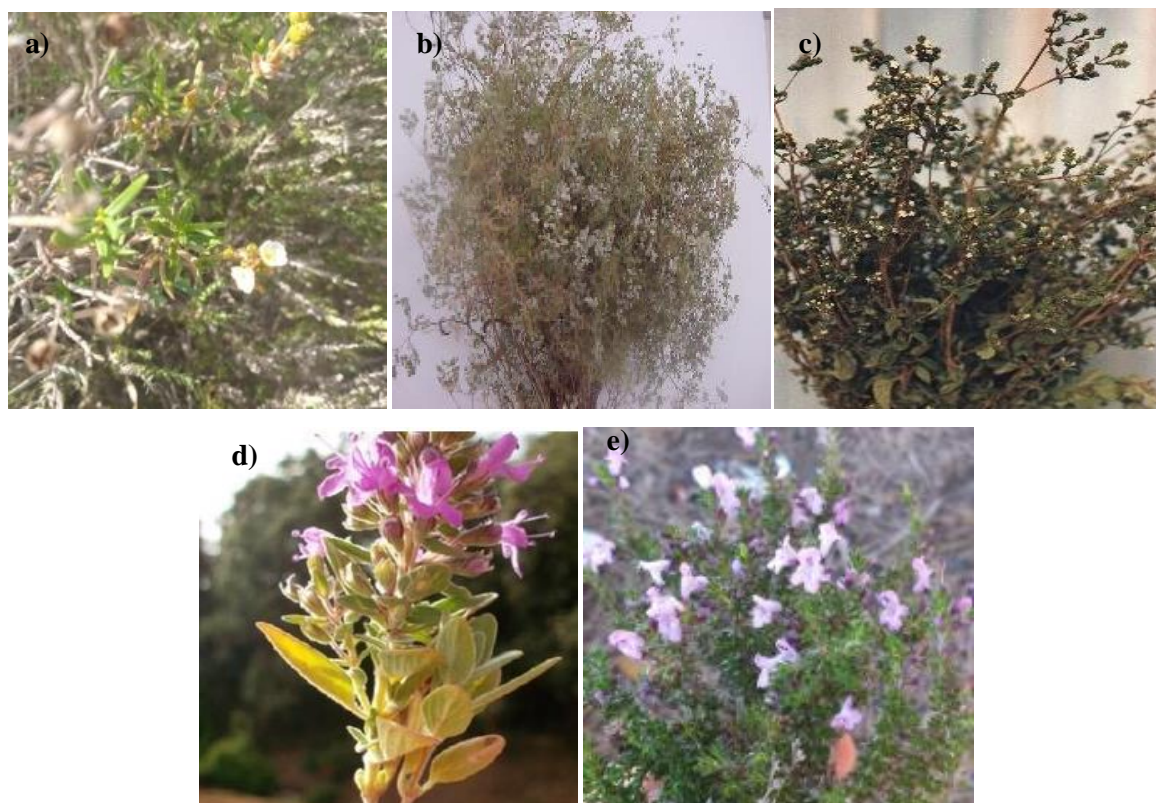
Cette étude a examiné cinq plantes appartenant à trois familles, comme indiqué dans le Tableau 3, reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques et considérant leur endémisme. La sélection de ces espèces végétales s'est basée sur une enquête ethnobotanique préliminaire et un criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (HE). Les critères de choix ont inclus l'utilisation traditionnelle par la population locale contre les infections dans le nord-ouest de l'Algérie, la disponibilité du matériel végétal, et la composition chimique des HE, riches en composés oxygénés de nature phénolique (Benbelaïd et al., 2017; Bendahou et al., 2008).

Tableau 3 : Les stations géographiques de récolte des plantes aromatiques.

Plantes aromatiques	famille	Parties de la plante	Stations	code
<i>Ammoides verticillata</i>	<i>Apiaceae</i>	Feuilles et fleurs	Terni, Tlemcen	VP-AM061320
<i>Cistus munbyi</i>	<i>Cistaceae</i>	Feuilles et fleurs	Région côtière de Honaine, Tlemcen	VP-SBF070620
<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Lamiaceae</i>	Feuilles et fleurs	Mefrouch, Tlemcen	VP-OR061720
<i>Thymbra capitata</i>	<i>Lamiaceae</i>	Feuilles et fleurs	Lala setti, Tlemcen.	VP-TH071220
<i>Thymus lanceolatus</i>	<i>Lamiaceae</i>	Feuilles et fleurs	Terni, Tlemcen	VP-TL061920

Les plantes étudiées, à savoir *Ammoides verticillata* (Nounkha), *Cistus munbyi* (Chebouba lfedia), *Origanum glandulosum* (Zaatar el berhouche), *Thymbra capitata* (Ziitera), et *Thymus*

*lanceolatus* (Zaâtar Terni) (Figure 8), ont été collectées de juin 2018 à juillet 2020. Le matériel végétal, constitué des sommités fleuries et des feuilles des parties aériennes des plantes, a été récolté en pleine inflorescence à l'état spontané, puis séché à l'ombre (à température ambiante) dans un endroit sec et aéré pendant 25 jours. L'identification botanique a été réalisée dans le laboratoire de gestion écologique des écosystèmes naturels en se basant sur le livre de botanique (Quézel & Santa, 1962) comme référence. Des spécimens de référence de toutes les espèces ont été déposés dans le laboratoire avec des codifications spécifiques (VPC)



**Figure 8 :** Plantes médicinales retenues.

**a)** *Cistus munbyi* ; **b)** *Ammoides verticillat* ; **c)** *Origanum glandulosum* ; **d)** *Thymus lanceolatus* ; **e)** *Thymbra capitata*

## 2.2. Obtention des huiles essentielles

L'extraction des HE à partir du matériel végétal a été réalisée par hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clevenger Figure, conforme aux recommandations de la pharmacopée européenne (2008). Le processus implique le contact direct du matériel végétal avec de l'eau, suivi de la condensation des vapeurs d'eau chargées d'HE. L'extraction a duré trois heures pour les parties aériennes des plantes aromatiques. Les HE obtenues ont été déshydratées avec du

sulfate de magnésium et conservées à 4 °C, à l'abri de la lumière. Le rendement a été calculé en pourcentage, en divisant la masse d'HE par la masse de matière végétale sèche.



**Photo 9** : Appareil type Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation

### 2.3. Analyse chimique des huiles essentielles

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC) a été effectuée à l'aide d'un chromatographe de type Perkin Elmer AutoSystem GC, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) dédiés à la détection des composés volatils. L'appareil comprenait également un injecteur/diviseur et deux colonnes distinctes, l'une polarisée (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et l'autre non polarisée (Rtx1, polydiméthylsiloxane), mesurant toutes deux 60,00 m × 0,22 mm (diamètre interne) avec une épaisseur de film de 0,25 µm. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un débit de 1 mL/min, avec une pression à la tête de colonne maintenue à 25 psi. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 250 °C et 280 °C. Le programme de température consistait en une augmentation de 60 à 230 °C à un taux de 2 °C/min, suivie d'une période de maintien de 45 minutes à 230 °C. L'injection s'est déroulée en mode split avec un rapport de division de 1/50, et la quantité d'huile essentielle injectée était de 0,2 µL. La quantification a été réalisée par intégration électronique directe des aires des pics.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a suivi un protocole similaire, mais avec l'utilisation d'un chromatographe Perkin Elmer AutoSystem XL et un détecteur de masse TurboMass Perkin Elmer. Les conditions opérationnelles, y compris le gaz porteur (hélium à 1

mL/min, pression à la tête de colonne à 25 psi), la température de l'injecteur (250 °C), le programme de température (de 60 à 230 °C à un taux de 2 °C/min avec une période de maintien de 35 minutes à 230 °C), le mode d'injection en split (rapport de division de 1/80), et la quantité d'huile essentielle injectée (0,2 µL) étaient similaires. La détection a été effectuée par un analyseur à quadrupôle fonctionnant par impact électronique, avec une fragmentation réalisée à un champ électrique de 70 eV. L'identification des composants des huiles essentielles a été réalisée par deux méthodes, l'indice de Kovats (1965) et la comparaison des spectres de masse avec ceux de la bibliographie

#### 2.4. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

##### 2.4.1. Technique de diffusion en gélose

L'activité antibactérienne des HE a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion en disque d'agar (Larif, Ouhssine, Soulaymani, & Elmidaoui, 2015). Un ensemble de quinze souches de *P. aeruginosa* a été spécifiquement choisi pour cette étude, comprenant treize souches cliniques, ainsi que deux souches de référence, ATCC 27853 et Pa01.

Suite à l'inoculation des souches et à une période d'incubation de 24 heures dans le bouillon de Müller-Hinton à 37 °C (Fluka Bio Chemika, Espagne), les inoculas ont été normalisés à une densité optique de 0,08 à 0,13, correspondant à  $10^8$  UFC/ml, ce qui correspond à 0,5 McFarland. Ces inoculas ont ensuite été ensemencés sur de l'agar Müller-Hinton (Fluka BioChemika, Espagne) à l'aide de techniques d'écouvillonnage. Un disque de papier filtre stérile Whatman N° 03 d'un diamètre de 6 mm, imprégné de 10 µl d'HE pure, a été déposé sur la surface de l'agar.

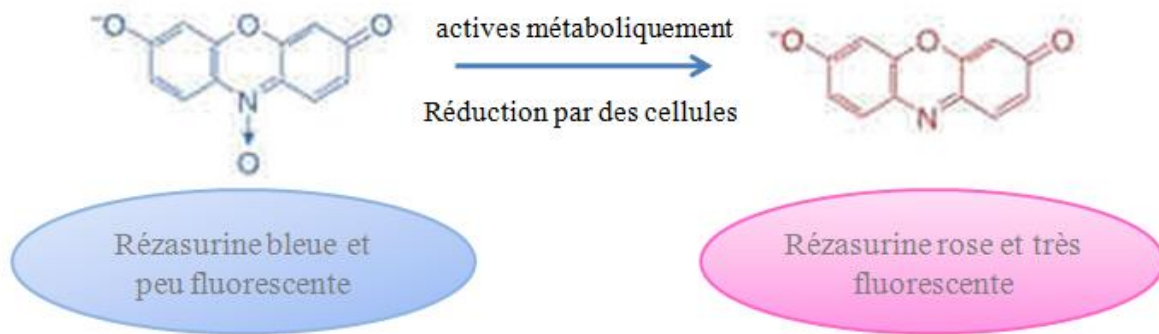
Après une période d'incubation de 24 heures, les diamètres d'inhibition, incluant ceux des disques, ont été mesurés en millimètres à l'aide d'une règle graduée. Chaque HE a fait l'objet d'un test indépendant, et l'expérience a été répétée trois fois afin de vérifier la reproductibilité des résultats.

##### 2.4.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La méthode de microdilution utilisant des plaques de microtitration à 96 puits, conforme à celle décrite par Wiegand et al., (2008) a été adaptée avec quelques ajustements afin de déterminer



la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) pour l'ensemble des souches bactériennes examinées. La rézasurine a servi d'indicateur de viabilité (Figure 10), où la couleur rose indique la croissance bactérienne et le bleu indique l'inhibition de la croissance (Sarker et al., 2007).



**Figure 10** : Conversion de la rézasurine en présence des bactéries vivantes

#### 2.4.2.1. Préparation du Réazarine

La préparation du réazarine a impliqué la dissolution de 270 mg dans 40 ml d'eau distillée stérile, suivie d'un mélange vigoureux par vortex pour garantir l'homogénéité. La solution résultante a été conservée à 4 °C pour maintenir sa stabilité (Sarker et al., 2007).

#### 2.4.2.2. Préparation de la Solution Mère et des Concentrations

La solution mère des HE a été élaborée avec une concentration de 40% v/v. Les concentrations variables des HE ont été obtenues par des dilutions successives dans le bouillon de Müller-Hinton, avec l'ajout de Tween 80 à 1% (v/v) pour assurer une dispersion complète des HE. Une solution complémentaire contenant du bouillon de Müller-Hinton et du Tween 80 à 1% a été préparée pour maintenir une concentration constante de Tween 80 à 1% dans les différentes concentrations des HE.

Les bactéries, initialement à une concentration de  $10^8$  UFC/ml, ont été diluées à 1/1000 pour obtenir une concentration finale de  $10^5$  UFC/ml. Dans la microplaque, 160  $\mu$ l de la suspension bactérienne diluée ont été placés dans les puits. Ensuite, 20  $\mu$ l de réazarine et 20  $\mu$ l de la solution des HE ont été ajoutés. La concentration finale de Tween 80 était maintenue à 0,1% (v/v) dans chaque puits, avec des concentrations des HE allant de 4% à 0,0078%. Cette approche méthodique a permis une évaluation précise des CMI pour différentes souches bactériennes.

## 2.5. Effet des huiles essentielles sur les facteurs de virulences

Pour les tests sur les facteurs de virulences, seule l'HE de *C. munbyi* a été étudié en raison de son caractère inédit, endémique des régions du Nord-Ouest de l'Algérie et du Nord-Est du Maroc, et basée sur les affirmations traditionnelles concernant son utilisation. À notre connaissance, aucune investigation n'a été réalisée sur cette HE spécifique face aux souches cliniques de *P. aeruginosa*. Ce choix stratégique se justifie par le potentiel unique de cette HE, offrant ainsi une contribution significative à la recherche dans ce domaine.

### 2.5.1. L'inhibition du QS

L'effet inhibiteur de l'HE de *C. munbyi* sur le QS a été étudié à travers deux tests distincts. Tout d'abord, son impact sur l'inhibition de la production de violacéine chez *Chromobacterium violaceum* CV 12472 a été examiné. Ensuite, son influence sur la régulation des signaux de communication intercellulaire au sein de *Chromobacterium violaceum* CV026 a été explorée, mettant en lumière son potentiel dans la modulation du QS.

#### 2.5.1.1. Inhibition de la Production de Violacéine

L'inhibition de la production de violacéine, un marqueur du QS, a été évaluée selon la méthode décrite par (Alfred et al., 2021). Des cultures fraîches de *C. violaceum* CV12472 ont été mélangées avec des concentrations CMI et sous-CMI de l'HE de *C. munbyi* dans du bouillon LB, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Les absorbances ont été mesurées à 585 nm dans un lecteur de microplaques à 96 puits (SpectraMax, Molecular Devices) pour détecter toute réduction de la production de violacéine par rapport au témoin, constitué de bouillon LB et de *C. violaceum* CV12472. L'inhibition de la violacéine a été calculée en pourcentage, offrant ainsi un aperçu de l'effet anti-quorum sensing de l'HE.

#### 2.5.1.2. L'inhibition du quorum sensing chez *C. violaceum* CV026.

L'efficacité anti-quorum sensing de l'HE de *C. munbyi* a été examinée à l'aide d'une méthode modifiée précédemment décrite par (Alfred Ngenge et al., 2021; Koh & Tham, 2011). Dans cette approche, 5 ml de Soft Top Agar, composé de 1,3 g d'agar, 2,0 g de tryptone, 1,0 g de chlorure de sodium, dissous dans 200 ml d'eau déionisée, ont été associés à 100 µL d'une pré-

culture de *C. violaceum* CV026 et 20 µL d'acylhomosérine lactone (AHL) à 100 µg/ml en tant que source externe d'hormones. Ce mélange a ensuite été délicatement versé sur la surface d'une plaque de gélose LB solidifiée en tant que couche supérieure. Après solidification, des puits de 5 mm de diamètre ont été créés sur chaque plaque et remplis avec 50 µL d'HE de *C. munbyi* aux concentrations CMI et sous-CMI. Chaque expérience a été répliquée en triplicata, et les plaques ont été incubées à 30 °C pendant trois jours. Le diamètre de la zone d'inhibition du QS, visualisé par un halo blanc ou crème autour du puits contre une pelouse pourpre de bactéries *C. violaceum* CV026 activées, a été mesuré en millimètres.

#### 2.5.2. Les types de mobilité

Pour étudier l'effet de l'HE de *C. munbyi* sur la motilité par swimming et la motilité par swarming de *P. aeruginosa*, une suspension à 10<sup>6</sup> UFC/ml, provenant des pré-cultures des souches de *P. aeruginosa*, a été inoculée par point au centre des boîtes de gélose contenant 20 ml de milieu adapté à chaque type de mobilité, avec des concentrations sous-CMI de l'HE de *C. munbyi*. Les boîtes ont ensuite été incubées pendant 24 heures à 37 °C. Des plaques sans HE ont été utilisées comme témoins non traités. L'étendue de l'essaim a été déterminée en mesurant la zone d'essaim (µm<sup>2</sup>) à l'aide du logiciel ImageJ et comparée avec le témoin.

#### 2.5.3. Pyocyanine

L'effet de l'HE de *C. munbyi* sur la production de pyocyanine par les souches de *P. aeruginosa* a été étudié selon la méthode décrite par Essar et al. (1990). Les cellules bactériennes ont été cultivées dans un bouillon de *Pseudomonas* (PB) avec ou sans l'HE à des concentrations sub-MIC pendant 72 heures à 37 °C. Le PB seul, complété avec 1% de Tween 80, a été utilisé comme témoin. Les surnageants, dépourvus de cellules par centrifugation, ont été extraits avec du chloroforme puis ré-extraits dans de l'HCl 0.2M pour obtenir une solution colorée. La concentration relative de pyocyanine a été mesurée spectrophotométriquement à 520 nm.

#### 2.5.4. L'inhibition de la production des exopolysaccharides (EPS)

Pour évaluer l'effet de l'HE de *C. munbyi* sur la production des EPS, les souches de test ont été cultivées en présence et en l'absence de concentrations sous-CMI de l'HE, et comparées à un groupe témoin. Extraction des EPS

L'extraction des EPS a suivi le protocole précédemment décrit par Huston et al., (2004). Les cellules ont été éliminées d'une pré-culture de nuit par centrifugation douce à 1 500 g pendant 50 minutes à 2 °C. Trois volumes d'éthanol à 100% refroidi ont été ajoutés au surnageant filtré, qui a ensuite été incubé toute la nuit à 2 °C. L'EPS a précipité et a été collecté par centrifugation à 10 000 g pendant 20 minutes. Les étapes de lavage à l'éthanol et de centrifugation ont été répétées trois fois. Pour éliminer les polysaccharides de faible poids moléculaire, le pellet final a été dissous dans de l'eau distillée et soumis à une dialyse pendant 48 heures à 2 °C en utilisant une tubulure de dialyse Spectra Por (coupée à 2 000-3 500 Da). La quantification des EPS a été réalisée par la méthode colorimétrique au phénol-acide sulfurique (Dubois et al., 1956).

#### 2.5.5. L'inhibition de la protéase LasA

La mesure de l'inhibition de la protéase LasA a été entreprise afin d'évaluer l'impact potentiel de l'HE de *C. munbyi* sur la sécrétion de cette dernière par *P. aeruginosa*. L'activité de la protéase LasA a été évaluée en analysant la capacité des surnageants de cultures de *P. aeruginosa* à lyser des cellules de *Staphylococcus aureus* préalablement bouillies (Kessler et al., 1993).

Pour ce faire, une pré-culture de *S. aureus* de 30 ml a été soumise à une ébullition dans un bain-marie à 100 °C pendant 10 minutes, suivie d'une centrifugation de 10 minutes à 20 683 g. Le culot obtenu a ensuite été re-suspendu dans un tampon de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 10 mM (pH 4.5) et dilué avec le même tampon jusqu'à atteindre une DO d'environ 0,8 à 600 nm.

Par la suite, une quantité de 100 µL du surnageant, dépourvue de cellules, provenant de cultures de *P. aeruginosa* cultivées avec ou sans l'HE de *C. munbyi*, a été ajoutée à 900 µL de la suspension de *S. aureus*. Les lectures de la DO à 600 nm ont été effectuées après des intervalles de 10, 20, 40, et 60 minutes.

Le pourcentage d'inhibition de l'activité de la protéase LasA a été calculé en comparaison avec le témoin de l'essai, représentant la condition sans l'ajout d'HE de *C. munbyi* (Karuppiyah et al., 2021).

#### 2.5.6. Biofilm

L'évaluation du pouvoir d'inhibition de la formation de biofilm par l'HE de *C. munbyi* a été réalisée à deux moments distincts du développement du biofilm en utilisant le test en

microplaques, tel que décrit par O'Toole (O'Toole, 2011). L'HE a été ajoutée au milieu dès le début de la culture (0 h, période pré-adhésion) et après la formation du biofilm (24 h de culture bactérienne).

#### 2.5.6.1. Inhibition de la formation du biofilm

Dans la phase pré-adhésion, l'HE de *C. munbyi* a été ajoutée dès le début de la culture pour évaluer son activité anti-biofilms. Des pré-cultures diluées des agents pathogènes testés ( $5 \times 10^5$  UFC/ml) ont été réparties dans des puits de microplaque, avec ou sans 20  $\mu$ l de différentes concentrations d'HE. Le Tween 80 a servi de témoin. Après incubation des microplaques à 37 °C pendant 24 heures, les plaques ont été rincées pour éliminer les cellules planctoniques, puis colorées avec du cristal violet à 0,1% pendant 15 minutes. Les puits colorés ont été rincés pour éliminer l'excès de colorant, et le biofilm formé a été dissous dans de l'acide acétique à 30%. Les mesures de densité optique ont été effectuées à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Biotek Elx800 MER), en utilisant de l'acide acétique à 30% comme blanc. Chaque expérience a été répétée trois fois pour garantir la fiabilité des résultats.

#### 2.5.6.2. Essai d'éradication de biofilm préformé

Pour évaluer l'efficacité de l'HE de *C. munbyi* dans l'éradication des biofilms matures déjà établis, un essai sur des biofilms préformés a été réalisé. Des puits d'une microplaque stérile à 96 puits ont été remplis avec 200  $\mu$ L de bouillon MH contenant une dilution de 1/100 de la pré-culture bactérienne. Après une incubation de 24 heures à 37 °C, le contenu des microplaques a été éliminé, et les puits ont été délicatement lavés trois fois avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, 200  $\mu$ L de milieu frais avec ou sans différentes concentrations d'HE de *C. munbyi* ont été ajoutés à chaque puits. Les microplaques inoculées ont été ré-incubées pendant 24 heures supplémentaires (pour un total de 48 heures) à 37 °C. Les puits témoins ont été remplis avec 200  $\mu$ L de bouillon MH stérile. Après 24 heures, les plaques ont subi le même traitement, et les biofilms ont été quantifiés en utilisant la coloration au cristal violet comme décrit précédemment. Le pourcentage d'inhibition de l'échantillon testé a été calculé en utilisant la formule ci-dessous.

$$\text{Taux d'inhibition du Biofilm(\%)} = \frac{\text{Control DO 490} - \text{Témoin DO 490}}{\text{Control DO 490}} \times 100$$

#### 2.5.6.3. Visualisation sur site des biofilms

L'évaluation de l'inhibition de la production de biofilm in situ à trois moments temporels distincts repose sur une méthodologie antérieurement documentée avec certaines adaptations (Fadila, 2016; Sarker et al., 2007).

1% des pré-cultures des souches testées (0,4 DO à 600 nm) ont été introduits dans des plaques de 24 puits contenant 1 ml de milieu MH frais et des lamelles de verre stériles, en présence ou en absence de diverses concentrations d'HE de *C. munbyi*. Après un temps d'incubation approprié (1 h pour l'adhésion et 24 h pour la formation du biofilm), les lamelles de verre ont été lavées à l'eau distillée pour éliminer les cellules planctoniques, et les biofilms formés ont été colorés avec une solution de cristal violet à 0,1%. Les lamelles de verre colorées et séchées à l'air ont été montées sur des lames de microscope avec le biofilm orienté vers le haut, et les biofilms visibles ont été observés sous un microscope optique (Carl ZEISS Einbautrafo 392575-9001) avec un grossissement de 40X.

Pour examiner l'effet de l'HE de *C. munbyi* sur les biofilms matures, des biofilms ont été développés sur des lamelles de verre de 1 cm × 1 cm disposées dans des plaques de 24 puits contenant une pré-culture re-suspendue dans 1 ml de milieu frais. Après une incubation de 24 heures, les lamelles de couverture ont subi trois rinçages à l'eau distillée pour éliminer les cellules planctoniques, puis les biofilms matures ont été traités avec les sous-CMI respectives de l'HE de *C. munbyi* pendant 24 heures. Les biofilms ont ensuite été observés au microscope optique conformément à la procédure précédemment décrite.

#### 2.5.6.4. Visualisation du biofilm sous microscope électronique à balayage (MEB)

Afin de visualiser l'effet de l'HE de *C. munbyi* sur la formation de biofilm sous un microscope électronique à balayage (MEB), des biofilms sur lamelles de verre ont été cultivés dans les cultures traitées et non traitées, comme décrit dans l'analyse microscopique en lumière. Après les incubations, les lamelles de verre ont été rincées à l'eau distillée pour éliminer les cellules planctoniques non adhérentes, et les biofilms ont été fixés avec 2,5% (v/v) de glutaraldéhyde dans du PBS pendant 5 heures à température ambiante. Après le lavage, la déshydratation a été réalisée dans de l'éthanol à différentes concentrations (30, 50, 70, 90 et 100%), comme décrit par Bose et al (Bose et al., 2020). Les lamelles de verre ont été séchées, revêtues d'or, et observées sous un microscope électronique à balayage à émission de champ JSM-7200F Schottky (Figure 11).



Figure 11 : microscope électronique à balayage à émission de champ JSM-7200F Schottky.

# **Résultats et Discussion**

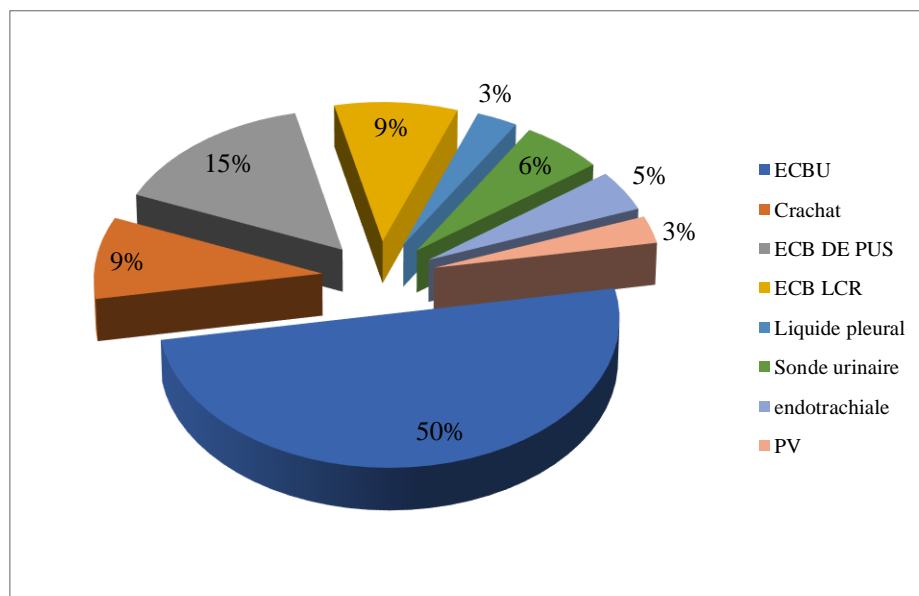


## 1. Isolement et identification des souches bactériennes

### 1.1. Répartition des souches par type de prélèvements

Entre janvier 2019 et novembre 2021, nous avons isolé 64 souches de *Pseudomonas aeruginosa* à partir de prélèvements cliniques positifs. Ces prélèvements ont été réalisés au niveau du laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Tlemcen. Conformément aux données présentées dans la (Figure 12), 53% de ces souches de *P. aeruginosa* ont été récupérées à partir d'infections urinaires, comprenant 33 souches provenant d'échantillons d'examen cytobactériologique des urines (ECBU) et 4 souches provenant de sondes urinaires. Les ECB de pus ont également contribué de manière significative avec 10 souches, suivies par les crachats avec 6 souches.

L'analyse des données présentées dans la Figure 12, révèle des tendances significatives dans la distribution des souches de *P. aeruginosa* en fonction des types de prélèvements. Il est notable que les échantillons ECBU et les prélèvements de pus sont apparemment les plus fréquents, suivis par les crachats et les échantillons de liquide céphalorachidien (LCR). Cette observation confirme que les voies urinaires et les infections cutanées pourraient représenter des sites privilégiés pour la colonisation ou l'infection par *P. aeruginosa*.(Newman, Floyd, & Fothergill, 2017)



**Figure 12 :** Répartition des souches de *P. aeruginosa* par type de prélèvement

**ECBU :** examen cytobactériologique des urines ; **ECB LCR :** examen cytobactériologique liquide céphalorachidien ; **ECB Pus :** examen cytobactériologique de pus ; **PV :** prélèvement vaginal.

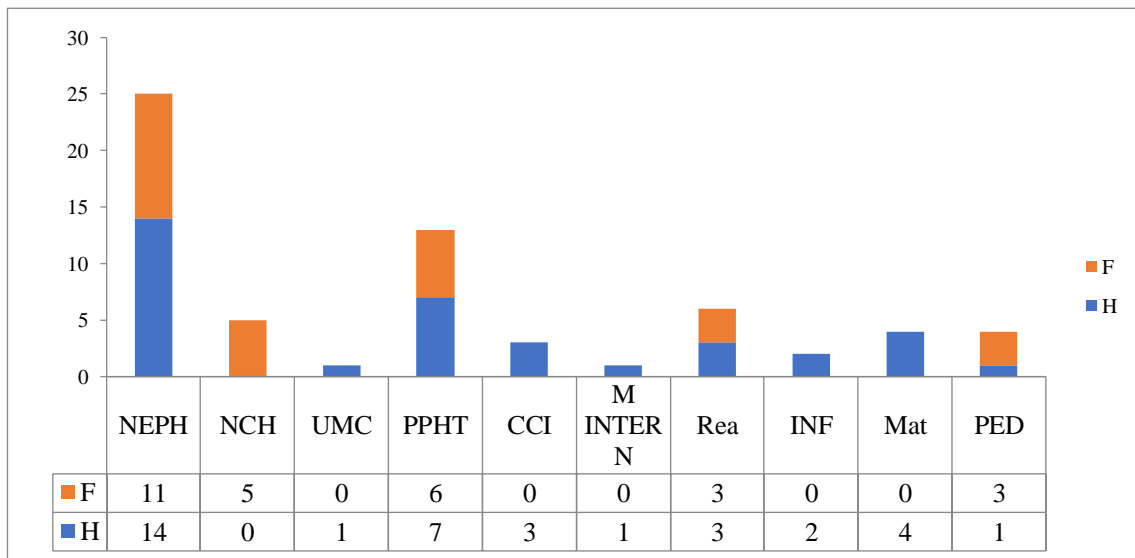
En revanche, les liquides pleuraux et les sondes endotrachéales semblent être moins fréquemment associés à la détection de cette bactérie. Cette diversité dans les origines des échantillons cliniques, incluant, l'urine, le pus, les plaies, le liquide céphalorachidien et le liquide pleural, témoigne de la capacité de *P. aeruginosa* à coloniser divers sites anatomiques et à provoquer des infections. L'ampleur de cette diversité souligne l'importance cruciale de notre étude dans l'évaluation des infections nosocomiales liées à cette bactérie.

De même, ces résultats mettent en évidence une prévalence notable de *P. aeruginosa* dans les voies urinaires et les infections cutanées, soulignant ainsi l'importance cruciale de la surveillance et du contrôle de cette bactérie dans ces contextes.

### **1.2. . Répartition des souches par service**

Les données présentées dans la Figure 13 reflètent la distribution des souches de *P. aeruginosa* selon le service et le sexe des patients. Dans le service de Néphrologie, 14 souches ont été isolées chez des patients masculins, représentant 56% du total de 25 souches dans ce service, tandis que 11 souches ont été identifiées chez des patients féminins, ce qui correspond à 44% de la distribution totale. Une tendance similaire est observée dans d'autres services, notamment dans la Pneumo-phtisiologie, où 7 souches ont été isolées chez les hommes, représentant 20% du total de 36 souches dans ce service, par rapport à 6 souches chez les femmes, ce qui équivaut à 17% de la distribution totale. À l'inverse, dans le service de Neurochirurgie, une prédominance féminine est notée, avec aucune souche isolée chez les hommes (0%) par rapport à 5 souches chez les femmes, représentant 100% du total de 5 souches dans ce service.

Dans notre étude, l'analyse quantitative des résultats a permis de mettre en évidence la répartition des souches de *P. aeruginosa* dans différents services hospitaliers. Par exemple, le service de Néphrologie représente 39% du total, suivi de la Pneumo-phtisiologie avec 20%, et le service de Réanimation avec 9%. Ces résultats concordent avec une étude antérieure menée par Meliani et al. (2020), qui a également observé une prédominance de l'infection à *P. aeruginosa* dans les unités de soins intensifs et le service d'urologie notamment avec 15.38% dans le service d'urologie et 7.69% dans le service d'endocrinologie. Nos résultats corroborent également avec les travaux de Bouguenoun et al., (2016) et Merradi et al., (2019), qui ont isolé des souches de *P. aeruginosa* avec des taux élevés dans les échantillons d'urine, atteignant respectivement 71.43% et 60.64%.



**Figure 13 :** Distribution des souches de *P. aeruginosa* selon le service et le sexe des patients

**NEPH :** néphrologie, **NCH :** neurochirurgie, **UMC :** urgences, **PPHT :** pneumo-phtisiologie, **CCI :** chirurgie infantile, **M interne :** médecine interne, **Rea :** réanimation, **INF :** infectiologie, **MAT :** maternité, **PED :** pédiatrie.

Par ailleurs, nos résultats indiquent que les prélèvements de pus constituent la deuxième source principale des souches isolées, en concordance avec les constatations de Sefraoui et al., (2014), qui ont réussi à isoler 94.44% des souches à partir de prélèvements de pus.

En ce qui concerne la distribution entre les sexes, notre analyse révèle que les hommes représentent 56% du total, tandis que les femmes représentent 44%. Ces résultats sont en ligne avec les travaux de Meradji et al., (2015) et Merradi et al., (2019), qui ont également noté une dominance masculine avec des taux de 60% et 63% respectivement. Les études de Meliani et al., (2020) confirment également que les hommes présentent un taux d'infections plus élevé par rapport aux femmes. Ces différences peuvent être attribuées à des facteurs tels que la nature des conditions médicales traitées dans chaque service, ainsi que des variations potentielles dans les comportements d'exposition ou les réponses immunitaires entre les sexes. Cependant, une analyse plus approfondie est nécessaire pour élucider pleinement ces variations et comprendre leur impact sur la prévalence des infections à *P. aeruginosa*.

### Identification

Les souches de *P. aeruginosa* ont été identifiées en utilisant la galerie API 20 NE (Biomérieux, Meylan, France). Les résultats de l'identification ont été traités par les formules d'identification

API sur Microsoft Excel. Cette méthode a révélé plusieurs caractéristiques biochimiques clés du genre *Pseudomonas*, telles que la réduction des nitrates en nitrites, l'oxydation du glucose, la présence d'une arginine dihydrolase, et l'utilisation exclusive du glucose comme source de carbone. De plus, l'assignation des souches à l'espèce *P.aeruginosa* a été confirmée par la présence de gélatinase, l'assimilation de l'acide adipique (Figure 14), un résultat positif à l'oxydase, ainsi que par leur capacité à être cultivées à 42°C et à produire une odeur aromatique distincte.



**Figure 14** : Plaque API 20NE après 24 h d'incubation.

## 2. Etude de la sensibilité des souches aux antibiotiques

L'évaluation de la sensibilité des isolats de *P. aeruginosa* aux antibiotiques revêt une importance cruciale pour orienter la sélection des agents antimicrobiens, assurant ainsi un traitement efficace et ayant des implications significatives pour le diagnostic et la prise en charge clinique des patients. Dans cette optique, nous avons procédé à des tests de sensibilité des souches aux antibiotiques en utilisant la méthode classique de diffusion des disques sur milieu gélosé de Mueller-Hinton (MH). Les critères de lecture et d'interprétation ont été appliqués selon les directives du (EUCAST, 2020).

Nos résultats, présentés dans la Figure 15, révèlent une diversité significative de niveaux de résistance parmi les souches de *P. aeruginosa* à l'égard des différents antibiotiques testés. Par exemple, une prévalence importante de résistance aux antibiotiques  $\beta$ -lactamines est observée, avec 53% des souches résistantes à la ticarcilline, 38% à la ticarcilline/clavulanique, 24% à la pipéracilline, et 37% à la céfépime. En revanche, une sensibilité plus élevée est notée envers les carbapénèmes, avec seulement 8% des souches résistantes à la pipéracilline/tazobactame, 33% à l'imipénème, et 5% au mérépénème. Les aminosides tels que la netilmicine et la gentamicine présentent également une sensibilité relativement élevée, avec seulement 3% des souches résistantes à chaque antibiotique.

Ces résultats sont en accord avec les travaux antérieurs de Drissi et al., (2008) et Sefraoui et al., (2014) qui ont également rapporté des taux élevés de résistance de *P. aeruginosa* à diverses classes d'antibiotiques. Par exemple, Drissi et al., (2008) ont montré des taux de résistance élevés tels que 56% à la ticarcilline, 81% à la pipéracilline/tazobactame, 88% à la ceftazidime, 80% à la céfépime, et 97% à la ciprofloxacine. Les isolats de Sefraoui et al., (2014) ont présenté divers niveaux de résistance, comme 38.2% à la ciprofloxacine, 34.83% à la ceftazidime, et 46.07% à la ticarcilline.

Touati et al., (2013) ont signalé que 100% des isolats étaient résistants à la ticarcilline, la ticarcilline/clavulanique et la pipéracilline/tazobactame, tandis que 29.41% étaient résistants à la ciprofloxacine. Pour Bourafa et al., (2018), des niveaux élevés de résistance ont été observés, par exemple, 88.9% à la ticarcilline, 88.9% à la ticarcilline/clavulanique, et 77.8% à la ceftazidime.

Ces résultats mettent en lumière la persistance et l'ampleur du défi posé par la résistance aux antibiotiques chez *P.aeruginosa*, représentant ainsi une préoccupation majeure au sein des hôpitaux algériens. Cela souligne impérativement la nécessité de concevoir des stratégies efficaces pour faire face à cette problématique dans le contexte hospitalier. Les taux élevés de résistance constatés dans différentes classes d'antibiotiques mettent en évidence l'urgence d'une gestion proactive de la résistance bactérienne.

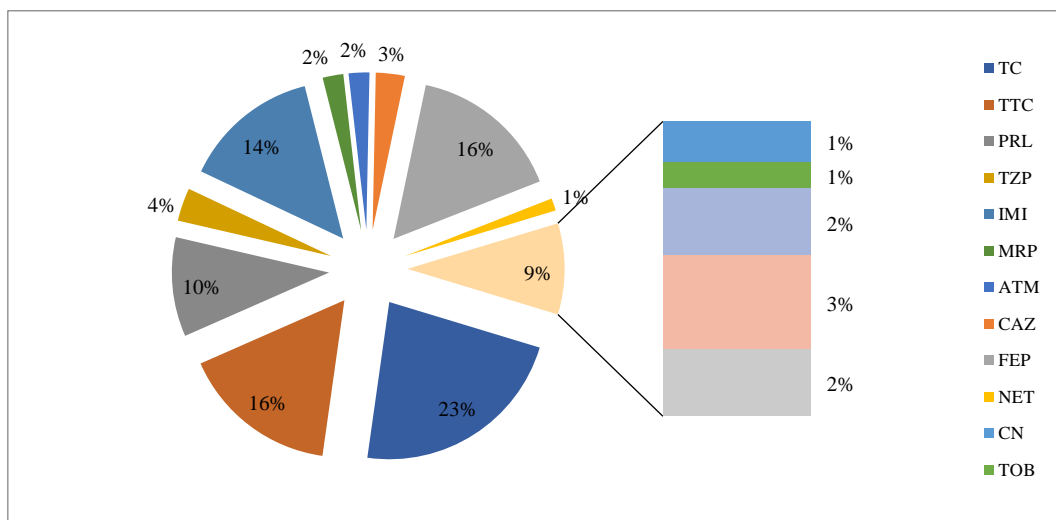


Figure 15 : Taux de résistance par antibiotique.

**TC** : Ticarcilline, **TTC** : la Ticarcilline+acide clavulanique, **PRL** : la Pipéracilline, **TYP** : la Pipéracilline+tazobactam, **CAZ** : la Ceftazidime, **ATM** : l'Aztréonam, **IMI** : l'Imipénème, **MRP** : la Méropénème, **LEV** : Levofloxacine, **TOB** : la Tobramycine, **CN** : la Gentamicine, **CIP** : la Ciprofloxacine, **OFX** : l'Ofloxacine, **NET** : la Netelmicine ; **FEP** : la Céfépime

Parmi les souches les plus résistantes, plusieurs profils notables ont été identifiés. Par exemple, PsH1, issu d'un échantillon d'ECBU du service de Néphrologie, présentait une résistance à tous les antibiotiques testés, à l'exception de l'imipénème et du méropénème. PsH7, provenant d'un échantillon de crachat du même service, montrait une résistance à tous les antibiotiques, à l'exception de la netelmicine, la gentamicine, la tobramicine et la levofloxacine. De même, PsH11, prélevé du pus dans le service de CCI, était résistante à la ticarcilline, à la ticarcilline/clavulanique, à la piperacilline, à la piperacilline/tazobactame, à l'imipénème, et à la LEV. En revanche, 11 souches sont demeurées sensibles à tous les antibiotiques examinés.

L'analyse plus détaillée, comme représentée dans la Figure 16, met en évidence une corrélation significative entre la distribution des souches de *P. aeruginosa* dans chaque service médical et les profils de résistance observés. Par exemple, le service de Néphrologie, représentant 39% du total des souches, manifeste également une résistance notable de 43%. Cette corrélation suggère que la fréquence élevée des souches dans ce service pourrait contribuer à une exposition accrue aux antibiotiques, favorisant ainsi le développement de mécanismes de résistance. En revanche, le service de Rea, représentant 9% du total, NCH 10% de la résistance. PPHT 20% et le reste reparti dans les autres services.

