REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHESCIENTIFIQUE UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET AGRONOMIQUES DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET DE MICROBIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie

Option : **Biotechnologie microbienne**

Thème

Activité antibiofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. contre deux souches de *Klebsiella pneumoniae.*

Réalisé par

BOUZID Feriel

LAMARA Belaid

Promoteur : Pr. HOUALI

Encadreur : Dr. BARIZ

Membres du jury

Dr. SEBBANE	Maitre de conférences B	Président	UMMTO
Dr. MSELA	Maitre de conférences B	Examinateur	UMMTO

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

Nous voudrions avant toute chose adresser nos remerciements aux membres du jury, en l'occurrence Monsieur Sebbane Hilal et Monsieur Msela Amine de nous avoir fait l'honneur d'évaluer notre travail.

Nous tenons également à exprimer nos sincères et profonds remerciements au Professeur Houali Karim qui nous a fait l'honneur de nous encadrer, pour nous avoir ouvert les portes du laboratoire de recherche de Biochimie Approfondie et de Biotechnologie, pour nous avoir soutenus, encouragé et tant appris.

Nous exprimons toute notre gratitude pour notre co-encadreur le Docteur Bariz Karim, pour tous les efforts qu'il a fournis, pour son intérêt, sa disponibilité et les enseignements qu'il nous a apportés durant la réalisation de ce projet de fin d'études.

Nos remerciements s'adressent également à Monsieur Moualek Idir, Monsieur Titouche Yacine, Madame Lahcen Souad ainsi que toute l'équipe du laboratoire pour leur aide, leur soutien et leur sympathie.

Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu à mes chers parents qui ont toujours su m'épauler, qui m'ont appris le sens de la persévérance, qui ont fait surgir mes meilleures qualités et sans qui tout effort aurait été vain.

En deuxième lieu, à mes grands-parents qui m'ont choyée jusqu'à l'âge adulte, qui m'ont comblée d'amour et d'affection et pour qui j'ai toujours été la lueur du bout du tunnel.

En troisième lieu, à ma sœur et à mon frère qui m'ont accompagnée durant toutes mes épreuves et pour qui je représente une source de motivation.

En quatrième lieu, à mes tantes et oncles qui m'ont aidée à me forger de courage et d'espoir et à être la personne que je suis devenue.

Enfin, à mes chères amies Lydia et Melissa qui m'ont apportée aide et soutien lors de la réalisation de ce travail.

Feriel

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes parents bien aimés, sans qui je ne serais jamais là où je suis, qui m'ont soutenu et encouragé au long de ces longues années d'études.

Qu'ils y trouvent toute ma gratitude et ma sincère reconnaissance.

A mes grands-parents, à mes sœurs, et à mes amis qui ont partagé avec moi les meilleurs et les pires moments de mon cursus, avec tous mes vœux de succès.

A ma tante et à mon cousin qui m'ont offert un toit loin de ma famille pour poursuivre mes études dans les meilleures conditions.

A ma famille, à mes proches.

A tous ceux que j'aime et qui me le rendent bien.

Belaid

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Biofilm

I.Généralités 2

I.1.Définition d'un biofilm.....2

I.2.Historique.....3

II.Mécanisme de formation d'un biofilm.....4

II.1.Etapes de formation.....4

II.1.1.Attachement réversible 4

II.1.2.Attachement irréversible.....5

II.1.3.Biofilm mature 5

II.1.4.Dispersion 5

II.2.Quorum sensing 6

III.Biofilm formé par *Klebsiella pneumoniae*.....8

III.1.Généralités sur *Klebsiella pneumoniae*.....8

III.1.1.Définition.....8

III.1.2.Systématique.....9

III.1.3.Caractères morphologiques te culturaux 10

III.1.4.Caractères biochimiques.....11

Table des matières

III.1.5.Virulence et résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella pneumoniae* 11

IV.Biofilm chez *Klebsiella pneumoniae* 15

Chapitre II : Caractéristiques et activité antibiofilm de l'huile essentielle du laurier noble

I.Laurier noble dans la mythologie grecque 18

II.Généralités 19

II.1.Plante du laurier noble 19

II.2.Vertus du laurier noble 20

II.3.Huile essentielle du laurier noble 21

III.Activité antibiofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L 22

III.1.Activité antibactérienne 23

III.2.Activité antibiofilm 23

Partie II : Partie expérimentale

Matériel et méthode

I.Matériel 25

I.1.Plante 25

I.2.Souches bactériennes 26

II.Méthode 26

II.1.Distillation par entrainement à la vapeur 26

II.2.Test de formation de biofilm 28

II.2.1.Revivification des souches bactériennes 28

II.2.2.Ensemencement 28

II.2.3.Préparation des suspensions bactériennes 29

Table des matières

II.2.4.Formation du biofilm.....29

II.3.Détermination des CMI 30

II.3.1.Préparation de la solution mère de l'huile essentielle du laurier 30

II.3.2.Test des CMI.....30

II.4.Activité antibiofilm de l'huile essentielle du laurier.....31

II.4.1.Préparation des suspensions bactériennes 31

II.4.2.Inhibition du développement du biofilm 32

Résultats et discussion

I.Rendement et densité de l'huile essentielle 33

II.Evaluation quantitative de la formation des biofilms par *Klebsiella pneumoniae* A et *Klebsiella pneumoniae* B 33

III.Détermination de la CMI.....34

IV.Evaluation de l'activité inhibitrice de la formation du biofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L 35

Conclusion.....37

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

EPS: exo-polysaccharide.

QS: Quorum Sensing.

AHL: N-acyl homoserine lactones.

AI: auto-inducteurs.

WGS: whole generation sequencing/ séquençage du genome entier.

KP: *Klebsiella pneumonia.*

VP: Voges-Proskauer.

ONPG: ortho-nitrophényl-β-galactoside.

ODC: ornithine décarboxylase.

LDC: lysine décarboxylase.

AMR: antimicrobial resistance.

HGT: transferts génétiques horizontaux.

MDR: multi-drug resistant.

Hp: hyper-virulent.

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapénèmase.

CRKP: carbapenem resistant *Klebsiella pneumonia.*

LPS: lipopolysaccharide.

TLR: toll-like receptor.

C6-AHL: N-hexanoyl-homoserine lactone.

C-di-GMP: cyclic-di-GMP.

LABAB : Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies.

ATP: adenosine triphosphate.

ADN: acide désoxyribonucléique.

Liste des abréviations

BHIB : bouillon cœur-cervelle.

MH : Mueller-Hinton.

DO : Densité optique.

Liste des figures

Figure 01 : Biofilm dans un milieu hospitalier 2

Figure 02 : Frottis d'un biofilm de patient atteint de mucoviscidose, infection à *Pseudomonas aeruginosa* observée au microscope optique au grossissement 1000 3

Figure 03 : Etapes de formation d'un biofilm.....6

Figure 04 : Comportement bactérien face à différentes concentrations d'auto-inducteurs.....7

Figure 05 : Contrôle de la formation d'un biofilm chez les bactéries à Gram négatif.....8

Figure 06 : Contrôle de la formation d'un biofilm via le QS chez les bactéries à Gram positif.....8

Figure 07 : Aspect des colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur MacConkey 9

Figure 08 : Position taxonomique de *Klebsiella pneumoniae* 10

Figure 09 : Répartition géographique des souches résistantes aux carbapénèmes chez *Klebsiella pneumoniae* 13

Figure 10 : Acquisition des gènes de résistance contre quelques antibiotiques chez *Klebsiella pneumoniae* à travers le temps 14

Figure 11 : Présentation schématique des facteurs de virulence chez *Klebsiella pneumoniae* .15

Figure 12 : Représentation des sous unités protéiques impliquées dans l'assemblage du fimbriae de type 3.....16

Figure 13 : Interactions entre les sous unités mrkA, mrkH et mrkI à des concentrations basses et élevées de c-di-GMP.....16

Figure 14 : Facteurs impliqués dans la formation d'un biofilm chez *Klebsiellapneumoniae* ...17

Figure 15 : Arbre de laurier noble.....20

Figure 16 : Feuilles de laurier noble sèches.....20

Figure 17 : Graphiques démontrant l'activité d'eugénol. A) l'activité antibiofilm à différentes concentrations d'eugénol. B) expression et répression de 5 gènes en présence et en absence d'eugénol 24

Liste des figures

Figure 18 : Modification de la morphologie cellulaire à différentes concentrations d'eugénol 24

Figure 19 : Feuilles de laurier noble.....26

Figure 20 : Dispositif de distillation.....27

Figure 21 : Culture de *Klebsiella pneumoniae* sur gélose MacConkey 28

Figure 22 : Plaque ELISA avant incubation 31

Figure 23 : Plaque ELISA après incubation de 4h.....32

Figure 24 : Détermination de la CMI sur microplaque au moyen de la résazurine 34

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L 22

Tableau II : Densités optiques à une longueur d'onde de 560 nm des biofilms formés après 4h d'incubation par *Klebsiella pneumoniea* A et *Klebsiella pneumoniae* B après l'ajout des dilutions semi-logarithmiques de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L 35

Tableau III : Appareillage et autre matériel utilisé.

Tableau IV : Composition chimique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L.

Introduction

Etant donné que les biofilms lors de leur attachement irréversible à un support biotique ou abiotique deviennent impossible à éradiquer, l'inhibition de leur formation devient de plus en plus critique surtout après l'émergence de l'antibiorésistance. Parmi les souches bactériennes formant les biofilms, *Klebsiella pneumoniae* représente un cas d'étude assez complexe en raison des transferts génétiques horizontaux qui ont donné naissance à des souches AMR et MDR, présentant de plus en plus de pathogénicité et d'infectiosité avec un taux de mortalité élevé à travers le monde **(Wyres *et al.*, 2020)**.

Les souches multi-résistances présentent également une virulence significative avec un système de protection contre la phagocytose. Les médiateurs du QS dans un biofilm de *Klebsiella pneumoniae* renforcent la résistance par la synthèse de toxines et d'enzymes lytiques **(Cadavid et Echeverri, 2019)**.

Afin de remédier à ce problème, les nouvelles recherches sont dirigées vers l'élaboration de nouvelles molécules longtemps utilisées en médecine traditionnelle.

Le laurier noble ou laurier d'Apollon présente de nombreuses vertus thérapeutiques et est utilisé depuis la nuit des temps surtout en infusion pour le traitement de certaines pathologies.

Toutefois, les bienfaits du laurier ne se résument pas qu'à ça, il est d'ailleurs de plus en plus utilisé dans le domaine agro-alimentaire, cosmétique, pharmaceutique et médical pour son moindre coût et l'absence d'effets secondaires. Les différents composants de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. lui confèrent plusieurs activités biologiques telles que l'activité antibiofilm en agissant sur la perméabilité des membranes cellulaires **(El-Tarabily *et al.*, 2021)**.

L'huile essentielle du laurier, est-elle efficace sur les biofilms formés par les souches « Multi-drug resistant » de *Klebsiella pneumoniae* ? Quels seraient les composants impliqués dans cette activité ? Et comment agissent-ils sur le biofilm ?

Ce travail a été réalisé, justement, dans le but d'évaluer l'activité antibiofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. contre *Klebsiella pneumoniae* A et *Klebsiella pneumoniae* B.

PARTIE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tout comme chaque organisme vivant sur terre a des besoins physiologiques nécessaires pour le maintien et la perpétuation de l'espèce ; les microorganismes sont également conditionnés par leur instinct de surviequi les pousse à réagir en situation de stress afin d'éviter l'arrêt de leur croissance et les dommages cellulaires. A cet effet, les microorganismes adoptent différents mécanismes de réponse aux stress, la formation de biofilms en est un parmi tant d'autres.

I. Généralités

I.1. Définition d'un biofilm

Un biofilm est une communauté microbienne de même ou de différentes espèces qui lors de conditions défavorables dans le milieu colonisent un support biotique ou abiotique afin de s'adapter au stress environnemental et se retrouvent ainsi piégées dans un réseau formé par leur matrice extracellulaire dit exo-polysaccharide « EPS » qui les protègecontre les agressions externes **(Ruhal et Kataria, 2021) (Figure 01)**.