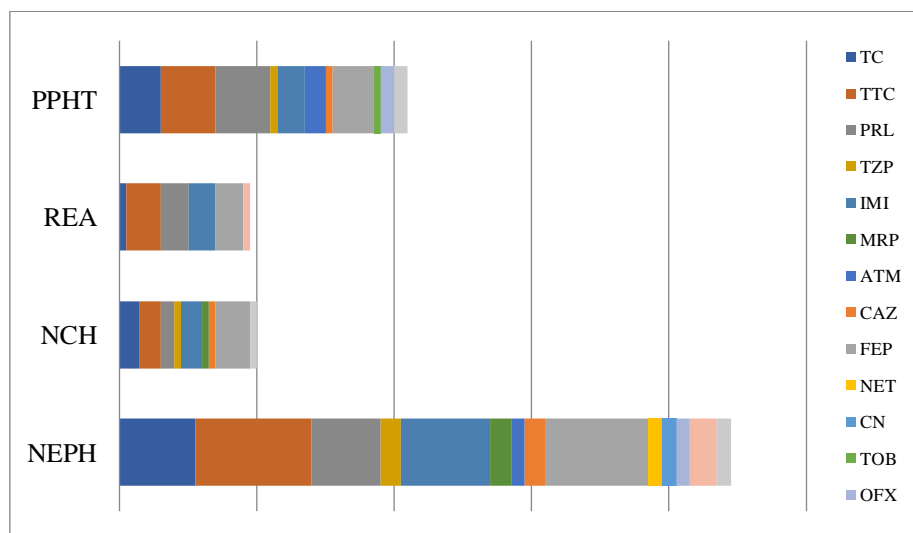


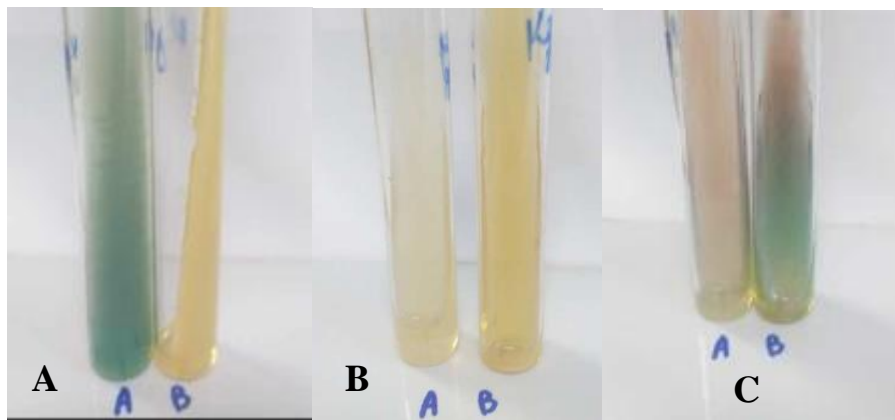
Figure 16 : Répartition de la résistance selon les services.

NEPH : néphrologie ; NCH : neurochirurgie ; REA : réanimation ; PPHT : pneumo-ptisiologie

### 3. Détermination phénotypique des facteurs de virulence

#### 3.1. Production de la pyocyanine et de la pyoverdine

Le milieu King A révèle la présence de pyocyanine, se traduisant par une coloration verdâtre, tandis que le milieu King B révèle la présence de pyoverdine, donnant une teinte jaune caractéristique (Figure 17). Ces milieux ont été utilisés pour caractériser les souches prélevées. Nous avons constaté que la pyocyanine a été produite par 28 souches, tandis que 29 souches étaient capables de produire la pyoverdine. Onze souches ont été capables de produire les deux pigments à la fois, alors que 34 souches produisent une unique pigmentation. En revanche, 17 souches étaient incapables de produire un quelconque pigment.



**Figure 17 :** Production de la pyocyanine et de la pyoverdine.

**A:** pyocyanine (+), pyoverdine (-); **B:** pyocyanine(-), pyoverdine (+); **C:** pyocyanine (+), pyoverdine (+)

#### 3.2. Quantification de la pyocyanine

L'analyse quantitative de la production de pyocyanine a été réalisée, révélant les concentrations de ce pigment chez différentes souches de *P. aeruginosa*. Les résultats, exprimés en microgrammes par millilitre ( $\mu\text{g/ml}$ ) de surnageant de culture, sont présentés de manière détaillée dans la Figure 18. Les valeurs varient considérablement d'une souche à l'autre, reflétant la diversité des capacités de production de pyocyanine au sein de la population bactérienne étudiée. Par exemple, PsH43 présente une concentration remarquablement élevée de 95,6032  $\mu\text{g/ml}$ , indiquant une production significative de pyocyanine. En revanche, certaines souches, telles que PsH16 et PsH51cb, montrent des concentrations plus faibles, suggérant une production moindre de ce pigment.

Les études antérieures, notamment celle menée par Maradji et al., (2016), ont rapporté que la production de pyocyanine était observée chez 100% des isolats étudiés de *P. aeruginosa*. Ce

facteur de virulence, constitué d'un pigment bleu de phénazine, est exclusivement produit par cette bactérie et est responsable des lésions tissulaires. Il agit en formant des radicaux superoxydes et hydroxyles réactifs, principalement dans l'épithélium respiratoire.

Les concentrations de pyocyanine variaient selon les études. Kassob et al., (2023), ont noté que la concentration du pigment était comprise entre 17 µg/ml et 31,5 µg/ml. De même, Shouman et al., (2023) ont analysé 125 isolats cliniques de *P. aeruginosa*, constatant que 45,6 % d'entre eux étaient producteurs de pyocyanine. Parmi ceux-ci, 36,8 % présentaient un faible niveau de pigment (< 5 µg/ml), tandis que 1,6 % montraient une production élevée de pyocyanine (> 10 µg/ml). Les résultats de l'étude de Silva et al., (2014) sont également concordants. Leur investigation, qui a examiné un ensemble de 96 souches isolées entre 1999 et 2010 dans divers hôpitaux brésiliens, a dévoilé une production moyenne de pyocyanine de  $9,61 \pm 4,32$  µg/ml, avec des variations allant de 1,29 à 25,94 µg/ml. Il est particulièrement notable que les souches cliniques de *P. aeruginosa* provenant de l'urine ont manifesté le niveau le plus élevé de pyocyanine, affichant une moyenne de  $20,15 \pm 5,65$  µg/ml.

Les travaux de Khadim et al., (2019) ont également contribué à la compréhension de la production de pyocyanine. Ils ont constaté que 63,5 % des isolats produisaient de la pyocyanine sur le milieu King A. Dans les cas d'infections cutanées, la production de pyocyanine atteignait 10,85 µg/ml chez les isolats provenant de brûlures, tandis que chez les isolats issus d'infections de plaies, elle variait de 3,312 à 6,163 µg/ml, et de 3,54 à 6,354 µg/ml pour les isolats provenant de fluides corporels. Ces résultats soulignent la variabilité dans la production de pyocyanine au sein de différentes souches et conditions d'isolement.



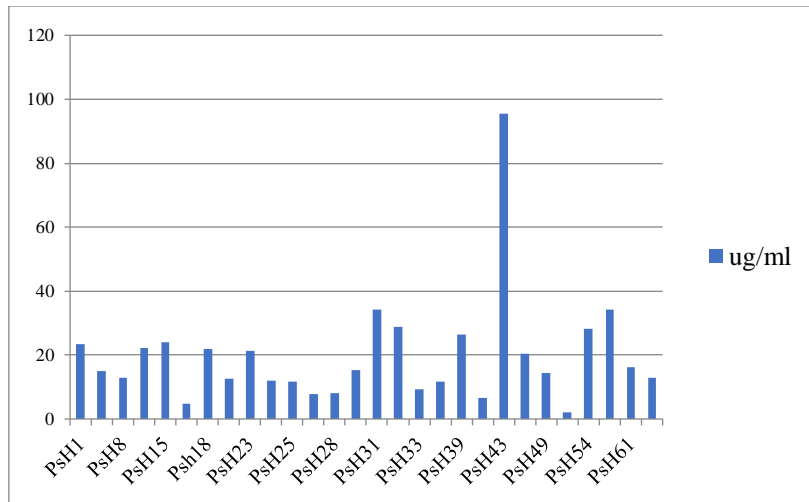
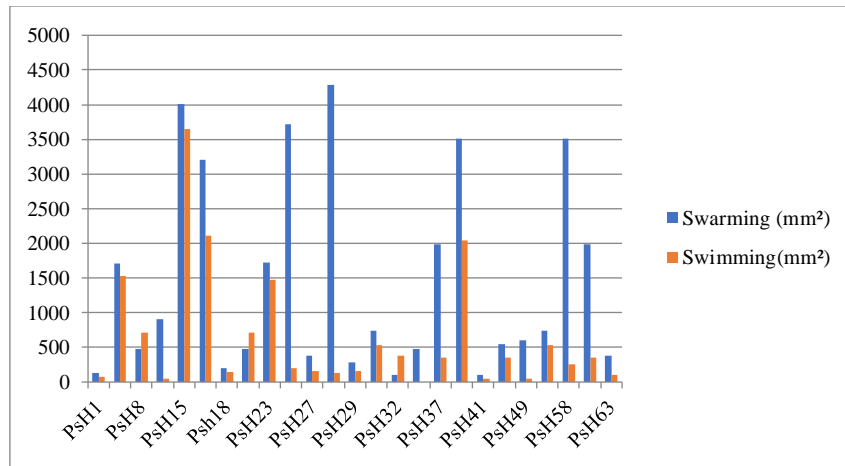


Figure 18 : Taux de production de pyocyanine.

### 3.3. Les phénotypes de mobilité

*P. aeruginosa*, en tant que bactérie hautement mobile, met en œuvre divers mécanismes de motilité. Les facteurs d'attachement jouent un rôle essentiel dans l'adhérence de *P. aeruginosa* aux surfaces, qu'elles soient abiotiques ou biotiques. Certains auteurs considèrent la mobilité comme un élément contribuant à la capacité des souches à former des biofilms. Cette étude a permis de visualiser deux types de mobilité sur différents milieux de culture. L'analyse des phénotypes de mobilité a conduit à une classification des souches en fonction de leurs capacités d'essaimage (swarming) et de nage (swimming), comme illustré dans la figure 19.

Les souches PsH2, PsH 15, PsH 16, PsH 23 et PsH 39 se démarquent par leur mobilité élevée, affichant des valeurs significativement élevées dans les deux paramètres. Ces souches pourraient présenter une capacité motile accrue, suggérant des caractéristiques adaptatives importantes.



**Figure 19 :** Les capacités des souches à la mobilité par swarming et par swimming

Un sous-groupe de souches, comprenant PsH2, PsH15, PsH16, PsH23, et PsH39, a démontré une bonne mobilité dans les deux types (essaient et nage). En ce qui concerne l'essaient, PsH28, PsH15, et PsH39 occupent respectivement les trois premières positions avec des superficies de 4286,82 mm<sup>2</sup>, 4012,72 mm<sup>2</sup>, et 3512,69 mm<sup>2</sup>. En ce qui concerne la nage, PsH15, PsH39, et PsH16 se distinguent avec des superficies respectives de 3654,24 mm<sup>2</sup>, 2048,63 mm<sup>2</sup>, et 2106,92 mm<sup>2</sup>.

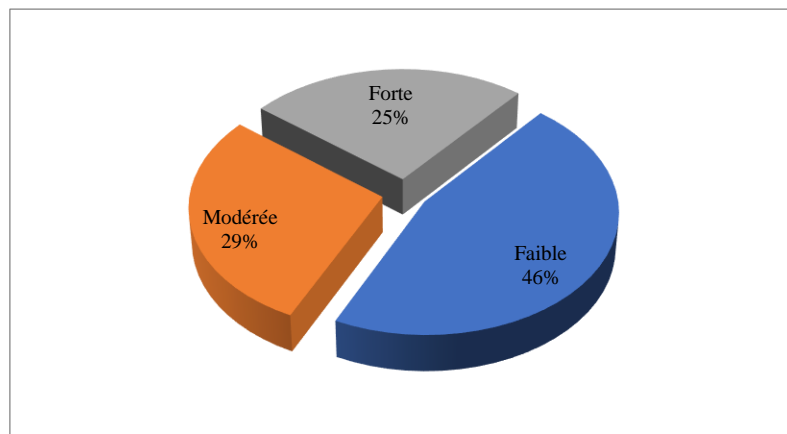
Un autre groupe de souches, incluant PsH8, PsH23, PsH24, PsH27, PsH29, PsH31, PsH32, PsH33, PsH37, PsH39, PsH48, PsH51cb, et PsH61, présente une mobilité modérée avec des valeurs intermédiaires d'essaient et de nage. Cette cohorte pourrait refléter une diversité de profils de mobilité au sein de cette catégorie.

Cependant, les autres souches présentent des niveaux de mobilité plus faibles, suggérant une capacité réduite à se déplacer sur des surfaces solides et à nager dans des milieux liquides. Les recherches menées par Mallikarjuna et ses collaborateurs (2023) ont également apporté une contribution significative à l'étude de la motilité de nage et d'essaient, facilitée par les flagelles chez *P.aeruginosa*. Leurs résultats mettent en évidence que treize isolats provenant de pus et quatre isolats urinaires ont manifesté à la fois une motilité de nage et d'essaient. Les conclusions de De Sousa et de son équipe (2023) ajoutent une dimension cruciale à cette compréhension, en soulignant que la motilité de *P. aeruginosa* dans l'urine est sujette à diverses influences, telles que la coexistence avec d'autres espèces bactériennes, la présence d'agents antimicrobiens, ainsi que le pH spécifique de l'urine. Cette étude met en lumière la complexité et la dynamique du déplacement de *P. aeruginosa* dans les échantillons d'urine humaine,

révélant une modulation par une variété de facteurs. Une telle connaissance approfondie est essentielle pour concevoir des stratégies efficaces visant à restreindre la propagation de la bactérie et à prévenir les infections associées.

### 3.4. Caractérisation du pouvoir de formation du biofilm

La caractérisation du pouvoir de formation du biofilm chez les souches isolées de *P. aeruginosa* a été réalisée à l'aide de la méthode quantitative de la microplaque à 96 puits. Les résultats ont montré que toutes les souches avaient la capacité de former un biofilm, mais à des niveaux variables. Les Figures 20 et 21 illustrent la diversité de cette capacité parmi les souches de *P. aeruginosa*. Une répartition en trois groupes a été effectuée, distinguant les souches fortes, modérées et faibles formatrices de biofilm. Environ 25% des isolats étaient fortement formateurs, 29% modérément formateurs et 46% faiblement formateurs de biofilm. Notamment, les souches PsH1, PsH4, PsH6, PsH15, PsH29, PsH43, PsH48 ont montré une capacité de formation de biofilm particulièrement élevée.



**Figure 20** : Capacité des souches de *P.aeruginosa* à former un biofilm.

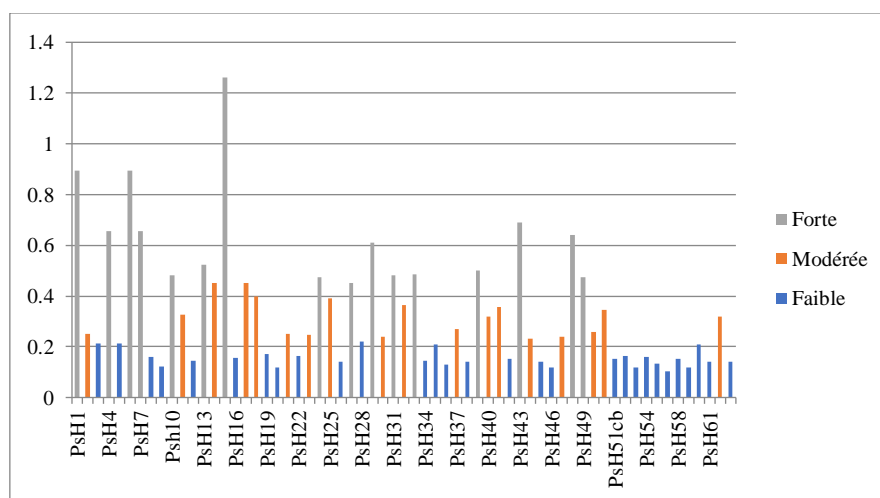


Figure 21 : Pouvoir de formation du biofilm chez les souches isolées de *P. aeruginosa*

#### 4. Composition chimique des huiles essentielles

Comme indiqué dans le tableau 4, un total de 54 composants a été identifié par chromatographie en phase gazeuse (GC) et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS), représentant un pourcentage variant entre 92 et 96% de l'ensemble des composants chimiques des HE examinées. Huit composés ont été décelés dans toutes les HE étudiées, avec des quantités différentes, à savoir :  $\alpha$ -thujène,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène,  $\alpha$ -terpinène, p-cymène,  $\gamma$ -terpinène, linalol et carvacrol. Les HE des plantes examinées ont manifesté une bonne diversité chimique. *A. verticillata*, *T. capitata* et *T. lanceolatus* ont présenté une abondance en monoterpènes oxygénés, notamment des alcools tels que le thymol, le carvacrol et le linalol. En revanche, *O. glandulosum* et *C. munbyi* sont principalement constituées de monoterpènes hydrocarbonés.

L'analyse de la composition chimique a démontré que le thymol prédomine dans les huiles essentielles d'*A. verticillata*, *O. glandulosum* et *T. lanceolatus*. Dans l'huile essentielle d'*A. verticillata*, le thymol est le composant principal à 49,55%, suivi par le méta-cymène à 14,23%, le para-cymène à 14,11%, et le carvacrol à 8,12%. Attou et al. (2019) ont également rapporté une prédominance du thymol à 45,77%, accompagné de monoterpènes tels que le p-cymène, le limonène et le  $\gamma$ -terpinène, totalisant 44,31%. Une étude plus récente par Senouci et al. (2020) a indiqué des concentrations élevées de carvacrol (44,3%), de limonène (19,3%) et de p-cymène (19,2%) dans une huile similaire. De plus, Tefiani et al. (2015) ont identifié l'alcool de cumin (44%), le p-cymène (18%) et le limonène (14%) comme principaux constituants dans une autre étude sur la composition d'huile.

Pour *O.glandulosum*, notre analyse a révélé la présence de thymol à 41,12%, de  $\gamma$ -terpinène à 25,33% et de para-cymène à 15,47%, comme rapporté par Bendahou et al. (2008). Leurs résultats ont montré des variations significatives pour le thymol, allant de 41,6% à 81,1%, suivi par le  $\gamma$ -terpinène de 27,0% à 3,1%, le p-cymène de 17,1% à 4,0%, et le carvacrol de 2,2% à 4,4%. Sari et al. (2006) ont étudié 23 échantillons d'*O.glandulosum* en Algérie, notant une prédominance de quatre composants principaux : le thymol (de 18,5% à 73,1%), le carvacrol (de 7,6% à 72,6%), le p-cymène (de 1,7% à 18,5%) et le  $\gamma$ -terpinène (de 1,1% à 18,7%).

En revanche, Béjaoui et al.(2013) ont observé des variations dans la quantité et la qualité de l'huile essentielle d' *O.glandulosum* à différents stades phénologiques, avec le carvacrol comme composé principal, présent dans des proportions allant de 61,08% à 83,37%, suivi par le p-cymène (de 3,02% à 9,87%) et le  $\gamma$ -terpinène (de 4,13% à 6,34%).

Nos résultats montrent également que le thymol est le composant principal de l'huile essentielle de *T. lanceolatus* avec 72,89%, suivi par le p-cymène (7,56%) et le  $\gamma$ -terpinène (6,15%). Ces données sont cohérentes avec celles de Nouasri et al. (2015), qui ont trouvé 80,2% de thymol, 6,25% de carvacrol et 2,67% de p-cymène, ainsi que celles de Khadir et al. (2016), qui ont rapporté 69,61% de thymol, 8,38% de  $\gamma$ -terpinène, 5,07% de p-cymène et 3,57% de carvacrol. Cette cohérence souligne la prédominance du thymol dans l'HE de *T. lanceolatus*, malgré des variations mineures dans les autres constituants, confirmant ainsi sa composition caractéristique.

Le carvacrol constituait la molécule prédominante dans l'HE de *T. capitatus*, atteignant une proportion de 58,68%. En règle générale, les HE des espèces de *Thymbra* présentent une abondance en carvacrol. *T. capitatus* est endémique de la région méditerranéenne, et plusieurs études ont caractérisé la composition chimique de cette plante.

Par exemple une étude menée par Bounatirou et al., en (2007) en Tunisie a indiqué que l'HE de *T. capitatus*, collectée à différents stades de développement sur trois emplacements distincts, était principalement composée de carvacrol (61,6 à 83%), de p-cymène (5 à 17%), de  $\gamma$ -terpinène (2 à 14%) et de  $\beta$ -caryophyllène (1 à 4%). Cette composition varie en fonction de l'emplacement et de la saison de croissance.

De même, le carvacrol était le composé principal dans 29 échantillons de *T. capitatus* de Sicile, variant entre 49 et 83%, selon l'étude de Napoli et al., en (2010). L'HE de *T. capitatus* d'Albanie

(Ibraliu et al., 2011) et du Portugal (Bentes et al., 2009) se caractérisaient également par une teneur élevée en carvacrol.

Une autre étude menée par Casiglia et al., (2019) a montré que l'HE de *T. capitatus* poussant à l'état sauvage à Salinelle, en Sicile, collectée à trois stades végétatifs différents, était caractérisée par une teneur élevée en carvacrol (81,2 à 14,2%), en  $\gamma$ -terpinène (34,4 à 2,6%) et en p-cymène (22,8 à 5,0%) de la teneur totale en huile. Le rendement et la composition en HE varient tout au long de la période de végétation de la plante.

Plus récemment, Tagnaout et al., (2022) ont révélé que l'HE de *T. capitatus* était riche en carvacrol (75%), p-cymène (10,58%), linalol (2,91%), (E)-caryophyllène (1,61%) et époxy caryophyllène (1,5%).

Cependant, il est important de noter que certains auteurs ont identifié un chémotype de thymol dans l'HE de *T. capitatus*, comme l'a montré l'étude menée par Goudjil et al., (2020) en Algérie, où le thymol représentait 51,22% de la teneur totale de l'HE, suivi par le carvacrol (12,59%) et le  $\gamma$ -terpinène (10,3%). De même, l'HE de *T. capitatus* de Sardaigne (Italie) a été dominée par le thymol (29,3%) et le p-cymène (26,4%), tandis que le carvacrol ne représentait que 10,8% selon l'étude de Cosentino et al. En (1999). L'HE de *T. capitatus* de Tizi Ouzou, en Algérie, présentait une composition de thymol (25,82%), linalol (23,40%) et gèranéol (14,22%) (BENDIF, 2021).

Pour l'HE de *C. munbyi*, notre analyse a révélé la présence de Terpinen-4-ol à 25,23%, Sabinène à 13,01% et méta-cymène à 15,86%, en accord avec les résultats de Benbelaid et al. (2017) qui ont rapporté des concentrations de Terpinen-4-ol à 23,75%, de méta-cymène à 17,30% et de Sabinène à 12,38% comme principaux constituants.

Tableau 4 : Composition chimique des huiles essentielles.

#	Composant	nRI	pRI	1	2	3	4	5
1	<i>alpha</i> -Thujene	922	1023	0.25	0.98	2.07	4.83	0.64
2	<i>alpha</i> -Pinene	931	1022	0.89	0.72	1.07	1.97	1.03
3	Camphene	943	1066	-	0.23	0.48	2.60	-
4	1-Octen-3-ol	959	1446	-	0.11	0.99	-	-
5	Octan-3-one	963	1253	-	0.15	-	-	-
6	Sabinene	964	1120	-	-	-	<b>13.01</b>	-
7	<i>beta</i> -Pinene	970	1110	0.13	0.13	0.54	0.70	1.37
8	Myrcene	979	1159	0.45	1.45	2.39	-	-
9	<i>Dehydro</i> -1.8-cineole	979	1197	-	-	-	0.35	-
10	<i>alpha</i> -Phellandrene	997	1164	-	0.20	0.55	-	-
11	<i>delta</i> -3-Carene	1005	1147	-	0.10	-	-	-
12	<i>alpha</i> -Terpinene	1008	1178	0.12	2.98	1.53	0.21	0.84
13	<i>meta</i> -Cymene	1010	1269	-	-	-	<b>15.86</b>	-
14	<i>para</i> -Cymene	1011	1268	<b>14.23</b>	<b>15.47</b>	<b>8.58</b>	0.53	<b>7.56</b>
15	Limonene	1020	1199	<b>14.11</b>	0.61	-	0.15	0.51
16	1,8-Cineole	1020	1209	-	-	-	1.02	-
17	<i>cis-beta</i> -Ocimene	1024	1230	-	0.10	-	-	-
18	<i>trans-beta</i> -Ocimene	1034	1247	-	0.10	-	-	-
19	<i>gamma</i> -Terpinene	1047	1243	6.50	<b>25.33</b>	5.67	1.42	5.16
20	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1051	1451	-	0.19	1.80	5.36	-
21	Terpinolene	1078	1280	0.15	0.15	-	0.98	-
22	Linalol	1081	1544	0.10	0.47	0.57	0.23	1.08
23	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1083	1345	-	-	-	3.07	-
24	<i>beta</i> -Thujone	1103	1422	-	-	-	0.56	-
25	Camphre	1123	1517	-	-	-	1.81	-
26	<i>cis</i> -Verbenol	1127	1655	-	-	-	1.62	-
27	<i>trans</i> -Verbenol	1129	1676	-	-	-	0.40	-
28	Bornéol	1148	1698	-	0.18	1.07	0.96	-
29	Terpinen-4-ol	1161	1600	0.15	0.17	5.16	<b>25.23</b>	-
30	Myrtenol	1177	1789	-	-	-	0.17	-
31	<i>alpha</i> -Terpinéol	1179	1700	0.12	0.27	-	1.24	-
32	( <i>E</i> )-Piperitol	1182	1457	-	-	-	0.11	-
33	( <i>Z</i> )-Cinna aldéhyde	1182	1867	-	-	-	-	-
34	<i>gamma</i> -Terpinéol	1183	1702	-	-	-	0.35	-
35	( <i>Z</i> )-Cavéole	1192	1832	-	-	-	0.43	-
36	Nerol	1208	1793	-	-	-	-	0.24
37	Thymyl–methyl–oxyde	1215	1586	-	-	-	-	0.40
38	Cuminaldehyde	1217	1782	-	-	-	0.64	-
39	( <i>E</i> )-Cinnamaldehyde	1233	2044	-	-	-	-	-
40	Linalyl acetate	1240	1557	-	-	-	0.61	-
41	Lyratyl acetate	1256	1630	-	-	-	0.27	-
42	<i>para</i> -Cymen-7-ol	1266	1690	-	-	-	1.83	-
43	Thymol	1266	2189	<b>49.55</b>	<b>41.12</b>	-	-	<b>72.98</b>
44	Bornyl acetate	1269	1515	-	-	-	0.12	-
45	<i>iso</i> -Bornyl acetate	1272	1581	-	-	-	0.23	-
46	Carvacrol	1278	2219	<b>8.12</b>	2.48	<b>58.68</b>	0.18	3.69
47	Terpinen-4-ol acetate	1282	2250	-	-	-	0.26	-

*Résultats et discussion*

48	Perillyl alcohol	1284	2005	-	-	-	0.44	-
49	<i>alpha</i> -Terpinyl acetate	1334	1695	-	-	-	2.18	-
50	Coumarin	1391	1488	-	-	-	-	-
51	<i>gamma</i> -Caryophyllene	1407	1571	-	-	1.70	-	-
52	Cinnamyl acetate	1413	2152	-	-	-	-	-
53	<i>beta</i> -Caryophyllene	1424	1591	-	0.69	-	-	0.34
54	<i>beta</i> -Bisabolene	1500	1720	-	0.20	-	-	-
55	<i>cis</i> -Calamenene	1512	1816	-	-	-	0.58	-
56	<i>beta</i> -Sesquiphellandrene	1516	1765	-	0.63	-	-	-
57	Caryophyllene oxide	1576	1980	-	-	-	2.07	0.23
	Viridiflorol	1591	2089	-	-	-	0.13	-
	Rendement (%)			1.8	4.1	1.8	0.8	0.9
	Total identifié			14	26	16	41	14
	Total identifié (%)			94.37	95.21	92.85	94.71	96.07
	Hydrocarbures monoterpéniques			36.83	<b>48.55</b>	22.88	<b>50.69</b>	16.66
	Monoterpènes oxygénés			<b>57.54</b>	45.14	<b>68.27</b>	40.60	<b>78.39</b>
	Phénylpropanoïdes			-	-	-	0.64	-
	Hydrocarbures sesquiterpéniques			-	1.52	1.70	0.58	0.34
	Sesquiterpènes oxygénés			-	-	-	2.20	0.23
	Autres composants			-	-	-	-	-

Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) de composants pour les huiles essentielles de (1) *A. verticillata*, (2) *O. glandulosum*, (3) *T. capitata*, (4) *C. munbyi*, (5) *T. lanceolatus*. Les pourcentages et l'ordre d'éluion des composants individuels sont indiqués sur la colonne non polaire. Les indices de rétention nRI et pRI sont respectivement donnés sur les colonnes non polaires (Rtx-1) et polaires (Rtx-Wax). L'identification est réalisée par comparaison des indices de rétention (RI) et des spectres de masse (MS).



#### 4.1. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Dans cette étude, l'activité antibactérienne de cinq a été évaluée contre un ensemble de quatorze souches de *P. aeruginosa*, comprenant treize souches cliniques résistantes aux antibiotiques ainsi qu'une souche de référence, ATCC 27853. Les résultats obtenus, présentés dans le Tableau 10, ont révélé les observations suivantes ; L'HE de *C. munbyi* se distingue par une zone moyenne d'inhibition de 14,5 mm et des CMI de 0,27%, indiquant une forte activité contre toutes les souches de *P. aeruginosa* testées. De manière similaire, l'HE de *T. lanceolatus* présente une activité notable avec une plage d'inhibition moyenne de 12,2 mm et des CMI de 1%. En revanche, bien qu'*O. glandulosum* et *A. verticillata* présentent des zones moyennes d'inhibition similaires (9,6 mm et 10,6 mm respectivement), elles affichent des CMI distinctes (0,6% et 1,9% respectivement). *T. capitata* présente la moins grande activité, avec des zones moyennes d'inhibition de 8,1 mm et des CMI moyennes de 0,96%.

**Tableau 5 :** L'effet inhibiteur des huiles essentielles étudiées contre les souches est exprimé par les zones d'inhibition de diamètre (ZI en mm ± SD) et les concentrations minimales inhibitrices (CMI en % v/v).

Souches	A. <i>verticillata</i>		O. <i>glandulosum</i>		T. <i>capitata</i>		C. <i>munbyi</i>		T. <i>lanceolatus</i>	
	ZI <sup>a</sup>	%	ZI <sup>a</sup>	%	ZI	%	ZI	%	ZI	%
	ATCC 27853	17,6 ± 2,5	0.5	14,3 ± 1,15	0.5	8,3 ± 0,5	2	20,0 ± 2,0	0.25	18,6 ± 1,5
P1	10,6 ± 0,5	1	9,3 ± 0,5	2	8,3 ± 0,5	1	14,6 ± 0,5	1	12,0 ± 1,0	0.5
P2	10,3 ± 1,1	1	9,0 ± 0,0	0.25	7,6 ± 0,5	1	13,6 ± 0,5	0.25	8,6 ± 0,5	0.5
P3	7,6 ± 1,1	1	9,3 ± 0,5	0.25	8,3 ± 0,5	0.5	14,3 ± 0,5	0.125	12,3 ± 0,5	0.25
P4	14,0 ± 1,7	0.5	9,6 ± 0,5	0.5	9,0 ± 0,0	1	14,6 ± 0,5	0.25	12,6 ± 0,5	0.25
P5	12,6 ± 0,5	4	9,3 ± 0,5	0.25	8,3 ± 0,5	0.5	14,3 ± 0,5	0.125	11,0 ± 0,0	0.5
P6	9,0 ± 1,0	4	10,0 ± 0,0	0.5	7,6 ± 0,5	1	10,6 ± 1,1	0.25	14,6 ± 0,5	0.25
P7	10,6 ± 0,5	1	9,6 ± 0,5	0.5	8,0 ± 1,0	0.5	15,0 ± 1,0	0.125	14,3 ± 1,1	0.25
P8	9,3 ± 0,5	1	8,3 ± 0,5	0.5	8,6 ± 0,5	1	13,0 ± 1,0	0.25	12,0 ± 0,0	0.5
P9	10,6 ± 0,5	4	9,6 ± 0,5	1	8,3 ± 0,5	2	20,6 ± 1,1	1	12,3 ± 0,5	0.25

P10	9,3 ± 0,5	2	9,3 ± 0,5	0,5	8,0 ± 0,0	0,5	10,3 ± 0,5	0,125	9,0 ± 0,5	0,5
P11	10,6 ± 1,5	1	9,0 ± 0,0	0,5	7,3 ± 0,5	0,5	15,0 ± 0,0	0,25	9,6 ± 0,5	0,5
P12	8,3 ± 0,5	2	9,6 ± 0,5	0,25	8,0 ± 1,0	1	14,6 ± 0,5	0,125	12,0 ± 0,0	0,5
P13	8,0 ± 0,0	4	9,0 ± 0,0	1	8,0 ± 1,0	1	12,6 ± 1,1	0,5	12,3 ± 0,5	0,5
Moyenne pour toutes les souches.	10,6	1,92	9,6	0,60	8,1	0,96	14,5	0,33	12,2	0,38

Dans le cadre de notre étude, nous avons observé une activité antibactérienne plus marquée par rapport à une étude antérieure menée par Benbelaid et al., (2017), où ils ont rapporté une zone d'inhibition de 8 mm et une CMI de 10 mg/ml pour l'HE de *C. munbyi*. De même, nos résultats présentent une activité plus prononcée que celle signalée par Nouasri et al., (2015), qui ont noté une activité modeste avec une zone d'inhibition de  $12 \pm 2,65$  mm et une CMI de 12,53 mg/ml pour l'HE de *T. lanceolatus*. Conformément à nos résultats, Bekhechi et al., (2008) ont souligné la résistance de *P. aeruginosa* à l'HE d'*O. glandulosum*, présentant des diamètres d'inhibition de 8,0 mm. Sari et al., (2006) ont étudié 23 échantillons d'*O. glandulosum*, relevant des zones d'inhibition variant entre 9 et 14 mm et des CMI entre 50 et 100 µg/ml. Cependant, l'activité de notre HE de *T. capitatus* semble légèrement inférieure à celle rapportée par (Jayari et al., 2018) qui ont observé une zone d'inhibition de 20 mm avec l'HE de *T. capitatus* contre *P. aeruginosa* ATCC 27853. De même, Qaralleh et al., (2019) ont noté une activité modérée de l'HE de *T. capitatus* contre *P. aeruginosa*, présentant des zones d'inhibition de 10,5 et 12,7 mm et une CMI de 1,11%. El jalal et al (El-Jalel, Elkady, Gonaid, & El-Gareeb, 2018) ont enregistré des résultats de  $9 \pm 0,84$  mm et  $11 \pm 0,73$  mm avec l'HE de *T. capitatus*. Enfin, Tammar et al., (2019) ont signalé des diamètres d'inhibition d'environ 11 mm pour l'HE de *T. capitatus* contre *P. aeruginosa* ATCC 27853, considéré comme modérément actif.

La diversité des activités antibactériennes observées parmi les HE et les extraits peut être expliquée par plusieurs facteurs, dont le type de bactérie testée et les principaux composants présents dans les HE ou extraits. Des études antérieures suggèrent une corrélation entre la composition chimique des principaux composants des HE et leur efficacité antimicrobienne, mettant en avant les composés phénoliques et les hydrocarbures terpéniques (Anand et al., 2019; Akthar et al., 2014;).

Les résultats obtenus ont révélé une forte activité antimicrobienne de l'HE de *C. munbyi*, qui peut être principalement attribuée au Terpinène-4-ol, à l' $\alpha$ -terpinéol, au cinéole, au  $\gamma$ -terpinène et au p-cymène contre les souches de *P. aeruginosa*. Le Terpinène-4-ol a été identifié comme une molécule ayant une activité significative contre *P.aeruginosa*, comme démontré dans les recherches menées par Noumi et al., (2018), ainsi que par Bose et al., (2020). Cependant, le mécanisme d'action spécifique de cette molécule contre *P. aeruginosa* reste peu étudié, malgré son efficacité documentée contre *Streptococcus agalactiae* en altérant simultanément la membrane et la paroi bactériennes (Zhang et al., 2018). L'analyse chimique des HE de *C. munbyi* a également révélé la présence significative de sabinène (13,01%).

Concernant l'HE de *T. lanceolatus*, son activité antimicrobienne est principalement due à la présence dominante de thymol (72,98%) et de p-cymène (7,56%). La synergie entre ces composants a été soulignée, avec des études montrant que certaines HE sont plus efficaces que leurs composants isolés. Cette synergie pourrait expliquer la supériorité de l'activité antimicrobienne de l'HE de *T. lanceolatus* par rapport à celle d'*O. glandulosum* et d'*A. verticillata*, malgré la présence du même composé majeur.

En revanche, l'HE de *T. capitatus* s'est avérée moins active, en raison en partie de la prédominance du carvacrol. Cette molécule présente une faible activité contre les bactéries à Gram négatif, en particulier *P. aeruginosa*. La résistance au carvacrol dans cette souche est liée à la pompe d'efflux MexAB-OprM, qui confère une insensibilité spécifique à cette molécule (Ibraliu et al., 2011).

## 4.2. Biofilm

Au cours de cette recherche, nous avons évalué l'impact de l'HE de *C.munbyi* sur la formation de biofilm par le test au cristal violet, en utilisant du polystyrène et du verre comme substrats, ces matériaux étant couramment employés dans les dispositifs médicaux. La méthode du cristal violet a été appliquée pour évaluer l'effet antibiofilm de l'HE de *C.munbyi*, en analysant son effet inhibiteur et éradicateur à différentes étapes de la formation de biofilm sur ces surfaces.

### 4.2.1. Inhibition de la formation du biofilm

Les taux d'inhibition du biofilm, évalués aux concentrations CMI et sous-CMI, sont consignés dans les tableaux 6 et 7. L'évaluation par le dosage en plaque des propriétés anti-biofilm de l'HE

de *C.munbyi* a révélé une diminution de la biomasse du biofilm de manière proportionnelle à la dose dans les différentes souches examinées.

Dans l'ensemble, à la concentration CMI, l'HE a éliminé plus de 70% du biofilm dans 19 des 24 souches testées, représentant ainsi 79,11% de l'ensemble des souches. Les souches à forte production de biofilm, telles que Pa2, Pa3, Pa6 et Pa16, ont présenté une résistance accrue à l'effet antibiofilm de l'HE, avec des taux d'inhibition respectifs de 39,09%, 57,22%, 49,44% et 59,07%.

Aux concentrations CMI/2 et CMI/4, l'activité de l'HE de *C.munbyi* était moins prononcée, avec des taux variant de 29,3% à 85,12% à CMI/2 et de 12,6% à 77,44% à CMI/4. L'isolat Pa20 a affiché la plus forte inhibition, tandis que la souche Pa6 a présenté la plus grande résistance. Par ailleurs, les taux d'inhibition étaient inférieurs à 45% à CMI/8 et à 30% à CMI/16.

#### 4.2.2. L'éradication des biofilms préformés

Les biofilms matures présentent une résistance accrue par rapport aux biofilms jeunes et aux cellules planctoniques (Donlan, 2000). Ainsi, pour évaluer l'efficacité de HE de *C.munbyi* dans l'éradication des biofilms matures, des biofilms préformés (âgés de 48 heures) ont été traités avec des concentrations égales ou inférieures à la CMI de l'HE. Les résultats indiquent que l'efficacité de l'HE de *C.munbyi* dans l'éradication des biofilms matures est moindre que celle observée pour les biofilms jeunes.

À la concentration de CMI, les pourcentages d'éradication varient entre 35,04% et 58,25%, avec une moyenne de 47,39%. Pour la concentration CMI/2, les taux d'éradication diminuent, oscillant entre 13,58% et 28,72%, avec une moyenne de 22,67%. Cependant, les concentrations CMI/4 et CMI/8 n'ont démontré aucun effet d'éradication, avec des pourcentages nuls dans toutes les souches testées.

L'efficacité de l'HE était constante à tous les stades de la formation du biofilm, que ce soit lors du test de pré-adhésion ajoutant l'HE au début de la culture microbienne, après une heure d'adhésion, ou sur des biofilms matures traités 24 heures après leur formation. Néanmoins, il a été observé que l'HE était moins performante pour éradiquer les biofilms matures par rapport

aux biofilms jeunes. Cette observation s'aligne avec la compréhension que les biofilms matures sont connus pour être plus résistants et difficiles à éliminer que les biofilms jeunes et les cellules planctoniques.