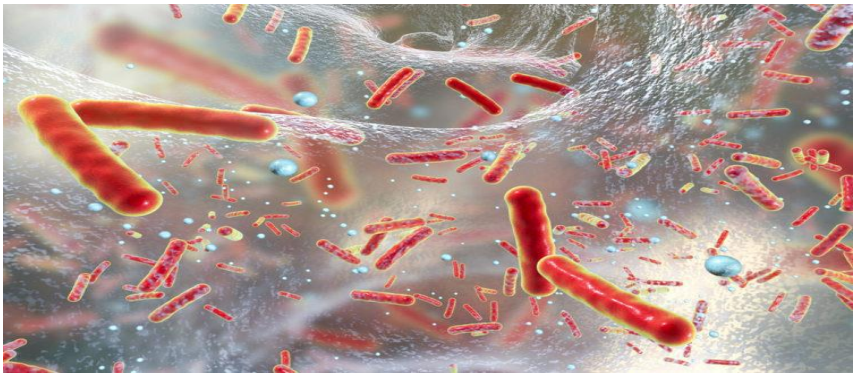

Figure 01 : Biofilm dans un milieu hospitalier **(Vanzieleghem, 2021).**

Selon Costerton, un biofilm est un assemblage de cellules bactériennes attachées irréversiblement à un support ou à une interface enveloppée dans une matrice de substances polymériques extracellulaires produites par les bactéries elles-mêmes, et qui présentent un phénotype différent de celui des bactéries planctoniques, au niveau du taux de croissance et de la transcription des gènes.

I.2. Historique

La toute première observation des biofilms remonte aux années 1600-1700 lorsque Van Leeuwenhoek avait remarqué des agrégats de microbes sur ses propres dents. Ensuite, vers les années 1800, Louis Pasteur a observé des amas microbiens qui acidifiaient le vin. A cette époque-là, les biofilms ne suscitaient pas l'intérêtqu'ils représentent aujourd'hui. Le terme « film »a été utilisé pour la première fois dans le domaine de la microbiologie marine et ce n'est qu'en 1922 qu'Angst a déclaré dans son rapport que les bactéries étaient responsables des couches visqueuses se formant sur les navires. A cet effet, Henrici a réalisé une étude microscopique sur les biofuling et s'est rendu compte que ces bactéries étaient attachées aux surfaces. Dans le domaine de lamédecine, la découverte des biofilms remonte à 1977 lorsque des biopsies de patients atteints de fibrose kystique ont été analysées par microscopie, des biofilms de *Pseudomonas aeuriginosa*ont été formés au niveau des poumons de ces patients **(Hoiby, 2017)**. La première image d'un biofilm dans le domaine hospitalier est illustrée ci-dessous :

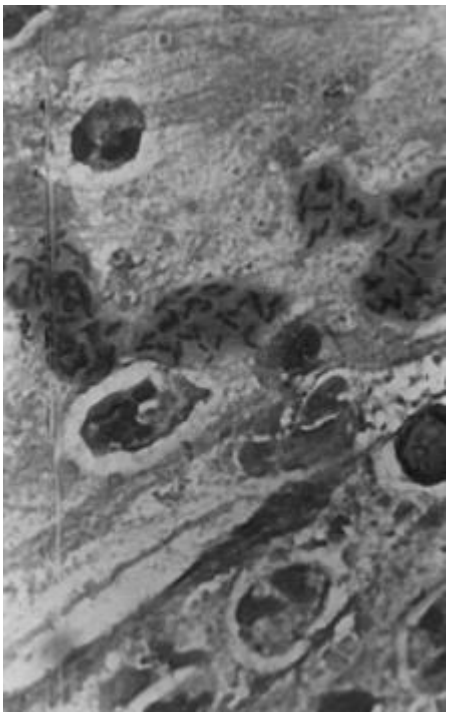

Figure 02 : Frottis d'un biofilm de patient atteint de mucoviscidose, infection à *Pseudomonas aeruginosa* observée au microscope optique au grossissement 1000 **(Hoiby, 2017)**.

Malgré la découverte des biofilms dans le domaine médical, le terme n'est utilisé dans ce dernier que vers 1981 et 1985 par des dentistes Suèdes et Costerton respectivement dans des rapports médicaux et dans le « MedicalMicrobiology » **(Hoiby, 2017)**.

Vers les années 1990, avec la découverte des techniques de fluorescence, l'analyse transcriptomique, l'utilisation de divers mutants de bactéries et la mesure des tensions d'oxygène dans les différentes couches du biofilm ainsi que, la compréhension de la nature et des propriétés des biofilms a permi de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la formation des biofilms **(Hoiby, 2017)**.

II. Mécanisme de formation d'un biofilm

Les bactéries afin de s'attacher au support à coloniser, perdent leur forme planctonique pour devenir sessiles, ainsi, le biofilm passe par plusieurs étapes de formation qui sont d'une complexité non négligeable puisqu'elles impliquent l'activation de tout un système de signalisation qu'on appelle Quorum Sensing « QS » et la transcription de nombreux gènes **(Goel *et al.*, 2021)**.

II.1. Etapes de formation

Il existe quatre étapes principales de la formation d'un biofilm :

II.1.1. Attachement réversible

L'attachement réversible (temporaire et faible) ; autrement dit, initial est l'étape d'adhésion des bactéries à une surface grâce aux forces gravitationnelles, mouvement Brownien et forces hydrodynamiques qui font que les cellules grâce à leurs appendices (pilis, flagelles, fimbriae) s'attachent au support **(Goel *et al.*, 2021)**. La nature de l'attachement dépend des caractéristiques physico-chimiques du support (température, pH, disponibilité des nutriments…) **(El-Tarabily *et al.*, 2021)**. Etant donné que les bactéries sont généralement chargées négativement, elles ont tendance à coloniser des surfaces de charges positives. **(Ruhal et Kataria, 2021)**. A ce stade les cellules microbiennes sont capable de changements vers un état planctonique et de se détacher du biofilm préformé **(Srey *et al.*, 2012)**.

II.1.2. Attachement irréversible

Durant cette phase, les interactions entre cellules et surface deviennent permanentes. Des gènes codants pour des protéines d'adhésion « adhésines » sont exprimés tandis que ceux qui codent pour les flagellines sont réprimés afin que les cellules deviennent immobiles et commencent donc à se multiplier et former de petits agrégats **(Goel *et al.*, 2021)** avec la présence d'une matrice d'EPS qui lorsqu'elle atteint une certaine épaisseur solidifie le biofilm de sorte à ce que sa destruction nécessitera un vigoureux lavage (brossage, raclage) **(Srey *et al.*, 2012)**. Le passage du biofilm de l'état réversible à l'état irréversible est très crucial du fait qu'il ne nécessite que quelques minutes **(Zhao *et al.*, 2017)**.

II.1.3. Biofilm mature

La maturation du biofilm consiste en premier lieu en la surproduction d'EPS constitué principalement d'eau avec de petites quantités de protéines, lipides, ADN, polysaccharide… dont le rôle est de protéger le biofilm de la dessiccation avec des canaux de transport d'eau et de nutriments ; en deuxième lieu en la communication entre cellules via le QS **(El-Tarabily *et al.*, 2021)**. Les cellules du biofilm émettent donc de petits signaux qu'on appelle auto-inducteurs qui sont captés par d'autres cellules dans l'environnement afin qu'elles rejoignent le biofilm **(Rohatgi et Gupta, 2021)**. L'attachement des colonies une à une confère au biofilm un aspect tridimensionnel composé de trois couches de cellules. La première couche représente la structure initiale régulatrice qui couvre le support occupé par des bactéries métaboliquement peu actives en raison de l'accès difficile aux nutriments et à l'oxygène mais se trouvent d'avantage protégées des agressions extérieures, la deuxième couche est une couche intermédiaire et la troisième constitue les cellules planctoniques qui sont en mode de division active et qui accèdent plus facilement aux nutriments et à l'oxygène. Le biofilm mature est doté d'une grande pathogénicité aidant à augmenter sa résistance aux antibiotiques **(Zhao *et al.*,2017)**.

II.1.4. Dispersion

La dispersion représente la dernière étape du cycle de formation du biofilm et est spontanée lorsque le support vieilli (accumulation de déchets, épuisement de nutriments, fluctuations du taux d'oxygène, etc.) ou lors d'une grande prolifération microbienne **(Rohatgi et Gupta, 2021)**. La dispersion passe par trois phases : l'érosion du substrat, la desquamation et l'abrasion **(Brindhadevi *et al.*, 2020)**. Des gènes codants pour des enzymes telles que la

lyase sont exprimés durant ces phases, permettant ainsi aux cellules de reprendre leur forme planctonique et de former à nouveau des biofilms **(Goel *et al*., 2021)**.

Le schéma suivant résume les quatre étapes de formation d'un biofilm :

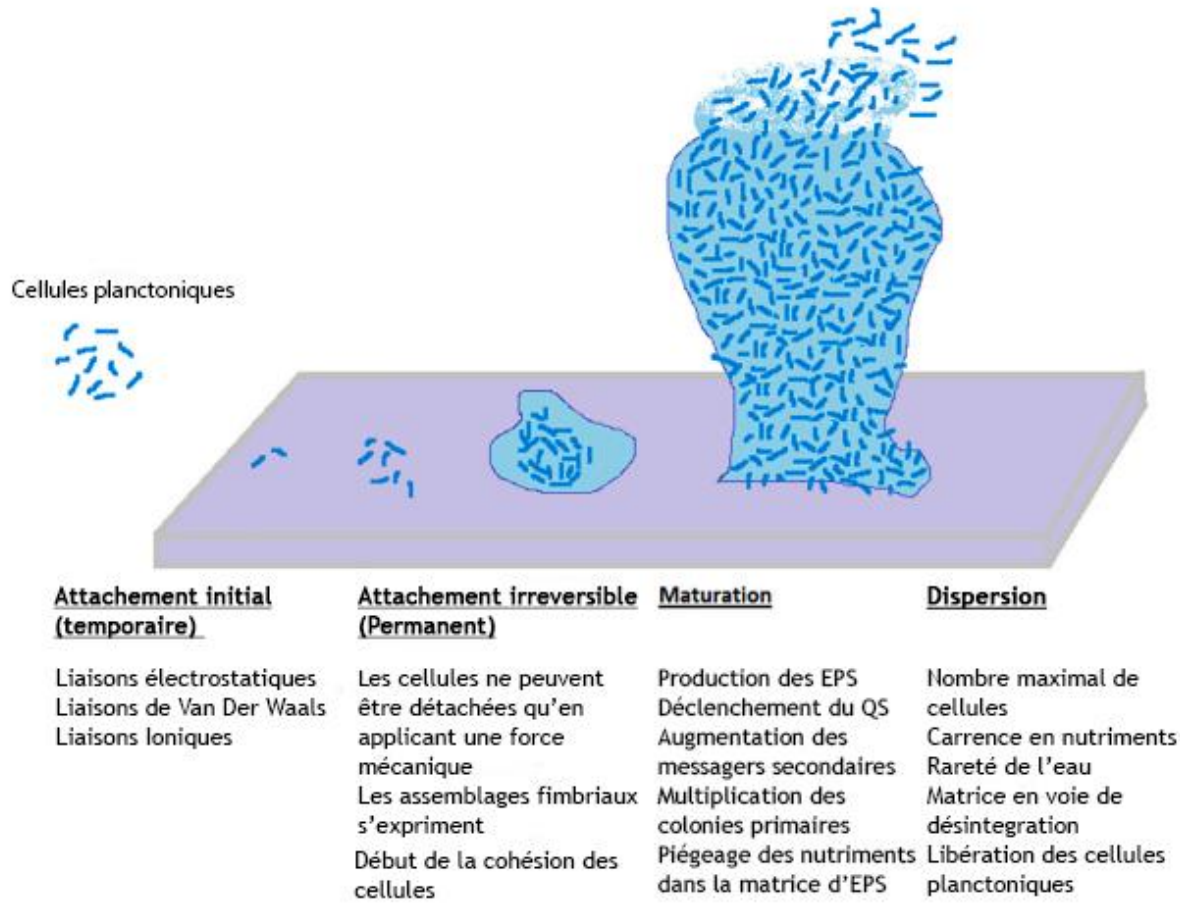

Figure 03 : Etapes de formation d'un biofilm **(Rohatgi et Gupta., 2021)**.