**Tableau 6 :** Mesure quantitative de l'inhibition du jeune biofilm (24 h) estimée par la coloration au cristal violet (mesure à 490 nm)

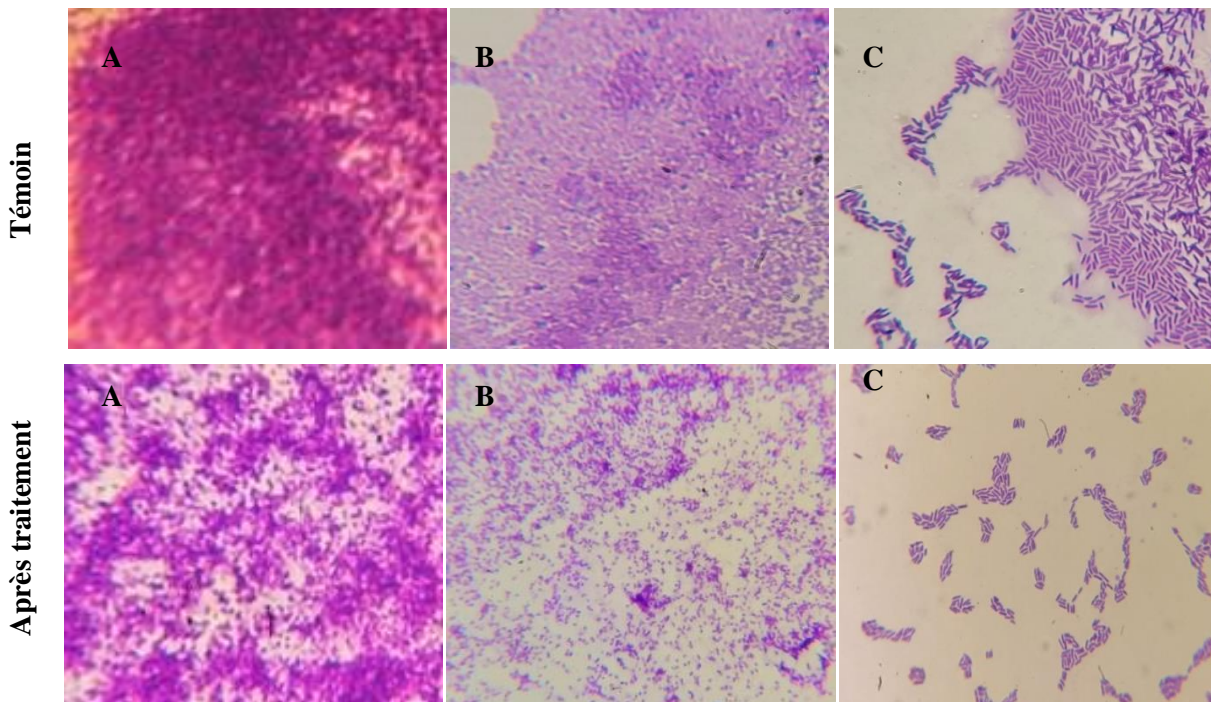
	<b>ATTC 27583</b>	<b>ATTC 9072</b>	<b>PaO1</b>	<b>Pa1</b>	<b>Pa2</b>	<b>Pa3</b>	<b>Pa4</b>	<b>Pa5</b>	<b>Pa6</b>	<b>Pa7</b>	<b>Pa8</b>	<b>Pa9</b>	<b>Pa10</b>	<b>Pa11</b>	<b>Pa12</b>	<b>Pa13</b>	<b>Pa16</b>	<b>Pa20</b>
MIC	71,11	83,2	72,02	72,34	39,09	57,22	77,28	79,41	49,44	84,21	83,92	86,82	71,17	70,28	93,12	70,35	59,07	91,99
MIC/2	56,19	60,8	44,23	57,22	32,33	44,33	53,58	65,41	29,3	63,78	77,79	68	62,64	65,94	68,57	50,05	39,56	85,12
MIC/4	38,40	45,2	38,94	42,59	31,57	43,17	48,44	46,25	12,6	41,05	45,07	44,23	39,90	40,46	35,39	35,23	28,11	77,44
MIC/8	28,77	40,4	37,69	22,59	28,82	30,35	38,04	40,67	9,44	40,32	43,69	44,94	36,21	25,05	19,34	24,57	27,34	38,72
MIC/16	24,89	30,4	22,11	14,15	27,31	28,72	30,43	36	0	29,52	19,89	20,47	28,5	20,39	12,51	12,01	17,58	6,51
MIC/32	21,36	26	13,08	12,34	10,31	6,35	4,739	26,38	0	13,15	11,31	17,88	8,37	3,36	7,28	0	14,97	3,65

**Tableau 6 :** Mesure quantitative de l'éradication des biofilms préformés (48 h) estimée par la coloration au cristal violet (mesure à 490 nm)

	<b>ATTC 27583</b>	<b>ATTC 9072</b>	<b>PaO1</b>	<b>Pa1</b>	<b>Pa2</b>	<b>Pa3</b>	<b>Pa4</b>	<b>Pa5</b>	<b>Pa6</b>	<b>Pa7</b>	<b>Pa8</b>	<b>Pa9</b>	<b>Pa10</b>	<b>Pa11</b>	<b>Pa12</b>	<b>Pa13</b>	<b>Pa16</b>	<b>Pa20</b>
MIC	51,19	53,72	49,54	56,32	38,57	39,95	45,36	54,65	35,04	54,21	48,63	51,82	47,62	50,06	48,68	54,38	36,04	58,25
MIC/2	26,93	23,65	28,72	25,3	14,87	13,58	23,65	20,6	19,41	23,17	20,65	22,16	24,68	20,36	28,19	26,38	17,65	29,36
MIC/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MIC/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

#### 4.2.3. Visualisation sur site des biofilms

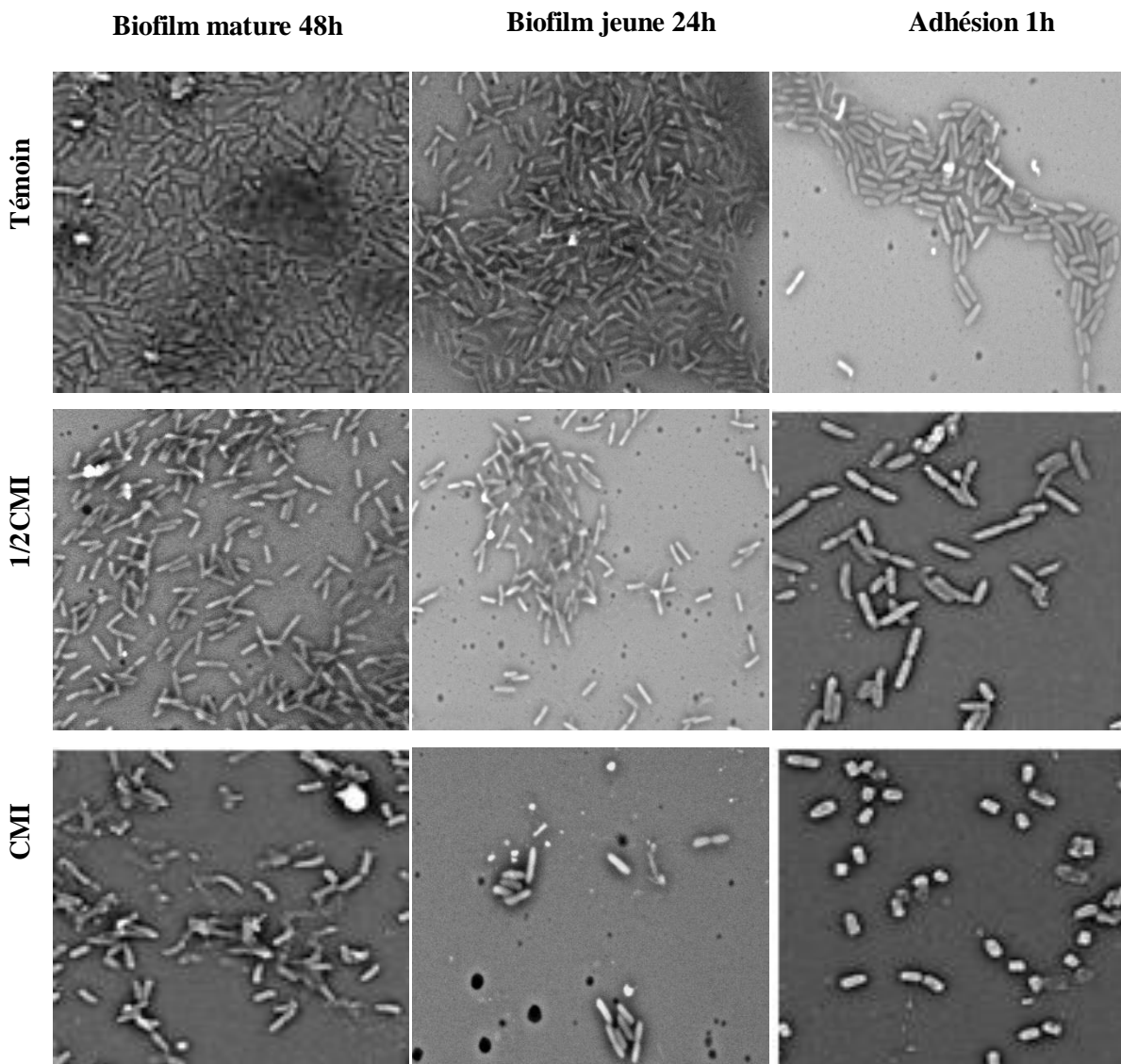
Les résultats ont été corroborés par des observations microscopiques optiques et électroniques. Les images au microscope optique ont révélé une formation de biofilm intense sur la surface de contrôle avec une organisation cellulaire caractéristique aux premiers stades d'adhésion. En revanche, seules quelques cellules ont été détectées sur les surfaces traitées avec l'HE.



**Figure 22** : Les images de la microscopie optique de l'effet d'huile essentielle de *C.munbyi* sur formation de biofilm.

**A:** biofilm mature (48h), **B:** biofilm de (24h), **C:** adhesion (1h)

Les résultats de la microscopie électronique à balayage ont confirmé une réduction significative des biofilms jeunes, présentant une architecture déformée et des microcolonies isolées après le traitement à l'HE, indépendamment des souches testées. En outre, les cellules traitées avec l'HE de *C.munbyi* ont montré une légère réduction de taille et des changements morphologiques par rapport au témoin non traité. Ces effets peuvent être attribués à la composition chimique spécifique de l'HE de *C. munbyi*, notamment à ses composés majeurs.



**Figure 23 :** Les images de la microscopie électronique à balayage de l'effet d'huile essentielle de *C.munbyi* sur formation de biofilm

Une recherche antérieure, exemplifiée par l'étude de Noumi et al., (2018), a démontré que le Terpinène-4-ol supprime la production de biofilm tout en inhibant l'adhésion simultanée de *S. aureus* aux surfaces en polystyrène et en verre. De manière similaire, une étude plus récente menée par Bose et al., (2020) a souligné le potentiel du Terpinène-4-ol dans l'atténuation et la formation de biofilms chez *P. aeruginosa*.

Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures sur d'autres HE, où l'impact sur la formation de biofilm variait en fonction de la souche bactérienne. Cette diversité observée peut être attribuée à la sensibilité unique des souches bactériennes à divers composés présents dans les HE. En outre, la formation de biofilm est un processus complexe, dépendant de facteurs



multiples tels que l'adhésion bactérienne, la formation de la matrice extracellulaire, et la communication cellulaire via la détection de quorum. Il est également important de noter que les mécanismes exacts par lesquels les composés des HE agissent sur les biofilms ne sont pas complètement compris. Les divers composés peuvent agir de manière synergique ou complémentaire pour perturber la formation de biofilm, interférer avec la matrice extracellulaire, ou inhiber la communication cellulaire (Nazzaro et al., 2013; Rossi et al., 2022). Ainsi, la capacité de l'HE de *C.munbyi* à réduire la formation de biofilm par inhibition, telle que démontrée dans cette étude, suggère son potentiel dans l'élimination de la résistance et de la virulence lors des infections.

#### 4.3. Activité Anti-quorum sensing

L'essai d'inhibition de la violacéine a été effectué en utilisant des concentrations d'HE de *C.munbyi* égales ou inférieures à la CMI, préalablement déterminée. Les résultats, illustrés dans la Figure 24, indiquent une diminution de la pigmentation violette, signalant l'inhibition de la croissance de *C.violaceum* CV12742 à la CMI (0,0625 % v/v).



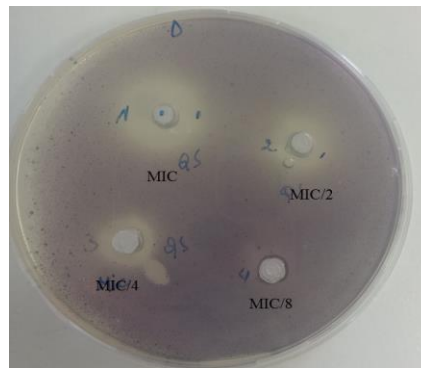
**Figure 24 :** Effet de l'HE de *C.munbyi* sur la production de la violacéine.

De plus, une inhibition totale de la production de violacéine, médiée par AHL, a été observée aux concentrations équivalentes à la CMI et à la moitié de la CMI. Ces inhibitions se sont élevées à environ 71,70 %, 44,95 % et 12,85 % aux concentrations de la CMI/4, CMI/8 et CMI/16 respectivement. Les résultats détaillés de l'inhibition de la violacéine sont présentés dans le Tableau 8.

**Tableau 7 :** Inhibition de la production de violacéine chez *C. violaceum* CV12472 par l'HE de *C.munbyi*.

Inhibition de la Violacéine (%)				
CMI	CMI/2	CMI/4	CMI/8	CMI/16
100±0.00	100±0.00	71.70±1.08	44.95±0.74	12.65±0.13

Les valeurs de la CMI et de la sous-CMI de l'HE de *C.munbyi* contre *C. violaceum* CV026 ont été déterminées avant d'analyser les zones d'inhibition du QS. Ces zones sont observées sous forme d'un halo incolore entourant une pelouse violette de violacéine produite autour des puits (Figure 25).



**Figure 25 :** Inhibition de la production de la violacéine chez *C. violaceum* CV026.

Comme illustré dans le tableau 9, la CMI s'est établie à 0,25 % v/v, démontrant une activité anti-QS avec un diamètre d'inhibition de  $23,0 \pm 0,5$  mm. Des halos incolores ont été observés autour des puits contenant des concentrations équivalentes à la moitié de la CMI et au quart de la CMI de l'HE de *C.munbyi*, indiquant une activité anti-QS avec des diamètres respectifs de  $08,0 \pm 1,0$  mm et  $0,7 \pm 0,5$  mm. En revanche, la concentration correspondant à un huitième de la CMI était inactive.

**Tableau 8 :** activité antiquorum sensing chez *C. violaceum* CV026 de l'HE de *C.munbyi*.

Zones d'Inhibition du QS (mm)				
CMI	CMI2	CMI/4	CMI/8	CMI/16
23±0.5	16 ±1	08 ±0.5	-	-

*C. violaceum* CV12742 produit une pigmentation violette en réponse au QS, tandis que *C. violaceum* CV026 nécessite l'ajout d'une hormone AHL spécifique pour déclencher un processus médié par QS. L'HE de *C. munbyi* a démontré une interférence significative dans la production de violacéine chez *C. violaceum* CV12742, même à des concentrations inférieures à la CMI, jusqu'à la CMI/16. De manière similaire, l'HE de *C. munbyi* a présenté une activité anti-quorum sensing contre *C. violaceum* CV026, se manifestant par un halo crémeux autour des puits, tandis que l'inhibition de la violacéine a été évaluée en observant l'absence de pigment violet.

Ces observations concordent avec des études antérieures où plusieurs HE et leurs principaux composants, tels que *Mentha piperita* (Husain et al., 2015), *Syzygium aromaticum* (Krishnan, Yin, & Chan, 2012), *Rosmarinus officinalis* (Nakagawa, Hillebrand, & Nunez, 2020), *Piper bredemeyeri*, *P. bogotense*, *P. brachypodom* (OLIVERO V, PÁJARO C, & STASHENKO, 2011), et *Lippia alba* (Olivero-Verbel, Barreto-Maya, Bertel-Sevilla, & Stashenko, 2014), ont démontré leur capacité à inhiber l'activité du QS sur *C. violaceum*, même à des concentrations inférieures à la CMI.

Une étude de Ramírez-Rueda et Salvador (2020) a évalué l'activité anti-quorum sensing de 24 HE sur *C. violaceum*, où 17 HE ont montré des effets positifs sur l'inhibition de la violacéine. Des recherches antérieures ont souligné l'activité anti-quorum sensing de certains HE partageant le même composé majoritaire que celui présent dans l'HE de *C. munbyi*, comme *Citrus limon* ( $\gamma$ -terpinène 10,1%) (Alfred Ngenge et al., 2021), *Eucalyptus polybractea* (p-cymène 25,5%), *Citrus clementina* (sabinène 31,4%), *Melaleuca alternifolia* (Terpinène-4-ol 40,4%,  $\gamma$ -terpinène 19,5%, et p-cymène 4,7%) (Noumi et al., 2018) et *M. alternifolia* (Terpinène-4-ol 45,6%,  $\gamma$ -terpinène 19,4%, et p-cymène 7,6%) (Alfred Ngenge et al., 2021).

Les recherches approfondies menées par Kerekes et al., (2013), Noumi et al. (2018), et Bose et al., (2020) ont mis en évidence le potentiel du Terpinène-4-ol dans l'atténuation des voies du QS en inhibant les AHL à longue chaîne.

#### **4.4. Inhibition des phénotypes de mobilités**

La capacité de l'HE de *C. munbyi* à réduire la motilité en essaim et la natation a été évaluée à différentes concentrations par la réalisation de tests de motilité sur différents milieux avec ensemencement ponctuel, en utilisant des isolats de *P. aeruginosa* spécialement sélectionnés pour ces tests. Les souches désignées Pa01, Pa ATCC9027, Pa16, Pa2 et Pa3 ont été

sélectionnées en raison de leur capacité élevée à envahir les plaques d'agar, présentant un diamètre dépassant 30 mm.

Parmi les nombreuses stratégies de colonisation employées par *P. aeruginosa*, le recours au flagelle pour générer un mouvement rotatif, lui permettant de nager dans des liquides tels que l'eau, les milieux de culture ou les sécrétions pulmonaires, favorise son déplacement vers les sites d'infection et la colonisation des surfaces. En revanche, l'essaim représente une forme de mouvement observée sur des surfaces solides, telles que des plaques de culture ou des surfaces cellulaires (Jurado-Martín et al., 2021) L'atténuation et l'inhibition de ces stratégies pourraient ainsi orienter le développement de nouvelles approches thérapeutiques et de mesures préventives plus efficaces contre les infections pulmonaires provoquées par *P. aeruginosa*.

Les résultats illustrés dans le Tableau 10 démontrent que toutes les doses sous-CMI utilisées exercent un effet inhibiteur sur la motilité en essaim et limitent la motilité en natation par rapport aux cellules témoins non traitées. Toutefois, une inhibition significative de la migration de toutes les souches testées a été observée à la CMI/2, avec un pourcentage d'inhibition de l'essaim d'environ 33,33%.

**Tableau 9 :** Effet de l'HE de *C. munbyi* sur la motilité par Swimming et par Swarming

	Inhibition du Swimming (%)				Inhibition du Swarming (%)			
	CMI	CMI/2	CMI/4	CMI/8	CMI	CMI/2	CMI/4	CMI/8
Pa2	81,90	66,47	69,39	42,44	97,26	88,48	85,27	42,39
Pa3	95,95	95,10	38,13	11,13	94,41	90,06	59,44	36,38
PaO1	42,53	10,67	4,12	0	81,35	66,73	54,98	49,95
Pa ATCC9027	93,99	74,74	58,90	26,95	89,82	76,87	61,44	54,42
Pa16	89,92	77,29	71,16	54,18	91,49	89,91	90,47	63,08

Les résultats de cette étude ont clairement démontré une réduction significative de la propagation des souches traitées avec l'HE de *C.munbyi*. Ces qui suggère que l'HE de *C.munbyi* possède la capacité d'interférer avec le système de QS régulé par Las et Rhl, ainsi qu'avec les fonctions du flagelle. Ces résultats sont en accord avec des recherches antérieures où le traitement par des huiles essentielles a montré une diminution de la motilité de *P. aeruginosa*. Une étude menée par Ramírez-Rueda et Salvador en 2020 a révélé une inhibition de la mobilité par swarming dans une fourchette de 85,7% à 100% par rapport au témoin. L'HE de *Coridothymus capitatus* a également fortement affecté la mobilité par swimming de *P.*

*aeruginosa* chez les patients atteints de fibrose kystique, selon Vrenna, et al., (2021). Une réduction maximale de la motilité en essaim a été observée lors du traitement avec une concentration sous-CMI de l'HE de *Cinnamomum tamala*, comme démontré par Farisa Banu, et al., (2017). Des résultats similaires ont été obtenus avec l'huile de girofle, où différentes concentrations ont significativement réduit la natation par rapport au témoin non traité, comme rapporté par Khan et al., (2009) ainsi que par Husain et al., (2015).

L'effet anti-motilité du Terpinène-4-ol a été décrit par Noumi et al., en (2018), qui ont trouvé une inhibition d'environ 25% de l'essaim de PAO1 à 100 g/ml de Terpinène-4-ol. Bos et al., en (2020) ont également observé une réduction significative des mouvements d'essaim (33,3%), de tressautement (50%) et de natation (25%) par rapport au témoin non traité en présence de sous-CMI (0,06%) de Terpinène-4-ol.

#### **4.5. Inhibition de la production de la pyocyanine**

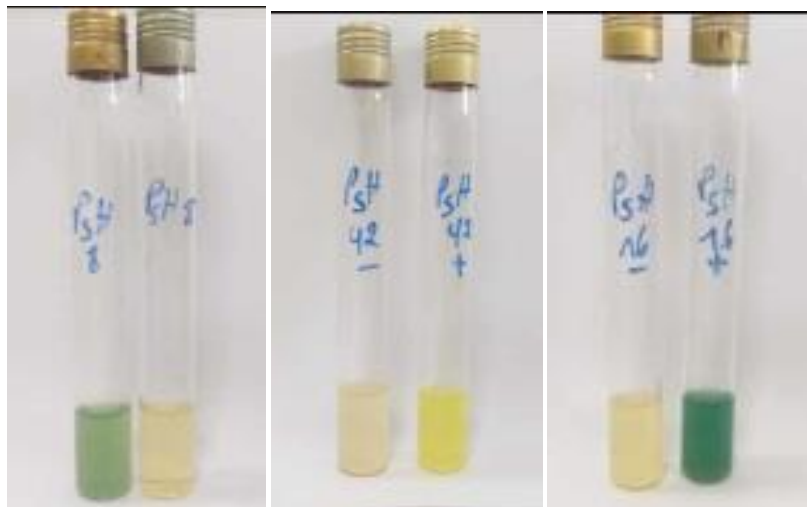
Parmi les nombreux facteurs de virulence régulés par le QS lors d'une infection, *P. aeruginosa* produit la pyocyanine, un pigment phénazinique crucial dans sa virulence (Jayaseelan, Ramaswamy, & Dharmaraj, 2014). Elle interfère avec les fonctions cellulaires par un processus oxydatif, causant des dommages cellulaires, une altération de la membrane, la dégradation de l'ADN, et l'inactivation des protéines (Hall et al., 2016). Contrôlée par le QS, elle supprime l'activité ciliaire des cellules respiratoires, compromettant la clairance mucociliaire et favorisant la persistance de *P. aeruginosa*, aggravant la colonisation et l'infection (Sadikot et al., 2005).

Les résultats du Tableau 11 ci-dessous révèlent que le prétraitement avec l'HE de *C. munbyi*, à des concentrations égales ou inférieures à la CMI, inhibe positivement la production de pyocyanine. À la CMI, une inhibition maximale de plus de 80% a été observée pour toutes les souches testées. À des concentrations inférieures à la CMI, l'HE a également montré une inhibition significative de la production de pyocyanine, variant de 54,34% à 86,66%. Cependant, à la CMI/8, le taux d'inhibition était inférieur à 19% pour toutes les souches.

**Tableau 10** : Évaluation quantitative de l'inhibition de la pyocyanine (%).

Souches	ATCC	ATCC	PaO1	Pa1	Pa2	Pa3	Pa4	Pa5	Pa6	Pa7	Pa8	Pa9	Pa10	Pa11	Pa13	Pa16
	27583	9027														
CMI	89,83	89,24	93,1	91,24	89,65	96	90	96,42	92,85	96,12	95,94	94,4	87,14	85,29	80,85	91,07
CMI/2	74,57	73,11	82,75	76,64	77,01	64	76,92	82,85	64,28	87,59	64,86	77,6	57,14	58,52	56,17	62,5
CMI/4	47,62	46,23	55,51	56,93	43,67	31,33	50	44,28	28,57	51,93	24,32	53,2	25,71	31,76	30,89	32,14
CMI/8	18,64	3,22	17,24	8,75	10,34	6,66	5,384	8,57	10,71	22,48	5,4	20	7,14	4,41	4,25	10,71

Les données sont exprimées en pourcentage d'inhibition de la pyocyanine résiduelle après le traitement à l'HE de *C. munbyi* par rapport aux témoins non traités.



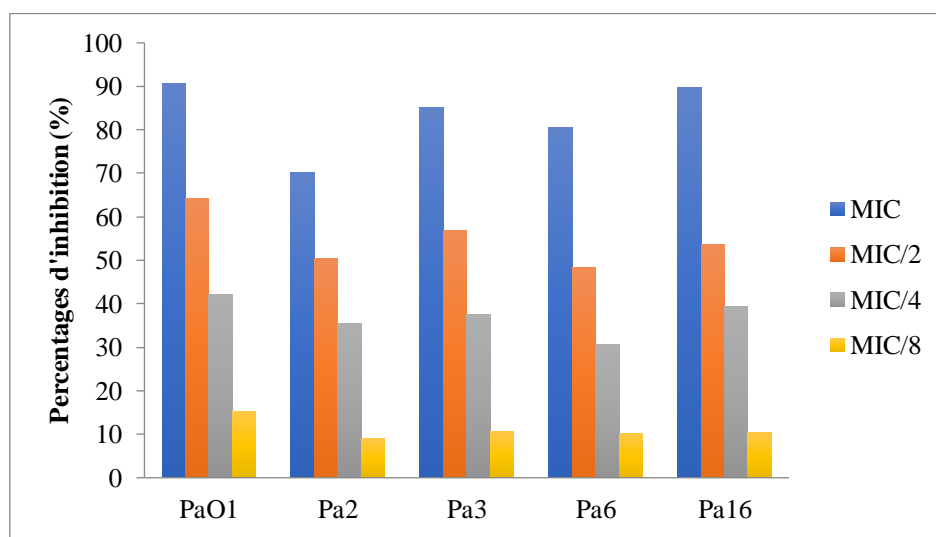
**Figure 26** : Inhibition de la production de la pyocyanine.

Les résultats de notre étude confirment une diminution significative de la production de pyocyanine en présence de l'HE de *C. munbyi*, suggérant une possible interférence avec le système de QS chez *P. aeruginosa*. Des études antérieures ont également signalé une réduction de la production de pyocyanine avec l'utilisation des HE, notamment celle de *Micromeria thymifolia*, riche en Terpinène-4-ol, montrant une réduction de 75% (Bukvički et al., 2016). Plus récemment, Bose et al. (2020) ont démontré une inhibition de 33 à 96% de la production de pyocyanine grâce au Terpinène-4-ol.

#### 4.6. Inhibition de la production des EPS

L'étude de l'effet inhibiteur de la production d'EPS a été réalisée sur quatre souches cliniques de *P. aeruginosa*, à savoir Pa2, Pa3, Pa6 et Pa16, ainsi que sur la souche modèle PaO1. Ces souches ont été sélectionnées en raison de leur capacité élevée à produire des biofilms.

Les résultats ont montré une réduction maximale de 90,62 % à la concentration MIC chez *P. aeruginosa* PAO1 Figure 27. Aux concentrations CMI/2, CMI/4 et CMI/8, l'HE de *C. munbyi* a réduit la production d'EPS de 64,21 %, 42,17 % et 15,32 % respectivement par rapport au témoin non traité. Les souches testées à la concentration CMI ont présenté une réduction maximale (70-90 %) de la concentration d'EPS, selon l'examen spectrométrique à 490 nm. L'HE de *C. munbyi* a diminué la production d'EPS de (45-56 %) et (30-40 %) aux concentrations CMI/2 et CMI/4, respectivement, tandis que la concentration MIC/8 était pratiquement inactive avec moins de 11 %. Dans la présente étude, l'HE de *C. munbyi* a significativement inhibé la production d'EPS de *P. aeruginosa* PAO1 et des souches cliniques.



**Figure 27 :** Analyse quantitative de l'inhibition de l'EPS en mesurant l'absorbance à 490 nm.

Une diminution de la production d'EPS pourrait potentiellement perturber l'architecture du biofilm et, par conséquent, favoriser une meilleure pénétration des antibiotiques. Nos résultats sont comparables à ceux de Husain et al. (2015), qui ont montré qu'à une concentration de 3 % v/v, l'HE de *M. piperita* entraînait une diminution de 76 % de la production d'EPS dans PAO1. De même, Sankar et al., (2014) ont observé une réduction de la production d'EPS des agents pathogènes testés dans *P. aeruginosa* PAO1 en utilisant l'HE de *M. koenigii* et l'extrait de la plante *T. bellerica*.

#### 4.7. Inhibition de l'endopeptidase LasA

Les enzymes protéolytiques LasA et LasB émergent comme des acteurs cruciaux dans le processus d'invasion de *P. aeruginosa*. Leur implication englobe la perturbation des jonctions serrées entre les cellules épithéliales et l'induction subséquente de modifications de la polarité cellulaire. De manière complémentaire, ces protéases peuvent abaisser le taux de toxines, contribuant ainsi à une réduction de l'inhibition de l'invasion.

Au cours de cette recherche, nous avons examiné le degré d'inhibition de l'activité staphylolytique de LasA en réponse à diverses concentrations d'HE de *C. munbyi*, à différents moments, comme représenté dans la Figure 29. Les résultats ont révélé que le surnageant des cultures traitées à l'HE a démontré une diminution significative et rapide de l'activité staphylolytique de LasA, dépendante de la concentration utilisée.

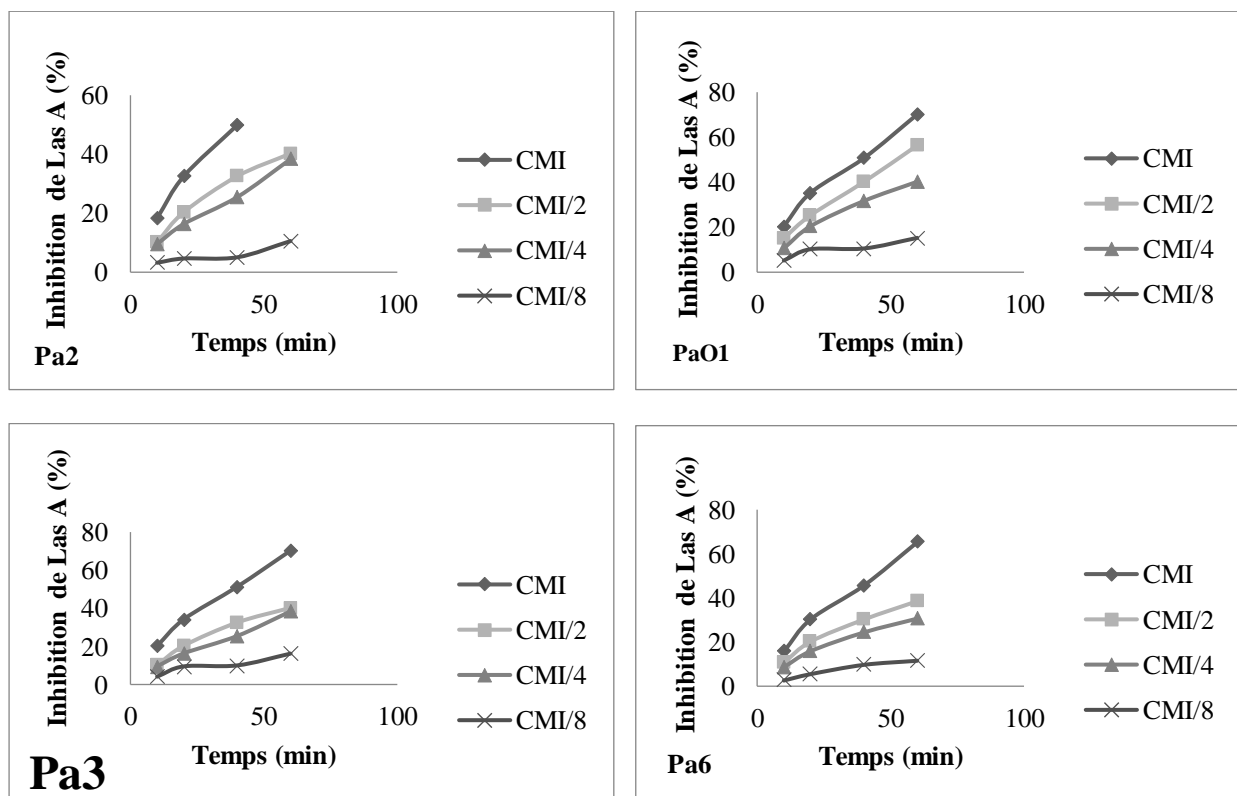


Figure 28 : Inhibition de l'activité staphylolytique de LasA par différentes concentrations d'HE de *C. munbyi*.

Le pourcentage d'inhibition de LasA a été calculé par rapport à l'OD témoin à 600 nm

Les résultats ont mis en évidence une diminution significative et rapide de l'activité staphylolytique de LasA dans le surnageant des cultures traitées à l'HE, laquelle était dépendante de la concentration utilisée. Cette inhibition était observée non seulement à la CMI,



mais aussi à des fractions de cette concentration (CMI/2, CMI/4, CMI/8). Par exemple, la souche Pa01 a montré une réduction progressive de son activité staphylolytique, atteignant un maximum de 70,12% à 60 minutes à la CMI, et une inhibition de 56,37% à la CMI/2 au même intervalle de temps. Des tendances similaires ont été observées chez les souches Pa2, Pa3, Pa6 et Pa16, soulignant des pourcentages d'inhibition variables en fonction du temps et de la concentration.

L'endopeptidase LasA, sécrétée sous le contrôle du QS, possède la capacité de cliver le pont pentaglycine présent dans le peptidoglycane des parois cellulaires de *S. aureus*, entraînant ainsi la dégradation des tissus infectés et favorisant l'invasion bactérienne (Kessler et al., 1993). Des recherches antérieures ont mis en évidence que certaines HE et extraits de plantes ont un effet neutralisant sur l'activité de la protéase LasA chez *P. aeruginosa*. Des extraits de plantes tels que *Bucida buceras*, *Conocarpus erectus*, *Tetrazygia bicolor*, *Callistemon viminalis* et *Chamaesyce hypericifolia* ont provoqué une réduction significative de l'activité de la protéase LasA, avec des pourcentages variés (Masák et al., 2014). Adonizio et al., (2008) et Singh et al., (2012) ont également constaté une diminution notable de l'activité de la protéase LasA grâce à l'extrait de fruit de *Lagerstroemia speciosa*. De manière similaire, les HE de *M. koenigii* et *C. tamala* ont démontré une réduction de 63,1 % et 76 % respectivement dans l'activité staphylolytique de la protéase LasA chez PaO1 (Farisa Banu et al., 2017; Ganesh & Rai, 2018)

Dans le cadre de la recherche de solutions de substances actives contre *Pseudomonas aeruginosa*, notre étude s'est concentrée sur l'évaluation et la valorisation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles (HE) extraites de plantes locales vis-à-vis des souches hospitalières de *P. aeruginosa* isolées du CHU de Tlemcen. L'objectif principal était d'explorer l'activité anti-quorum sensing et l'effet inhibiteur des HE de la plante endémique *Cistus munbyi* sur des aspects spécifiques de la virulence des souches cliniques de *P. aeruginosa*, ainsi que sur des souches de référence, en évaluant des paramètres tels que la production de pyocyanine, la formation de biofilm et la motilité.

En isolant 64 souches de *P.aeruginosa* à partir de prélèvements cliniques positifs, nous avons constaté des tendances significatives dans la distribution des souches en fonction des types de prélèvements, soulignant notamment une prévalence importante de *P. aeruginosa* dans les infections urinaires. Les souches présentaient une diversité significative de niveaux de résistance aux antibiotiques, avec une prévalence marquée de résistance aux antibiotiques  $\beta$ -lactamines.

Concernant la virulence, certaines souches ont démontré une capacité variable dans des paramètres tels que la production de pyocyanine, la formation de biofilm, et la motilité de nage et d'essaim.

Les analyses approfondies par chromatographie en phase gazeuse des HE extraites de différentes plantes ont identifié 54 composants chimiques dans les HE étudiées, montrant une diversité chimique intéressante. Huit composés ont été trouvés dans toutes les huiles essentielles étudiées, à savoir :  $\alpha$ -thujène,  $\alpha$ -pinène,  $\beta$ -pinène,  $\alpha$ -terpinène, p-cymène,  $\gamma$ -terpinène, linalol et carvacrol. Les HE des plantes examinées ont manifesté une bonne diversité chimique. *A. verticillata*, *T. capitata* et *T. lanceolatus* ont présenté une abondance de monoterpènes oxygénés, notamment des alcools tels que le thymol, le carvacrol et le linalol. En revanche, *O. glandulosum* et *C. munbyi* sont principalement constituées de monoterpènes hydrocarbonés.

L'HE de *C. munbyi* s'est distinguée par une zone d'inhibition moyenne de 14,5 mm et des CMI de 0,27 %, indiquant une forte activité contre toutes les souches de *P. aeruginosa* testées. De manière similaire, l'HE de *T. lanceolatus* a montré une activité notable avec une zone d'inhibition moyenne de 12,2 mm et des CMI de 1 %. En revanche, bien qu'*O. glandulosum* et *A. verticillata* aient présenté des zones d'inhibition moyennes similaires (9,6 mm et 10,6 mm respectivement), elles ont affiché des CMI distincts (0,6 % et 1,9 % respectivement). *T. capitata*

a présenté la moins grande activité, avec des zones d'inhibition moyennes de 8,1 mm et des CMI moyennes de 0,96 %.

Les résultats ont également montré une diminution de la biomasse du biofilm, confirmée par des observations microscopiques optiques et électroniques. Les images au microscope optique ont révélé une formation de biofilm intense sur la surface de contrôle, avec une organisation cellulaire caractéristique aux premiers stades d'adhésion. En revanche, seules quelques cellules ont été détectées sur les surfaces traitées avec l'HE. Les observations au microscope électronique à balayage ont confirmé une réduction significative des biofilms jeunes, présentant une architecture déformée et des microcolonies isolées après traitement à HE, indépendamment des souches testées. De plus, les cellules traitées avec l'HE de *C. munbyi* ont montré une légère réduction de taille et des changements morphologiques par rapport au témoin non traité.

De plus, l'HE de *C. munbyi* a montré une activité anti-quorum sensing en réduisant la production de violacéine chez *C.violaceum* 12472 et en inhibant le QS chez *C.violaceum* CV026. Nos résultats indiquent que le prétraitement avec l'HE de *C. munbyi*, à des concentrations égales ou inférieures à la CMI, a inhibé efficacement la production de pyocyanine. Toutes les doses de l'HE inférieures à la CMI ont également montré un effet inhibiteur sur la motilité par swarming et ont réduit la motilité par swimming par rapport aux cellules témoins non traitées. De plus, l'HE de *C. munbyi* a significativement inhibé la production d'exopolysaccharides chez *P. aeruginosa* PAO1 et les souches cliniques. Nos résultats ont également mis en évidence une diminution rapide et significative de l'activité staphylolytique de LasA dans le surnageant des cultures traitées avec cette HE.

Notre étude présente des résultats prometteurs concernant l'utilisation des HE, en particulier celles de *C. munbyi*, comme solution potentielle contre *P. aeruginosa*. Cela ouvre de nouvelles perspectives intéressantes pour le développement de stratégies alternatives d'irrigation. À la lumière de ces résultats, il serait avantageux d'explorer la valorisation des plantes aromatiques en développant des produits pharmaceutiques à base d'HE, comme des onguents, des lotions, des gels, voire même des peintures pour les murs des établissements de santé, afin de traiter les infections et de désinfecter l'atmosphère. Il est également pertinent d'approfondir la recherche en étudiant d'autres souches bactériennes résistantes à divers antibiotiques, en cherchant à comprendre le mécanisme inhibiteur des HE, et potentiellement en purifiant et identifiant de nouvelles molécules antimicrobiennes.

# **Références bibliographiques**

- Abdelli, I., Hassani, F., Bekkel Brikci, S., & Ghalem, S. (2021). In silico study the inhibition of angiotensin converting enzyme 2 receptor of COVID-19 by *Ammoides verticillata* components harvested from Western Algeria. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(9), 3263-3276.
- Adamo, R., Sokol, S., Soong, G., Gomez, M. I., & Prince, A. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 30(5), 627-634.
- Ahmed, S. A., Rudden, M., Smyth, T. J., Dooley, J. S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2019). Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 3521-3535. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09618-0>
- Ait-Mimoune, N., Hassaine, H., & Boulanoir, M. (2022). Bacteriological profile of urinary tract infections and antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* in Algeria. *Iranian journal of microbiology*, 14(2), 156.
- Aiza, A., Kaidi, R., Ahmed, M., & Khiati, B. (2023). Bacteriological Profile and Antibiotic Resistance Patterns of Pus/Wound Samples in Humans with Infected Wounds in North Central Algeria. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 17(3).
- Akthar, M. S., Degaga, B., & Azam, T. (2014). Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: A review. *J. Issues ISSN*, 2350, 1588.
- Alfred Ngenge, T., Kucukaydin, S., Ceylan, O., & Duru, M. E. (2021). Evaluation of enzyme inhibition and anti-quorum sensing potentials of *Melaleuca alternifolia* and *Citrus sinensis* essential oils. *Natural Product Communications*, 16(9), 1934578X211044565. doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X211044565>
- Al-Hasan, M. N., Wilson, J. W., Lahr, B. D., Eckel-Passow, J. E., & Baddour, L. M. (2008). Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a population-based study. *The American journal of medicine*, 121(8), 702-708.
- Al-Orphaly, M., Hadi, H. A., Eltayeb, F. K., Al-Hail, H., Samuel, B. G., Sultan, A. A., & Skariah, S. (2021). Epidemiology of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Middle East and North Africa Region. *Mosphere*, 6(3), e00202-00221.
- Al-Wrafy, F., Brzozowska, E., Górska, S., & Gamian, A. (2017). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*—the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*, 71, 78-91.
- Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., & Lakhssassi, N. (2019). A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*, 9(11), 258.