II.2. Quorum sensing « QS »

Les bactéries dans une population ont recours à une voie de signalisation qu'on appelle QS afin qu'elles puissent communiquer entre elles. Ce dernier peut survenir au sein d'une population de la même ou de différentes espèces afin d'activer ou de réprimer l'activité microbienne. Lors de la formation d'un nouveau biofilm, les cellules de la couche initiale secrètent des molécules qu'elles libèrent dans le milieu extracellulaire qui seront captées par les autres bactéries afin de rejoindre le biofilm ; tandis que lorsque le biofilm vieilli et que la prolifération microbienne est importante, les cellules bactériennes secrètent des auto-

inducteurs qui lorsqu'ils atteignent un certain seuil dans le milieu extracellulaire, seront reconnus par les cellules du biofilm qui vont à leurs tours induire l'expression de plusieurs gènes afin que leurs activités soient réprimées **(Zhao *et al.*, 2017)**. L'image suivante représente l'agissement d'une bactérie face aux auto-inducteurs :

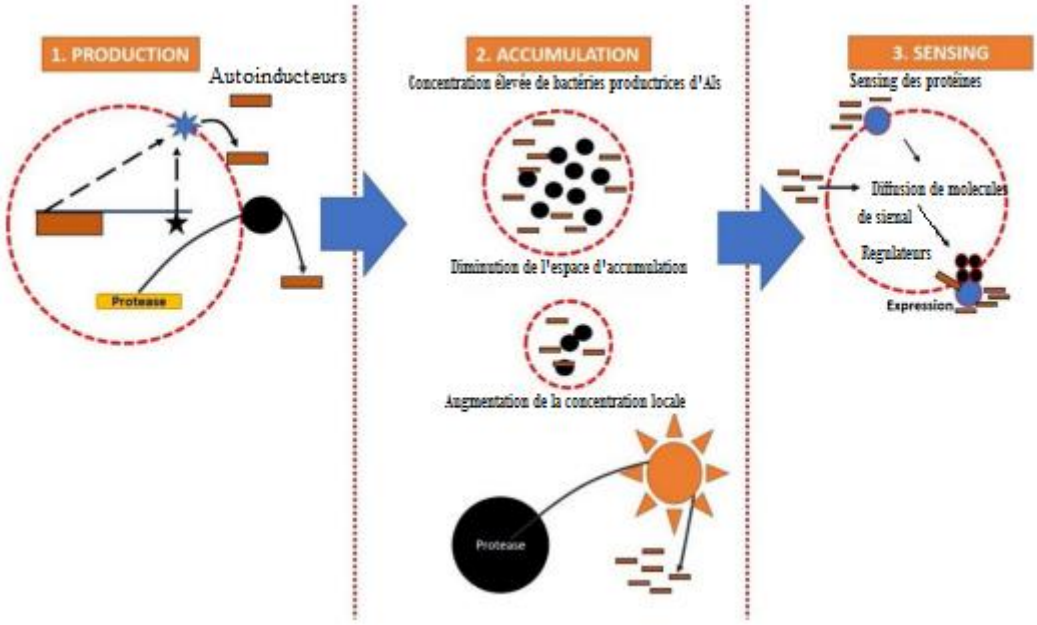

Figure 04 : Comportement bactérien face à différentes concentrations d'auto-inducteurs **(Brindhadevi *et al.*, 2020)**.

Le premier organisme dans lequel a été étudié le QS est *Vibrio fischeri* basé sur sa bioluminescence dans les écosystèmes marins. Le QS fonctionne selon trois principes :

a. Les auto-inducteurs ne sont pas reconnus par les bactéries à faibles concentrations, tandis qu'à grandes concentrations ils sont reconnus et induisent une réponse cellulaire.
b. Les membranes des cellules sont impliquées dans la détection des auto-inducteurs.
c. La détection des auto-inducteurs accélère leur production **(Brindhadevi *et al.*, 2020)**.

Les auto-inducteurs impliqués dans le QS chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif ne sont pas les mêmes. Les Gram positifs secrètent des oligopeptides tandis que les Gram négatifs secrètent des N-acylhomoserine lactones « AHL » avec un groupe d'auto-inducteurs2 « AI2 » qu'on retrouve chez les deux types de bactéries et qui servent à communiquer avec d'autres espèces microbiennes **(Ciric *et al.*, 2019)**.

Les images suivantes représentent le contrôle de formation des biofilms par le QS :

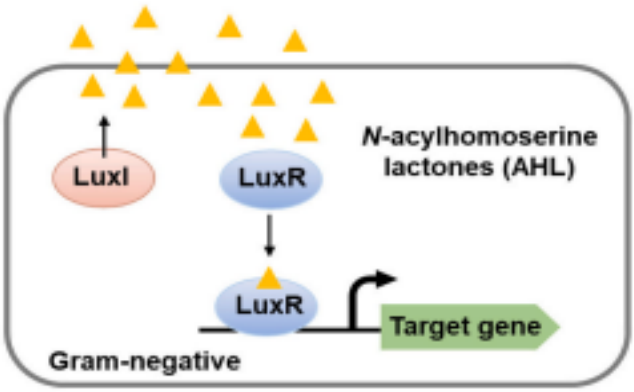

Figure 05 : Contrôle de la formation d'un biofilm chez les bactéries à Gram négatif **(Jiang *et al.*, 2021)**.

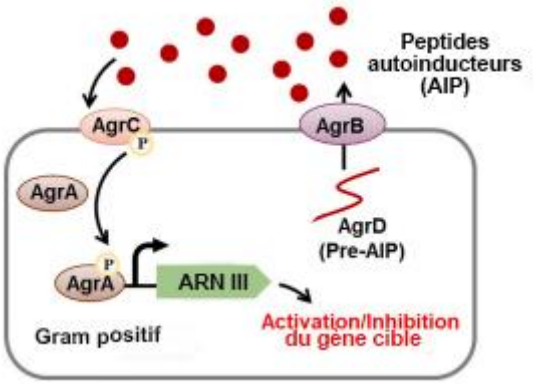

Figure 06 : Contrôle de la formation d'un biofilm via le QS chez les bactéries à Gram positif **(Jiang *et al.*, 2021)**.