- Angane, M., Swift, S., Huang, K., Butts, C. A., & Quek, S. Y. (2022). Essential oils and their major components: an updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and their potential application in the food industry. *Foods*, *11*(3), 464.
- Attou, A., Davenne, D., Benmansour, A., & Lazouni, H. (2019). Chemical composition and biological activities of *Ammoides verticillata* essential oil from west Algeria. *Phytothérapie*, *17*(1), 2-8.
- Aziz, Z. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. M., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., . . . Ashraf, G. M. (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. *Current drug metabolism*, *19*(13), 1100-1110.
- Badal, D., Jayarani, A. V., Kollaran, M. A., Kumar, A., & Singh, V. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on endotracheal tubes requires multiple two-component systems. *Journal of Medical Microbiology*, *69*(6), 906-919.
- Baptista-Silva, S., Borges, S., Ramos, O. L., Pintado, M., & Sarmiento, B. (2020). The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review. *Journal of Essential Oil Research*, *32*(4), 279-295.
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in context*, *7*.
- Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A., & Boussaid, M. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages. *Journal of Medicinal Food*, *16*(12), 1115-1120.
- Bejarano, P., Langeveld, J., Hudson, B., & Noelken, M. (1989). Degradation of basement membranes by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infection and immunity*, *57*(12), 3783-3787.
- Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., & Abdelouahid, D. (2008). Composition and antibacterial activity of the essential oils contained in Algerian *Origanum glandulosum* (Desf.). *Phytothérapie*, *6*, 153-159.
- Bekhechi, C., Boti, J. B., Bekkara, F. A., Abdelouahid, D. E., Casanova, J., & Tomi, F. (2010). Isothymol in Ajowan essential oil. *Natural Product Communications*, *5*(7), 1934578X1000500726.
- Belas, R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in microbiology*, *22*(9), 517-527.
- Belhattab, R., Larous, L., Figueiredo, A. C., Santos, P. A., Barroso, J. G., & Pedro, L. G. (2005). *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour and fragrance journal*, *20*(2), 209-212.
- Benbelaïd, F., Khadir, A., Abdoune, M. A., & Bendahou, M. (2013). Phytochemical screening and in vitro antimicrobial activity of *Thymus lanceolatus* Desf. from Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *3*(6), 454-459.

- Benbelaïd, F., Khadir, A., Abdoune, M. A., Bendahou, M., Muselli, A., & Costa, J. (2014). Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(6), 463-472.
- Benbelaïd, F., Khadir, A., Bendahou, M., Abdoune, M. A., Muselli, A., & Costa, J. (2017). Composition and antimicrobial activity of *Cistus munbyi* essential oil: an endemic plant from Algeria. *Journal of Forestry Research*, 28(6), 1129-1134. doi: <https://doi.org/10.1007/s11676-017-0387-6>
- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J.-M., Bernardini, A.-F., & Costa, J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106(1), 132-139.
- BENDIF, H. H. (2021). Phytochemical constituents of Lamiaceae family. *RHAZES: Green and Applied Chemistry*, 11, 71-88.
- Bentes, J., Miguel, M., Monteiro, I., Costa, M., Figueired, A., Barroso, J., & Pedro, L. (2009). Antioxidant activities of the essential oils and extracts of Portuguese *Thymbra capitata* and *Thymus mastichina*. *Italian journal of food science*, 21(2).
- Bose, S. K., Chauhan, M., Dhingra, N., Chhibber, S., & Harjai, K. (2020). Terpinen-4-ol attenuates quorum sensing regulated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiology*, 15(2), 127-142. doi: <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0204>
- Bouguenoun, W., Bakour, S., Bentorki, A. A., Al Bayssari, C., Merad, T., & Rolain, J.-M. (2016). Molecular epidemiology of environmental and clinical carbapenemase-producing Gram-negative bacilli from hospitals in Guelma, Algeria: Multiple genetic lineages and first report of OXA-48 in *Enterobacter cloacae*. *Journal of global antimicrobial resistance*, 7, 135-140.
- Bouharkat, B., Tir Touil, A., Mullié, C., Chelli, N., & Meddah, B. (2020). Bacterial ecology and antibiotic resistance mechanisms of isolated resistant strains from diabetic foot infections in the north west of Algeria. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 19, 1261-1271.
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M. G., Faleiro, L., Rejeb, M., Neffati, M., . . . Pedro, L. (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chemistry*, 105(1), 146-155.
- Bourafa, N., Chaalal, W., Bakour, S., Lalaoui, R., Boutefnouchet, N., Diene, S. M., & Rolain, J.-M. (2018). Molecular characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli clinical isolates in Algeria. *Infection and drug resistance*, 735-742.
- Bouteiller, M., Dupont, C., Bourigault, Y., Latour, X., Barbey, C., Konto-Ghiorghi, Y., & Merieau, A. (2021). *Pseudomonas flagella*: generalities and specificities. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3337.

- Bouyahya, A., Chamkhi, I., Balahbib, A., Rebezov, M., Shariati, M. A., Wilairatana, P., . . . El Omari, N. (2022). Mechanisms, anti-quorum-sensing actions, and clinical trials of medicinal plant bioactive compounds against bacteria: a comprehensive review. *Molecules*, 27(5), 1484.
- Bouyahya, A., Chamkhi, I., Guaouguaou, F.-E., Benali, T., Balahbib, A., El Omari, N., . . . El Menyiy, N. (2020). Ethnomedicinal use, phytochemistry, pharmacology, and food benefits of *Thymus capitatus*. *Journal of ethnopharmacology*, 259, 112925.
- Brindhadevi, K., LewisOscar, F., Mylonakis, E., Shanmugam, S., Verma, T. N., & Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, 96, 49-57.
- Brindhadevi, K., LewisOscar, F., Mylonakis, E., Shanmugam, S., Verma, T. N., & Pugazhendhi, A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, 96, 49-57.
- Brown, V., & Lowbury, E. (1965). Use of an improved cetrimide agar medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical pathology*, 18(6), 752-756.
- Bukvički, D., Cirić, A., Soković, M., Vannini, L., Nissen, L., Novaković, M., . . . Marin, P. D. (2016). *Micromeria thymifolia* essential oil suppresses quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Natural Product Communications*, 11(12), 1934578X1601101232.
- Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annual review of microbiology*, 66, 493-520.
- Camele, I., Elshafie, H. S., Caputo, L., & De Feo, V. (2019). Anti-quorum sensing and antimicrobial effect of Mediterranean plant essential oils against phytopathogenic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 10, 2619.
- Carmeli, Y., Troillet, N., Eliopoulos, G. M., & Samore, M. H. (1999). Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(6), 1379-1382.
- Casiglia, S., Bruno, M., Scandolera, E., Senatore, F., & Senatore, F. (2019). Influence of harvesting time on composition of the essential oil of *Thymus capitatus* (L.) Hoffmanns. & Link. growing wild in northern Sicily and its activity on microorganisms affecting historical art crafts. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 2704-2712.
- Castronovo, L. M., Vassallo, A., Mengoni, A., Miceli, E., Bogani, P., Firenzuoli, F., . . . Maggini, V. (2021). Medicinal plants and their bacterial microbiota: A review on antimicrobial compounds production for plant and human health. *Pathogens*, 10(2), 106.
- Catullo, G., Montmollin, B. d., & Radford, E. A. (2011). Zones importantes pour les plantes en Méditerranée méridionale et orientale: sites prioritaires pour la conservation.



- Chadha, J., Harjai, K., & Chhibber, S. (2022). Repurposing phytochemicals as anti-virulent agents to attenuate quorum sensing-regulated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial biotechnology*, 15(6), 1695-1718.
- Cherny, K. E., & Sauer, K. (2019). *Pseudomonas aeruginosa* requires the DNA-specific endonuclease EndA to degrade extracellular genomic DNA to disperse from the biofilm. *Journal of bacteriology*, 201(18), 10.1128/jb.00059-00019.
- Corral-Lugo, A., Daddaoua, A., Ortega, A., Espinosa-Urgel, M., & Krell, T. (2016). Rosmarinic acid is a homoserine lactone mimic produced by plants that activates a bacterial quorum-sensing regulator. *Science Signaling*, 9(409), ra1-ra1.
- Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, 29(2), 130-135.
- Craig, L., Forest, K. T., & Maier, B. (2019). Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nature Reviews Microbiology*, 17(7), 429-440.
- Daira, N. E.-H., Maazi, M. C., & Chefrour, A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85(1), 276-290.
- De Groot, A. C., & Schmidt, E. (2016). Essential oils, part III: chemical composition. *Dermatitis*, 27(4), 161-169.
- de Sousa, T., Hébraud, M., Alves, O., Costa, E., Maltez, L., Pereira, J. E., . . . Poeta, P. (2023). Study of antimicrobial resistance, biofilm formation, and motility of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urine samples. *Microorganisms*, 11(5), 1345.
- De Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M. L. E., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., . . . Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12892.
- de Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M. L., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., . . . Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12892.
- Delarras, C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*: Éd. Tec & doc-Éd. médicales internationales, impr.
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1), 30-33.
- Donlan, R. M. (2000). Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO journal*, 46(6), S47-S52.
- Drissi, M., Ahmed, Z. B., Dehecq, B., Bakour, R., Plesiat, P., & Hocquet, D. (2008). Antibiotic susceptibility and mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance among clinical strains of

- Pseudomonas aeruginosa*: first report in Algeria. *Medecine et maladies infectieuses*, 38(4), 187-191.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. t., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356. doi: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- El-Jalel, L. F., Elkady, W. M., Gonaïd, M. H., & El-Gareeb, K. A. (2018). Difference in chemical composition and antimicrobial activity of *Thymus capitatus* L. essential oil at different altitudes. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 156-160.
- Engel, L. S., Hill, J. M., Caballero, A. R., Green, L. C., & O'Callaghan, R. J. (1998). Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 16792-16797.
- Eslahi, H., Fahimi, N., & Sardarian, A. R. (2017). Chemical composition of essential oils. *Essential oils in food processing: chemistry, safety and applications*, 119-171.
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., & Crawford, I. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of bacteriology*, 172(2), 884-900. doi: DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.884-900.1990>
- EUCAST. (2020). European committee on antimicrobial susceptibility testing du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (ca-sfm). recommandations.
- Fadila, M. (2016). Evaluation of a non-submerged cultivation assay combined to ESEM imaging for analysis of biofilms formed by dairy-associated sporeforming bacteria. *African journal of microbiology research*, 10(32), 1263-1273.
- Farisa Banu, S., Rubini, D., Rakshita, S., Chandrasekar, K., Murugan, R., Wilson, A., . . . Nithyanand, P. (2017). Antivirulent properties of underexplored *Cinnamomum tamala* essential oil and its synergistic effects with DNase against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms—an in vitro study. *Frontiers in microbiology*, 8, 1144. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01144>
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., & Prince, A. (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infection and immunity*, 66(1), 43-51.
- Fleiszig, S. M., & Evans, D. J. (2002). The pathogenesis of bacterial keratitis: studies with *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical and Experimental Optometry*, 85(5), 271-278.
- Frank, D. W. (1997). The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 26(4), 621-629.
- Freeman, L. (1916). Chronic general infection with the *Bacillus pyocyaneus*. *Annals of surgery*, 64(2), 195.

- Freney, J., Leclercq, R., Renaud, F., & Riegel, P. (2007). Précis de bactériologie clinique *Précis de bactériologie clinique* (pp. [1779]-[1779]).
- Galdino, A. C. M., Branquinha, M. H., Santos, A. L., & Viganor, L. (2017). Pseudomonas aeruginosa and its arsenal of proteases: weapons to battle the host. *Pathophysiological aspects of proteases*, 381-397.
- Ganesh, P. S., & Rai, V. R. (2018). Attenuation of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation by medicinal plants against antibiotic resistant Pseudomonas aeruginosa. *Journal of traditional and complementary medicine*, 8(1), 170-177. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.05.008>
- Gang, R. K., Bang, R. L., Sanyal, S. C., Mokaddas, E., & Lari, A. R. (1999). Pseudomonas aeruginosa septicaemia in burns. *Burns*, 25(7), 611-616.
- García-Salinas, S., Elizondo-Castillo, H., Arruebo, M., Mendoza, G., & Irusta, S. (2018). Evaluation of the antimicrobial activity and cytotoxicity of different components of natural origin present in essential oils. *Molecules*, 23(6), 1399.
- Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2022). A review of Pseudomonas aeruginosa metallophores: Pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology*, 11(12), 1711.
- Giraud, C., & De Bentzmann, S. (2012). Inside the complex regulation of Pseudomonas aeruginosa chaperone usher systems. *Environmental microbiology*, 14(8), 1805-1816.
- Gökalsın, B., Berber, D., & Sesal, N. C. (2019). Pseudomonas aeruginosa quorum sensing and biofilm inhibition *Quorum Sensing* (pp. 227-256): Elsevier.
- Goltermann, L., & Tolker-Nielsen, T. (2017). Importance of the exopolysaccharide matrix in antimicrobial tolerance of Pseudomonas aeruginosa aggregates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(4), 10.1128/aac.02696-02616.
- Gómez, M. I., & Prince, A. (2007). Opportunistic infections in lung disease: Pseudomonas infections in cystic fibrosis. *Current opinion in pharmacology*, 7(3), 244-251.
- Gopu, V., Meena, C. K., & Shetty, P. H. (2015). Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: in-vitro and in-silico evidence. *PLoS one*, 10(8), e0134684.
- Goudjil, M. B., Zighmi, S., Hamada, D., Mahcene, Z., Bencheikh, S. E., & Ladjel, S. (2020). Biological activities of essential oils extracted from Thymus capitatus (Lamiaceae). *South African Journal of Botany*, 128, 274-282.
- Guilbaud, M., Bruzard, J., Bouffartigues, E., Orange, N., Guillot, A., Aubert-Frambourg, A., . . . Bellon-Fontaine, M.-N. (2017). Proteomic response of Pseudomonas aeruginosa PAO1 adhering to solid surfaces. *Frontiers in microbiology*, 8, 1465.
- Gul, M., Memon, F. S., Mehmood, A., Khan, W. U., Ali, S., & Latif, A. (2023). A REVIEW PAPER: ON VIRULENT DETERMINANTS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE MECHANISMS OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA. *Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology*, 30(17), 640-675.

- Haiko, J., & Westerlund-Wikström, B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, 2(4), 1242-1267.
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., . . . Arora, D. (2016). Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 236.
- Hernando-Amado, S., Alcalde-Rico, M., Gil-Gil, T., Valverde, J. R., & Martínez, J. L. (2020). Naringenin inhibition of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing response is based on its time-dependent competition with N-(3-Oxo-dodecanoyl)-L-homoserine lactone for LasR binding. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 25.
- Hilliam, Y., Kaye, S., & Winstanley, C. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* and microbial keratitis. *Journal of Medical Microbiology*, 69(1), 3-13.
- Horna, G., & Ruiz, J. (2021). Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological research*, 246, 126719.
- Howell, H. A., Logan, L. K., & Hauser, A. R. (2013). Type III secretion of ExoU is critical during early *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *MBio*, 4(2), 10.1128/mbio.00032-00013.
- Hugh, R., & Leifson, E. (1964). The proposed neotype strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 14(2), 69-84.
- Husain, F. M., Ahmad, I., Khan, M. S., Ahmad, E., Tahseen, Q., Khan, M. S., & Alshabib, N. A. (2015). Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Frontiers in microbiology*, 6, 420.
- Huston, A. L., Methe, B., & Deming, J. W. (2004). Purification, characterization, and sequencing of an extracellular cold-active aminopeptidase produced by marine psychrophile *Colwellia psychrerythraea* strain 34H. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3321-3328.
- Huszczynski, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2019). The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens*, 9(1), 6.
- Huszczynski, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2019). The role of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. *Pathogens*, 9(1), 6.
- Ibraliu, A., Mi, X., Ristic, M., Stefanovic, Z. D., & Shehu, J. (2011). Analysis of essential oils of three wild medicinal plants in Albania. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(1), 58-62.

- Jakobsen, T. H., Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Givskov, M., & Høiby, N. (2013). Targeting quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: current and emerging inhibitors. *Future Microbiology*, 8(7), 901-921.
- Javanmardi, F., Emami, A., Pirbonyeh, N., Keshavarzi, A., & Rajaei, M. (2019). A systematic review and meta-analysis on Exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Infection, Genetics and Evolution*, 75, 104037.
- Jayari, A., El Abed, N., Jouini, A., Mohammed Saed Abdul-Wahab, O., Maaroufi, A., & Ben Hadj Ahmed, S. (2018). Antibacterial activity of *Thymus capitatus* and *Thymus algeriensis* essential oils against four food-borne pathogens inoculated in minced beef meat. *Journal of Food Safety*, 38(1), e12409.
- Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., & Dharmaraj, S. (2014). Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 1159-1168.
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3128.
- Kambouche, N., & El-Abed, D. (2003). Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Oran (Algeria). *Journal of Essential Oil Research*, 15(1), 39-40.
- Karuppiah, V., Thirunanasambandham, R., & Thangaraj, G. (2021). Anti-quorum sensing and antibiofilm potential of 1, 8-cineole derived from *Musa paradisiaca* against *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(4), 1-12.
- Kassob, D. S., & Hummadi, E. H. (2023). Study of pyocyanin production and biofilm formation in clinical *Pseudomonas aeruginosa*. *Academic Science Journal*, 1(2), 139-152.
- Kerekes, E. B., Deák, É., Takó, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vágvölgyi, C., & Krisch, J. (2013). Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 115(4), 933-942. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.12289>
- Kessler, E., Safrin, M., Olson, J. C., & Ohman, D. E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7503-7508.
- Khadim, M., & Marjani, M. (2019). Pyocyanin and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn infections in Baghdad, Iraq. *Biological*, 12(1), 131.
- Khadir, A., Bendahou, M., Benbelaid, F., Abdoune, M., & Abdelouahid, D. (2013). Antimicrobial potency of *Thymus lanceolatus* Desf. collected in Algeria. *Phytothérapie*, 11, 353-358.

- Khadir, A., Sobeh, M., Gad, H. A., Benbelaid, F., Bendahou, M., Peixoto, H., . . . Wink, M. (2016). Chemical composition and biological activity of the essential oil from *Thymus lanceolatus*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 71(5-6), 155-163.
- Khalifa, A. B. H., Moissenet, D., Thien, H. V., & Khedher, M. (2011). *Les facteurs de virulence de Pseudomonas aeruginosa: mécanismes et modes de régulations*. Paper presented at the Annales de biologie clinique.
- Khan, M. S. A., Zahin, M., Hasan, S., Husain, F. M., & Ahmad, I. (2009). Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Letters in applied microbiology*, 49(3), 354-360.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1511-1524.
- Koh, K. H., & Tham, F.-Y. (2011). Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 44(2), 144-148.
- Kollef, M. H., Chastre, J., Fagon, J.-Y., François, B., Niederman, M. S., Rello, J., . . . Go, K. W. (2014). Global prospective epidemiologic and surveillance study of ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical care medicine*, 42(10), 2178-2187.
- Krishnan, T., Yin, W.-F., & Chan, K.-G. (2012). Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by ayurveda spice clove (*Syzygium Aromaticum*) bud extract. *Sensors*, 12(4), 4016-4030.
- Kurachi, M. (1958). Studies on the biosynthesis of pyocyanine.(II): Isolation and determination of pyocyanine. *Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University*, 36(6), 174-187.
- Laarman, A. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F. J., van Strijp, J. A., & Rooijackers, S. H. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *The Journal of Immunology*, 188(1), 386-393.
- Lalucat, J., Mulet, M., Gomila, M., & García-Valdés, E. (2020). Genomics in bacterial taxonomy: impact on the genus *Pseudomonas*. *Genes*, 11(2), 139.
- Lam, J. S., Taylor, V. L., Islam, S. T., Hao, Y., & Kocíncová, D. (2011). Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Frontiers in microbiology*, 2, 118.
- Larif, M., Ouhssine, M., Soulaymani, A., & Elmidaoui, A. (2015). Potential effluent oil mills and antibacterial activity polyphenols against some pathogenic strains. *Research on Chemical Intermediates*, 41(2), 1213-1225.

- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in molecular medicine*, 10(12), 599-606.
- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*, 6(1), 26-41.
- Lee, W., Woo, E.-R., & Lee, D. G. (2016). Phytol has antibacterial property by inducing oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Free radical research*, 50(12), 1309-1318.
- Li, Q., Mao, S., Wang, H., & Ye, X. (2022). The Molecular Architecture of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing Inhibitors. *Marine Drugs*, 20(8), 488.
- Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., & Lu, W. (2022). Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 926758.
- Lister, P. D., Wolter, D. J., & Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), 582-610.
- Liu, X., Cai, J., Chen, H., Zhong, Q., Hou, Y., Chen, W., & Chen, W. (2020). Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 141, 103980.
- Lodise Jr, T. P. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*, 63, e61-e111.
- Lund-Palau, H., Turnbull, A. R., Bush, A., Bardin, E., Cameron, L., Soren, O., . . . Connett, G. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert review of respiratory medicine*, 10(6), 685-697.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L., & Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and infection*, 2(9), 1051-1060.
- Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., & Wozniak, D. J. (2009). Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS pathogens*, 5(3), e1000354.
- Magill, S. S., Edwards, J. R., Bamberg, W., Beldavs, Z. G., Dumyati, G., Kainer, M. A., . . . Nadle, J. (2014). Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *New England Journal of Medicine*, 370(13), 1198-1208.
- Mallikarjuna, P. V., & Dhanashree, B. (2023). Phenotypic and genotypic characterization of clinical *Pseudomonasaeruginosa*. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 18(3), 480.
- Mann, E. E., & Wozniak, D. J. (2012). *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS microbiology reviews*, 36(4), 893-916.

- Marino, A., Nostro, A., Mandras, N., Roana, J., Ginestra, G., Miceli, N., . . . Tullio, V. (2020). Evaluation of antimicrobial activity of the hydrolate of *Coridothymus capitatus* (L.) Reichenb. fil.(Lamiaceae) alone and in combination with antimicrobial agents. *BMC complementary medicine and therapies*, 20, 1-11.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. (2014). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 158, 73-80.
- Masák, J., Čejková, A., Schreiberová, O., & Řezanka, T. (2014). *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. *FEMS microbiology ecology*, 89(1), 1-14.
- Mechergui, K., Coelho, J. A., Serra, M. C., Lamine, S. B., Boukhchina, S., & Khouja, M. L. (2010). Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1745-1749.
- Mechergui, K., Jaouadi, W., Coelho, J., Serra, M. C., & Khouja, M. (2016). Biological activities and oil properties of *Origanum glandulosum* Desf: A review. *Phytothérapie*, 14(2), 102-108.
- Meliani, S., Toumi, S., Djahoudi, H., Deghdegh, K., Amoura, K., & Djahoudi, A. (2020). Synergistic combination of colistin with imipenem, amikacine or ciprofloxacin against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem-resistant isolated in Annaba hospital Algeria. *Biocell*, 44(2), 175.
- Mellouk, F. Z., Bakour, S., Meradji, S., Al-Bayssari, C., Bentakouk, M. C., Zouyed, F., . . . Rolain, J. M. (2017). First detection of VIM-4-producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in Northeastern (Annaba, Skikda) Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 23(3), 335-344.
- Meradji, S., Barguigua, A., cherif Bentakouk, M., Nayme, K., Zerouali, K., Mazouz, D., . . . Timinouni, M. (2016). Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria. *Burns*, 42(4), 906-918.
- Meradji, S., Barguigua, A., Zerouali, K., Mazouz, D., Chettibi, H., Elmdaghri, N., & Timinouni, M. (2015). Epidemiology of carbapenem non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Eastern Algeria. *Antimicrobial resistance and infection control*, 4(1), 1-8.
- Merradi, M., Kassah-Laouar, A., Ayachi, A., Heleili, N., Menasria, T., Hocquet, D., . . . Sauget, M. (2019). Occurrence of VIM-4 metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an Algerian hospital. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 13(04), 284-290.
- Meyer, J. a., & Abdallah, M. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Microbiology*, 107(2), 319-328.



- Michalska, M., & Wolf, P. (2015). Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in microbiology*, 6, 963.
- Migula, W. (1900). Pseudomonas aeruginosa (Schröter) Mig. *System der Bakterien*, 2, 884-885.
- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., & Harjai, K. (2009). Urinary tract infections caused by Pseudomonas aeruginosa: a minireview. *Journal of infection and public health*, 2(3), 101-111.
- Moghnieh, R. A., Kanafani, Z. A., Tabaja, H. Z., Sharara, S. L., Awad, L. S., & Kanj, S. S. (2018). Epidemiology of common resistant bacterial pathogens in the countries of the Arab League. *The Lancet infectious diseases*, 18(12), e379-e394.
- Moore, N. M., & Flaws, M. L. (2011). Introduction: pseudomonas aeruginosa. *Clinical laboratory science*, 24(1), 41.
- Morrison Jr, A. J., & Wenzel, R. P. (1984). Epidemiology of infections due to Pseudomonas aeruginosa. *Reviews of infectious diseases*, 6(Supplement\_3), S627-S642.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 481-511.
- Nagaoka, K., Yamashita, Y., Kimura, H., Kimura, H., Suzuki, M., Fukumoto, T., . . . Maki, H. (2019). Anti-PcrV titers in non-cystic fibrosis patients with Pseudomonas aeruginosa respiratory tract infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 87, 54-59.
- Nakagawa, S., Hillebrand, G. G., & Nunez, G. (2020). Rosmarinus officinalis L.(rosemary) extracts containing carnosic acid and carnosol are potent quorum sensing inhibitors of staphylococcus aureus virulence. *Antibiotics*, 9(4), 149.
- Napoli, E. M., Curcuruto, G., & Ruberto, G. (2010). Screening of the essential oil composition of wild Sicilian thyme. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4), 816-822.
- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 247-256.
- Naskar, S., Hohl, M., Tassinari, M., & Low, H. H. (2021). The structure and mechanism of the bacterial type II secretion system. *Molecular Microbiology*, 115(3), 412-424.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
- Newman, J. W., Floyd, R. V., & Fothergill, J. L. (2017). The contribution of Pseudomonas aeruginosa virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS microbiology letters*, 364(15), fnx124.
- Nouasri, A., Dob, T., Toumi, M., Dahmane, D., Krimat, S., Lamari, L., & Chelgoume, C. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Thymus

- lanceolatus Desf., an endemic thyme from Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(5), 1246-1252.
- Nouasri, A., Krimat, S., Dahmane, D., Ksouri, A., Metidji, H., & Dob, T. (2018). Biological activities and chemical analysis of phenolic and flavonoid components of *Thymus hirtus* Willd. and *Thymus lanceolatus* Desf. extracts. *Phytothérapie*, 16(6), 353-364.
- Noumi, E., Merghni, A., M. Alreshidi, M., Haddad, O., Akmadar, G., De Martino, L., . . . Al-Sieni, A. (2018). Chromobacterium violaceum and Pseudomonas aeruginosa PAO1: Models for evaluating anti-quorum sensing activity of Melaleuca alternifolia essential oil and its main component terpinen-4-ol. *Molecules*, 23(10), 2672.
- O'Callaghan, R., Caballero, A., Tang, A., & Bierdeman, M. (2019). Pseudomonas aeruginosa keratitis: protease IV and PASP as corneal virulence mediators. *Microorganisms*, 7(9), 281.
- Olivero v, j. T., pájaro c, n. P., & stashenko, E. (2011). Antiquorum sensing activity of essential oils isolated from different species of the genus Piper. *Vitae*, 18(1), 77-82.
- Olivero-Verbel, J., Barreto-Maya, A., Bertel-Sevilla, A., & Stashenko, E. E. (2014). Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from Lippia alba. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 759-767.
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*(47), e2437.
- Ouyang, J., Sun, F., Feng, W., Sun, Y., Qiu, X., Xiong, L., . . . Chen, Y. (2016). Quercetin is an effective inhibitor of quorum sensing, biofilm formation and virulence factors in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Applied Microbiology*, 120(4), 966-974.
- Padulosi, S. (1997). *Oregano: Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, 8-12 May 1996, CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy* (Vol. 14): Bioversity International.
- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 37(1), 177-192.
- Pantarella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., & Berlutti, F. (2013). Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali di Igiene Medicina Preventiva e di Comunità*, 25(1), 31-42.
- Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Falara, V., Givanoudi, S., Kostas, S., & Kanellis, A. K. (2014). Genus Cistus: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Frontiers in chemistry*, 2, 35.
- Parte, A. C. (2018). LPSN—List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(6), 1825-1829.

- Pearson, J. P., Gray, K. M., Passador, L., Tucker, K. D., Eberhard, A., Iglewski, B. H., & Greenberg, E. P. (1994). Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(1), 197-201.
- Pejin, B., Ciric, A., Glamoclija, J., Nikolic, M., Stanimirovic, B., & Sokovic, M. (2015). Quercetin potently reduces biofilm formation of the strain *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vitro. *Current pharmaceutical biotechnology*, *16*(8), 733-737.
- Pharmacopoeia, E. (2008). Determination of essential oils in herbal drugs (pp. 251-256): Council of Europe Strasbourg Cedex, France.
- Pier, G. B. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *International journal of medical microbiology*, *297*(5), 277-295.
- Pitt, T. (1998). *Pseudomonas*, *Burkholderia* and related genera. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, *3*, 1109-1138.
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Frontiers in microbiology*, *2*, 65.
- Qaralleh, H. (2019). Thymol rich *Thymbra capitata* essential oil inhibits quorum sensing, virulence and biofilm formation of beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Natural Product Sciences*, *25*(2), 172-180.
- Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., . . . Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*(1), 199.
- Quézel, P., & Santa, S. (1962). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Tome, 1*, 460.
- Rajkumari, J., Borkotoky, S., Murali, A., Suchiang, K., Mohanty, S. K., & Busi, S. (2018). Cinnamic acid attenuates quorum sensing associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Biotechnology letters*, *40*, 1087-1100.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, *13*(6), 151-171.
- Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*, *62*, 250-264.
- Reichling, J. (2020). Anti-biofilm and virulence factor-reducing activities of essential oils and oil components as a possible option for bacterial infection control. *Planta medica*, *86*(08), 520-537.
- Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: an update. *Drugs*, *81*(18), 2117-2131.

- Rossi, C., Chaves-López, C., Serio, A., Casaccia, M., Maggio, F., & Paparella, A. (2022). Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: An updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(8), 2172-2191.
- Sader, H. S., Castanheira, M., Duncan, L. R., & Mendes, R. E. (2021). Antimicrobial activities of ceftazidime/avibactam, ceftolozane/tazobactam, imipenem/relebactam, meropenem/vaborbactam, and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* from patients with skin and soft tissue infections. *International Journal of Infectious Diseases*, 113, 279-281.
- Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., & Prince, A. S. (2005). Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 171(11), 1209-1223.
- Sandoval-Motta, S., & Aldana, M. (2016). Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 8(3), 253-267.
- Saoulajan, C., Boujida, N., El Mihaoui, A., El Baakili, A., Alshahrani, M. M., Lee, L.-H., & Bouyahya, A. (2022). Phytochemistry, pharmacological investigations, industrial applications, and encapsulation of *Thymbra capitata* L., a review. *Trends in Food Science & Technology*, 129, 463-491.
- Sari, M., Biondi, D. M., Kaâbeche, M., Mandalari, G., D'Arrigo, M., Bisignano, G., . . . Ruberto, G. (2006). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and fragrance journal*, 21(6), 890-898.
- Sarkar, R., Chaudhary, S. K., Sharma, A., Yadav, K. K., Nema, N. K., Sekhoacha, M., . . . Mukherjee, P. K. (2014). Anti-biofilm activity of Marula—a study with the standardized bark extract. *Journal of ethnopharmacology*, 154(1), 170-175.
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321-324.
- Sathe, N., Beech, P., Croft, L., Suphioglu, C., Kapat, A., & Athan, E. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and novel approaches to treatment “Knowing the enemy” the threat of *Pseudomonas aeruginosa* and exploring novel approaches to treatment. *Infectious Medicine*, 2(3), 178-194.
- Schalk, I. J., & Guillon, L. (2013). Pyoverdine biosynthesis and secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for metal homeostasis. *Environmental microbiology*, 15(6), 1661-1673.
- Sefraoui, I., Berrazeg, M., Drissi, M., & Rolain, J.-M. (2014). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from western Algeria between 2009 and 2012. *Microbial Drug Resistance*, 20(2), 156-161.

- Semra, I., Benmerache, A., Chibani, S., Kabouche, A., Abuhamdah, S., & Kabouche, Z. (2013). Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Origanum glandulosum* Desf. from Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, 5(3), 381-385.
- Shouman, H., Said, H. S., Kenawy, H. I., & Hassan, R. (2023). Molecular and biological characterization of pyocyanin from clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 166.
- Silva, L. V., Galdino, A. C. M., Nunes, A. P. F., dos Santos, K. R., Moreira, B. M., Cacci, L. C., . . . Santos, A. L. (2014). Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of medical microbiology*, 304(8), 990-1000.
- Singh, B. N., Singh, H. B., Singh, A., Singh, B. R., Mishra, A., & Nautiyal, C. S. (2012). Lagerstroemia speciosa fruit extract modulates quorum sensing-controlled virulence factor production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 158(2), 529-538.
- Singh, S., Datta, S., Narayanan, K. B., & Rajnish, K. N. (2021). Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 1-19.
- Sırıken, B., Öz, V., & Erol, İ. (2021). Quorum sensing systems, related virulence factors, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fish. *Archives of Microbiology*, 203, 1519-1528.
- Soltani, S., Shakeri, A., Iranshahi, M., & Boozari, M. (2021). A Review of the Phytochemistry and Antimicrobial Properties of *Origanum vulgare* L. and Subspecies. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 20(2), 268.
- Song, W. S., & Yoon, S.-i. (2014). Crystal structure of FliC flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* and its implication in TLR5 binding and formation of the flagellar filament. *Biochemical and biophysical research communications*, 444(2), 109-115.
- Spagnolo, A. M., Sartini, M., & Cristina, M. L. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, 32(3), 169-175.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.
- Strateva, T., & Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of microbiology*, 61(4), 717-732.
- Strateva, T., & Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of microbiology*, 61, 717-732.
- Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*, 58(9), 1133-1148.

- Streeter, K., & Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment.*
- T Rybtke, M., O Jensen, P., Hoiby, N., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., & Bjarnsholt, T. (2011). The implication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in infections. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued)*, 10(2), 141-157.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., . . . Carmeli, Y. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet infectious diseases*, 18(3), 318-327.
- Tagnaout, I., Zerkani, H., Hadi, N., El Moumen, B., El Makhoukhi, F., Bouhrim, M., . . . Zair, T. (2022). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of *Thymus broussonetii* Boiss and *Thymus capitatus* (L.) Hoffmann and Link essential oils. *Plants*, 11(7), 954.
- Tammar, S., Salem, N., Bettaieb Rebey, I., Sriti, J., Hammami, M., Khammassi, S., . . . Msaada, K. (2019). Regional effect on essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus capitatus* L. *Journal of Essential Oil Research*, 31(2), 129-137.
- Tapia-Rodriguez, M. R., Bernal-Mercado, A. T., Gutierrez-Pacheco, M. M., Vazquez-Armenta, F. J., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., . . . Ayala-Zavala, J. F. (2019). Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* exposed to carvacrol: Alterations of the Quorum sensing at enzymatic and gene levels. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 13, 531-537.
- Tapia-Rodriguez, M. R., Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Martinez-Tellez, M. A., Martins, C. M., & Ayala-Zavala, J. F. (2017). Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. *Food Control*, 75, 255-261.
- Taylor, P. K., Yeung, A. T., & Hancock, R. E. (2014). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of biotechnology*, 191, 121-130.
- Tchakal-Mesbahi, A., Abdouni, M., & Metref, M. (2021). Prevalence of Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Burn Wounds In Algeria. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 34(2), 150.
- Tchakal-Mesbahi, A., Metref, M., Singh, V. K., Almpani, M., & Rahme, L. G. (2021). Characterization of antibiotic resistance profiles in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burn patients. *Burns*, 47(8), 1833-1843.
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8671.

- Thomas, S., Holland, I. B., & Schmitt, L. (2014). The type 1 secretion pathway—the hemolysin system and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1629-1641.
- Thomsen, K., Høiby, N., Jensen, P. Ø., Ciofu, O., & Moser, C. (2022). Immune Response to Biofilm Growing Pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Biomedicine*, 10(9), 2064.
- Tomou, E.-M., Lytra, K., Rallis, S., Tzakos, A. G., & Skaltsa, H. (2022). An updated review of genus *Cistus* L. since 2014: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties. *Phytochemistry Reviews*, 21(6), 2049-2087.
- Touati, M., Diene, S. M., Dekhil, M., Djahoudi, A., Racherache, A., & Rolain, J.-M. (2013). Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(5), 2426.
- Toumi, S., Meliani, S., Amoura, K., Rachereche, A., Djebien, M., & Djahoudi, A. (2018). Multidrug-resistant Gram-negative bacilli producing oxacillinases and Metallo- $\beta$ -lactamases isolated from patients in intensive care unit-Annaba hospital-Algeria (2014-2016). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(7), 107-113.
- Trautmann, M., Lepper, P. M., & Haller, M. (2005). Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism. *American journal of infection control*, 33(5), S41-S49.
- Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., & Tasca Ribeiro, V. S. (2022). Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: A review. *Pathogens*, 11(3), 300.
- Urgancı, N. N., Yılmaz, N., Alaşalvar, G. K., & Yıldırım, Z. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* and Its Pathogenicity. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 10(4), 726-738.
- Vallet, I., Diggle, S. P., Stacey, R. E., Cámara, M., Ventre, I., Lory, S., . . . Filloux, A. (2004). Biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*: fimbrial cup gene clusters are controlled by the transcriptional regulator MvaT. *Journal of bacteriology*, 186(9), 2880-2890.
- Vallet, I., Olson, J. W., Lory, S., Lazdunski, A., & Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6911-6916.
- Vandeputte, O. M., Kiendrebeogo, M., Rasamiravaka, T., Stevigny, C., Duez, P., Rajaonson, S., . . . El Jaziri, M. (2011). The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 157(7), 2120-2132.
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041.

- Veesenmeyer, J. L., Hauser, A. R., Lisboa, T., & Rello, J. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Critical care medicine*, 37(5), 1777.
- Venturi, V. (2006). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS microbiology reviews*, 30(2), 274-291.
- Villavicencio, R. T. (1998). The history of blue pus. *Journal of the American College of Surgeons*, 187(2), 212-216.
- Vrenna, G., Artini, M., Ragno, R., Relucenti, M., Fiscarelli, E. V., Tuccio Guarna Assanti, V., . . . Selan, L. (2021). Anti-virulence properties of *coridothymus capitatus* essential oil against *pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients. *Microorganisms*, 9(11), 2257.
- Wavre-Oberhänsli, A., & Nicod, L. P. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* et maladie broncho-pulmonaire chronique obstructive: Pneumologie. *Revue médicale suisse*, 6(272), 2240-2243.
- WHO, O. (2017). One health. *World Health Organization*, 736.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163-175.
- Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? *Molecules*, 24(11), 2130.
- Wu, M., & Li, X. (2015). *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* *Molecular medical microbiology* (pp. 1547-1564): Elsevier.
- Y Ramírez-Rueda, R., & Salvador, M. J. (2020). Phenotypic detection of quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine and swarming by volatile organic products. *Future Microbiology*, 15(12), 1147-1156.
- Yamine, J., Chihib, N.-E., Gharsallaoui, A., Dumas, E., Ismail, A., & Karam, L. (2022). Essential oils and their active components applied as: free, encapsulated and in hurdle technology to fight microbial contaminations. A review. *Heliyon*.
- Zaidi, F. Z., Dali-Yahia, R., Zenati, K., Yazı, L., Lounes, M., Aberkane, S., . . . Touati, A. (2020). Characterization of VIM-4 producing clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Western Algeria: sequence type and class 1 integron description. *Microbial Drug Resistance*, 26(12), 1437-1441.
- Zalegh, I., Akssira, M., Bourhia, M., Mellouki, F., Rhallabi, N., Salamatullah, A. M., . . . Mhand, R. A. (2021). A review on *Cistus* sp.: phytochemical and antimicrobial activities. *Plants*, 10(6), 1214.

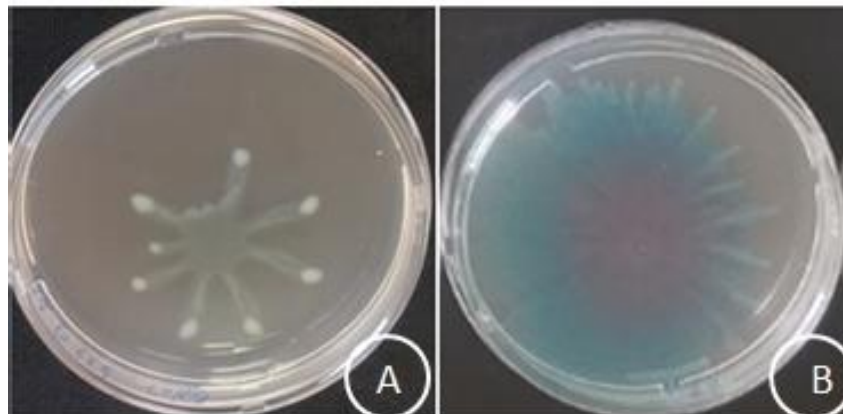


- Zatout, F., Benarba, B., Bouazza, A., Babali, B., Bey, N. N., & Morsli, A. (2021). Ethnobotanical investigation on medicinal plants used by local populations in Tlemcen National Park (extreme North West Algeria). *Mediterranean Botany*, 15(30), 12.
- Zhang, Y., Feng, R., Li, L., Zhou, X., Li, Z., Jia, R., . . . He, C. (2018). The antibacterial mechanism of terpinen-4-ol against *Streptococcus agalactiae*. *Current microbiology*, 75, 1214-1220.
- Zhou, L., Zheng, H., Tang, Y., Yu, W., & Gong, Q. (2013). Eugenol inhibits quorum sensing at sub-inhibitory concentrations. *Biotechnology letters*, 35, 631-637.
- Zoued, A., Brunet, Y. R., Durand, E., Aschtgen, M.-S., Logger, L., Douzi, B., . . . Cascales, E. (2014). Architecture and assembly of the Type VI secretion system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1664-1673.