III. Biofilm formé par *Klebsiella pneumoniae*

III.1. Généralités sur *Klebsiella pneumoniae*

III.1.1. Définition

Klebsiella pneumoniae, ou bacille de Friedländer a été décrite pour la première fois par Carl Friedländer, qui en 1882, l'a isolée des poumons de patients morts de pneumonies **(Martin et Bachman, 2018)**. Il s'agit de bactéries ubiquitaires qu'on retrouve à la surface des muqueuses des animaux ou dans l'environnement (eau, sol, poussière, etc.). Chez l'homme, elles sont commensales et se trouvent majoritairement dans le tube digestif, elles sont

également présentes à des concentrations moins importantes dans le nasopharynx à travers lequel elles peuvent atteindre le sang et les autres tissus causant ainsi des infections **(Wang *et al.*, 2020)**. *Klebsiella pneumoniae* est considérée comme un agent pathogène à partir du XX^{e}siècle, principalement responsable d'infections respiratoires et urinaires **(Murphy et Clegg, 2012)** et est impliquée dans 8 à 10%des infections nosocomiales dans l'Europe et aux Etats Unis. Cette bactérie est d'un taux de mortalité élevée et les traitements sont très limités du fait qu'elle ait développée des capacités de résistance **(Willsey *et al.*, 2018)**. L'image suivante représente la culture d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* :

Figure 07 : Aspect des colonies de *Klebsiella pneumoniae* sur MacConkey **(Baydaa, 2019)**.

III.1.2.Systématique

La classification scientifique de *Klebsiella pneumoniae* est décrite ci-dessous :

- Règne : *Bacteria*
- Phylum : *Proteobacteria*
- Classe : *Gamma Proteobacteria*
- Ordre : *Enterobacteriales*
- Famille : *Enterobacteriaceae*
- Genre : *Klebsiella*

- Espèce : *pneumoniae.* **(Brenner *et al.*, 2005).**

Le séquençage du génome entier « WGS » chez *Klebsiella pneumoniae* a permis d'identifier des liens de parentés avec d'autres espèces avec un pourcentage de 95% d'identité nucléotidique désignées sous le nom de complexe d'espèces de *Klebsiella pneumoniae* :

- **KP 1 :** *Klebsiella pneumoniae*
- **KP 2 :***Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae*
- **KP 3 :***Klebsiella variicola subsp. variicola*
- **KP 4 :***Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae*
- **KP 5 :***Klebsiella variicola subsp. tropica*
- **KP 6 :***Klebsiella quasivariicola*
- **KP 7 :***Klebsiella africana.* **(Wyres*et al.*,2020)**.

Le schéma suivant représente un arbre phylogénétique des bactéries se rapprochant de *Klebsiella pneumoniae* :

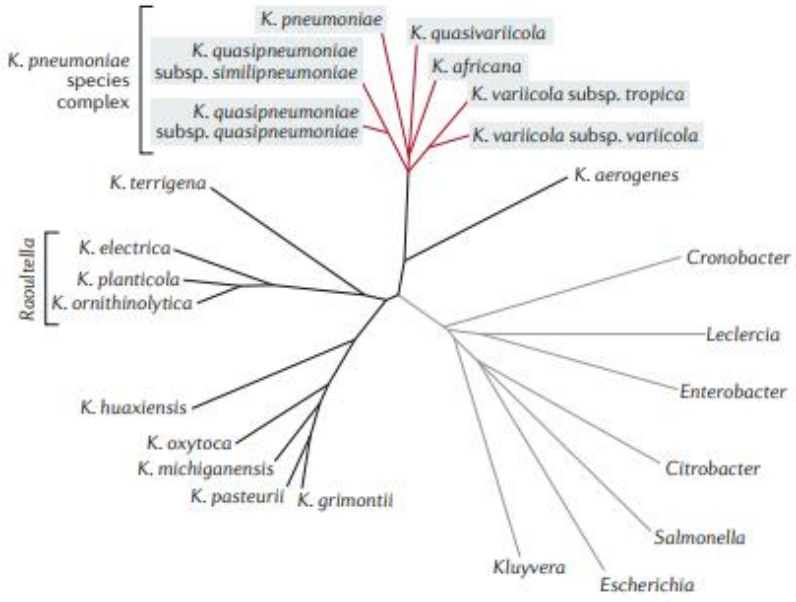

Figure 08 : Position taxonomique de *Klebsiella pneumoniae* **(Wyres *et al.*, 2020)**.

III.1.3. Caractères morphologiques et culturaux

Les Klebsielles retrouvent sous forme de petits bacilles réguliers à Gram négatif avec des extrémités arrondies, leur taille varie entre 0.3 à 1 µm de diamètre et 0.6 à 6 µm de longueur, elles sont immobiles, non sporulées et s'agencent de différentes manières ; soit en

courtes chainettes, en diplobacilles et parfois même isolées **(Ayan *et al.*, 2003 ; Jonas *et al.*, 2004).**

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* poussent en conditions d'aéro-anaérobiose après incubation de 18 à 24h à 37°C sur des milieux spécifiques aux entérobactéries tels que la gélose au sang, gélose nutritive, trypticase soja, Mac Conkey, Hecktoen, etc. Les colonies sur gélose sont brillantes, rondes, lisses, parfois visqueuses et bombées **(Grimont et Grimont, 2005)**.

III.1.4. Caractères biochimiques

Klebsiella pneumoniae est Gram négatif, oxydase négative, catalase positive, fermentant le glucose et le lactose, indole négatif, VP positif, ONPG positif, ODC négatif, LDC positif, uréase positif avec production de gaz **(Drancort*et al.*, 2001 ; Grimont et Grimont, 2005).**

III.1.5.Virulence et résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella Pneumoniae*

Le centre de contrôle et de prévention des maladies aux Etats Unis estime que plus de deux millions de personnes contractent des infections dues aux microorganismes antibiorésistants chaque année avec une moyenne de 23000 cas de mortalité. *Klebsiella pneumoniae* est considérée comme l'une des bactéries ayant connues une importante émergence de l'antibiorésistance ainsi qu'un considérable taux d'infection. Le WGS et les applications *in silico* de *Klebsiella pneumoniae* ont permis de détecter plus de 6000 gènes impliqués dans la virulence, la résistance aux antibiotiques, l'infection et la colonisation **(Martin et Bachman, 2018)**.

Les plasmides représentent le premier facteur responsable de l'apparition des « antimicrobial resistance » « AMR » et ce par le moyen de transferts génétiques horizontaux « HGT ». De nombreuses expériences ayant pour but l'étude de l'espèce *Klebsiella pneumoniae* ont permis de déduire qu'il existe plus de diversité plasmidique dans les clones des « multi-drugresistant » « MDR » (Résistance à plus de trois antibiotiques en plus de l'ampicilline à laquelle toutes les souches de *Klebsiella pneumoniae* sont résistantes) que chez les clones des « hyper-virulent » « hp » **(Wyres *et al.*, 2020)**.