# **Annexe**



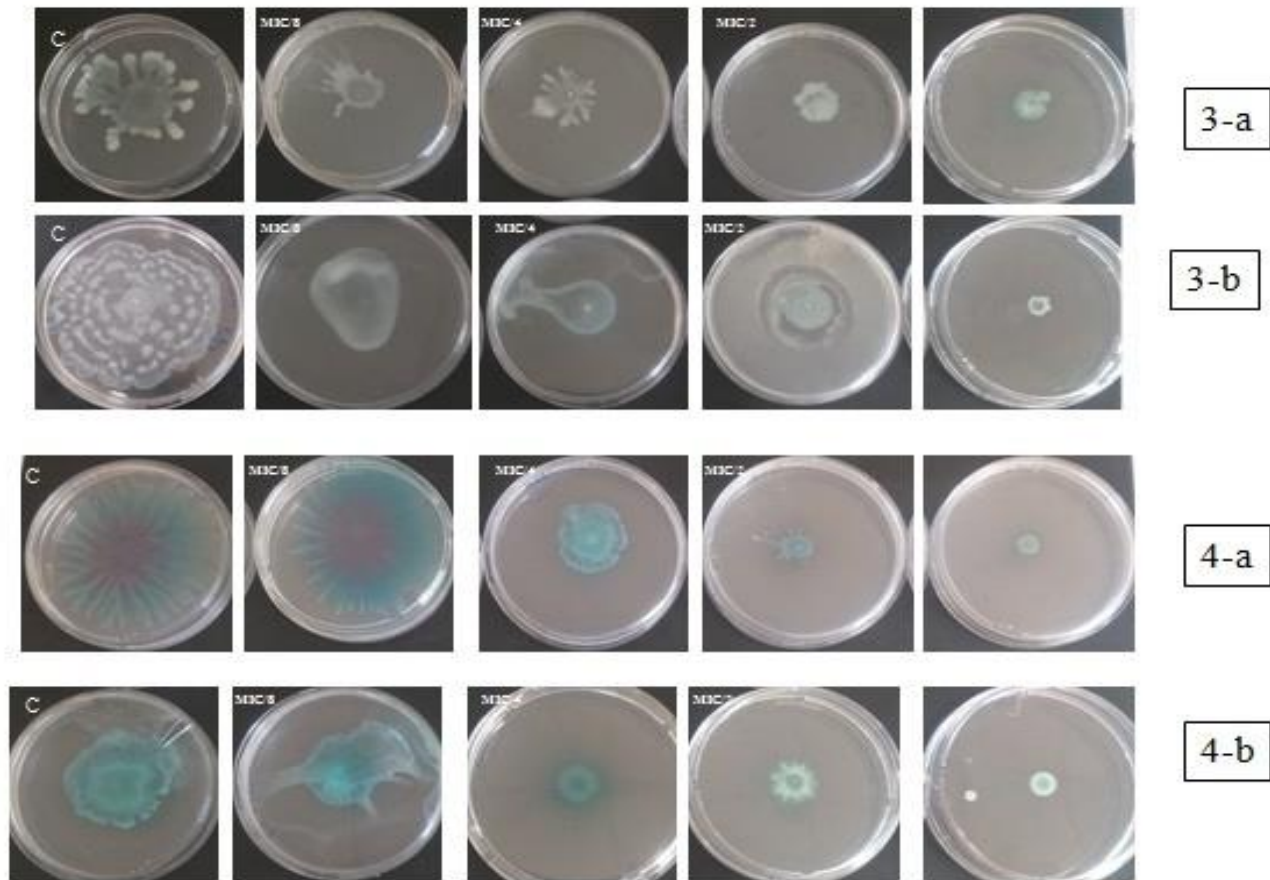
**Figure 29** : Evaluation de la production de biofilm par la méthode de CV.  
**T** : témoin négatif ; **A** : souches fortement formatrices de biofilm ; **B** : formation modérée ; **C** :  
 :  
 Faiblement formatrice de biofilm.



**Figure 30** : Les deux types de mobilité  
 A : Mobilité de type Swimming. B : Mobilité de type Swarming.

**Tableau 11 : Inhibition de l'activité staphylolytique de LasA par différentes concentrations d'HE de *C. munbyi***

Temps (min)	LasA Inhibition (%)															
	CMI				CMI/2				CMI/4				CMI/8			
	10	20	40	60	10	20	40	60	10	20	40	60	10	20	40	60
PaO1	20.36±0.04	35.25±0.03	50.68±0.05	70.12±0.03	15.15±0.05	25.27±0.03	40.12±0.02	56.37±0.05	10.58±0.06	20.41±0.05	31.65±0.05	40.21±0.04	5.19±0.0	10.21±	10.54±	15.25±
Pa2	18.32±0.06	32.54±0.05	49.85±0.06	69.35±0.07	10.21±0.02	20.36±0.06	32.54±0.05	40.25±0.03	9.56±0.02	16.35±0.06	25.46±0.06	38.36±0.03	3.21±	4.65±	5.05±	10.56±
Pa3	20.25±0.04	34.21±0.06	51.32±0.04	70.28±0.09	15.24±0.06	24.65±0.04	36.94±0.04	46.87±0.02	10.02±0.05	18.65±0.05	28.65±0.02	35.14±0.04	4.12±	9.51±	10.02±	16.21±
Pa6	15.63±0.05	30.24±0.07	45.61±0.04	65.24±0.06	10.65±0.05	20.18±0.05	30.21±0.04	38.54±0.05	8.61±0.06	15.84±0.03	24.36±0.05	30.64±0.06	2.57±	5.46±	9.68±	11.54±
Pa16	19.84±0.06	36.21±0.03	51.48±0.06	71.63±0.04	14.25±0.04	26.32±0.05	42.32±0.06	50.46±0.04	9.75±0.07	19.04±0.04	30.08±0.04	39.84±0.05	6.52±	10.54±	11.25±	31.21±



**Figure 31** : Effet de l'huile essentielle de *C.munbyi* sur les phénotypes de mobilité.

a) Swarming ; b) Swimming

**Tableau 12** : caractères phénotypiques des souches de *P.aeruginosa*

souche	King A	King B	pyocyanine ug/ml	biofilm
PsH1	+	-	23,38864	0,115
PsH2	+	-	14,85264	0,895
PsH8	-	+	12,804	0,25
Psh11	-	-	22,1936	0,214
PsH15	-	+	23,9008	0,654
PsH16	-	+	4,78016	0,214
Psh18	-	+	22,02288	0,895
PsH19	+	-	12,63328	0,657
PsH23	-	-	21,34	0,159
PsH24	-	-	11,9504	0,123
PsH25	+	+	11,60896	0,482
PsH27	-	-	7,85312	0,325
PsH28	-	+	8,02384	0,145
PsH29	-	-	15,3648	0,523
PsH31	+	-	34,144	0,451
PsH32	+	-	28,85168	0,155
PsH33	+	+	9,21888	1,26
PsH37	+	+	11,60896	0,45
PsH39	+	-	26,29088	0,399
PsH41	-	-	6,48736	0,173
PsH43	-	-	95,6032	0,12
PsH48	-	-	20,4864	0,25
PsH49	+	-	14,5112	0,165
PsH51cb	+	-	2,04864	0,246
PsH54	+	-	28,1688	0,475
PsH58	-	-	34,144	0,391
PsH61	+	-	16,2184	0,541
PsH63	+	+	12,804	0,452

# **Publications**



## Inhibitory Effect of Essential Oils Obtained from Five Algerian Plants against *Pseudomonas aeruginosa*, Including Carbapenem-Resistant Strains

Asma Benaissa<sup>1</sup>, Khadir Abdelmounaim<sup>1\*</sup>, Fethi Benbelaid<sup>1</sup>, Ammara Bousselham<sup>2</sup>, Yassine Benziane<sup>1</sup>, Alain Muselli<sup>3</sup>, and Mourad Bendahou<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical, and Environment (LAMAABE), Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature, Life, Earth, and Universe, Abou Bekr Belkaïd University of Tlemcen, Algeria

<sup>2</sup>Microbiology laboratory, University Hospital Center of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

<sup>3</sup>Laboratory of Natural Products Chemistry, University of Corsica, UMR CNRS 6134, France

**Abstract** – *Pseudomonas aeruginosa* is a pathogenic and nosocomial bacterium responsible for serious health-care-associated infections mainly for its resistance to antibiotics. Against this problem researches for new active substances must be continued to overcome nosocomial infections caused by *P. aeruginosa*. Essential oils extracted from medicinal plants are a good alternative thanks to their proved antimicrobial activities. This study aims to evaluate the antibacterial activity of five essential oils obtained from plants that grow naturally in western Algeria against antibiotic-resistant *P. aeruginosa* strains. The studied essential oils, obtained by hydrodistillation, were analysed for the determination of their composition using GC-MS. The antibacterial activity of the studied essential oils was evaluated by disk diffusion and broth microdilution methods against fourteen *P. aeruginosa* strains, of which thirteen have been isolated from clinical sources and one reference strain. The obtained results show that *Cistus munbyi* and *Thymus lanceolatus* essential oils possess a good activity against antibiotic-resistant *P. aeruginosa* strains. While *Origanum glandulosum*, *Ammoides verticillata*, and *Thymbra capitata* were less active respectively. Thus, *C. munbyi* and *T. lanceolatus* essential oils can be considered as good alternatives treatment against nosocomial infections caused by *P. aeruginosa*.

**Keywords** – Antibacterial activity, antibiotic resistance, disk diffusion, essential oils, nosocomial infections, *Pseudomonas aeruginosa*

### Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic Gram-negative bacterium widely encountered in the medical field.<sup>1</sup> It is a facultative and non-sporulating anaerobic bacterium that is considered ubiquitous in soil and water. However, this species is rare in places where human activity is absent.<sup>2</sup> *P. aeruginosa* is involved in various types of infections, such as pneumonia, skin infections and urinary tract infections<sup>3</sup> causing high morbidity and mortality rates,<sup>4</sup> in which its pathogenicity is due to an arsenal of enzymes and toxins produced during infection.<sup>5</sup> On the other hand, this pathogenic species is also considered as a nosocomial bacterium because of its involvement in the majority of hospital-acquired infections, in

particular intensive care.<sup>6</sup> This infectious bacterium is known for its resistance to most antibiotics through the development of a multitude of resistance mechanisms.<sup>7</sup> In fact, *P. aeruginosa* is considered among the most resistant bacteria to antibiotics compared to other pathogenic species,<sup>8</sup> since this pathogen has developed resistance to several latest generation antibiotics such as carbapenems.<sup>9</sup> This ability is due not only to the production of enzymes that degrade antibiotic molecules<sup>2,10</sup> but also to its rapid acquisition of resistance genes through the plasticity of its genome.<sup>11</sup> Moreover, *P. aeruginosa* is known by forming biofilms, a phenomenon produced through cellular communication between bacteria called “quorum sensing”, which allows this species to protect itself against all antimicrobial agents.<sup>12</sup> Therefore, the discovery and development of alternative therapeutic strategies for combating *P. aeruginosa* infections are increasingly in demand with much attention<sup>7</sup> since the pharmaceutical industry produces fewer antimicrobial substances mainly against Gram-negative bacteria.<sup>13</sup>

\*Author for correspondence

Khadir Abdelmounaim, Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical, and Environment (LAMAABE), Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature, Life, Earth, and Universe, Abou Bekr Belkaïd University of Tlemcen, Algeria  
Tel: +213-54-133-1110; E-mail: khadirabdel@yahoo.fr



For centuries, man has used plants to treat common infectious pathologies, knowing that some traditional treatments are still part of the usual treatment of various diseases.<sup>14</sup> Plants, especially those medicinal ones, are known for their chemical diversity.<sup>15</sup> Indeed, plants construct over 100,000 therapeutic molecules from their secondary metabolism, in which many of them, if not most, possess either antimicrobial activity against pathogens<sup>16</sup> or against their antibiotic resistance mechanisms.<sup>17</sup> For this reason, research on plant extracts may contribute to the discovery of new antimicrobial molecules that can be used as antibiotics<sup>18</sup> or used as an origin for the synthesis of other antibiotic molecules by combinatorial chemistry.<sup>19</sup> Essential oils (EOs) obtained from aromatic plants are a promising source of molecules with antimicrobial effects against a large number of microorganisms,<sup>20</sup> among which multidrug-resistant bacteria.<sup>21</sup>

It turned out through previous studies that Gram-negative bacteria are less sensitive to EOs than Gram-positive ones,<sup>22</sup> especially *P. aeruginosa* strains, which are the least sensitive bacteria to Eos.<sup>23</sup> However, some authors have found some active EOs against *P. aeruginosa*, especially those of *Cinnamomum cassia*<sup>24</sup> and *Syzygium aromaticum*<sup>25</sup> and then Eos of *Anthemis nobilis* and some species from the genera of *Thymus* and *Origanum*.<sup>26,27</sup> Despite this, the number of active EOs against *P. aeruginosa* remains very limited and not widespread in the world. For this purpose, the evaluation of other EOs seems interesting to overcome *P. aeruginosa* nosocomial infections.

Therefore, this study aims to evaluate the antibacterial activity of five EOs obtained from local medicinal plants against antibiotic-resistant *P. aeruginosa* including carbapenem-resistant strains. The selection of plants was made on the basis of their use by the local population, for this purpose we have selected five plants which are among the most used medicinal plants to treat different types of infections in the north-west region of Algeria.

## Experimental

**Plant material** – Five plants were studied in this work that are part of three families known for their therapeutic characteristics. Voucher specimens of all species were deposited in our laboratory with specific codifications (VPC). The plants aerial parts were harvested in full bloom which are; *Ammoides verticillata* (*A. verticillata*) “*Apiaceae*” (Terni, Tlemcen. VP-AM061320), *Origanum glandulosum* (*O. glandulosum*) “*Lamiaceae*” (Mefrouch, Tlemcen. VP-OR061720) *Thymbra capitata* (*T. capitata*)

“*Lamiaceae*” (Lala setti, Tlemcen. VP-TH071220), *Cistus munbyi* (*C. munbyi*) “*Cistaceae*” (Coastal region of Honaine, Tlemcen. VP-SBF070620) and *Thymus lanceolatus* (*T. lanceolatus*) “*Lamiaceae*” (Terni, Tlemcen. VP-TL061920) from June 2018 to July 2020. The choice of these plant species is based on their use by the local population against infections in northwest Algeria. The botanical identification of the different harvested plants was carried out in the Ecological Management of Natural Ecosystems laboratory, according to their characteristics and using the botany book by Quézel and Santa (1962)<sup>28</sup> as a reference.

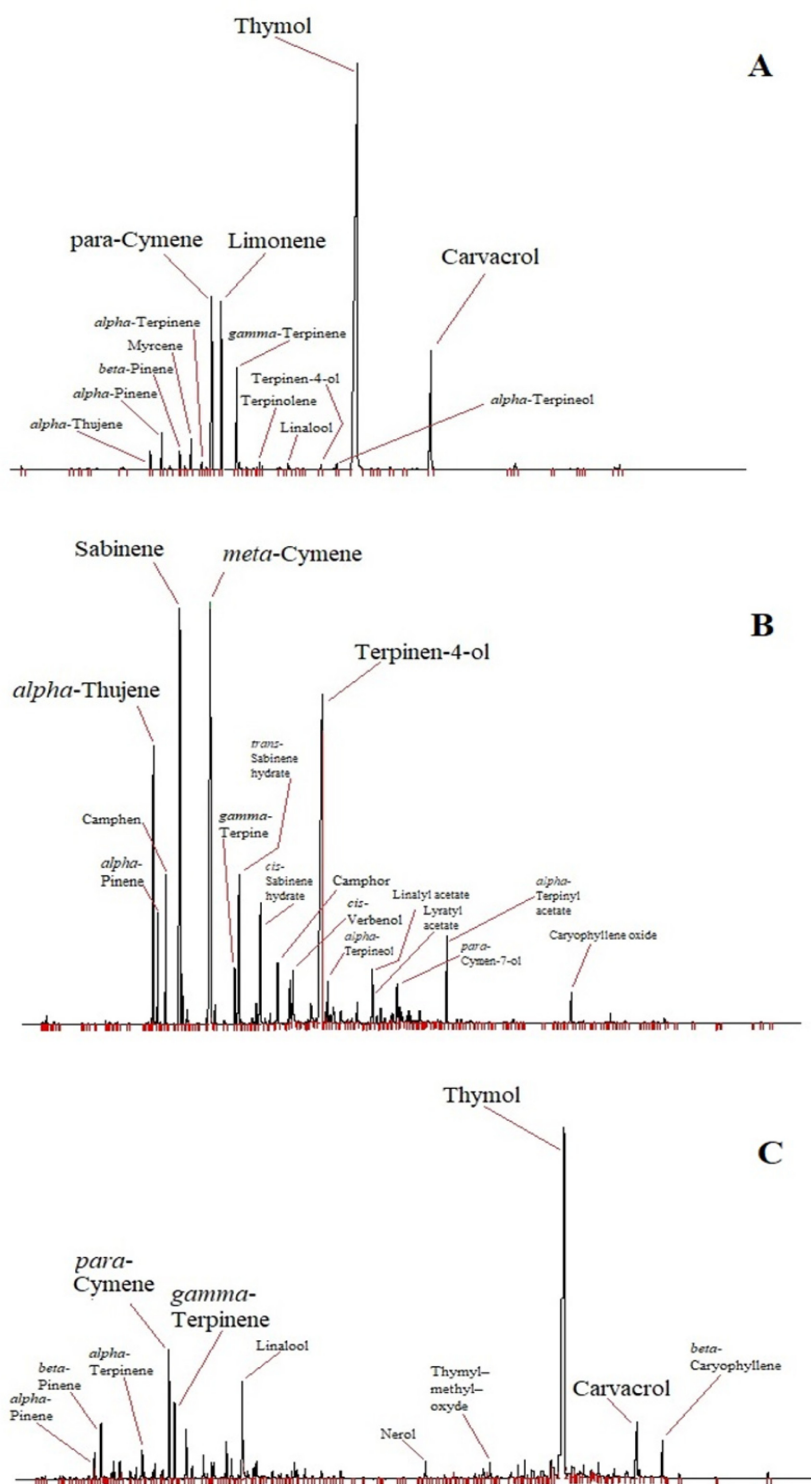
**Obtaining EOs** – EOs extraction was performed using a Clevenger-type apparatus according to the recommendations of the European pharmacopoeias (2005).<sup>29</sup> 100 g of air-dried aerial parts was put in a flask with 1 liter of distilled water, and then boiled for three hours. The yield (%) of the obtained essential oil was calculated by the following formula: Yield (%) = Mass of essential oil (g) / Mass of dry plant matter (g).

After that, the resulting EOs were dried using magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>) then filled in closed dark vials at 4°C and protected from light until analysis.

**Chemical analyses by GC and GC-MS** – Gas chromatography (GC) analysis was performed using a Perkin Elmer Auto system GC-type chromatograph equipped with two flame ionization detectors (FID) for the detection of volatile compounds, one injector/splitter and two polar (Rtx-Wax. polyethylene glycol) and nonpolar (Rtx-1. polydimethylsiloxane) columns (60.00 m × 0.22 mm, inner diameter, film thickness 0.25 μm). The carrier gas was helium (1 mL/min) with a column head pressure of 25 psi. The injector temperature was 250°C and that of the detector was 280°C. The temperature was programmed to increase from 60 to 230°C at the rate of 2°C/min, and then maintained constant for 45 min at a level of 230°C. The injection was done in split mode with a split ratio of 1/50. The amount of EO injected was 0.2 μL. Quantification was made by direct electronic integration of peak areas.

GC and GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry) analysis was similar to the preceding except that a Perkin Elmer Autosystem XL chromatograph was used along with a Perkin Elmer TurboMass mass detector.

The carrier gas was again helium (1 mL/min) with a column head pressure of 25 psi, injector temperature of 250°C and programmed to rise from 60 to 230°C at the rate of 2°C/min, and then kept constant for 35 min at 230°C. The injection was done in split mode but with a split ratio of 1/80. The amount of EO injected was 0.2 μL. Detection was carried out by a quadrupole analyser which consisted of an assembly of four parallel electrodes with a



**Fig. 1.** Chromatograms of the most active oils. (A) *A. verticillata*, (B) *C. munbyi*, (C) *T. lanceolatus*.

cylindrical section. The source temperature was 150°C. The device functioned by electron impact and fragmentation was performed at an electric field of 70 eV.

Identification of components of EOs was carried out by

two methods, which are the Kovats index (1965)<sup>30</sup> and the comparison of mass spectra with those of the bibliography.<sup>31</sup>

**Microbial Strains** – Fourteen strains of *P. aeruginosa*

have been selected for this study; thirteen strains were isolated from patients hospitalized at the University Hospital of Tlemcen, Algeria, and one reference strain ATCC 27853. The clinical strains were provided from laboratory of Microbiology, University Hospital Center of Tlemcen, Algeria. These strains have been isolated in routine by clinicians for treatment purposes then conserved in the same institute. No samples were taken specifically for this study. Strains isolation was done in several hospital departments, namely, surgery (03), pneumo-phthysiology (03), dermatology (01), intensive care (02), nephrology (02), infectiology (01) ophthalmology (01) at the University Hospital Center of Tlemcen, from October 2018 to June 2020. At the first time, samples were cultured in Brain Heart Infusion Broth for enrichment (Conda Pronadisa™, Spain) at 37°C for 18 h. The positive cultures were inoculated in MacConkey agar (Fluka®, Switzerland) and incubated at 37°C for 24 h to isolate pure colonies. After purification, all isolated strains of *P. aeruginosa* were firstly identified by conventional microbiological methods, while the final identification confirmation was carried out by API 20NE gallery “BioMérieux France”. Identified strains were conserved in brain heart infusion broth (Conda Pronadisa™, Spain) with glycerol (Fluka®, France) (8:2, v/v) at –20°C.

**Antibiogram** – An Antibiogram according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines was performed in order to select multiresistant strains from the clinical collection obtained from the University Hospital Center of Tlemcen, Algeria. The tested antibiotics were those among the most used to treat infections caused by *P. aeruginosa* strains that are: imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ticarcillin + clavulanic (75/10 µg), cefepime (30 µg) tobramycin (10 µg), netilmicin (30 µg) and ofloxacin (5 µg) (Biorad®, USA). The results were interpreted according to EUCAST guidelines.<sup>32</sup>

**Aromatogram assay** – The EOs antibacterial activity was evaluated by the agar disk diffusion method. After strains inoculation and incubation for 24 hours in Müller-Hinton broth at 37°C (Fluka Bio Chemika, Spain), the inocula are standardized to 0.5 McFarland for an optical density of 0.08 to 0.13 at a wavelength of 625 nm, which corresponds to 10<sup>8</sup> CFU/mL<sup>33</sup> and are then inoculated on Müller-Hinton agar (Fluka BioChemika, Spain) by swabbing techniques. A sterile Whatman N° 03 paper disc 6 mm in diameter impregnated with 10 µL of pure EO was placed on the surface of the agar.

**Minimum inhibitory concentration determination** – The minimum inhibitory concentrations (MICs) of EOs

were determined by the modified broth micro-dilution method by Wiegand et al<sup>34</sup> and resazurin was used as a viability indicator.

**Resazurin preparation** – The resazurin preparation was carried out by dissolving an amount of 270 mg in 40 mL of sterile distilled water, and then the solution was mixed well using a vortex to ensure that the solution was homogeneous. Finally, the product was stored at 4°C.<sup>35</sup>

**Preparation of stock solution and concentrations** – The stock solution was prepared with a 40% v/v concentration of EOs. The different concentrations of EOs were prepared by successive dilutions on the order of 1/2 in Müller-Hinton broth (Fluka BioChemika, Spain) by adding Tween 80 at a concentration of 1% (v/v) in order to have total miscibility of EO in the broth. A second solution was prepared with Müller-Hinton broth and Tween 80 to a concentration of 1%. This solution was used to complete the successive dilutions of the first solution which contains the EO and so that the concentration of Tween 80 remains the same at 1% in the different concentrations prepared. The inocula at 10<sup>8</sup> CFU/mL were diluted to 1/1000 to obtain the concentration of 10<sup>5</sup> CFU/mL.

In the microplate, 160 µL of the bacterial suspension at 10<sup>5</sup> CFU/mL were placed inside the wells. Then 20 µL of resazurin and 20 µL of the EO solution were added. The final concentration of Tween 80 is 0.1% (v/v) in each well, and the final EO concentrations are 4% up to 0.0078%.

**Statistical Analyses** – Data are reported as mean ± SD of three measurements. The scientific statistic software SPSS V.26 was used for statistical analysis. The diameter of inhibitory zones and MICs results were grouped according to EOs types and checked for normality by Shapiro–Wilk test. Comparisons between groups were done using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used for multiple comparisons tests between EOs. P < 0.05 was regarded as significant.

## Results and Discussion

The chemical composition of the studied EOs determined by GC and GC/MS is shown in Table 1 and Fig. 1. A total of 54 components were identified with a percentage ranging between 92 and 96% of all components. Eight compounds were identified in all studied EOs with different amounts which are;  $\alpha$ -thujene,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -terpinene, *p*-cymene,  $\gamma$ -terpinene, linalool and carvacrol. The studied plants' EOs presented a good chemical variability. *A. verticillata*, *T. capitata*, and *T. lanceolatus*

**Table 1.** Chemical composition of the studied EOs.

Results are in percentage (%) of components for EOs of (1) *A. verticillata*, (2) *O. glandulosum*, (3) *T. capitata*, (4) *C. munbyi*, (5) *T. lanceolatus*, and percentages and elution order of individual components are given on the nonpolar column. Retention indices nRI and pRI are given respectively on nonpolar (Rtx-1) and polar (Rtx-Wax) columns. ID: identification method by comparison of (RI) retention indices and (MS) mass spectra.

#	Component	nRI	pRI	1	2	3	4	5	ID
1	$\alpha$ -Thujene	922	1023	0.25	0.98	2.07	4.83	0.64	RI, MS
2	$\alpha$ -Pinene	931	1022	0.89	0.72	1.07	1.97	1.03	RI, MS
3	Camphene	943	1066	-	0.23	0.48	2.60	-	RI, MS
4	1-Octen-3-ol	959	1446	-	0.11	0.99	-	-	RI, MS
5	Octan-3-one	963	1253	-	0.15	-	-	-	RI, MS
6	Sabinene	964	1120	-	-	-	<b>13.01</b>	-	RI, MS
7	$\beta$ -Pinene	970	1110	0.13	0.13	0.54	0.70	1.37	RI, MS
8	Myrcene	979	1159	0.45	1.45	2.39	-	-	RI, MS
9	Dehydro-1.8-cineole	979	1197	-	-	-	0.35	-	RI, MS
10	$\alpha$ -Phellandrene	997	1164	-	0.20	0.55	-	-	RI, MS
11	$\delta$ -3-Carene	1005	1147	-	0.10	-	-	-	RI, MS
12	$\alpha$ -Terpinene	1008	1178	0.12	2.98	1.53	0.21	0.84	RI, MS
13	<i>m</i> -Cymene	1010	1269	-	-	-	<b>15.86</b>	-	RI, MS
14	<i>p</i> -Cymene	1011	1268	14.23	15.47	<b>8.58</b>	0.53	<b>7.56</b>	RI, MS
15	Limonene	1020	1199	14.11	0.61	-	0.15	0.51	RI, MS
16	1,8-Cineole	1020	1209	-	-	-	1.02	-	RI, MS
17	<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimene	1024	1230	-	0.10	-	-	-	RI, MS
18	<i>trans</i> - $\beta$ -Ocimene	1034	1247	-	0.10	-	-	-	RI, MS
19	$\gamma$ -Terpinene	1047	1243	6.50	<b>25.33</b>	5.67	1.42	5.16	RI, MS
20	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	1051	1451	-	0.19	1.80	5.36	-	RI, MS
21	Terpinolene	1078	1280	0.15	0.15	-	0.98	-	RI, MS
22	Linalool	1081	1544	0.10	0.47	0.57	0.23	1.08	RI, MS
23	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	1083	1345	-	-	-	3.07	-	RI, MS
24	$\beta$ -Thujone	1103	1422	-	-	-	0.56	-	RI, MS
25	Camphor	1123	1517	-	-	-	1.81	-	RI, MS
26	<i>cis</i> -Verbenol	1127	1655	-	-	-	1.62	-	RI, MS
27	<i>trans</i> -Verbenol	1129	1676	-	-	-	0.40	-	RI, MS
28	Borneol	1148	1698	-	0.18	1.07	0.96	-	RI, MS
29	Terpinen-4-ol	1161	1600	0.15	0.17	5.16	<b>25.23</b>	-	RI, MS
30	Myrtenol	1177	1789	-	-	-	0.17	-	RI, MS
31	$\alpha$ -Terpineol	1179	1700	0.12	0.27	-	1.24	-	RI, MS
32	( <i>E</i> )-Piperitol	1182	1457	-	-	-	0.11	-	RI, MS
33	$\gamma$ -Terpineol	1183	1702	-	-	-	0.35	-	RI, MS
34	( <i>Z</i> )-Carveol	1192	1832	-	-	-	0.43	-	RI, MS
35	Nerol	1208	1793	-	-	-	-	0.24	RI, MS
36	Thymyl-methyl-oxyde	1215	1586	-	-	-	-	0.40	RI, MS
37	Cuminaldehyde	1217	1782	-	-	-	0.64	-	RI, MS
38	Linalyl acetate	1240	1557	-	-	-	0.61	-	RI, MS
39	Lyratyl acetate	1256	1630	-	-	-	0.27	-	RI, MS
40	<i>p</i> -Cymen-7-ol	1266	1690	-	-	-	1.83	-	RI, MS
41	Thymol	1266	2189	<b>49.55</b>	<b>41.12</b>	-	-	<b>72.98</b>	RI, MS
42	Bornyl acetate	1269	1515	-	-	-	0.12	-	RI, MS
43	<i>iso</i> -Bornyl acetate	1272	1581	-	-	-	0.23	-	RI, MS
44	Carvacrol	1278	2219	8.12	2.48	<b>58.68</b>	0.18	3.69	RI, MS

Table 1. continued

#	Component	nRI	pRI	1	2	3	4	5	ID
45	Terpinen-4-ol acetate	1282	2250	-	-	-	0.26	-	RI, MS
46	Perillyl alcohol	1284	2005	-	-	-	0.44	-	RI, MS
47	$\alpha$ -Terpinyl acetate	1334	1695	-	-	-	2.18	-	RI, MS
48	$\gamma$ -Caryophyllene	1407	1571	-	-	1.70	-	-	RI, MS
49	$\beta$ -Caryophyllene	1424	1591	-	0.69	-	-	0.34	RI, MS
50	$\beta$ -Bisabolene	1500	1720	-	0.20	-	-	-	RI, MS
51	<i>cis</i> -Calamenene	1512	1816	-	-	-	0.58	-	RI, MS
52	$\beta$ -Sesquiphellandrene	1516	1765	-	0.63	-	-	-	RI, MS
53	Caryophyllene oxide	1576	1980	-	-	-	2.07	0.23	RI, MS
54	Viridiflorol	1591	2089	-	-	-	0.13	-	RI, MS
	Yield (%)			1.8	4.1	1.8	0.8	0.9	
	Total identified			14	26	16	41	14	
	Total identified (%)			94.37	95.21	92.85	94.71	96.07	
	Monoterpene hydrocarbons			36.83	<b>48.55</b>	22.88	<b>50.69</b>	16.66	
	Oxygenated monoterpenes			<b>57.54</b>	45.14	<b>68.27</b>	40.60	<b>78.39</b>	
	Phenylpropanoids			-	-	-	0.64	-	
	Sesquiterpene hydrocarbons			-	1.52	1.70	0.58	0.34	
	Oxygenated sesquiterpenes			-	-	-	2.20	0.23	
	Other components			-	-	-	-	-	

showed richness in oxygenated monoterpenes, in particular alcohols, such as thymol, carvacrol and linalool. Whereas, *O. glandulosum* and *C. munbyi* are constituted principally by hydrocarbons monoterpenes.

Thymol was the major compound in EOs of *A. verticillata*, *O. glandulosum* and *T. lanceolatus* (49.55, 41.12, 72.98%, respectively). The high amount of thymol in *T. lanceolatus* EOs is explained by the fact the species belonging to the genus *Thymus* are known by their richness in this molecule. Even the name of thymol is coming from *Thymus*.<sup>36</sup>

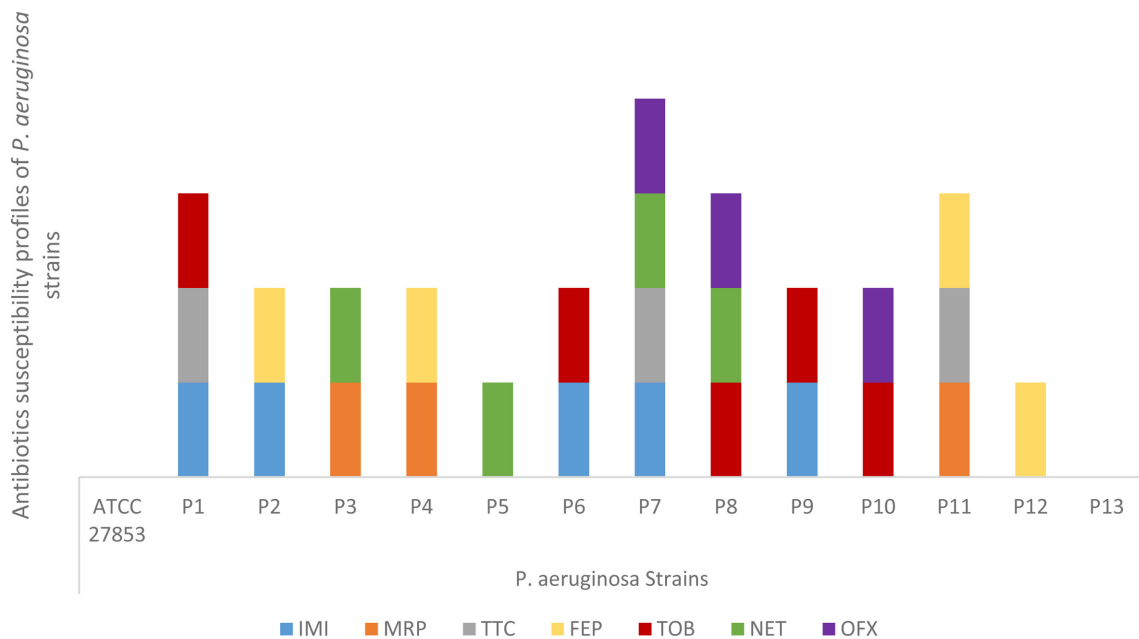
Carvacrol was the main molecule in *T. capitata* EO (58.68%). In general, *Thymbra* species EOs are rich in carvacrol.<sup>37</sup> However, some authors found thymol chemotype in *T. capitata* EO such as Goudjil et al.<sup>38</sup> The chemical composition of *C. munbyi* EO showed three substances identified in large amount that are terpinen-4-ol (25.23%), *m*-cymene (15.86%), and sabinene (13.01%). The most studies carried out on *Cistus* genus EOs reveals the presence of terpinen-4-ol either in high amounts such as *C. libanotis* (18–22%)<sup>39</sup> or in low amounts as *C. ladanifer* (4%).<sup>40</sup>

In the present study, the antibiotics susceptibility of fourteen strains of *P. aeruginosa* were assessed against; imipenem, meropenem, Ticracillin + clavulanic, cefepime, tobramycin, netilmicin and ofloxacin. The results of the antibiotic resistance profiles are summarized in Fig. 2. Of

thirteen clinical strains, twelve were resistant to at least one antibiotic and only one clinical strain is completely sensitive. The reference strain ATCC 27853 was also sensitive to all the antibiotics tested. One strain was the most resistant (P7), as this one is resistant to four antibiotics among the seven tested. Meropenem, Ticracillin + clavulanic and ofloxacin were the most active antibiotics since only three strains were insensitive to these antibiotics, while imipenem and tobramycin were the less active antibiotics as five strains among fourteen were resistant to them. Eight clinical strains were resistant to antibiotics belonging to the carbapenem family, including five strains resistant to imipenem and three strains resistant to meropenem, knowing that the carbapenem family is considered to be the last resort drugs against these pathogens.<sup>41</sup>

The *in vitro* inhibition effect of studied EOs with inhibition zones and MICs against *P. aeruginosa* strains (Table 2) showed a significant difference between the tested EOs ( $p < 0.05$ ).

*C. munbyi* is one of endemic plants of Algeria.<sup>28</sup> In this research, the antibacterial activity of *C. munbyi* EO against clinical and resistant strains of *P. aeruginosa* was evaluated. Interestingly, the obtained results showed that *C. munbyi* EO exhibited the strongest activity among the tested EOs on *P. aeruginosa* strains with an average zone of inhibition of 14.5 mm and MICs of 0.27% against all the studied strains (Table 2). This effect is mainly due to



**Fig. 2.** Antibiotics susceptibility profiles of *P. aeruginosa* strains. Imipenem.(IMI); Meropenem (MRP); Ticracillin + clavulanic; (TTC) Cefepime (FEP); Tobramycin (TOB); and Netmycin (NET), Ofloxacin (OFX).

**Table 2.** Inhibition effect of studied EOs against strains. Expressed by the diameter inhibition zones (IZ in mm ± SD) and Minimum inhibitory concentrations (MICs in % v/v).

Strains	plants essential oils <sup>a</sup>									
	1*		2*		3		4		5	
	IZ <sup>b</sup>	MIC <sup>c</sup> %	IZ <sup>b</sup>	MIC <sup>c</sup> %	IZ <sup>b</sup>	MIC <sup>c</sup> %	IZ <sup>b</sup>	MIC <sup>c</sup> %	IZ <sup>b</sup>	MIC <sup>c</sup> %
ATCC 27853	17.6 ± 2.5	0.5	14.3 ± 1.15	0.5	8.3 ± 0.5	2	20.0 ± 2.0	0.25	18.6 ± 1.5	0.125
P1	10.6 ± 0.5	1	9.3 ± 0.5	2	8.3 ± 0.5	1	14.6 ± 0.5	1	12.0 ± 1.0	0.5
P2	10.3 ± 1.1	1	9.0 ± 0.0	0.25	7.6 ± 0.5	1	13.6 ± 0.5	0.25	8.6 ± 0.5	0.5
P3	7.6 ± 1.1	1	9.3 ± 0.5	0.25	8.3 ± 0.5	0.5	14.3 ± 0.5	0.125	12.3 ± 0.5	0.25
P4	14.0 ± 1.7	0.5	9.6 ± 0.5	0.5	9.0 ± 0.0	1	14.6 ± 0.5	0.25	12.6 ± 0.5	0.25
P5	12.6 ± 0.5	4	9.3 ± 0.5	0.25	8.3 ± 0.5	0.5	14.3 ± 0.5	0.125	11.0 ± 0.0	0.5
P6	9.0 ± 1.0	4	10.0 ± 0.0	0.5	7.6 ± 0.5	1	10.6 ± 1.1	0.25	14.6 ± 0.5	0.25
P7	10.6 ± 0.5	1	9.6 ± 0.5	0.5	8.0 ± 1.0	0.5	15.0 ± 1.0	0.125	14.3 ± 1.1	0.25
P8	9.3 ± 0.5	1	8.3 ± 0.5	0.5	8.6 ± 0.5	1	13.0 ± 1.0	0.25	12.0 ± 0.0	0.5
P9	10.6 ± 0.5	4	9.6 ± 0.5	1	8.3 ± 0.5	2	20.6 ± 1.1	0.125	12.3 ± 0.5	0.25
P10	9.3 ± 0.5	2	9.3 ± 0.5	0.5	8.0 ± 0.0	0.5	10.3 ± 0.5	0.25	9.0 ± 0.5	0.5
P11	10.6 ± 1.5	1	9.0 ± 0.0	0.5	7.3 ± 0.5	0.5	15.0 ± 0.0	0.25	9.6 ± 0.5	0.5
P12	8.3 ± 0.5	2	9.6 ± 0.5	0.25	8.0 ± 1.0	1	14.6 ± 0.5	0.125	12.0 ± 0.0	0.5
P13	8.0 ± 0.0	4	9.0 ± 0.0	1	8.0 ± 1.0	1	12.6 ± 1.1	0.5	12.3 ± 0.5	0.5
Mean for all strains	10.6	1.92	9.6	0.60	8.1	0.96	14.5	0.27	12.2	0.38

<sup>a</sup> (1) *A. verticillata*, (2) *O. glandulosum*, (3) *T. capitata*, (4) *C. munbyi*, (5) *T. lanceolatus*.

<sup>b</sup> diameter inhibition zones. <sup>c</sup> Minimum inhibitory concentrations

Plants with Asterisk (\*) mean that they have statistically the same effect obtained by the diameter inhibition zones (Mann-Whitney test; P > 0.05).

terpinene-4-ol which is the major compound with a percentage >24%. This compound is a known molecule

that possesses a remarkable inhibitory effect against *P. aeruginosa*. Papadopoulos et al<sup>42</sup> have tested terpinen-4-

ol,  $\alpha$ -terpineol, cineole,  $\gamma$ -terpinene, and *p*-cymene against thirty strains of *P. aeruginosa*, in which they found terpinen-4-ol was the most active molecule. However, there are no studies that explain the mechanism of action of terpinen-4-ol against strains of *P. aeruginosa*. The only study that investigated the mechanism of action of terpinen-4-ol against bacterial strains was carried out on *Streptococcus agalactiae*, in which the authors reported that terpinen-4-ol kills this bacterium by damaging the membrane and the wall at the same time.<sup>43</sup> But these findings cannot explain sufficiently the antibacterial potency of this molecule on *P. aeruginosa* cells, given that the cellular structure difference of *S. agalactiae* from that of *P. aeruginosa* which contains an extra outer membrane, hence the need for further research to explain the mechanism of action of this molecule on *P. aeruginosa* cells.

On the other hand, chemical analysis of *C. munbyi* EO showed as well the presence of sabinene among the major constituents of the EO (13.01%); this molecule is also endowed with antimicrobial activity in particular against Gram-negative bacteria.<sup>44</sup> While for *m*-cymene (15.86%), there are no studies that have evaluated its antimicrobial potential.

*T. lanceolatus* is also an endemic plant of Algeria.<sup>45</sup> The EO of this plant exhibits a good antibacterial activity against *P. aeruginosa* strains with a mean inhibition range for all strains of 12.2 mm and MICs of 1% (Table 2). This activity is mainly due to the presence of a large amount of thymol (72.98%), but also to the presence of *p*-cymene (7.56%) that is known by antimicrobial properties.<sup>46</sup> In addition to that, antimicrobial activity of EOs may be due to the synergistic effect among their constituents. In fact, several studies revealed that some EOs are more active than their main compound.<sup>47</sup> It has previously been shown by Delgado et al.<sup>48</sup> that the combination between thymol and *p*-cymene increases significantly the antimicrobial effect against *Bacillus cereus* strains. This may explain that this EO is more active than *O. glandulosum* and *A. verticillata* EOs despite the fact that they have the same majority compound.

*O. glandulosum* and *A. verticillata* are spontaneous-growth medicinal plants in North Africa (Algeria and Tunisia) and Mediterranean Europe.<sup>27,49</sup> EOs of these plants contain thymol as the main component and presented the same medium effect against *P. aeruginosa* strains in the disk diffusion method ( $p > 0.05$ ) (average inhibition zones are 9.6 and 10.6 mm respectively). However, MICs were lower for *O. glandulosum* than for *A. verticillata* (0.6 and 1.9 % respectively). These results

can be explained by the fact that certain EOs have viscosities that affect their diffusion on the agar during the disk diffusion method. Therefore, they present low MICs compared with the inhibition diameters.<sup>50</sup> For this purpose, *O. glandulosum* EO can be considered to be more active against *P. aeruginosa* strains than *A. verticillata* EO, since research has shown that MIC testing is the most accurate method for assessing antimicrobial activity.<sup>51,52</sup>

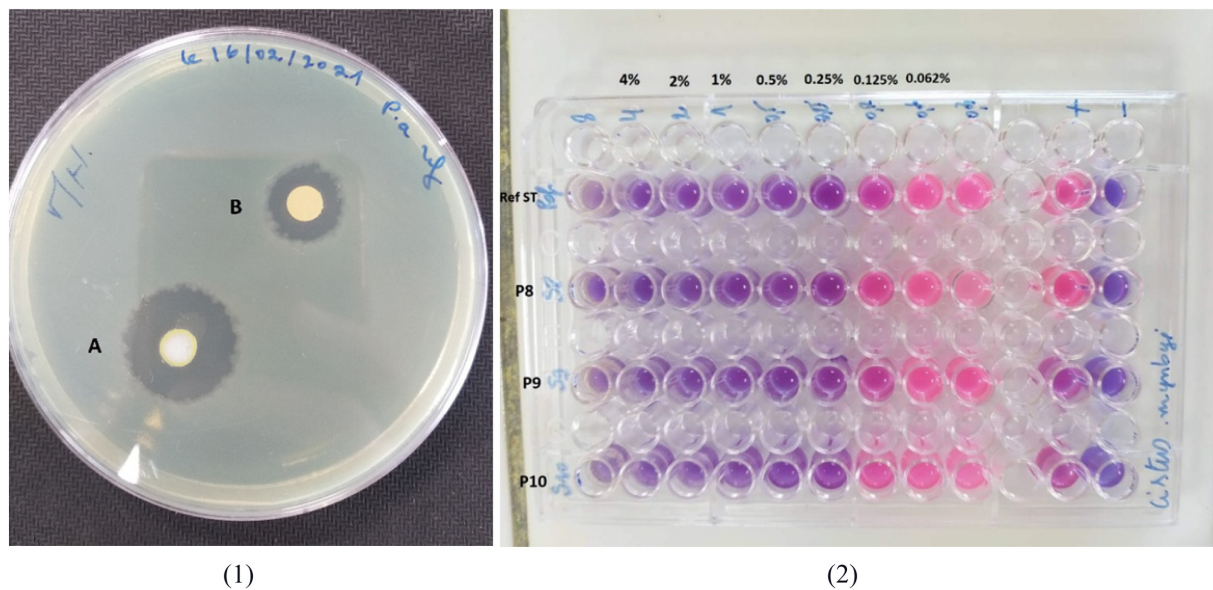
*T. capitata* is a species from the Mediterranean Basin. The EO extracted from this plant presented the lowest effect against *P. aeruginosa* strains (average inhibition zones; 8.1 mm and MICs average; 0.96%) (Table 2) which is the greatest MIC after that of *A. verticillata*. Our findings are slightly lower than those obtained by Tammar et al.<sup>53</sup> who found inhibition diameters around 11 mm when they tested the EO of this plant against *P. aeruginosa* ATCC 27853, and which can be considered as mildly active. Indeed, carvacrol has a low activity against gram-negative bacteria, especially *P. aeruginosa*. This resistance to carvacrol is generated by the MexAB-OprM Efflux Pump that confers insensitivity of *P. aeruginosa* to this molecule.<sup>54</sup>

The reference strain ATCC 27853 was more sensitive to most EOs than the clinical strains with large inhibition zones  $> 20$  mm (Fig. 3) and MICs: 0.125% for *C. munbyi*. Sakkas et al.<sup>55</sup> observed a significant difference in sensitivity to EOs between the reference strains and the clinical ones, in which they concluded that it is absolutely important to test EOs on antibiotic-resistant clinical strains.

In the last years, *P. aeruginosa* strains resistant to carbapenem are dramatically limiting treatment options that pose a real threat to public health.<sup>56</sup> EOs can be used to fight against resistant bacteria and will be a good alternative to antibiotics thanks to their antimicrobial potencies,<sup>57</sup> particularly for external uses such as skin infections,<sup>58</sup> especially caused by *P. aeruginosa*.<sup>59</sup> However, the EOs active on *P. aeruginosa* are extremely rare because the outer membrane and the active efflux system of that bacterium prevent their antibacterial effect.<sup>60</sup> For that reason, we are interested in this research to highlight EOs that are active on *P. aeruginosa* clinical strains by assessing the sensitivity of fourteen strains to five EOs from medicinal plants that grow naturally in Algeria.

Our results indicate that the EOs of five Algerian plants studied in this approach have presented an antibacterial activity against multidrug-resistant *P. aeruginosa* strains. There are two plants that have the highest activity against antibiotic-resistant *P. aeruginosa* strains which are *C. munbyi* and *T. lanceolatus*. Whereas, *O. glandulosum* and *A. verticillata* showed a medium activity. Nevertheless, *T.*





**Fig. 3.** (1); zones of inhibition obtained by the aromagram method for the EOs extracted from plants; **A:** *C. munbyi*. **B:** *T. lanceolatus* on the strain ATCC 27853. (2); Minimum inhibitory concentrations (MIC in % v/v) obtained by *C. munbyi* EO on strains; P8, P9, P10 and ATCC 27853.

*capitata* was the less active.

The obtained results may open interesting perspectives, for example; other plants coming from other regions of Algeria should also be tested to select other active EOs on *P. aeruginosa*. Moreover, other studies are needed in order to explain the mechanism of action of terpinen-4-ol which is the main compound of *C. munbyi* on *P. aeruginosa* strains, since no study has been done in this context. Furthermore, it seems interesting to test a combination between thymol and p-cymene on *P. aeruginosa* since these are the main compounds of *T. lanceolatus* which also gave good results.

Our findings have an important medical interest knowing that among the tested strains there are eight ones that are resistant to carbapenems and other antibiotics. Therefore, *C. munbyi* and *T. lanceolatus* EOs may be recommended for more research on the development of pharmaceutical products as an alternative to antibiotics and to struggle against infections caused by this pathogen.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the General Directorate for Scientific Research and Technological Development, Algeria. This study is among the university research projects funded by the General Directorate for Scientific Research and Technological Development under grant Number (PRFU-D01N01UN130120180002).

### Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### References

- (1) Crone, S.; Vives-Flórez, M.; Kvich, L.; Saunders, A. M.; Malone, M.; Nicolaisen, M. H.; Martínez-García, E.; Rojas-Acosta, C.; Catalina Gomez-Puerto, M.; Calum, H.; Whiteley, M.; Kolter, R.; Bjarnsholt, T. *APMIS* **2020**, *128*, 220–231.
- (2) Rossi, E.; La Rosa, R.; Bartell, J. A.; Marvig, R. L.; Haagenen, J. A.; Sommer, L. M.; Molin, S.; Johansen, H. K. *Nat. Rev. Microbiol.* **2021**, *19*, 331–342.
- (3) Driscoll, J. A.; Brody, S. L.; Kollef, M. H. *Drugs* **2007**, *67*, 351–368.
- (4) Almagro, P.; Salvadó, M.; Garcia-Vidal, C.; Rodríguez-Carballeira, M.; Cuchi, E.; Torres, J.; Heredia, J. L. *Respiration* **2012**, *84*, 36–43.
- (5) Newman, J. W.; Floyd, R. V.; Fothergill, J. L. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364*, fnx124.
- (6) Riou, M.; Carbonnelle, S.; Avrain, L.; Mesaros, N.; Pirnay, J. P.; Bilocq, F.; De Vos, D.; Simon, A.; Piérard, D.; Jacobs, F.; Dediste, A.; Tulkens, P. M.; Van Bambeke, F.; Glupczynski, Y. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2010**, *36*, 513–522.
- (7) Pang, Z.; Raudonis, R.; Glick, B. R.; Lin, T. J.; Cheng, Z. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 177–192.
- (8) de Oliveira Barsottini, M. R.; Rocha, R. R.; Laurindo, M. V.; de Moraes, F. L. L.; da Rocha, S. L. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2019**, *62*, e19180503
- (9) Fournier, C.; Poirel, L.; Nordmann, P. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2020**, *98*, 115121.
- (10) Guo, Y.; Wang, J.; Niu, G.; Shui, W.; Sun, Y.; Zhou, H.; Zhang, Y.; Yang, C.; Lou, Z.; Rao, Z. *Protein Cell.* **2011**, *2*, 384–394.



- (11) Botelho, J.; Grosso, F.; Peixe, L. *Drug Resist. Updat.* **2019**, *44*, 100640.
- (12) Mah, T. F.; Pitts, B.; Pellock, B.; Walker, G. C.; Stewart, P. S.; O'Toole, G. A. *Nature* **2003**, *426*, 306–310.
- (13) Coates, A. R. M.; Hu, Y. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 1147–1154.
- (14) Rios, J. L.; Recio, M. C. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 80–84.
- (15) Dass, S.; Mathur, M. Herbal drugs: Ethnomedicine to modern medicine; Ramawat, K. Ed; Springer Berlin; India, **2009**, pp 7–32.
- (16) Lewis, K.; Ausubel, F. M. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1504–1507.
- (17) Abreu, A. C.; McBain, A. J.; Simoes, M. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1007–1021.
- (18) Saleem, M.; Nazir, M.; Ali, M. S.; Hussain, H.; Lee, Y. S.; Riaz, N.; Jabbar, A. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 238–254.
- (19) Liu, R.; Li, X.; Lam, K. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *38*, 117–126.
- (20) Kalemba, D.; Kunicka, A. *Curr. Med. Chem.* **2003**, *10*, 813–829.
- (21) Warnke, P. H.; Becker, S. T.; Podschun, R.; Sivananthan, S.; Springer, I. N.; Russo, P. A.; Wiltfang, J.; Fickenscher, H.; Sherry, E. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **2009**, *37*, 392–397.
- (22) Shaaban, H. A. In Essential Oils-Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications: Essential Oil as Antimicrobial Agents: Efficacy, Stability, and Safety Issues for Food Application; de Oliveira, M. S.; da Costa, W. A.; Silva, S. G. Ed; Intechopen; United Kingdom, **2020**, pp 1–33.
- (23) Cox, S. D.; Markham, J. *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *103*, 930–936.
- (24) Elumalai, S.; Kesavan, R.; Ramganes, S.; Prakasam, V.; Murugasen, R. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia* **2010**, *7*, 251–258.
- (25) Faujdar, S. S.; Bisht, D.; Sharma, A. *J. Family Med. Prim. Care.* **2020**, *9*, 180–186.
- (26) Bekhechi, C.; Bekkara, F. A.; Abdelouahid, D. E.; Tomi, F.; Casanova, J. *J. Essent. Oil Res.* **2007**, *19*, 594–596.
- (27) Bendahou, M.; Muselli, A.; Grignon-Dubois, M.; Benyoucef, M.; Desjobert, J. M.; Bernardini, A. F.; Costa, J. *Food Chem.* **2008**, *106*, 132–139.
- (28) Quézel, P.; Santa, S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales: Centre National de la Recherche Scientifique: Paris, **1962**, pp 781–819.
- (29) European-Pharmacopoeia. 5th edn (5.0). Council of Europe, France, **2005**, pp 217–218.
- (30) Kovats, E. S. *Adv. Chromatogr.* **1965**, *1*, 229–247.
- (31) Adams, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry; Allured publishing corporation: USA, **2007**, pp 1–804.
- (32) EUCAST. CASFM / EUCAST V1.2 Octobre 2020; Central Hospital Växjö: Sweden, **2020**.
- (33) Larif, M.; Ouhssine, M.; Soulaymani, A.; Elmidaoui, A. *Res. Chem. Intermed.* **2015**, *41*, 1213–1225.
- (34) Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 163–175.
- (35) Sarker, S. D.; Nahar, L.; Kumarasamy, Y. *Methods.* **2007**, *42*, 321–324.
- (36) Nabavi, S. M.; Marchese, A.; Izadi, M.; Curti, V.; Daglia, M.; Nabavi, S. F. *Food chem.* **2015**, *173*, 339–347.
- (37) Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1465–1476.
- (38) Goudjil, M. B.; Zighmi, S.; Hamada, D.; Mahcene, Z.; Bencheikh, S. E.; Ladjel, S. S. *Afr. J. Bot.* **2020**, *128*, 274–282.
- (39) Zidane, H.; Fauconnier, M. L.; Sindic, M.; El Bachiri, A. *J. Chem. Pharm. Res.* **2014**, *6*, 281–287.
- (40) El Karkouri, J.; Bouhrim, M.; Al Kamaly, O. M.; Mechchate, H.; Kchibale, A.; Adadi, I.; Amine, S.; Alaoui Ismaili, S.; Zair, T. *Plants* **2021**, *10*, 2068.
- (41) Ventola, C. L. *Pharm. Ther.* **2015**, *40*, 277–283.
- (42) Papadopoulos, C. J.; Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 449–451.
- (43) Zhang, Y.; Feng, R.; Li, L.; Zhou, X.; Li, Z.; Jia, R.; Song, X.; Zou, Y.; Yin, L.; He, C.; Liang, X.; Zhou, W.; Wei, Q.; Du, Y.; Yan, K.; Wu, Z.; Yin, Z. *Curr. Microbiol.* **2018**, *75*, 1214–1220.
- (44) Kazemi, M. *Int. J. Food Prop.* **2015**, *18*, 1784–1792.
- (45) Nouasri, A.; Dob, T.; Toumi, M.; Dahmane, D.; Krimat, S.; Lamari, L.; Chelgoume, C. *J. Essent. Oil Bear. PL.* **2015**, *18*, 1246–1252.
- (46) Mevy, J. P.; Bessiere, J. M.; Dherbomez, M.; Millogo, J.; Viano, J. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 682–685.
- (47) Veras, H. N.; Rodrigues, F. F.; Colares, A. V.; Menezes, I. R.; Coutinho, H. D.; Botelho, M. A.; Costa, J. G. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 508–512.
- (48) Delgado, B.; Palop, A.; Fernández, P. S.; Periago, P. M. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *218*, 188–193.
- (49) Bekhechi, C.; Boti, J. B.; Bekkara, F. A.; Abdelouahid, D. E.; Casanova, J.; Tomi, F. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1107–1110.
- (50) Hood, J. R.; Wilkinson, J. M.; Cavanagh, H. M. A. *J. Essent. Oil Res.* **2003**, *15*, 428–433.
- (51) Hernández, T.; Canales, M.; Avila, J. G.; García, A. M.; Martínez, A.; Caballero, J.; De Vivar, A. R.; Lira, R. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *96*, 551–554.
- (52) Lopez, P.; Sanchez, C.; Batlle, R.; Nerin, C. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6939–6946.
- (53) Tammar, S.; Salem, N.; Bettaiieb Rebey, I.; Sriti, J.; Hammami, M.; Khammassi, S.; Marzouk, B.; Ksouri, R.; Msaada, K. *J. Essent. Oil Res.* **2019**, *31*, 129–137.
- (54) Pesingi, P. V.; Singh, B. R.; Pesingi, P. K.; Bhardwaj, M.; Singh, S. V.; Kumawat, M.; Sinha, D. K.; Gandham, R. K. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2664.
- (55) Sakkas, H.; Gousia, P.; Economou, V.; Sakkas, V.; Petsios, S.; Papadopoulou, C. *J. Intercult. Ethnopharmacol* **2016**, *5*, 212–218.
- (56) Meletis, G. *Ther. Adv. Infect. Dis.* **2016**, *3*, 15–21.
- (57) Solórzano-Santos, F.; Miranda-Novales, M. G. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 136–141.
- (58) Orchard, A.; van Vuuren, S. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2017**, *2017*, 4517971.
- (59) Wu, D. C.; Chan, W. W.; Metelitsa, A. I.; Fiorillo, L.; Lin, A. N. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2011**, *12*, 157–169.
- (60) Longbottom, C. J.; Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Mee, B. J.; Riley, T. V. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 386–392.

Received April 26, 2023

Revised October 17, 2023

Accepted October 17, 2023

# Biofilm Disruption and Virulence Attenuation Effects of Essential Oil From Endemic Algerian *Cistus munbyi* (Cistaceae) Against Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa*

Natural Product Communications  
Volume 19(4): 1–20  
© The Author(s) 2024  
Article reuse guidelines:  
sagepub.com/journals-permissions  
DOI: 10.1177/1934578X241245234  
journals.sagepub.com/home/npx



Asma Benaissa<sup>1</sup> , Abdelmounaim Khadir<sup>1,2</sup> , Alfred Ngenge Tamfu<sup>3,4,5</sup> , Selcuk Kucukaydin<sup>5</sup>, Nawel Latti<sup>1</sup>, Fethi Benbelaid<sup>1,6</sup> , Sameh Boudiba<sup>7</sup> , Busra Eroglu<sup>8</sup>, Mourad Bendahou<sup>1</sup> and Ozgur Ceylan<sup>4</sup>

## Abstract

**Background:** *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic, resistant and highly pathogenic bacteria, responsible for severe nosocomial infections in humans. There is need to search new antimicrobials to target *P. aeruginosa* strains. *Cistus munbyi* is used in traditional medicine to manage infections. **Objectives:** This work aims to investigate the antimicrobial, antibiofilm and other antivirulence effects of essential oil from *C. munbyi* against *P. aeruginosa*. **Materials and methods:** Essential oil (EO) was prepared by hydro-distillation from *C. munbyi*, characterized by GC–MS and evaluated for its antimicrobial, antibiofilm and anti-virulence effects against clinical isolates of *P. aeruginosa*. **Results:** 100% of compounds were identified with Terpinen-4-ol (33.20%), Sabinene (13.20%),  $\alpha$ -Thujene (11.30%), and p-Cymene (9.94%) being the major constituents. The EO had good antimicrobial activity determined by diameters of inhibition zones and broth dilution. At minimal inhibitory concentration (MIC), the EO eliminated more than 70% of young biofilms in 19 strains out of 24 tested strains while at 2MIC, only one strain had biofilm inhibition below 70%. The EO eliminated more than 50% of mature biofilms in 13 strains out of 24 tested. Biofilm disruption was concentration-dependent at sub-MIC and indicated good potential of *C. munbyi* EO as *P. aeruginosa* antibiofilm agent. Scanning electron microscopy (SEM) images revealed that untreated colonies had a well-developed biofilm while there was significant reduction of biofilms with distorted architecture and cell shrinkage upon treatment with EO. The *C. munbyi* EO at MIC and sub-MIC was able to reduce quorum-sensing (QS) virulence factors such as pyocyanin production, exopolysaccharides matrix and elastase secretion. Significant QS revealed by reduction of violacein in *C. violaceum* (CV12472 and CV026) was observed. **Conclusion:** The overall results show good anti-pseudomonal effects of *C. munbyi* EO which makes it a potential agent to reduce the spread of infections and resistance to antibiotics from *P. aeruginosa* strains.

## Keywords

*Cistus munbyi* essential oil, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiofilm activity, virulence attenuation, anti-quorum sensing

Received: December 1st, 2023; Accepted: March 18th, 2024.

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical, and Environment (LAMAABE), Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature, Life, Earth, and Universe, Abou Bekr Belkaïd University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria

<sup>2</sup>Department of Biology, Oran University, Oran, Algeria

<sup>3</sup>Department of Chemical Engineering, School of Chemical Engineering and Mineral Industries, University of Ngaoundere, Ngaoundere, Cameroon

<sup>4</sup>Food Quality Control and Analysis Program, Ula Ali Kocman Vocational School, Mugla Sitki Kocman University, Mugla, Turkey

<sup>5</sup>Department of Medical Services and Techniques, Koycegiz Vocational School of Health Services, Mugla Sitki Kocman University, Mugla, Turkey

<sup>6</sup>Department of Biology, Faculty of Exact Sciences and Natural Life Sciences, Mohamed Khider University, Biskra, Algeria

<sup>7</sup>Laboratory of Applied Chemistry and Renewable Energies (LACRE), Echahid Cheikh Larbi Tebessi University, Tebessa, Algeria

<sup>8</sup>Department of Chemistry, Faculty of Science, Mugla Sitki Kocman University, Mugla, Turkey

## Corresponding Authors:

Alfred Ngenge Tamfu, Department of Chemical Engineering, School of Chemical Engineering and Mineral Industries, University of Ngaoundere, Ngaoundere 454, Cameroon.

Email: macntamfu@yahoo.co.uk

Asma Benaissa, Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical, and Environment (LAMAABE), Department of Biology, Faculty of Sciences of Nature, Life, Earth, and Universe, Abou Bekr Belkaïd University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria.

Email: asmaben36@gmail.com



## Introduction

The versatile opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is one of the major pathogenic bacteria, capable of causing acute and chronic infections to humans and animals.<sup>1,2</sup> It is responsible for severe nosocomial infections in humans, with a high incidence of infections occurring in immunocompromised patients, suffering from chronic obstructive lung disease<sup>3</sup> and is the most frequently isolated pathogen in patients with cystic fibrosis (CF) and is therefore one of the most clinically important pathogens.<sup>4</sup> It should be noted this flagellated bacteria easily moves and colonizes surfaces on which it establishes biofilms and makes its spread more rampant.<sup>5,6</sup> Its pathogenicity is based on a vast and complex arsenal of soluble virulence factors (toxins, enzymes, exopolysaccharides, etc) and cellular structures (pili, secretion systems, etc) that allow it to adapt and persist in the CF respiratory tract throughout the process of infection and aiding the bacteria to survive the effects of the host's immune system.<sup>7</sup> These virulence factors intervene at the various stages of the process of infection and thus allow the progression of the disease by strengthening the adhesion, modifying the immune response of the patient, preventing phagocytosis, destroying host tissues and protecting the pathogen from the action of various antimicrobials.<sup>8</sup> The virulence factors produced by *P. aeruginosa* are globally controlled by an incredible, complex and interconnected control circuits and signaling systems which is triggered by the threshold population density of the microbial cells and coordinated by a communication network mechanism called quorum sensing (QS).<sup>9–11</sup> The QS network in *P. aeruginosa* is therefore dependent on the density of the bacterial population and their ability to communicate with each other and it relies on the production and reception of small diffusible signal molecules mostly N-acyl-homoserine lactone (AHL) molecules.<sup>12–14</sup> When these diffusible pheromones reach a critical threshold concentration, they bind to the type "R" transcriptional regulator. The successful linkage of autoinducers to transcriptional regulators activates the expression of "I" target genes associated with pathogenicity, ecological adaptation, control of virulence factors, the formation of biofilms and the development of antibiotic resistance.<sup>15</sup> Many physiological processes such as conjugation, symbiosis, antibiotic production, virulence, competence, sporulation, motility and biofilm formation are mediated by QS during which Gram-positive and Gram-negative bacteria use oligopeptides and acylated homoserine lactones as autoinducers, respectively.<sup>2,16,17</sup>

*P. aeruginosa* has four self-regulating signaling systems that are hierarchically ranked and interconnected are able to modulate the activities of each other.<sup>18</sup> Elastase, associated with immune evasion (Las), rhamnolipid, related to the structure and dynamics of the biofilm (Rhl), *Pseudomonas* quinolone signal (Pqs) and integrated quorum sensing (Iqs).<sup>8,19</sup> The Las system has a dominant role in this hierarchy since it can interfere by positively controlling the expression of the other three systems.<sup>1,20</sup> The Las system controls the synthesis of

N- (3-oxododecanoyl)-L- homoserine lactone (3-oxo C12-AHL) to activate the appropriate Las R regulator and also to trigger the expression of genes responsible for the production of Las A protease and Las B elastase as well as for the production of exotoxin-A.<sup>21,22</sup> Similarly, the cytoplasmic receptor RhlR responds to the «N-butanoyl-L-homoserine lactone» (C4-HSL) synthesized by RhlI in order to regulate the expression of genes involved in the synthesis of elastase, rhamnolipids and alkaline proteases of siderophores and motilities.<sup>3,20,23</sup> It also triggers the secretion of Pyocyanin which is a blue-green pigment with a crucial role in the virulence of *P. aeruginosa*.<sup>15</sup> It equally suppresses the immune response of the host cell by decreasing the frequency of ciliary beats, which can further alter the innate defense mechanisms of the respiratory tract as it induces neutrophil apoptosis and increases the production of interleukin IL-8.<sup>7,15,24,25</sup> The third system, Pqs, uses synthesized signal molecules with a quinolone-based structure (heptyl-3 hydroxy-4 quinolone), which trigger transcription of the operon pqsABCDE-phnAB.<sup>26</sup> The Pqs system plays a variety of roles, including mediating intercellular signaling through QS, regulating virulence factors, iron acquisition, induction of oxidative stress and modulation of host immune responses.<sup>8,15,26</sup> The fourth QS channel recently discovered is the Iqs which utilizes 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde as its signal molecule and contributes to regulating responses to environmental stress, inhibition of host's cell growth and stimulation of apoptosis.<sup>8,12,26</sup>

Other virulence factors are usually regulated by different systems, for example, the Las and Rhl systems are involved in the formation of biofilm.<sup>21</sup> Biofilms are highly structured architecture consisting of microcolonies fixed to a surface and embedded in a self-produced extracellular matrix composed of exopolysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids.<sup>8,26,27–29</sup> Bacteria cells use different forms of motilities such as swarming and swimming to colonize surfaces prior to biofilm establishment.<sup>30,31</sup> In the early stages of lung infection, *P. aeruginosa* floats freely through the airways in planktonic form, and during the progression of the infection, the bacterial colonies transform into sessile biofilm mode.<sup>32</sup> There are many multifactorial dynamic processes that occur at various stages through well-established mechanisms leading to the colonization of the lungs and these steps are controlled by the QS and involve different virulence factors.<sup>19,27</sup> Adhesion is the initial stage of biofilm formation and this stage usually requires different structural compartments.<sup>33</sup> This makes use of flagella that ensure the swimming motility necessary for attachment, dissemination, colonization of the host epithelium and transition from the planktonic phase to the biofilm mode.<sup>20,34</sup> Once the attachment is achieved, *P. aeruginosa* passes to a more stable state of attachment and other types of surface motility, such as swarming and twitching motility, which are mediated by type IV pili and play important roles in mediating adherence to mucosal surfaces and subsequent colonization.<sup>33,35,36</sup> Fixation of *P. aeruginosa* on surfaces is followed by progression towards a mature biofilm in which microcolonies develop and multiply on surfaces producing extracellular polymer substances (EPS) as a solid

structural matrix for better attachment.<sup>12,15</sup> This EPS self-secreted polymer matrix provides a scaffold and protective barrier to embedded cells against various stresses such as bacteriophages and host immune responses making them able to resist antimicrobial treatments up to 1000 times more than their planktonic counterparts.<sup>37–39</sup> Biofilms contribute to chronic infections that are difficult to treat with ordinary antibiotics.<sup>40</sup> Thus, the inhibition of biofilm production and QS can disrupt the development of the protective three-dimensional structure providing a lead-way for the development of new anti-infective agents.<sup>26,33</sup> Such new types of antimicrobials target virulence factors of the bacteria and not their vitality, and avoiding the strong pressure of conventional antibiotics which makes microbes to develop resistance.<sup>1,7,26</sup>

Humans have exploited aromatic medicinal plants as an indispensable source of therapeutic molecules, usually possessing antimicrobial activity, most especially plant essential oils (EOs).<sup>41</sup> EOs are a mixture of volatile compounds including fatty acids and alcohols, terpenoids and phenylpropanoids.<sup>42</sup> Several *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated interesting antimicrobial and antibiofilm effects of EOs against many pathogenic fungi and bacteria.<sup>43</sup> However, few studies exist on the anti-virulence and anti-quorum sensing properties of essential oils.<sup>22,44</sup> *Cistus* plants are widely distributed plant in the Mediterranean area and they are very popular as herbal teas and equally used in traditional medicine, mostly for the treatment of infections.<sup>45,46</sup> Over 111 phytochemical compounds with interesting biological activities of *Cistus* species have been reported.<sup>47</sup> *Cistus munbyi* is a medicinal plant that is endemic to Northwestern Algeria and Northeastern Morocco where it is mostly used to treat some pulmonary infections.<sup>48</sup> This work focused on the extraction of EO from *C. munbyi* and determining its phytochemical composition using gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Equally the effects of this EO on various virulence factors of *P. aeruginosa* strains were investigated and reported.

## Experimental

### *Plant Material and Essential Oils Extraction*

The whole aerial parts of *C. munbyi* were collected at the flowering stage in May 2022 in the coastal Region of Beni Khelad, located in the Northwest of Algeria at 35.13°48.7' N, 1.36°23.6' W. The specimens were taxonomically identified and authenticated by a botanist at the laboratory of Ecological Management of Natural Ecosystems of the University of Tlemcen in comparison with previous identification.<sup>49</sup> A voucher specimen was deposited in our laboratory under the code CS-BF250522. 500 g of the air-dried aerial parts of the collected plants were subjected to hydrodistillation for 3 h using a Clevenger-type apparatus according to the European Pharmacopoeia. The obtained essential oil (EO) which was 9.0 g, was dried over anhydrous sodium sulfate, stored in dark bottles at 4 °C until tested and analyzed.

### *Gas Chromatography–Flame Ionization Detector (GC–FID) and Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) Analyses*

The essential oils were analyzed by GC–FID and GC–MS as described previously.<sup>50,51</sup> For GC analyses, a Rxi-5Sil MS fused silica capillary non-polar column (30 m × 0.25 I.D., film thickness 0.25 μm) and FID was used. Temperatures for the injector and detector were set to 250 °C to 270 °C, respectively. Helium was used as carrier gas with a 1.4 mL/min flow rate. The sample injection volume was 0.2 μL with a split ratio of 20:1. A Class GC10 GC computer program was used to determine the percentage composition of the essential oils. The initial oven temperature was held at 60 °C for 5 min, then increased up to 240 °C with 4 °C/min increments and held at this temperature for 10 min. For GC–MS analyses, an ion trap MS and a Rxi-5Sil MS fused silica non-polar capillary column (30 m × 0.25 mm I.D., film thickness 0.25 μm) were used. The carrier gas was helium with a 1.4 mL/min flow rate. The injector and MS transfer line temperatures were 220 °C to 290 °C, respectively. The temperature of the ion source was 200 °C, and the injection volume was 0.2 μL with a split ratio of 20:1. Electronic ionization-mass spectrometry (EIMS) measurements were taken at 70 eV ionization energy. Mass range was from  $m/z$  28 to 650 amu. Scan time was 0.5 s with 0.1 s interscan delays. The oven temperature was held at 60 °C for 5 min, then increased up to 240 °C with 4 °C/min increments and kept at this temperature for 10 min. For identification of essential oil components, co-injection with standards (whenever possible) was used, together GC retention indices determined using a homologous series of C7–C30 alkanes (Supelco), and computer matching with the Wiley, TRLIB, and NIST08 libraries, as well as a comparison of fragmentation patterns documented in the literature.<sup>17</sup> Quantification of each of the essential oil's individual constituents was based on internal normalization for the components.

### *Bacterial Strain and Growth Conditions*

Twenty multi-resistant clinical strains of *P. aeruginosa* were selected to test the *in vitro* antibacterial activity of *C. munbyi* EO. The strains were isolated from respiratory samples of patients with pulmonary infections at the University Hospital of Tlemcen (Algeria). These isolates were sub-cultured on selective medium citremide (HIMEDIA M024) and identified by manual and automatic systems (API20NE, Vitek2). The wild type Pa01 were selected based on their ability to form biofilm, to produce pyocyanin, and to swarm and swim and two reference strains *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *P. aeruginosa* ATCC 9027 were used as positive controls.<sup>52</sup> The mutant *Chromobacterium violaceum* CV026 and *C. violaceum* CV12742 were used to evaluate the inhibitory effect of *C. munbyi* EO on quorum sensing and violacein production respectively. All clinically isolated strains were maintained in glycerol (30%) and stored at –80 °C. For every new experiment, fresh stocks



were sub-cultured. *P. aeruginosa* strains were grown in Brain Heart Infusion broth (BHIB) at 37 °C. *Chromobacterium violaceum* CV026 and CV12742 were routinely cultured aerobically in Luria–Bertani (LB) broth and the cultures were incubated at 30 °C and 37 °C, respectively, for 24 h.

### Antimicrobial Activity Assay

The preliminary antimicrobial activity of *C. munbyi* EO was carried out by the well diffusion method.<sup>53</sup> Using a sterile cotton swab, fresh standardized cultures (OD<sub>600</sub> ≈ 0.1) were extensively streaked onto petri dishes filled with Mueller–Hinton (MH) agar (Fluka®, India). Wells with 6 mm diameter were made on the MH agar using a sterile cork borer. 20 µL of *C. munbyi* EO was added to the wells, and the plates were incubated at 37 °C for 24 h. The diameter of the zones of inhibition was taken as a measure of the antimicrobial activity. All experiments were performed in triplicate.

### Determination of Minimum Inhibitory Concentrations

The minimal inhibition concentration (MIC) value was determined for all bacteria tested in this study using the microdilution assay in 96-well microtiter plates, according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2017.<sup>54</sup> Briefly various concentrations of EO were prepared by mixing proportions of EO (4%–0.007%, v/v) with 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) solution. The test medium was Mueller–Hinton (MH) broth for *P. aeruginosa* strains and LB broth for *C. violaceum* CV026 and *C. violaceum* CV 12472, and the density of bacteria was 5 × 10<sup>5</sup> colony-forming units (CFU)/mL. Serial two-fold dilutions of the EO ranging from 4% to 0.007% v/v were prepared in 96-well microtiter plate supplemented with test culture and incubated for 24 h at 37 °C. As the control, bacterial cultures were performed in DMSO at a concentration of 1% V/V. MIC concentration was estimated visually and was defined as the lowest concentration needed to inhibit the growth of each tested micro-organism in the wells. Concentrations below the MICs were considered sub-inhibitory and were further used to study the anti-QS and biofilm inhibitory properties in the above-mentioned strain.

### Biofilm Formation Assays

As described by O’toole,<sup>55</sup> the microtiter dish assay was used to evaluate the inhibition of biofilm formation by *C. munbyi* EO at two different time points during biofilm development. The EO was introduced into the medium at the beginning of the cultivation (0 h, pre-adhesion period), and after biofilm formation (24 h of bacterial culture).

#### Pre-Adhesion Period

A total of 180 µL of diluted overnight cultures of the tested pathogens (5 × 10<sup>5</sup> CFU/mL) were dispensed into each microplate well in the absence and presence of 20 µL of varying

concentrations of *C. munbyi* EO. DMSO was used as a control. After incubation of the microplates at 37 °C for 24 h, the plates were rinsed with water to remove planktonic cells and subsequently stained with 0.1% crystal violet for 10 min. The stained wells were rinsed, and the biofilm was dissolved in 30% acetic acid. Measurements of optical densities were spectrophotometrically performed at 490 nm in a microplate reader (Biotek Elx800 MER) using 30% acetic acid as a blank. The experiments were repeated three times.

### Preformed Biofilm Eradication Assay

To determine the potency of the *C. munbyi* EO to inhibit mature biofilms, an assay on the preformed biofilm was also realized. Wells of a sterile 96-well microplate were filled with 200 µL of MH broth containing a 1/100 dilution of the overnight bacterial culture. Wells without EO served as controls. After 24 h incubation at 37 °C the contents of the microplates were poured out and the wells were gently washed three times with sterile distilled water. Then 200 µL of fresh medium with or without different concentrations of *C. munbyi* EO was added to each well. The inoculated microplates were re-incubated for an additional 24 h (48 h total) at 37 °C. After 24 h, the plates underwent the same treatment and the biofilms were quantified using crystal violet staining as previously described.

Percentage of inhibition of the tested sample was calculated using the formula in below.

$$\text{Biofilm inhibition (\%)} = \frac{OD_{490\text{Control}} - OD_{490\text{Sample}}}{OD_{490\text{Control}}} \times 100$$

### In Situ Visualization of Biofilms

Visualization of the inhibition of biofilm production *in situ* at three different time stages is based on a previously reported methodology with some modifications.<sup>56,57</sup> Briefly, 1% of overnight cultures of the tested pathogens (0.4 OD at 600 nm) were added in 24-well plates to 1 mL of fresh MH medium containing sterile glass coverslips in the absence and presence of different concentrations of *C. munbyi* EO. After an adequate incubation time (1 h for adhesion and 24 h for biofilm formation), the coverslips were rinsed with distilled water to remove planktonic cells and the biofilms formed were stained with a 0.1% crystal violet solution. The stained and air-dried coverslips were placed on slides with the biofilm facing up and the visible biofilms were visualized under a light microscope (Carl ZEISS Einbautrafo 392575-9001) at magnifications of 40X. To visualize the action of *C. munbyi* EO on mature biofilms, biofilms were grown on 1 cm × 1 cm glass slide placed in 24-well plates containing an overnight culture re-suspended in 1 mL of fresh medium. After 24 h incubation, the cover glasses were rinsed thrice with distilled water to remove the planktonic cells and mature biofilms were then treated with respective sub-MICs of *C. munbyi* EO for 24 h, biofilms were visualized by light microscope as described previously.

### Visualization of Biofilm Under Scanning Electron Microscope

In order to visualize the effect of *C. munbyi* EO on biofilm formation under scanning electron microscope (SEM), biofilms on coverslips were grown in the treated and untreated cultures as described in light microscopic analysis. After incubations coverslips were rinsed with distilled water to remove unbound planktonic cells and biofilms were fixed with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in PBS for 5 h at room temperature. After washing, dehydration was done in ethanol with different concentrations (30, 50, 70, 90% and 100%) as described by Bose et al.<sup>2,56</sup> Coverslips were dried, gold coated and viewed under field. 100 TM Hitachi environmental scanning electron microscope, at pressure in microscope chamber of 4 Torr.

### Antivirulence Activities

**Violacein Inhibition.** The inhibition potential of the violacein produced by *C. violaceum* CV 12472 was evaluated by quantitative analysis as described by.<sup>58</sup> For the experiment 10  $\mu$ L of overnight fresh cultures of *C. violaceum* CV12472 (0.4 OD at 600 nm) were mixed with 170  $\mu$ L of LB broth in sterilized microplates and 20  $\mu$ L of MIC and sub-MIC concentrations of *C. munbyi* EO. Assay in without EO (LB broth and *C. violaceum* CV12472) served as positive control. After incubation at 37 °C for 24 h for test plates, the absorbances were read at 585 nm in a 96-well plate microplate reader (SpectraMax, Molecular Devices) to determine any reduction of violacein pigment with respect to the control. Violacein inhibition expressed as percentage inhibition was deduced from the formula:

$$\text{Violacein inhibition (\%)} = \frac{\text{OD 585 control} - \text{OD585 sample}}{\text{OD 585 control}} \times 100$$

### Bioassay for Quorum-Sensing Inhibition (QSI) Activity Using *C. violaceum* CV026

The anti-quorum sensing activity of *C. munbyi* EO was evaluated using a modified version of a previously described method.<sup>58,59</sup> First, 5 mL of Soft Top Agar, which consisted of 1.3 g agar, 2.0 g tryptone, 1.0 g sodium chloride, dissolved in 200 mL of deionized water, was mixed with 100  $\mu$ L of an overnight culture of *C. violaceum* CV026 and 20  $\mu$ L of 100  $\mu$ g/mL acylhomoserine lactone (AHL), precisely *N*-hexanoylhomoserine lactone (C6-HSL; Sigma-Aldrich) as an external source of hormones. This mixture was then poured gently onto the surface of a solidified LB agar plate as an overlay. After the overlay was solidified, wells with a diameter of 5 mm were made on each plate and filled with 50  $\mu$ L of *C. munbyi* EO at MIC and sub-MIC concentrations. Each experiment was performed in triplicate and the plates were incubated at 30 °C for 3 days. The diameter of the quorum sensing inhibition zone, which was indicated by a white or cream-colored

halo around the well against a purple lawn of activated *C. violaceum* CV026 bacteria, was measured in millimeters.