*Klebsiella pneumoniae e*st considérée comme étant l'espèce la plus résistante des entérobactéries aux carbapénèmes qui représentent la classe des antibiotiques appartenant à la famille des bêta-lactamines. L'émergence de *Klebsiella pneumoniae* carbapénèmase « KPC-1, KPC-2 et KPC-3 » pose de sérieux problèmes cliniques et complique le traitement des infections **(Chung, 2016)**. La résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux carbapénèmes est due à plusieurs facteurs dont les mutations génétiques, la régulation au moyen des pompes à efflux, la diminution de perméabilité de la membrane externe et l'hyperproduction d'enzymes de type AmpC **(Martin et Bachman, 2018)**. Il existe de nombreux types de carbapénèmase tels que : IMP-1 découvert au Japan en 1991, GES-4, VIM-1, OXA-48 et NDM-1. Les souches portant le gène bla_{KPC} ont été détectées un peu partout à travers le monde avec des infections nosocomiales plus importantes pour les gènes bla_{KPC-2} et bla_{KPC-3}. La capacité des gènes bla_{KPC} à causer des infections humaines est associée à trois mécanismes de transmission du gène en question :

- Possibilité de transposition du gène bla_{KPC}.
- HGT.
- Propagation des souches CRKP portant le gène bla_{KPC}.

Le plasmide pKpQIL a été le premier plasmide portant le gène bla_{KPC} découvert en 2006, suivi d'autres plasmides tels que le plasmide pBK15692, pBK30683, pKP13d et pKP1034 qui représente un hybride entre deux plasmides ; pKPCLK30 de Taiwan et pHN7A8 de Chine. La plupart des gènes bla_{KPC} sont porteurs d'éléments mobiles qui permettent leur transfert dans d'autres plasmides **(Yang *et al.*, 2020)**.

L'image suivante représente la répartition géographique des souches résistantes aux carbapénèmes chez *Klebsiella pneumoniae* :

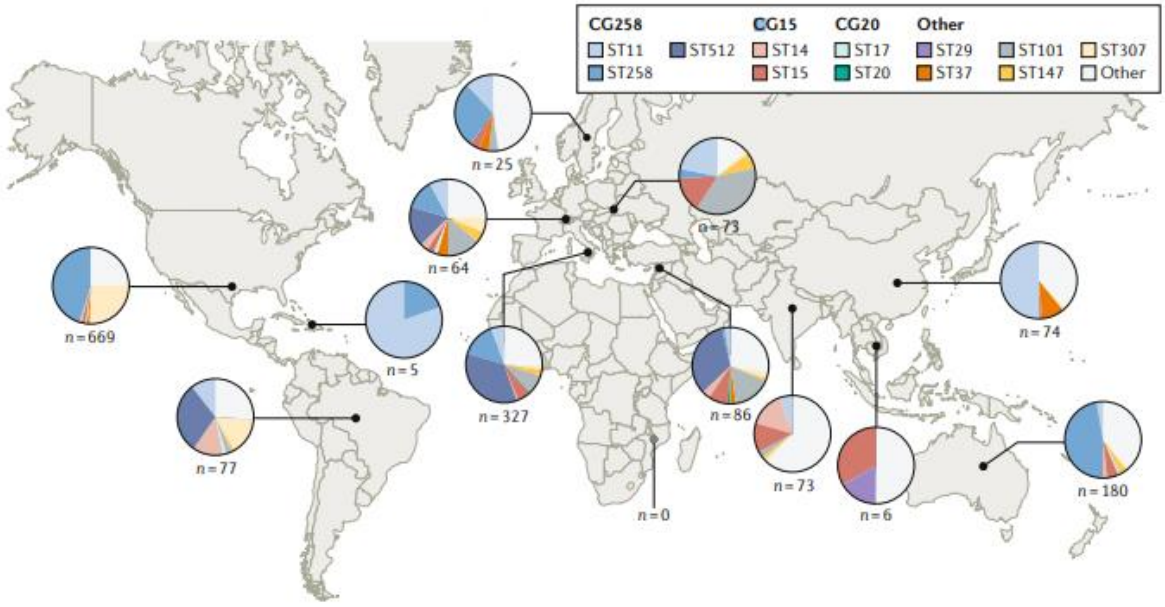

Figure 09 : Répartition géographique des souches résistantes aux carbapénèmes chez *Klebsiella pneumoniae* **(Wyres *et al*., 2020)**.

La colistine est un antibiotique appartenant à la classe des polymixines utilisée entre 1960 et 1970 pour traiter les infections des bactéries à Gram négatif. La résistance de *Klebsiella pneumoniae* à la colistine est induite par des mutations au niveau des gènes de régulation tel que le gène mgrB responsable de la régulation de la modification des lipides A. Le premier plasmide résistant à la colistine a été découvert en 2015 dans un organisme d'*Escherichia coli* en Chine au niveau du gène mcr-1 tandis que chez *Klebsiella pneumoniae,* ce n'est qu'en septembre 2016 qu'ils ont pu isolés un organisme résistant à cet antibiotique au niveau d'un gène différent du mcr-1 **(Martin et Bachman, 2018)**.

En plus de la résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux carbapénèmes et à la colistine, elle résiste également à de nombreuses autres classes d'antibiotiques dont les aminoglycosides, quinolones, tigecyclines, etc. **(Wang *et al*., 2020)**.