### Pyocyanin Assay

Pyocyanin production in treated and untreated cultures of *P. aeruginosa* was determined as described by Essar et al.<sup>60</sup> Briefly, bacterial cells were inoculated in *Pseudomonas* broth (PB) (20 g of Bacto-Peptone, 1.4 g of MgCl<sub>2</sub>, and 10 g of K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> per liter of distilled water) with or without *C. munbyi* EO at their respective sub-MIC concentrations and incubated for 72 h at 37 °C. As the control, the PB was supplemented with 0.5% of DMSO. Cell free supernatants collected by centrifugation at 10 000 *g* for 15 min was extracted with 3 mL of chloroform and then re-extracted in 1 mL of 0.2 M HCl to get a pink to deep-red colored solution. The relative concentration of pyocyanin was subsequently spectrophotometrically quantified at 520 nm.

### Swarming and Swimming Motilities

To study the effect of *C. munbyi* EO on swarming motility, overnight culture of *P. aeruginosa* strains was point inoculated at the center of swarming medium consisting 1% w/v peptone supplemented with 0.5% w/v each of D-glucose, agar and NaCl with sub-MICs of *C. munbyi* EO and incubated for 24 h at 37 °C. Plates without EO were taken as untreated control. The extent of swarming was determined by measuring the swarming area ( $\mu\text{m}^2$ ) using ImageJ software and compared with the control.<sup>3</sup> In swimming assay, the procedures were the same as those of the swarming assay, except for the swimming medium composition, which consisted of 1.0% tryptone, 0.5% NaCl, and 0.3% agar.<sup>7</sup>

### Extraction and Quantification of Exopolysaccharide

Test strains grown in the presence and absence of sub-MICs of *C. munbyi* EO were centrifuged, and the resulting supernatant was filtered. Three volumes of chilled 100% ethanol were added to the filtered supernatant, which was then incubated overnight at 4 °C.<sup>61</sup> Precipitated EPS were collected by centrifugation at 10 000 *g* for 20 min and quantified by measuring sugars following the method of Dubois et al.<sup>62</sup>

### LasA Staphylolytic Assay

LasA protease activity was measured by determining the efficiency of culture supernatants of *P. aeruginosa* to lyse boiled *Staphylococcus aureus* cells.<sup>63</sup> A 30-mL overnight culture of *S. aureus* was boiled in a water bath at 100 °C for 10 min and centrifuged for 10 min at 20 683 *g*. Then, the pellet was resuspended in 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.5) and then diluted with the same buffer to an OD of (~0.8 at 600 nm). After that, a 100- $\mu$ L aliquot of cell free supernatant of *P. aeruginosa* cultured with or without EO was added to 900  $\mu$ L *S. aureus* suspension, and the

OD at 600 nm was determined after 10, 20, 40, and 60 min. The percentage inhibition of protease activity was calculated with respect to the assay control (without *C. munbyi* EO).<sup>64</sup>

## Results

### *Chemical Composition of the Essential Oil*

After the hydrodistillation process, it was found that from 500 g of plant material, 9.0 g of EO were obtained, making a yield of 1.8%. GC-MS was used to determine the chemical composition of *C. munbyi* EO and the results are presented in Table 1. The results of the analysis show the presence of 44 identified compounds (100%) as presented in Table 1. The compounds identified include a variety of monoterpenes and sesquiterpenes. Monoterpene hydrocarbons represent the largest proportion, accounting for 57.01% of total oil volume, while monoterpenoids and oxygenates account for 41.22%. Sesquiterpene hydrocarbons and sesquiterpenoids are present in smaller quantities, at 1.03% and 0.27%, respectively. The composition of *C. munbyi* EO is characterized by a balanced mixture of several compounds. There is no dominant compound, but rather a significant combination of Terpinen-4-ol (33.20%), Sabinene (13.20%),  $\alpha$ -Thujene (11.30%), and p-Cymene (9.94%). It is also noteworthy that other compounds are present in significant quantities, such as  $\gamma$ -Terpinene (13.60%),  $\alpha$ -Terpinene (6.81%), and p-Cymene (9.94%).

### *Phenotypic Characterization of Clinical and Reference Strains*

*P. aeruginosa* isolates selected for this study were characterized for their susceptibility to a range of antibiotics, and their ability to produce specific virulence factors, such as biofilm formation, pyocyanin production, swarming and swimming motility. The evaluation of these characteristics in the strains studied is reported in Table 2.

### *Antimicrobial Effect of C. munbyi EO*

The antibacterial effect of *C. munbyi* EO was verified by two laboratory tests; by determining the diameter of the inhibition zone and the MIC value. As summarized on Table 3 for the most susceptible strains, the EO demonstrated a significant inhibitory effect against all *P. aeruginosa* isolates and reference strains tested, with inhibition zone diameters ranging up to  $22 \pm 0.5$  mm against the Pa3 strain and MIC values as low as 0.125% to 1% v/v against the Pa3 and Pa16 strains. Interestingly, Pa6 was most susceptible as EO had highest inhibition zone diameter of  $22 \pm 0.5$  mm against it. In the microdilution assay, Pa3 and Pa16 were most susceptible as EO had lowest MIC values of 0.125% v/v against both of them. Antimicrobial activity of the EO against the less susceptible strains is provided in Supplemental material (Table S3).

### *Antibiofilm Activities of C. munbyi EO*

In this study, the effect of *C. munbyi* EO on biofilm formation was evaluated by the crystal violet test on polystyrene and glass, which are the most frequently used materials in medical devices. The percentages of biofilm inhibition against the more susceptible strains assayed at 2XMIC, MIC and sub-MIC concentrations are summarized in Table 4 (for young biofilms after 24 h) and Table 5 (for mature biofilms after 48 h). Antimicrobial activity of the EO against the less susceptible strains are provided in the Supplemental material (Tables S4 and S5). Microtiter plate assay of the anti-biofilm activity of *C. munbyi* EO showed a dose-dependent reduction of biofilm biomass in the tested strains. Overall, it was found that at MIC concentration, EO removed more than 70% of the biofilm from 19 strains out of 24 tested, which represents 79.11% of all the tested strains. The most biofilm producing strains named Pa2, Pa3, Pa6, and Pa16 were more resistant to the anti-biofilm effect of EO with an inhibition rate of 39.09%, 57.22%, 49.44%, and 59.07%, respectively. At MIC/2 and MIC/4 concentrations, the *C. munbyi* EO was less active with a rate ranging from 29.3% to 85.12% at MIC/2 and 12.6% to 77.44% at MIC/4. The strongest inhibition was observed against the Pa20 isolate, while the Pa6 strain was the most resistant. Furthermore, the inhibition rate was less than 45% at MIC/8% and 30% at MIC/16. Mature biofilms are much difficult to destroy compared with young biofilms and planktonic cells. For this purpose, pre-formed biofilms (48 h) were treated with sub-MIC of *C. munbyi* EO to evaluate its eradication ability. The ability of *C. munbyi* EO to eradicate pre-formed biofilms was found to be less important than that exerted on young biofilms.

### *Scanning Electron Microscopy (SEM) Analysis*

To demonstrate clearly the antibiofilm effect of *C. munbyi* EO, Microscopic investigations were conducted on glass slides in a static condition in the absence (control) and in the presence of sub-MIC concentrations of EO. Light microscopic images showed a very intensive biofilm formation on the control surface with a characteristic organization of cells in the early stages of adhesion, while a few cells were observed on the treated surfaces. SEM images taken with mature biofilms after 48 h (Figure 1a) and young biofilms after 24 h (Figure 1b) revealed that the untreated control had a well-developed biofilm while a significant reduction of young biofilms was observed with distorted architecture and isolated microcolonies upon treatment with EO in all tested strains. Compared to the control (Figure 1a and 1b), cells treated with *C. munbyi* EO showed slight cell shrinkage with morphology changes.

### *Anti-Virulence Activities*

*Violacein Inhibition.* AHL-mediated QS regulates biofilm formation and virulence factors such as secretion of violacein. The best studied model system for screening QS inhibitors is

**Table 1.** Chemical Composition of Essential oil from *Cistus munbyi*.

No.	RI <sup>a</sup>	LRI <sup>b</sup>	Compounds	<i>C. munbyi</i> (%) <sup>c</sup>	Identification Methods
<b>1</b>	<b>922</b>	<b>928</b>	<b><math>\alpha</math>-Thujene</b>	<b>11.30</b>	<b>Co-GC, MS, RI</b>
2	931	935	$\alpha$ -Pinene	0.26	Co-GC, MS, RI
3	951	952	Camphene	0.40	Co-GC, MS, RI
<b>4</b>	<b>965</b>	<b>971</b>	<b>Sabinene</b>	<b>13.20</b>	<b>Co-GC, MS, RI</b>
5	988	992	$\beta$ -Pinene	0.68	Co-GC, MS, RI
6	992	994	2,3-dehydro 1,8-cineole	0.27	MS, RI
7	1013	1010	$\alpha$ -Phellandrene	0.15	Co-GC, MS, RI
8	1018	1019	$\alpha$ -Terpinene	6.81	Co-GC, MS, RI
<b>9</b>	<b>1027</b>	<b>1031</b>	<b><i>p</i>-Cymene</b>	<b>9.94</b>	<b>Co-GC, MS, RI</b>
10	1033	1036	1,8-Cineole	0.25	Co-GC, MS, RI
11	1035	1038	Limonene	0.18	Co-GC, MS, RI
<b>12</b>	<b>1052</b>	<b>1053</b>	<b><math>\gamma</math>-Terpinene</b>	<b>13.60</b>	<b>Co-GC, MS, RI</b>
13	1080	1085	Terpinolene	0.49	Co-GC, MS, RI
14	1096	1100	$\beta$ -Linalool	0.19	Co-GC, MS, RI
15	1113	1117	$\alpha$ -Thujone	0.27	Co-GC, MS, RI
16	1118	1121	Camphor	0.64	Co-GC, MS, RI
17	1122	1128	Verbenol	0.85	Co-GC, MS, RI
18	1155	1162	Borneol	0.22	Co-GC, MS, RI
19	1160	1168	3-Thujen-2-one	0.17	MS, RI
<b>20</b>	<b>1165</b>	<b>1171</b>	<b>Terpinen-4-ol</b>	<b>33.20</b>	<b>Co-GC, MS, RI</b>
21	1169	1173	<i>p</i> -Cymene-8-ol	0.13	MS, RI
22	1178	1183	Myrtenol	0.38	Co-GC, MS, RI
23	1185	1189	$\alpha$ -Terpineol	0.23	Co-GC, MS, RI
24	1200	1207	Trans-piperitol	0.36	Co-GC, MS, RI
25	1203	1208	<i>p</i> -Cumenol	0.17	MS, RI
26	1215	1220	Cis-piperitol	0.57	MS, RI
27	1235	1237	Cuminaldehyde	0.29	MS, RI
28	1270	1273	Carvyl acetate	0.16	MS, RI
29	1275	1277	Cumic alcohol	0.34	MS, RI
30	1277	1280	Carvacrol	0.33	Co-GC, MS, RI
31	1280	1282	Thymol	0.48	Co-GC, MS, RI
32	1282	1288	Bornyl acetate	0.52	Co-GC, MS, RI
33	1286	1290	Terpinen-4-ol acetate	0.46	MS, RI
34	1289	1296	Sabinyl acetate	0.31	MS, RI
35	1295	1299	Perillic alcohol	0.14	Co-GC, MS, RI
39	1331	1338	$\alpha$ -Terpineol acetate	0.29	MS, RI
37	1355	1361	Eugenol	0.15	Co-GC, MS, RI
38	1447	1452	$\beta$ -Caryophyllene	0.26	Co-GC, MS, RI
39	1516	1518	Calamenene	0.39	MS, RI
40	1540	1544	$\alpha$ -Calacorene	0.25	MS, RI
41	1563	1572	Caryophyllene oxide	0.27	Co-GC, MS, RI
42	1643	1648	Cadalene	0.13	MS, RI
43	1842	1855	Sclareol oxide	0.18	MS, RI
44	2102	2115	Sclareol	0.14	MS, RI
			Monoterpene hydrocarbons	57.01	
			Monoterpenoids	41.22	
			Sesquiterpene hydrocarbons	1.03	
			Sesquiterpenoids	0.27	
			Others	0.47	
			Total identified (%)	100	
			Total number of components	44	

aRetention index experimentally determined using homologous series of C7–C30 alkanes on Rxi-5Sil MS fused silica column.

bLinear retention index taken from Adams (2007) and/or NIST 08 (2008).

cPercentage concentration.

Identification methods: **Co-GC**: Co-injection with authentic compounds, **RI**: based on comparison of calculated with those reported in ADAMS and NIST 08, **MS**: based on comparison with WILEY, ADAMS and NIST 08 MS databases.



**Table 2.** Phenotypic Characterization of Clinical and Reference Strains.

Strains	Pyocyanin (OD 520 nm)	Biofilm <sup>a</sup> (OD 490 nm)	Biofilm <sup>b</sup> (OD 490 nm)	Swarming Motility (mm <sup>2</sup> )	Swimming Motility (mm <sup>2</sup> )	Antibiotic Resistance
ATCC27583	0.59	0.859 ± 0.04	1.408 ± 0.01	131.73 ± 3.12	75.34 ± 0.65	/
ATCC9027	0.93	0.25 ± 0.04	0.430 ± 0.04	1711.56 ± 2.65	1534.53 ± 2.35	/
PaO1	0.29	0.209 ± 0.01	0.431 ± 0.01	476.14 ± 1.54	713.66 ± 4.62	/
Pa1	1.37	0.332 ± 0.01	0.754 ± 0.03	911.61 ± 1.25	45.08 ± 0.04	TC; TTC; PRL; TZP; IMI; CAZ; FEP
Pa2	0.87	1.55 ± 0.01	2.30 ± 0.02	4012.72 ± 3.24	3654.24 ± 5.21	TC; TTC; PRL; TZP; IMI; CAZ; FEP
Pa3	0.75	1.26 ± 0.03	2.09 ± 0.03	3208.67 ± 4.68	2106.92 ± 4.61	TC; TTC; OFX
Pa4	1.30	0.399 ± 0.02	0.630 ± 0.01	205.81 ± 0.12	148.63 ± 1.51	TC; TTC; IMI; FEP; CN
Pa5	1.40	0.173 ± 0.01	0.446 ± 0.04	476.14 ± 1.21	713.66 ± 2.53	/
Pa6	0.28	0.254 ± 0.01	0.490 ± 0.02	1720.61 ± 3.65	1473.28 ± 3.68	TC; TTC; PRL; TZP; IMI; MRP; NET
Pa7	1.29	0.475 ± 0.01	0.927 ± 0.05	3714.07 ± 2.54	202.72 ± 1.65	TC; TTC; PRL; TZP; IMI; CAZ; FEP
Pa8	0.74	0.391 ± 0.03	0.530 ± 0.01	74.25 ± 0.21	50.25 ± 0.32	TC; TTC; PRL; TZP; CAZ; FEP; CN;
Pa9	1.25	0.425 ± 0.01	0.625 ± 0.04	380.82 ± 2.29	155.15 ± 2.38	TC; TTC; PRL; IMI; FEP; OFX
Pa10	0.70	0.621 ± 0.02	1.042 ± 0.01	4286.82 ± 4.76	137.43 ± 1.36	TC; TTC; IMI; FEP
Pa11	0.68	0.611 ± 0.04	0.930 ± 0.02	289.16 ± 2.13	157.58 ± 0.21	TC; TTC; PRL; IMI; CAZ; FEP; LEV
Pa12	0.46	1.225 ± 0.04	1.643 ± 0.01	741.31 ± 1.37	531.62 ± 2.01	TC; TTC; PRL; TZP; IMI; ATM; CAZ; FEP, LEV
Pa13	0.47	0.365 ± 0.01	0.542 ± 0.04	109.14 ± 0.95	383.24 ± 3.62	TC; TTC; IMI; FEP
Pa14	0.90	0.486 ± 0.05	0.830 ± 0.03	483.59 ± 1.56	249.32 ± 1.25	IMI; FEP
Pa15	2	0.270 ± 0.02	0.642 ± 0.01	1981.37 ± 3.58	357.51 ± 1.05	TC; TTC; PRL; TZP; CAZ; FEP
Pa16	1.69	1.302 ± 0.04	1.993 ± 0.01	3512.69 ± 3.68	2048.63 ± 2.57	TC; TTC; IMI; FEP
Pa17	0.54	0.357 ± 0.02	0.452 ± 0.04	104.71 ± 0.57	50.41 ± 0.05	TC; TTC; IMI; MRP; FEP
Pa18	0.68	0.691 ± 0.07	0.808 ± 0.01	65.27 ± 0.24	43.81 ± 0.04	FEP
Pa19	1.54	1.64 ± 0.05	2.04 ± 0.01	540.61 ± 1.94	351.76 ± 1.27	TC; TTC ; PRL; IMI; FEP ; OFX
Pa20	0.38	0.750 ± 0.01	0.981 ± 0.03	601.59 ± 4.61	45.21 ± 0.14	TC; TTC; PRL; TZP; IMI; CAZ; FEP

<sup>a</sup>Biofilm production during an incubation period of 24 h without medium replacement. <sup>b</sup> Biofilm production during an incubation period of 48 h with medium replacement after 24 h. **CIP**, ciprofloxacin 5 µg; **CAZ**, ceftazidim 30 µg; **ATM**, aztreonam 30 µg; **TZP**, piperacillin + tazobactam 100/10 µg; **IMI**, imipenem 10 µg; **TOB**, tobramycin 10 µg; **FEP**, cefepim 30 µg; **PRL**, piperacillin 100 µg; **MRP**, meropenem 10 µg; **TC**, ticarcillin 75 µg; **TTC**, ticarcillin + clavulanic acid 75/10 µg; **OFX**, ofloxacin 5 µg; **CN**, genatmycin 30 µg.

**Table 3.** Antimicrobial Activity of *C. munbyi* EO (Mean Inhibition Zone and Inhibitory Concentration (MIC) Values in mm and % v/v).

	ATTC 27583	ATTC 9072	Pa1	Pa2	Pa3	Pa5	Pa6	Pa7	Pa8	Pa10	Pa11	Pa14	Pa15	Pa16	Pa18	Pa19	Pa20
<b>Inhibition zone</b>	20.0 ± 2.0	21.0 ± 1.0	16.0 ± 2.0	18.0 ± 1.0	22.0 ± 0.5	17.0 ± 2.0	18.0 ± 0.0	15.0 ± 1.0	20.0 ± 0.5	18.0 ± 0.0	17.0 ± 0.5	17.0 ± 0.5	20.0 ± 0.5	20.0 ± 2.0	16.0 ± 0.05	14.0 ± 1.0	18.0 ± 2.0
<b>MIC (% v/v)</b>	0.25	0.5	0.5	0.25	0.125	0.5	0.25	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	0.25	0.125	0.5	0.5	0.25

*C. violaceum* 12472 (CV12472) since it produces an easily measurable pigment violacein. In this study a quantitative evaluation of the QS inhibitory activity of *C. munbyi* EO was performed based on the development of the biosensor organism and the decrease in violet pigment (violacein) synthesis at different concentrations compared to the untreated control. The violacein inhibition assay was performed at MIC and sub-MIC concentrations after determining the MIC value of *C. munbyi* EO. The obtained results showing a reduction of purple pigmentation as shown in Figure 2, indicates that *C. munbyi* EO inhibited the growth of *C. violaceum* CV12472 at MIC (0.0625%, v/v), as well as complete inhibition of AHL-mediated violacein production at MIC and MIC/2 concentrations. This inhibition was approximately 71.70%; 44.95% and 12.85% at MIC/4, MIC/8 and MIC/16 concentrations respectively. The results of violacein inhibition are given in Table 6.

### Anti-Quorum Sensing Activity

*C. violaceum* CV026 is a mini-Tn5 mutant strain that produces purple pigmentation due to QS-dependent expression of the genes encoding violacein when supplemented externally with an inducing concentration of medium-chain AHLs. It is suitably used as a model bacterium to determine disruption of quorum sensing by determining zones of quorum sensing inhibition.<sup>65</sup> MIC and sub-MIC values of *C. munbyi* EO against *C. violaceum* CV026 were determined before the determination of quorum sensing inhibition zones. A measurable colorless halo against a purple lawn of produced violacein (Figure 2) observed around wells indicated QS inhibition zones. The MIC value was 0.25%v/v and showed an anti-QS activity with inhibition diameter zone of 23.0 ± 0.5 mm. Colorless halos observed around wells containing MIC/2 and MIC/4 concentrations of

**Table 4.** Quantitative Measurement of the Inhibition of Young Biofilm (24 h) Estimated by the Crystal Violet Staining (Measurement at 490 nm).

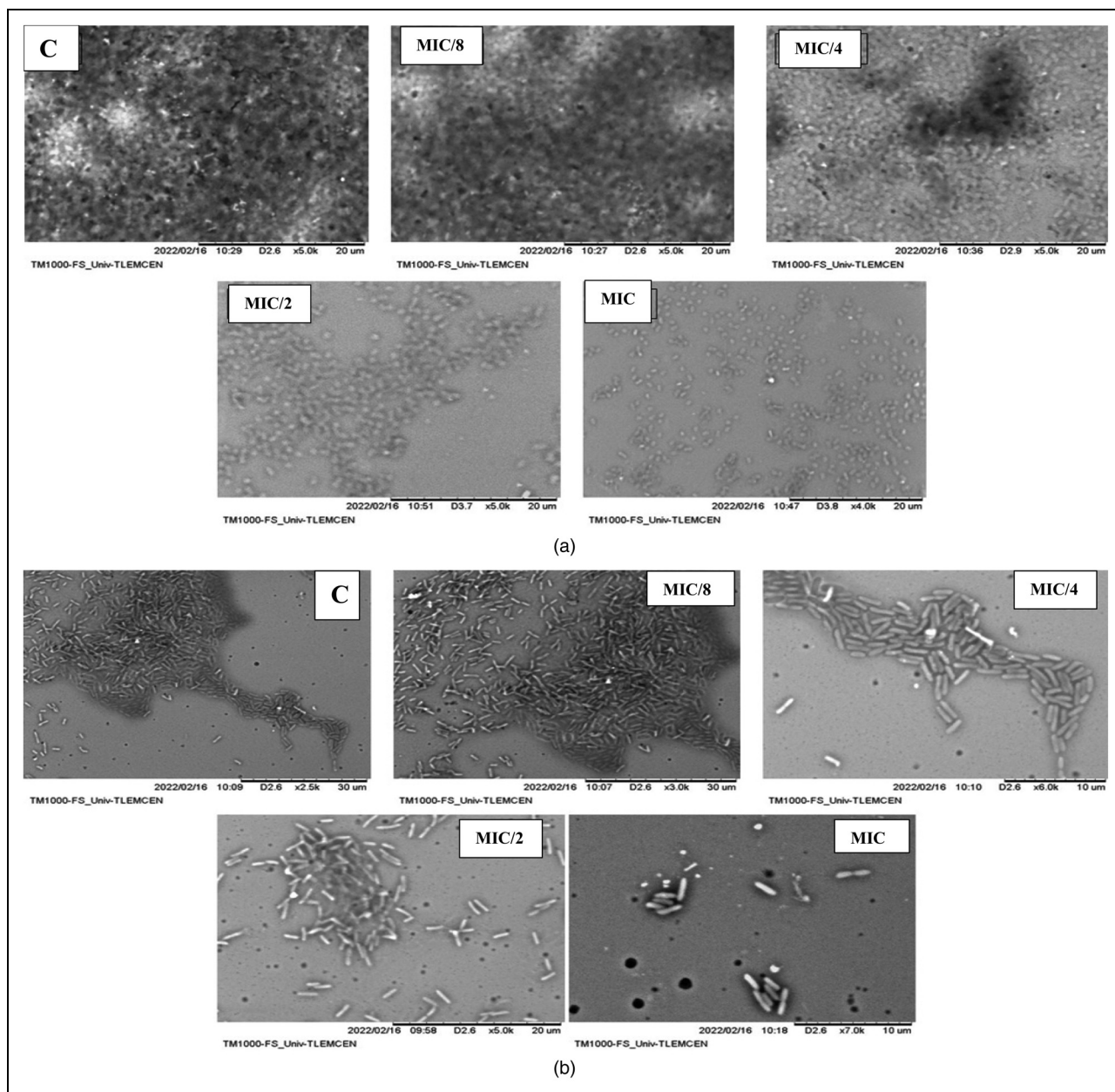
	ATTC 27583	ATTC 9072	Pa01	Pa5	Pa7	Pa8	Pa9	Pa10	Pa11	Pa12	Pa13	Pa14	Pa15	Pa16	Pa17	Pa18	Pa19	Pa20
2MIC	93.49 ± 0.04	92.80 ± 0.03	80.09 ± 0.04	87.93 ± 0.04	89.47 ± 0.03	92.99 ± 0.02	94.82 ± 0.04	81.96 ± 0.05	81.56 ± 0.03	97.32 ± 0.04	80.8 ± 0.005	83.33 ± 0.03	96.87 ± 0.04	80.87 ± 0.03	82.72 ± 0.02	92.18 ± 0.04	82.80 ± 0.05	94.36 ± 0.05
MIC	71.11 ± 0.02	83.20 ± 0.04	72.02 ± 0.02	79.41 ± 0.03	84.21 ± 0.02	83.92 ± 0.05	86.82 ± 0.03	71.17 ± 0.04	70.28 ± 0.03	93.12 ± 0.03	70.35 ± 0.04	73.45 ± 0.05	96.23 ± 0.05	59.07 ± 0.02	78.01 ± 0.04	80.89 ± 0.04	75.73 ± 0.03	91.99 ± 0.05
MIC/2	56.19 ± 0.05	60.80 ± 0.03	44.23 ± 0.04	65.41 ± 0.01	63.78 ± 0.04	77.79 ± 0.03	68.00 ± 0.05	62.64 ± 0.02	65.94 ± 0.04	68.57 ± 0.05	50.05 ± 0.02	64.19 ± 0.04	84.34 ± 0.02	39.56 ± 0.04	50.67 ± 0.04	65.05 ± 0.05	43.71 ± 0.01	85.12 ± 0.03
MIC/4	38.40 ± 0.01	45.20 ± 0.02	38.94 ± 0.01	46.25 ± 0.01	41.05 ± 0.05	45.07 ± 0.04	44.23 ± 0.02	39.90 ± 0.03	40.46 ± 0.02	35.39 ± 0.01	35.23 ± 0.04	40.23 ± 0.05	36.86 ± 0.04	28.11 ± 0.03	40.44 ± 0.05	40.50 ± 0.03	32.50 ± 0.03	77.44 ± 0.04
MIC/8	28.77 ± 0.04	40.40 ± 0.05	37.69 ± 0.05	40.67 ± 0.02	40.32 ± 0.01	43.69 ± 0.01	44.94 ± 0.04	36.21 ± 0.04	25.05 ± 0.04	19.34 ± 0.04	24.57 ± 0.01	44.03 ± 0.02	34.47 ± 0.03	27.34 ± 0.02	39.68 ± 0.03	39.65 ± 0.02	35.30 ± 0.04	38.72 ± 0.04
MIC/16	24.89 ± 0.04	30.40 ± 0.04	22.10 ± 0.04	36.00 ± 0.04	29.52 ± 0.04	19.89 ± 0.04	20.47 ± 0.01	28.50 ± 0.005	20.39 ± 0.05	12.51 ± 0.05	12.01 ± 0.05	30.65 ± 0.04	29.64 ± 0.04	17.58 ± 0.04	30.63 ± 0.02	14.90 ± 0.03	29.51 ± 0.03	6.51 ± 0.02
MIC/32	21.36 ± 0.02	26.00 ± 0.01	13.08 ± 0.03	26.38 ± 0.03	13.15 ± 0.03	11.31 ± 0.05	17.88 ± 0.03	8.37 ± 0.03	3.36 ± 0.04	7.28 ± 0.005	0	28.60 ± 0.03	20.48 ± 0.04	14.97 ± 0.05	33.92 ± 0.04	13.02 ± 0.05	15.42 ± 0.02	3.65 ± 0.04
MIC/64	15.46 ± 0.05	17.60 ± 0.05	6.85 ± 0.04	2.96 ± 0.02	1.05 ± 0.02	2.73 ± 0.02	0	3.38 ± 0.004	0	1.79 ± 0.03	0	10.49 ± 0.01	1.75 ± 0.05	0	13.00 ± 0.05	0	6.58 ± 0.04	0

The data represents mean values of three independent experiments.

**Table 5.** Quantitative Measurement of the Inhibition of Mature Biofilm (48 h) Estimated by the Crystal Violet Staining (Measurement at 490 nm).

	ATTC 27583	ATTC 9072	Pa01	Pa5	Pa7	Pa8	Pa9	Pa10	Pa11	Pa12	Pa13	Pa14	Pa15	Pa16	Pa17	Pa18	Pa19	Pa20
MIC	51.19 ± 0.04	53.72 ± 0.05	49.54 ± 0.02	54.65 ± 0.04	54.21 ± 0.05	48.63 ± 0.03	51.82 ± 0.05	47.62 ± 0.03	50.06 ± 0.04	48.68 ± 0.05	54.38 ± 0.04	45.65 ± 0.01	57.06 ± 0.05	36.04 ± 0.02	51.67 ± 0.05	59.63 ± 0.04	57.65 ± 0.05	58.25 ± 0.03
MIC/2	26.93 ± 0.05	23.65 ± 0.03	28.72 ± 0.04	20.60 ± 0.04	23.17 ± 0.04	20.65 ± 0.02	22.16 ± 0.04	24.68 ± 0.02	20.36 ± 0.04	28.19 ± 0.03	26.38 ± 0.03	20.58 ± 0.04	24.39 ± 0.02	17.65 ± 0.05	27.84 ± 0.03	19.63 ± 0.05	21.08 ± 0.03	29.3 ± 0.02
MIC/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MIC/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

The data represents mean values of three independent experiments.



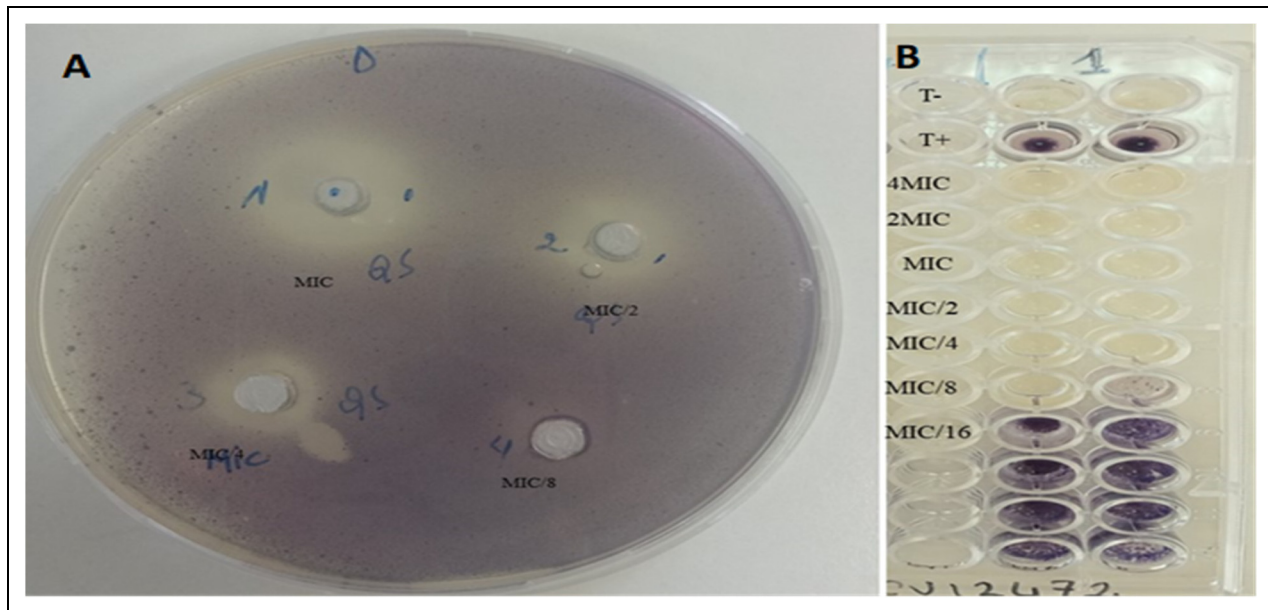
**Figure 1.** (a) SEM images of *P. aeruginosa* PA01 after 48 h of incubation (C = control). (b) SEM images of *P. aeruginosa* PA01 after 24 h of incubation (C = control).

*C. munbyi* EO, indicating anti-QS activity with a diameter of  $0.8.0 \pm 1.0$  mm and  $0.7 \pm 0.5$  mm, respectively, whereas MIC/8 concentration was inactive.

#### Effect of *C. munbyi* EO on Motility Phenotypes

*P. aeruginosa* possesses a unique polar flagellum involved in adhesion to respiratory epithelial cells and participates in both swarming and swimming motility which play an important role in the early stages of biofilm development and formation. To verify the ability of *C. munbyi* EO at different concentrations

to reduce swarming and swimming motility, tests were performed on different motility media by spot inoculation of *P. aeruginosa* isolates pre-selected for the assay. The strains denoted Pa01, Pa ATCC9027, Pa16, Pa2, and Pa3 were chosen according to their high capacity to invade agar plates with diameters exceeding 30 mm. The swimming and swarming motility plates are given on Figure 3 and the reduction in swim or swarm fronts can be seen on plates. The results demonstrate that all sub-MIC doses used exerted a concentration-dependent inhibitory effect on swarming and swimming motilities in the plates compared to control plates with untreated cells. However, major migration



**Figure 2.** Quorum-sensing inhibition plate (A); violacein inhibition plate (B).

**Table 6.** Inhibition of Violacein Production Against *C. violaceum* CV12472 and Anti-QS Activity Against *C. violaceum* CV026 by *C. munbyi* EO.

Violacein Inhibition (%)				
MIC	MIC/2	MIC/4	MIC/8	MIC/16
100 ± 0.00	100 ± 0.00	71.70 ± 1.08	44.95 ± 0.74	12.65 ± 0.13
Anti-Quorum Sensing Inhibition Zones (mm)				
23 ± 0.5	16 ± 1	08 ± 0.5	-	-

inhibition of all tested strains was achieved at MIC and MIC/2 with good percentage inhibitions and in both models, Pa3 was most susceptible while Pa01 was least susceptible. The results of motility inhibition of *C. munbyi* EO are given on Table 7.

#### Effect of *C. munbyi* EO on Pyocyanin Production

Among the many QS-controlled virulence factors produced by *P. aeruginosa* during infection, pyocyanin is a redox-active blue-green phenazine pigment involved in many pathogenic mechanisms.<sup>66</sup> Therefore, inhibition of pyocyanin production is important for disease progression. As summarized in Table 8 for the most susceptible strains, pretreatment with *C. munbyi* EO at MIC and sub-MIC concentrations showed that the inhibitory effect on pyocyanin production was positively correlated with EO concentration of with compared to that of untreated control. At the MIC concentration, a maximum of more than 80% inhibition of pyocyanin production was observed at all tested strains, while at concentrations below the MIC, EO was still able to significantly inhibit pyocyanin production in all strains tested, with inhibition rates ranging from 54.34% (Pa12 strain) to 86.66% (Pa14 strain) at MIC/2, from 24.32% (Pa8 strain) to 56.93% (Pa1 strain) at

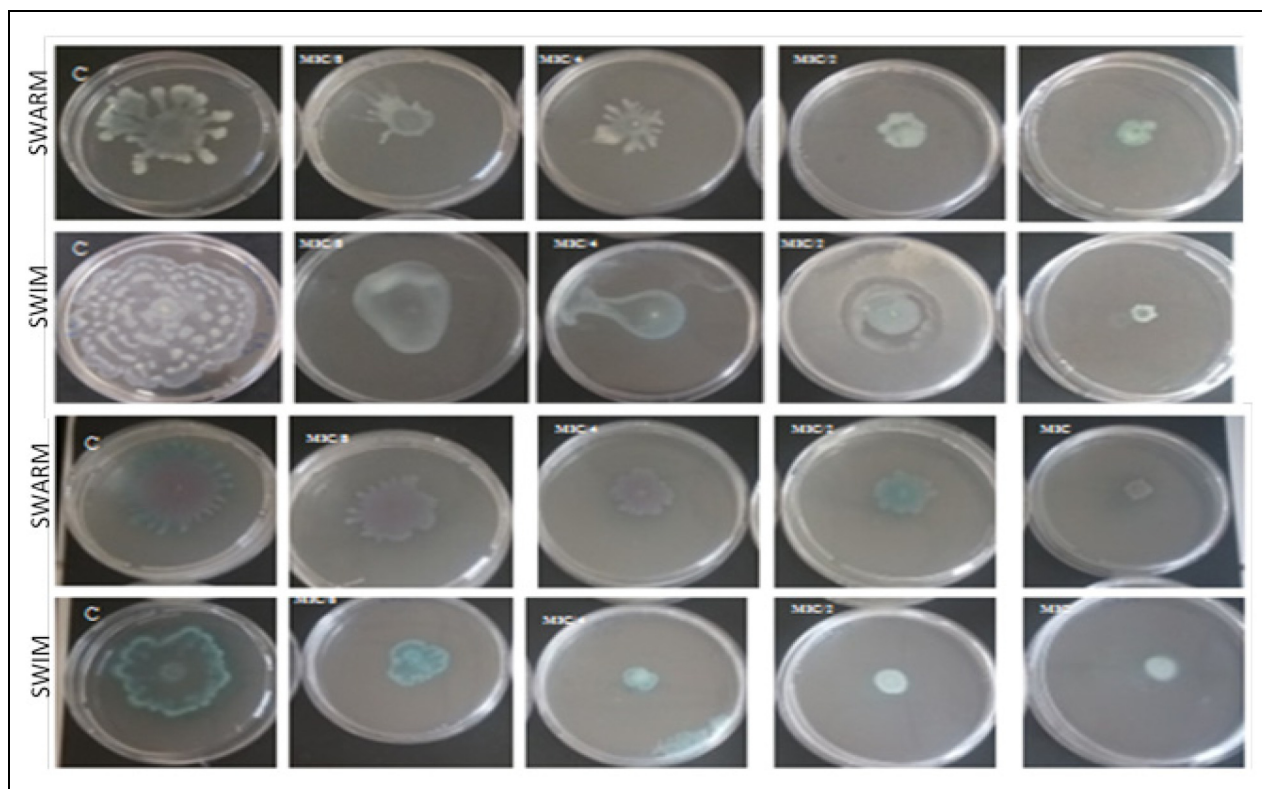
MIC/4. Whereas the inhibition rate was less than 19% for all strains tested at MIC/8. The inhibition of pyocyanin production of the EO against the less susceptible strains is provided in Supplemental material (Table S8).

#### Inhibition of EPS Production by *C. munbyi* EO

The biofilm confers resistance to different antimicrobial agents on the bacteria embedded within it. This resistance is due to the EPS matrix which plays a crucial role in the formation and maintenance of the biofilm architecture. The study of the inhibitory effect of EPS production was performed on four selected clinical strains of *P. aeruginosa*, namely Pa2, Pa3, Pa6, and Pa16 and the model strain Pa01. These strains were selected based on their high capacity to produce biofilms. In *P. aeruginosa* Pa01, a maximum reduction of 90.62% was observed at MIC concentration (Figure 4). At MIC/2, MIC/4 and MIC/8 concentrations *C. munbyi* EO reduced significantly ( $P < 0.05$ ) EPS production by 64.21%, 42.17% and 15.32% respectively compared to the untreated control. The tested strains at MIC concentration showed maximum reduction (70-90%) in the concentration of EPS, according to the spectrometric examination at 490 nm. The oils tested decreased EPS production by (45-56%) and (30-40%) at MIC/2 and MIC/4 concentrations, respectively, while MIC/8 was almost inactive with less than 11%.

#### Inhibition of Las A Staphylolytic Activity by *C. munbyi* EO

QS in *P. aeruginosa* controls the secretion of a range of extracellular protease enzymes, such as protease IV, alkaline protease, elastase A and elastase B, which are associated with the virulence of this opportunistic pathogen. Las A elastase (also called staphylolytic



**Figure 3.** Swimming and swarming motility plates (C = control).

**Table 7.** Effect of *C. munbyi* EO on Swarming and Swimming Motility.

	Swimming Inhibition (%)				Swarming Inhibition (%)			
	MIC	MIC/2	MIC/4	MIC/8	MIC	MIC/2	MIC/4	MIC/8
Pa2	81.90 ± 1.04	66.47 ± 0.68	69.39 ± 0.57	42.44 ± 1.04	97.26 ± 0.91	88.48 ± 0.51	85.27 ± 0.97	42.39 ± 1.04
Pa3	95.95 ± 0.65	95.10 ± 0.98	38.13 ± 1.04	11.13 ± 0.64	94.41 ± 1.12	90.06 ± 0.39	59.44 ± 1.05	36.38 ± 0.94
PaO1	42.53 ± 0.69	10.67 ± 0.53	4.12 ± 0.24	0	81.35 ± 1.03	66.73 ± 0.97	54.98 ± 1.06	49.95 ± 1.06
ATCC9027	93.99 ± 1.02	74.74 ± 0.61	58.90 ± 0.82	26.95 ± 0.73	89.82 ± 0.65	76.87 ± 0.57	61.44 ± 0.98	54.42 ± 0.97
Pa16	89.92 ± 0.95	77.29 ± 0.97	71.16 ± 0.91	54.18 ± 0.94	91.49 ± 0.94	89.91 ± 0.38	90.47 ± 0.64	63.08 ± 1.02

protease or staphylolysin) is a serine endopeptidase able to cleave the pentaglycine bridge present in the peptidoglycan of *S. aureus* cell walls.<sup>63</sup> The percentage inhibition of LasA staphylolytic activity by different concentrations of *C. munbyi* EO were evaluated at different times and summarized on Table 9 for the most susceptible strains. The plots of percentage inhibition of LasA staphylolytic activity against time are given on Figure 5. The supernatant from EO-treated cultures showed a significant reduction in LasA staphylolytic activity in a concentration-dependent manner compared to that of the control. Complete data of Table 9 for LasA staphylolytic activity is provided in the Supplemental material.

## Discussion

*P. aeruginosa* is an opportunistic bacterium known to cause lung infections, particularly in patients with CF and other chronic

lung diseases.<sup>25</sup> The effectiveness of antibiotics that act directly on bacteria can be compromised by biofilm formation, particularly under conditions of stress. As a result, current therapeutic options for combating various pathogens are inadequate and pose significant health problems. Biofilms provide a protective environment for bacteria and increase their resistance to antibiotics and the immune system. This therefore poses a serious problem for human health, making it important to research new therapies that directly target or disrupt biofilm formation and attenuate virulence factors controlled by QS to overcome this resistance and improve clinical outcomes. Compounds derived from natural sources, especially secondary plant metabolites, are valuable resources in the context of QS inhibition.<sup>67,68</sup> Consequently, *C. munbyi* was chosen in this study as it has been used to alleviate lung infections for many years in folk medicine. Although some biological activities of *C. munbyi* have been



tested in many aspects, its QSI properties against *P. aeruginosa* have not yet been explored.

In the first part of the work, the chemical composition of *C. munbyi* EO was established by GC-MS analysis. Our results indicate that Terpinene-4-ol (33.2%),  $\gamma$ -Terpinene (13.6%), Sabinene (13.2%),  $\alpha$ -Thujene (11.3%), p-Cymene (9.94%), and  $\alpha$ -Terpinene (6.81%) are the main compounds. These results agree with some quantitative and qualitative differences with the work of Benbelaid et al<sup>48</sup> in which terpinen-4-ol was also dominant but with a percentage of (23.75%). A significant difference lies in the both the class and amount of certain compounds identified in this study compared to other reports. In

our work, p-Cymene and  $\alpha$ -Terpine were detected in significant concentrations, whereas the study by Benbelaid et al<sup>32</sup> highlighted the presence of other compounds such as trans-Sabinene hydrate (5, 62%),  $\alpha$ -Thujene (5.22%), cis-Sabinene hydrate (4%),  $\alpha$ -Terpinyl acetate (2.63%), Camphene (2.60%), and Caryophyllene oxide (2.35%). These differences in the chemical composition of EOs may be due to variations in sample sources, growing and harvesting conditions, and other environmental, climatic and seasonal factors. The biological activities of EOs are determined by the presence of their chemical constituents, which can vary in terms of qualitative and quantitative composition. Consequently, these variations

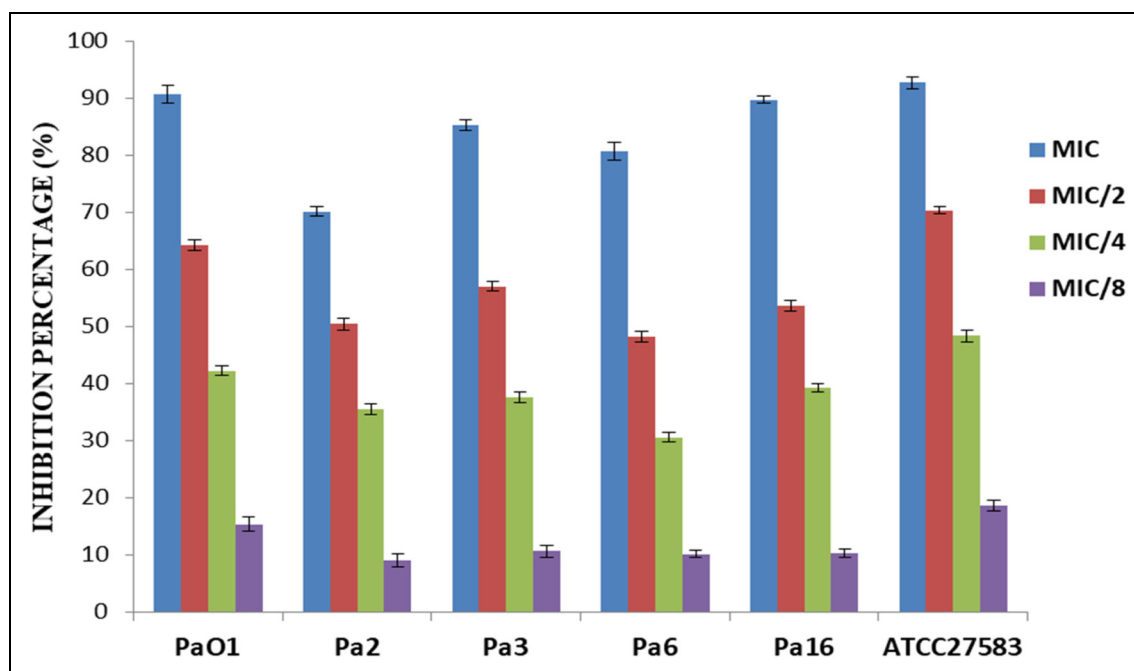
**Table 8.** The Quantitative Assessment of Pyocyanin Inhibition (%).

Strains	ATCC27583	PaO1	Pa1	Pa3	Pa4	Pa5	Pa6	Pa7	Pa8	Pa9	Pa14	PA15	Pa16	Pa17
MIC	89.83 ± 1.25**	93.10 ± 1.00**	91.24 ± 0.93**	96.00 ± 1.13**	90.00 ± 1.26*	96.42 ± 2.15*	92.85 ± 1.00*	96.12 ± 1.10*	95.94 ± 60*	94.4 ± 2.50**	95.55 ± 50*	95.00 ± 1.09*	91.07 ± 1.21*	93.33 ± 1.50*
MIC/2	74.57 ± 1.00*	82.75 ± 1.26*	76.64 ± 1.25*	64.00 ± 0.85*	76.92 ± 0.75**	82.85 ± 1.11*	64.28 ± 0.25*	87.59 ± 0.93*	64.86 ± 1.22*	77.60 ± 1.70*	86.66 ± 0.99*	62.50 ± 1.31*	62.50 ± 1.01**	58.33 ± 0.91*
MIC/4	47.62 ± 0.56**	55.51 ± 0.55*	56.93 ± 0.15**	31.33 ± 1.02**	50.00 ± 1.05*	44.28 ± 1.05*	28.57 ± 0.34**	51.93 ± 0.51**	24.32 ± 0.87*	53.20 ± 0.85**	33.33 ± 57*	50.00 ± 0.79*	32.14 ± 0.92*	35.83 ± 1.08**
MIC/8	18.64 ± 0.11*	17.24 ± 0.71	8.75 ± 0.23*	6.66 ± 0.31*	5.38 ± 0.20*	8.57 ± 0.21*	10.71 ± 0.15**	22.48 ± 0.40*	5.40 ± 0.91**	20.00 ± 0.10*	11.11 ± 0.05*	10.00 ± 0.12*	10.71 ± 0.07*	16.66 ± 0.40*

The data represents mean values of three independent experiments.

\*  $P \leq .05$ .

\*\*  $P \leq .005$ .

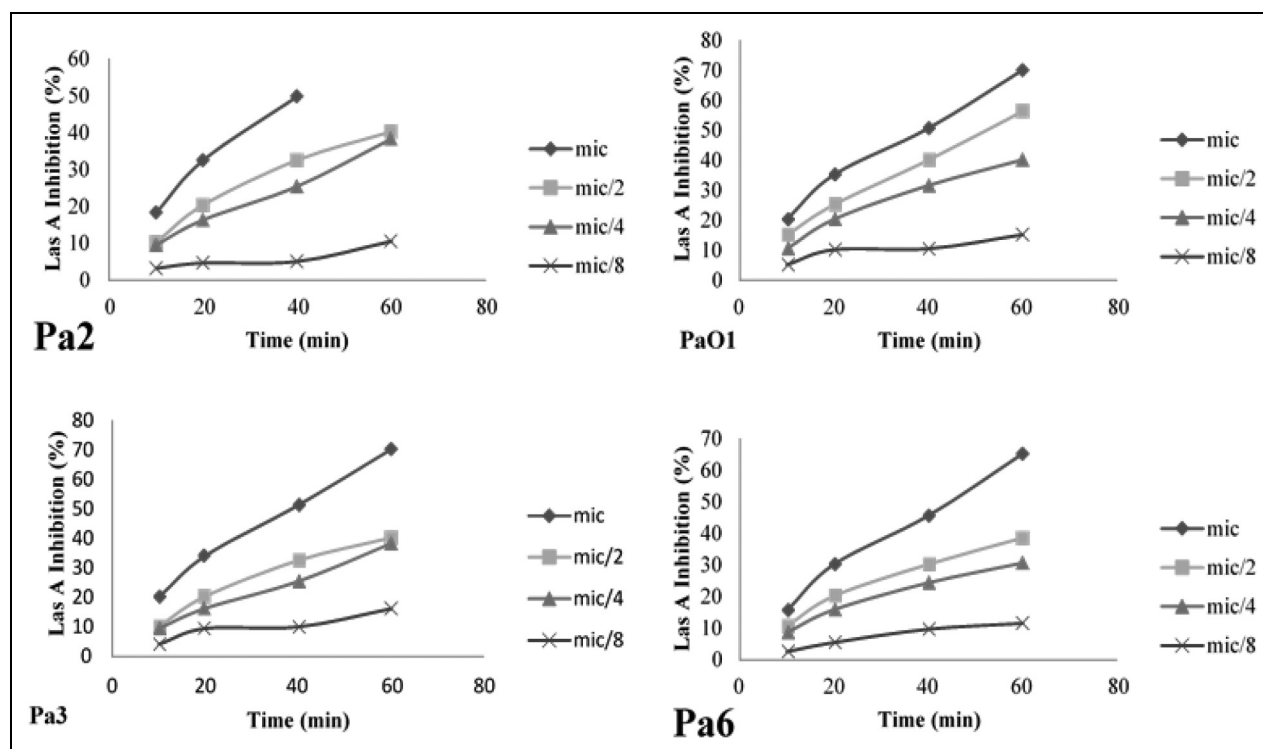


**Figure 4.** Quantitative analysis of EPS inhibition by measuring the absorbance at 490 nm.

in the chemical composition of EOs can lead to variations in their biological activities.<sup>69</sup> Though chemical studies on this plant from other regions are quite existent, investigations on biological activities are scarce.

The main objective of this study was to focus on the attenuation of virulence factors phenotypically expressed by *P. aeruginosa* strains isolated from patients suffering from pulmonary infections. Firstly, the antimicrobial activity of *C. munbyi* EO was

explored, and the MIC was determined to select sub-MICs in order to study their effects on growth and the inhibition of QS-regulated functions. The MIC of *C. munbyi* EO was found to be between 0.125% and 1%, consistent with previous studies and suggesting that the chemical compounds present in *C. munbyi* EO account for the antimicrobial effects.<sup>48</sup> The anti-biofilm effect of *C. munbyi* EO against *P. aeruginosa* evaluated on polystyrene and glass which are materials commonly



**Figure 5.** Inhibition of LasA staphylolytic activity by different concentrations of *C. munbyi* EO. The percentage of LasA inhibition was calculated with respect to control OD at 600 nm.

**Table 9.** Inhibition of LasA Staphylolytic Activity by Different Concentrations of *C. munbyi* EO.

Time (min)	LasA Inhibition (%)											
	MIC			MIC/2			MIC/4			MIC/8		
	20	40	60	20	40	60	20	40	60	20	40	60
<b>Pa01</b>	35.25 ± 0.03	50.68 ± 0.05	70.12 ± 0.03	25.27 ± 0.03	40.12 ± 0.02	56.37 ± 0.05	20.41 ± 0.05	31.65 ± 0.05	40.21 ± 0.04	10.21 ± 0.07	10.54 ± 0.06	15.25 ± 0.05
<b>Pa2</b>	32.54 ± 0.05	49.85 ± 0.06	69.35 ± 0.07	20.36 ± 0.06	32.54 ± 0.05	40.25 ± 0.03	16.35 ± 0.06	25.46 ± 0.06	38.36 ± 0.03	4.65 ± 0.15	5.05 ± 0.02	10.56 ± 0.11
<b>Pa3</b>	34.21 ± 0.06	51.32 ± 0.04	70.28 ± 0.09	24.65 ± 0.04	36.94 ± 0.04	46.87 ± 0.02	18.65 ± 0.05	28.65 ± 0.02	35.14 ± 0.04	9.51 ± 0.03	10.02 ± 0.10	16.21 ± 0.02
<b>Pa6</b>	30.24 ± 0.07	45.61 ± 0.04	65.24 ± 0.06	20.18 ± 0.05	30.21 ± 0.04	38.54 ± 0.05	15.84 ± 0.03	24.36 ± 0.05	30.64 ± 0.06	5.46 ± 0.01	9.68 ± 0.02	11.54 ± 0.04
<b>Pa16</b>	36.21 ± 0.03	51.48 ± 0.06	71.63 ± 0.04	26.32 ± 0.05	42.32 ± 0.06	50.46 ± 0.04	19.04 ± 0.04	30.08 ± 0.04	39.84 ± 0.05	10.54 ± 0.02	11.25 ± 0.15	31.21 ± 0.21

Data are reported as the percentage of residual pyocyanin inhibition after the *C. munbyi* EO treatment in comparison with untreated controls. The data represents mean values of three independent experiments.

used in medical devices, indicated interesting results. The findings showed a dose-dependent reduction in biofilm biomass for most of the strains tested and the inhibition percentages at same dose varied from one strain to another. This observation was equally valid at all stages of biofilm formation, whether in the pre-adhesion test by adding EO at the start of the microbial culture or after one hour of adhesion, or on the mature biofilm with the application of EO 24 h after its formation. However, EO was found to be less effective at eradicating mature biofilms than young biofilms, consistent with the fact that mature biofilms are known to be more resistant and difficult to remove than young biofilms and planktonic cells. These findings were confirmed by optical and electron microscopic observations. Optical microscope images showed very intensive biofilm formation on the control surface with the characteristic organization of cells in the early stages of adhesion, while only a few cells were observed on EO-treated surfaces. Scanning electron microscopy results revealed a significant reduction in young biofilms with distorted architecture and isolated microcolonies upon EO treatment for all strains tested. In addition, cells treated with *C. munbyi* EO showed slight cell shrinkage with changes in morphology compared to the untreated control. These effects may be attributed to the chemical composition of *C. munbyi* essential oil, and in particular to its major compound Terpinen-4-ol. A previous study, such as that carried out by Noumi et al 2018,<sup>52</sup> has demonstrated that Terpinen-4-ol disrupts biofilm production and simultaneously inhibits the adhesion of *S. aureus* to polystyrene and glass surfaces. Another more recent study carried out by Bose and co-workers also highlighted the potential of Terpinen-4-ol in the attenuation and formation of biofilms in *P. aeruginosa*.<sup>3</sup> This observed variability may be due to the individual sensitivity of bacterial strains to different compounds present in EOs. Different compounds may act synergistically or complementarily to disrupt biofilm formation, interfere with the extracellular matrix or inhibit cell communication.<sup>70,71</sup> Therefore, the ability of *C. munbyi* EO to reduce biofilm formation by inhibition, as shown in this study, is a good indication of its possible application in the elimination of resistance and virulence during infections.

It is well established that bacterial communication and secretion of virulence factors are related to QS-regulated phenotypes. In order to further understand the mechanism of attenuation of cell communication signals in *P. aeruginosa* called QS, by *C. munbyi* EO, an in vitro study based on competition with appropriate biosensor bacterial strains was carried out. *C. violaceum* CV12742, which produces purple pigmentation in response to QS, and *C. violaceum* CV026, which requires the addition of a specific hormone AHL to trigger a QS-mediated process were used and they represent signal emission and signal reception, respectively. It was observed that the sub-MIC of *C. munbyi* EO showed a pronounced interference in the production of violacein in *C. violaceum* CV12742 up to the MIC/16 concentration. Similarly, *C. munbyi* EO exerted anti-quorum sensing activity against *C. violaceum* CV026, reflected by a creamy halo

around the wells, while violacein inhibition was assessed by observing the absence of violet pigment. The ability of EOs to disrupt quorum sensing in bacteria may be a promising target for attenuating virulence and countering the progression of resistance. According to previous studies, anti-quorum sensing activity has been observed in several EOs and their main components,<sup>72</sup> including *Mentha piperita*,<sup>73</sup> *Syzygium aromaticum*,<sup>74,75</sup> *Rosmarinus officinalis*,<sup>76</sup> *Piper bredemeyeri*, *P. bogotense*, *P. brachypodom*,<sup>77</sup> and *Lippia alba*.<sup>78</sup> Many EOs have demonstrated good ability to inhibit QS activity on *C. violaceum*, even at their sub-MIC.<sup>79</sup> In a study conducted by Ramírez-Rueda and Salvador in (2020), the anti-quorum sensing activity of 24 EOs was evaluated on *C. violaceum* out of which 17 showed positive effects on violacein inhibition.<sup>18</sup> It is interesting to note that previous studies have already highlighted the anti-quorum sensing activity of certain EOs that share similar major compounds with *C. munbyi* EO namely *Citrus limon* ( $\gamma$ -terpinene 10.1%), *Eucalyptus polybractea* (p-cymene 25.5%),<sup>80</sup> *Citrus clementina* (sabinene 31.4%), *Melaleuca alternifolia* (Terpinene-4-ol 40.4%,  $\gamma$ -terpinene 19.5%, and p-cymene 4.7%)<sup>52</sup> *M. alternifolia* (Terpinene-4-ol 45.6%,  $\gamma$ -Terpinene 19.4%, and p-Cymene 7.6%).<sup>50</sup> Extensive studies have highlighted the potential of terpinene-4-ol to attenuate QS pathways through inhibition of long-chain AHLs.<sup>52,57</sup> These findings reinforce the idea that these compounds may play a key role in inhibiting QS and suppressing bacterial virulence activities.

Among the many colonization strategies employed by *P. aeruginosa* is the use of the flagellum to generate a rotational movement that enables it to swim in liquids such as water, culture media or lung secretions, moving towards sites of infection and colonizing surfaces. Swarming, on the other hand, is a form of movement that occurs on solid surfaces, such as culture plates or cell surfaces.<sup>8</sup> Swarming and flagellum-mediated swimming are QS-dependent virulence functions (regulated by the Rhl system) that play a crucial role in the initiation of cell/surface attachment during biofilm development in lung infections.<sup>25</sup> The attenuation and inhibition of these strategies may therefore guide the development of new therapeutic approaches and more effective preventive measures against lung infections caused by *P. aeruginosa*. The results in this study suggest that *C. munbyi* EO may have the ability to interfere with the QS system mediated by Las and Rhl, as well as with flagellum functions. A study by Ramírez-Rueda & Salvador showed swarming inhibition in the range of 85.7% to 100% compared to the control. *Coriidothymus capitatus* EO also strongly affected the swarming and swimming motility of *P. aeruginosa* in CF patients.<sup>7,18</sup> A maximal reduction in swarming motility was observed upon treatment with sub-MIC of *Cinnamomum tamala* EO.<sup>81</sup> Similar results were obtained with clove oil, where different concentrations significantly reduced swimming motility compared to the untreated control.<sup>73</sup> The antimotility effect of Terpinen-4-ol has already been described and the percentage inhibition of PA01 swarming was about 25% at a concentration of 100 g/mL of Terpinen-4-ol.<sup>52</sup> A significant reduction in swarming (33.3%),



twitching (50%) and swimming (25%) movements compared to the untreated control to the presence of sub-MIC (0.06%) of Terpinen-4-ol have been reported as well.<sup>3</sup>

Pyocyanin production also contributes to *P. aeruginosa* virulence factors. One of the main mechanisms by which pyocyanin contributes to virulence is its ability to interfere with numerous cellular functions in host cells via an oxidative process; this causes oxidative damage to cellular components, cell membrane damage, DNA degradation, protein inactivation.<sup>82</sup> It can also alter cellular signaling pathways, leading to an exacerbated inflammatory response in the respiratory tract.<sup>24</sup> Furthermore, this green pigment, whose production is controlled by QS, is also involved in suppressing the ciliary activity of respiratory epithelial cells, thus compromising mucociliary clearance, an important pulmonary defense mechanism against pathogens. This promotes the persistence of *P. aeruginosa* in the airways, leading to more severe colonization and infection.<sup>83</sup> The results of our study undoubtedly demonstrated a significant decrease in pyocyanin production for all strains tested in the presence of *C. munbyi* EO. This observation strongly suggests a possible interference of EO with the activation and regulation of the QS system in *P. aeruginosa*. Several previous studies have reported a reduction in pyocyanin production following the use of EOs and extracts from various plants. The results of a previous study showed a 75% reduction in pyocyanin production in *P. aeruginosa* strains treated with *Micromeria thymifolia* EO, which contains numerous phytochemicals, including Terpinen-4-ol.<sup>17</sup> More recently, Terpinen-4-ol was shown to be able to inhibit pyocyanin production by 33% to 96% efficiency.<sup>3</sup>

EPS is one another virulence factor of *P. aeruginosa*, which facilitates the formation of biofilms and promoting the chronicity of infections.<sup>33,84</sup> In the present study, *C. munbyi* EO significantly inhibited the EPS production of *P. aeruginosa* PA01 and clinical strains. Decreased EPS production can potentially disrupt biofilm architecture and consequently, lead to good antibiotic penetration. Our results are comparable to some reported data which indicated that *M. piperita* EO at a concentration of 3% v/v exhibits 76% decrease in EPS production in PA01.<sup>37</sup> Similarly, Sankar and co-workers showed a reduction in the EPS production of pathogens tested in *P. aeruginosa* PA01 by *M. koenigii* EO and *T. bellerica* plant extract.<sup>57</sup> Interestingly, *C. munbyi* EO was also able to reduce the Las A staphylolytic activity of *P. aeruginosa* isolates. The Las A protease is an endopeptidase secreted under the control of the QS and has the ability to cleave the pentaglycine bridge present in the peptidoglycan of *S. aureus* cell walls and degrade infected tissues, thereby promoting bacterial invasion.<sup>63</sup> Previous studies have demonstrated that certain EOs and plant extracts can have a neutralizing effect on Las A protease activity in *P. aeruginosa*. Similarly, *M. koenigii* EO and *C. tamala* EO showed a 63.1% and 76% reduction respectively in Las A protease staphylolytic activity in Pa01.<sup>22,81</sup>

This study may involve some limitations. This include the detailed genetic identification of clinical strains and the resistant genes that may be involved. Equally, the poor solubility of essential oil in water can affect the bioassays.

## Conclusion

Microbial infections and resistance to antibiotics is a serious health problem that needs urgent response. The research for new antibiotics with different mechanisms of action attracts the attention of many researchers. *Pseudomonas aeruginosa* is a highly pathogenic bacterium, resistant to several antibiotics and causes infections in the lungs (pneumonia), blood, urinary tract and many other organs. It is also involved in various nosocomial infections and expresses virulence factors and forms resistant biofilms. In this study, essential oil from endemic plant *Cistus munbyi* from Algeria was obtained by hydrodistillation in good yields and characterized by GC-MS.  $\alpha$ -Thujene, Sabinene, p-Cymene,  $\gamma$ -Terpinene, and Terpinen-4-ol were found to be the major constituents. The essential oil had good antimicrobial, antibiofilm and anti-QS effects against various clinical strains of *P. aeruginosa*. Given the promising results obtained from clinical strains of *P. aeruginosa* isolated from patients with pulmonary infections, *C. munbyi* EO could be considered as a candidate for the development of new therapeutic approaches and more effective preventive measures against this type of infection. Therefore, further research is needed to better understand the mechanisms of action of *C. munbyi* EO compounds and their efficacy in inhibiting quorum sensing pathways, reducing virulence and preventing biofilm formation in *P. aeruginosa*, in order to develop targeted and more effective approaches to deal with this pathogen.

## Acknowledgments

This work is supported by the General Directorate for Scientific Research and Technological Development (DGRSDT), Algeria.

## Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Ethical Approval


Ethical approval is not applicable for this article.


## Funding


The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.


## ORCID iDs

Asma Benaissa  <https://orcid.org/0000-0002-9163-5858>

Abdelmounaim Khadir  <https://orcid.org/0000-0002-5707-6685>

Alfred Ngenge Tamfu  <https://orcid.org/0000-0001-6683-3337>

Fethi Benbelaid  <https://orcid.org/0000-0003-4024-4846>

Sameh Boudiba  <https://orcid.org/0000-0001-5629-195X>

## Statement of Human and Animal Rights

This article does not contain any studies with human or animal subjects.

## Statement of Informed Consent

There are no human subjects in this article and informed consent is not applicable.

## Supplemental Material

Supplemental material for this article is available online.

## References

- Qin S, Xiao W, Zhou C, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):199. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
- Tamfu AN, Ceylan O, Fru GC, Ozturk M, Duru ME, Shaheen F. Antibiofilm, anti-quorum sensing and antioxidant activity of secondary metabolites from seeds of *Annona senegalensis*, Persoon. *Microb Pathog*. 2020;144:104191. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104191>
- Bose SK, Chauhan M, Dhingra N, Chhibber S, Harjai K. Terpinen-4-ol attenuates quorum sensing regulated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol*. 2020;15(2):127-142. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0204>
- Moyne O, Castelli F, Bicout DJ, et al. Metabotypes of *Pseudomonas aeruginosa* correlate with antibiotic resistance, virulence and clinical outcome in cystic fibrosis chronic infections. *Metabolites*. 2021;11(2):63. <https://doi.org/10.3390/metabo11020063>
- Tamfu AN, Kocak G, Ceylan O, Valentine F, Bütün V, Çiçek H. Synthesis of cross-linked diazaborine-based polymeric microparticles with anti-quorum sensing, anti-swarming, antimicrobial, and antibiofilm properties. *J Appl Polym Sci*. 2023;140(11):e53631. <https://doi.org/10.1002/app.53631>
- Tamfu AN, Ceylan O, Kucukaydin S, Duru ME. HPLC-DAD phenolic profiles, antibiofilm, anti-quorum sensing and enzyme inhibitory potentials of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze and *Curcuma longa* L. *LWT-Food Sci Technol*. 2020;133:110150. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110150>
- Vrenna G, Artini M, Ragno R, et al. Anti-virulence properties of coridothymus capitatus essential oil against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from cystic fibrosis patients. *Microorganisms*. 2021; 9(11):2257. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112257>
- Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Venturi V. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev*. 2006;30(2):274-291. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00012.x>
- Boudiba S, Tamfu AN, Hanini K, et al. Synthesis of a new diarylhydrazone derivative and an evaluation of its in vitro biofilm inhibition and quorum sensing disruption along with a molecular docking study. *J Chem Res*. 2023;47(4):17475198231184603.
- Tamfu AN, Ceylan O, Cârâc G, Talla E, Dinica RM. Antibiofilm and anti-quorum sensing potential of cycloartane-type triterpene acids from Cameroonian grassland propolis: phenolic profile and antioxidant activity of crude extract. *Molecules*. 2022;27(15):4872. <https://doi.org/10.3390/molecules27154872>
- Gökalsın B, Berber D, Sesal NC. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and biofilm inhibition. In: *Quorum sensing*. Elsevier; 2019: 227-256. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814905-8.00009-5>
- Ikome HN, Tamfu AN, Abdou JP, et al. Disruption of biofilm formation and quorum sensing in pathogenic bacteria by compounds from *Zantboxylum gilletti* (De Wild) PG Waterman. *Appl Biochem Biotechnol*. 2023;195:6113-6131. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04380-6>
- Boudiba S, Tamfu AN, Berka B, et al. Anti-quorum sensing and antioxidant activity of essential oils extracted from Juniperus species, growing spontaneously in Tebessa region (east of Algeria). *Nat Prod Commun*. 2021;16(6):1934578X211024039. <https://doi.org/10.1177/1934578X211024039>
- Khalifa ABH, Moissenet D, Thien HV, Khedher M. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations. Paper presented at: Annales de biologie clinique 2011.
- Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55(1):165-199.
- Talla RM, Tamfu AN, Wakeu BNK, et al. Evaluation of anti-quorum sensing and antibiofilm effects of secondary metabolites from *Gambeya lacourtiana* (De Wild) Aubr. & Pellegr against selected pathogens. *BMC Complement Med Ther*. 2023;23(1):300.
- Y Ramírez-Rueda R, Salvador MJ. Phenotypic detection of quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine and swarming by volatile organic products. *Future Microbiol*. 2020; 15(12):1147-1156. <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0033>
- Sırken B, Öz V, Erol İ. Quorum sensing systems, related virulence factors, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from fish. *Arch Microbiol*. 2021;203:1519-1528. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02159-5>
- Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. 2015;6(1):26-41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>
- Ahmed SA, Rudden M, Smyth TJ, Dooley JS, Marchant R, Banat IM. Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019;103:3521-3535. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09618-0>
- Ganesh PS, Rai VR. Attenuation of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation by medicinal plants against antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Tradit Complement Med*. 2018;8(1):170-177.
- Pearson JP, Gray KM, Passador L, et al. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(1):197-201. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.197>

24. Rada B, Leto TL. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends Microbiol.* 2013;21(2):73-81. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.10.004>
25. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
26. Bukvički D, Cirić A, Soković M, et al. *Micromeria thymifolia* essential oil suppresses quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Prod Commun.* 2016;11(12):1934578X1601101232. <https://doi.org/10.1177/1934578X1601101232>
27. Tamfu AN, Ceylan O, Kucukaydin S, Ozturk M, Duru ME, Dinica RM. Antibiofilm and enzyme inhibitory potentials of two annonaceous food spices, African pepper (*Xylopia aethiopica*) and African nutmeg (*Monodora myristica*). *Foods.* 2020;9(12):1768. <https://doi.org/10.3390/foods9121768>
28. Ceylan O, Tamfu AN, Doğaç Yİ, Teke M. Antibiofilm and anti-quorum sensing activities of polyethylene imine coated magnetite and nickel ferrite nanoparticles. *3 Biotech.* 2020;10(12):513. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02509-6>
29. Doğaç Yİ, Tamfu AN, Bozkurt S, Kayhan M, Teke M, Ceylan O. Inhibition of biofilm, quorum-sensing, and swarming motility in pathogenic bacteria by magnetite, manganese ferrite, and nickel ferrite nanoparticles. *Biotechnol Appl Biochem.* 2023:1-16. <https://doi.org/10.1002/bab.2545>
30. Haouam C, Boudiba S, Tamfu AN, et al. Assessment of chemical composition and in vitro antioxidant, antidiabetic, anticholinesterase and microbial virulence-quenching effects of salad burnet (*Sanguisorba minor* L.) harvested from Algeria. *Plants.* 2023; 12(24):4134.
31. Popova M, Gerginova D, Trusheva B, et al. A preliminary study of chemical profiles of honey, cerumen, and propolis of the African stingless bee *Meliponula ferruginea*. *Foods.* 2021;10(5):997.
32. Lund-Palau H, Turnbull AR, Bush A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10(6):685-697. <https://doi.org/10.1080/17476348.2016.1177460>
33. Tuon FF, Dantas LR, Suss PH, Tasca Ribeiro VS. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a review. *Pathogens.* 2022;11(3):300. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>
34. Thomsen K, Hoiby N, Jensen PØ, Ciofu O, Moser C. Immune response to biofilm growing pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Biomedicines.* 2022;10(9):2064. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092064>
35. Ha D-G, O'Toole GA. C-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review. *Microbial Biofilms.* 2015;3(2):301-317. <https://doi.org/10.1128/9781555817466.ch15>
36. Yeung AT, Torfs EC, Jamshidi F, et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is controlled by a broad spectrum of transcriptional regulators, including MetR. *J Bacteriol.* 2009;191(18):5592-5602. <https://doi.org/10.1128/jb.00157-09>
37. Husain FM, Ahmad I, Khan MS, et al. Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of gram-negative bacteria. *Front Microbiol.* 2015;6:420. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00420>
38. Alain KY, Tamfu AN, Kucukaydin S, et al. Phenolic profiles, antioxidant, anti-quorum sensing, antibiofilm and enzyme inhibitory activities of selected Acacia species collected from Benin. *LWT.* 2022;171:114162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114162>
39. Tamfu AN, Munvera AM, Botezatu AVD, et al. Synthesis of benzoyl esters of  $\beta$ -amyryn and lupeol and evaluation of their antibiofilm and antidiabetic activities. *Results Chem.* 2022;4:100322. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100322>
40. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 2003;5(13):1213-1219. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.08.009>
41. Firenzuoli F, Gori L. Herbal medicine today: clinical and research issues. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2007;4(S1):37-40. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem096>
42. Masyita A, Sari RM, Astuti AD, et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chem X.* 2022;100217. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>
43. Valdivieso-Ugarte M, Gomez-Llorente C, Plaza-Díaz J, Gil Á. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: a systematic review. *Nutrients.* 2019;11(11):2786. <https://doi.org/10.3390/nu11112786>
44. Camele I, Elshafie HS, Caputo L, De Feo V. Anti-quorum sensing and antimicrobial effect of Mediterranean plant essential oils against phytopathogenic bacteria. *Front Microbiol.* 2019;10:2619. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02619>
45. Papaefthimiou D, Papanikolaou A, Falara V, Givanoudi S, Kostas S, Kanellis AK. Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes' biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Front Chem.* 2014;2:35. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00035>
46. Zalegh I, Akssira M, Bourhia M, et al. A review on *Cistus* sp.: phytochemical and antimicrobial activities. *Plants.* 2021;10(6):1214. <https://doi.org/10.3390/plants10061214>
47. Tomou E-M, Lytra K, Rallis S, Tzakos AG, Skaltsa H. An updated review of genus *Cistus* L. since 2014: traditional uses, phytochemistry, and pharmacological properties. *Phytochem Rev.* 2022;21(6):2049-2087. <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09827-y>
48. Benbelaïd F, Khadir A, Bendahou M, Abdoune MA, Muselli A, Costa J. Composition and antimicrobial activity of *Cistus munbyi* essential oil: an endemic plant from Algeria. *J Forestry Res.* 2017; 28(6):1129-1134. <https://doi.org/10.1007/s11676-017-0387-6>
49. Quézel P, Santa S. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. *Tome.* 1962;1:460.
50. Alfred Ngenge T, Kucukaydin S, Ceylan O, Duru ME. Evaluation of enzyme inhibition and anti-quorum sensing potentials of *Melaleuca alternifolia* and *Citrus sinensis* essential oils. *Nat Prod Commun.* 2021;16(9):1934578X211044565. <https://doi.org/10.1177/1934578X211044565>
51. Tamfu AN, Tagatsing F, Talla E, et al. Chemical composition and evaluation of anticholinesterase activity of essential oil from Cameroonian propolis. *Issues Biol Sci Pharm Res.* 2019;7(3):58-63. <https://doi.org/10.15739/ibspr.19.007>

52. Noumi E, Merghni A, Alreshidi MM, et al. *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: models for evaluating anti-quorum sensing activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its main component terpinen-4-ol. *Molecules*. 2018;23(10):2672. <https://doi.org/10.3390/molecules23102672>
53. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.11.005>
54. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne*, 2017; PA. p. 106-112.
55. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE*. 2011;47:e2437. <https://dx.doi.org/10.3791/2437>
56. Fadila M. Evaluation of a non-submerged cultivation assay combined to ESEM imaging for analysis of biofilms formed by dairy-associated sporeforming bacteria. *Afr J Microbiol Res*. 2016; 10(32):1263-1273. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8203>.
57. Sarkar R, Chaudhary SK, Sharma A, et al. Anti-biofilm activity of Marula—a study with the standardized bark extract. *J Ethnopharmacol*. 2014;154(1):170-175. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.067>.
58. Tamfu AN, Boukhedena W, Boudiba S, Deghboudj S, Ceylan Ö. Synthesis and evaluation of inhibitory potentials of microbial biofilms and quorum sensing by 3-(1, 3-dithian-2-ylidene) pentane-2, 4-dione and ethyl-2-cyano-2-(1, 3-dithian-2-ylidene) acetate. 2022. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.69.e87834>.
59. Koh KH, Tham F-Y. Screening of traditional Chinese medicinal plants for quorum-sensing inhibitors activity. *J Microbiol Immunol Infect*. 2011;44(2):144-148. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2009.10.001>
60. Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford I. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol*. 1990;172(2): 884-900. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.884-900.1990>.
61. Huston AL, Methe B, Deming JW. Purification, characterization, and sequencing of an extracellular cold-active aminopeptidase produced by marine psychrophile *Colwellia psychrerythraea* strain 34H. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70(6):3321-3328. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3321-3328.2004>.
62. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers P, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*. 1956;28(3):350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
63. Kessler E, Safrin M, Olson JC, Ohman DE. Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J Biol Chem*. 1993;268(10):7503-7508. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53203-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53203-8)
64. Karuppiah V, Thirunanasambandham R, Thangaraj G. Anti-quorum sensing and antibiofilm potential of 1,8-cineole derived from *Musa paradisiaca* against *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *World J Microbiol Biotechnol*. 2021;37(4):1-12. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03029-y>
65. Harrison AM, Soby SD. Reclassification of *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 and its quorum biosensor mutant CV026 to *Chromobacterium subtsugae*. *Amb Express*. 2020;10(1):1-7. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01140-1>
66. Jayaseelan S, Ramaswamy D, Dharmaraj S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014;30:1159-1168. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1552-5>
67. Gorlenko CL, Kiselev HY, Budanova EV, Zamyatin Jr AA, Ikryannikova LN. Plant secondary metabolites in the battle of drugs and drug-resistant bacteria: new heroes or worse clones of antibiotics? *Antibiotics*. 2020;9(4):170. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040170>
68. Koh C-L, Sam C-K, Yin W-F, et al. Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds. *Sensors*. 2013;13(5):6217-6228. <https://doi.org/10.3390/s130506217>
69. Ni Z-J, Wang X, Shen Y, et al. Recent updates on the chemistry, bioactivities, mode of action, and industrial applications of plant essential oils. *Trends Food Sci Technol*. 2021;110:78-89. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.070>
70. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R. Quorum sensing and phytochemicals. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):12607-12619. <https://doi.org/10.3390/ijms140612607>
71. Rossi C, Chaves-López C, Serio A, Casaccia M, Maggio F, Paparella A. Effectiveness and mechanisms of essential oils for biofilm control on food-contact surfaces: an updated review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022;62(8):2172-2191. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1851169>
72. Asfour HZ. Anti-quorum sensing natural compounds. *J Microsc Ultrastruct*. 2018;6(1):1. [https://doi.org/10.4103%2FJMAU.JMAU\\_10\\_18](https://doi.org/10.4103%2FJMAU.JMAU_10_18)
73. Husain FM, Ahmad I, Asif M, Tahseen Q. Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *J Biosci*. 2013; 38(5):835-844. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9385-9>
74. Ganesh PS, Rai VR. Evaluation of anti-bacterial and anti-quorum sensing potential of essential oils extracted by supercritical CO<sub>2</sub> method against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Essential Oil Bearing Plants*. 2015;18(2):264-275. <https://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2015.1025295>.
75. Nakagawa S, Hillebrand GG, Nunez G. *Rosmarinus officinalis* l. (rosemary) extracts containing carnosic acid and carnosol are potent quorum sensing inhibitors of staphylococcus aureus virulence. *Antibiotics*. 2020;9(4):149. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.08.008>
76. Olivero V JT, Pájaro C NP, Stashenko E. Antiquorum sensing activity of essential oils isolated from different species of the genus Piper. *Vitae*. 2011;18(1):77-82. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300001>
77. Olivero-Verbel J, Barreto-Maya A, Bertel-Sevilla A, Stashenko EE. Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*. *Braz J Microbiol*. 2014;45:759-767. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000300001>
78. Poli J-P, Guinoiseau E, de Rocca Serra D, et al. Anti-quorum sensing activity of 12 essential oils on *chromobacterium violaceum* and specific action of cis-cis-p-menthenolide from corsican

- Mentha suaveolens* ssp. *Insularis*. *Molecules*. 2018;23(9):2125. <https://doi.org/10.3390/molecules23092125>
79. Ngeenge A, Ceylan O, Fru G, Arab Y, Emin D, Ozturk M. Antimicrobial, antibiofilm, anti-quorum sensing and motility inhibition activities of essential oil from seeds of food spice *Xylopiya aethiopica* (Dunal) A. Rich. on some pathogenic bacteria. *Res J Biotechnol*. 2021;16:68-76.
80. Farisa Banu S, Rubini D, Rakshitaa S, et al. Antivirulent properties of underexplored Cinnamomum tamala essential oil and its synergistic effects with DNase against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms—an in vitro study. *Front Microbiol*. 2017;8:1144. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01144>
81. Hall S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, et al. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel)*. 2016;8(8):236. <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1044SO>
82. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen–host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(11):1209-1223. <https://doi.org/10.1164/rccm.200408-1044SO>
83. Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microb Ecol*. 2014;68:1-12. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0297-x>
84. Adonizio A, Kong K-F, Mathee K. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(1):198-203. <https://doi.org/10.1128/aac.00612-07>