La figure suivante représente quelques gènes de résistance chez *Klebsiella pneumoniae* :

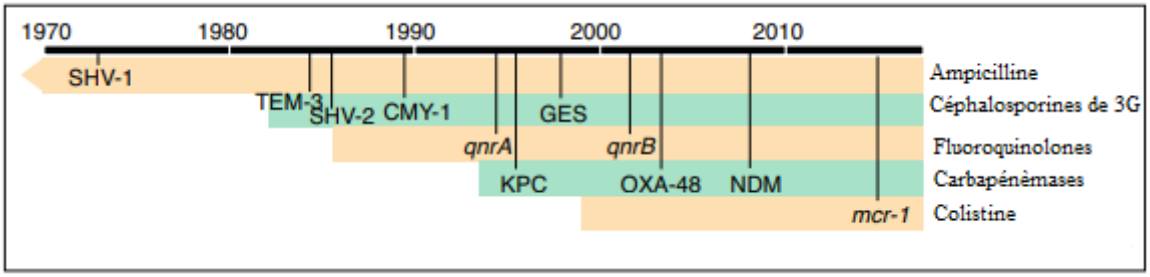

Figure 10 : Acquisition des gènes de résistance contre quelques antibiotiques chez *Klebsiella pneumoniae* à travers le temps **(Wyres et Holt, 2018)**.

Lors du processus infectieux, *Klebsiella pneumoniae* adopte des barrières mécaniques et chimiques pour éviter sa reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Pour ce faire, elle a recourt à quatre types de facteurs de virulence : pili, capsule, lipopolysaccharides « LPS » et transporteurs de fer. Les pilis de type 1 et de type 3 permettent à la bactérie de s'attacher aux cellules et aux surfaces abiotiques. Le plasmide RmpA qui régule la synthèse de la capsule polysaccharidique responsable de virulence est généralement retrouvé chez les hvKP **(Wang *et al.*, 2020)**. La capsule joue également un rôle dans la protection contre la phagocytose et permet à la cellule d'échapper au système immunitaire de l'hôte, elle est composée de sous unités répétées de 4 à 6 sucres portées par le gène cps. D'après des tests sérologiques, 77 types de capsules ont été identifiés. Le LPS couvrant la membrane des bactéries à Gram négatif est le médiateur majeur de virulence, afin de ne pas être reconnu, il modifie sa structure et échappe ainsi aux recepteurs toll-like 4 « TLR4 » engendrant l'inhibition de la réponse inflammatoire. Le LPS possède trois composants : un lipide A, un core et un antigène O. Ce dernier est variable chez *Klebsiella pneumoniae* du fait qu'il exite 9 sérotypes dont O1, O2 et O3 qui sont responsable de 80%des infections **(Martin et Bachman, 2018)**. Etant donné que le fer est indispensable pour le développement et la réplication des bactéries, *Klebsiella pneumoniae* possède quatre types de sidérophores (trasporteurs de fer) : enterobactin, yersiniabactin, salmochelin, etaerobactin **(Wang *et al.*, 2020)**.

La figure suivante représente les différents facteurs de virulence et le maintiens de l'homéostasie dans un biofilm :

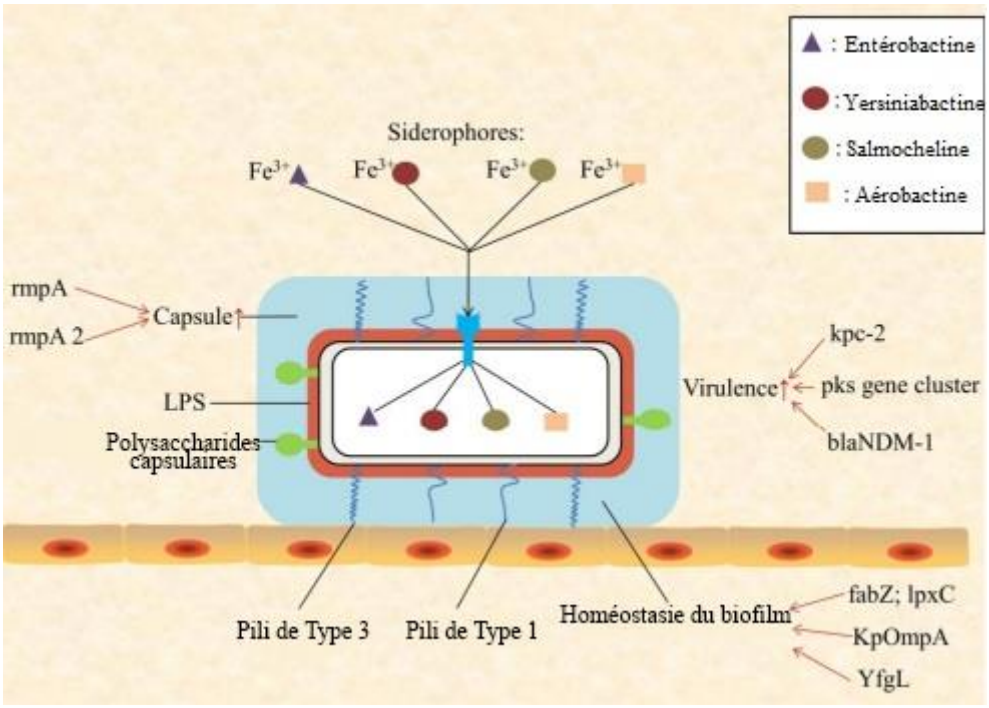

Figure 11 : Présentation schématique des facteurs de virulence chez *Klebsiella pneumoniae* **(Wang *et al.*, 2020)**.

IV. Biofilm chez *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est capable de former des biofilms et de créer des communications intercellulaires via le QS au moyen de divers AHL tels que : N-octanoylhomoserine lactone, N-3-dodecanoyl-L-homoserine lactone et N-hexanoyl-homoserine lactone (C6-AHL) ; responsables de la synthèse d'enzymes lytiques, toxines et exopolysccharides impliqués dans la pathogénicité, virulence et formation de biofilm **(Cadavid et Echeverri, 2019)**. Certaines études ont démontrées que des mutations au niveau des gènes fabZ et lpxC induisent l'inhibition du développement de *Klebsiella pneumoniae* ainsi que la perte de l'homéostasie du biofilm ; la lipoprotéine YfgL est impliquée dans la formation du biofilm et de la transcription de l'expression de pilis de type 1 ; la protéine membranaire A « KpOmpA » est responsable de la reconnaissance des cellules et de leur adhésion **(Wang *et al.*, 2020)**.

L'un des facteurs responsables de la formation de biofilms chez *Klebsiella pneumoniae* est le fimbriae de type 3 dont la synthèse est régulée par un complexe de protéines (mrk A, mrk B, mrk C, mrk D et mrk F) **(Willset *et al.*, 2018)**.

L'image suivante représente les sous unités impliquées dans la production du fimbriae 3 :

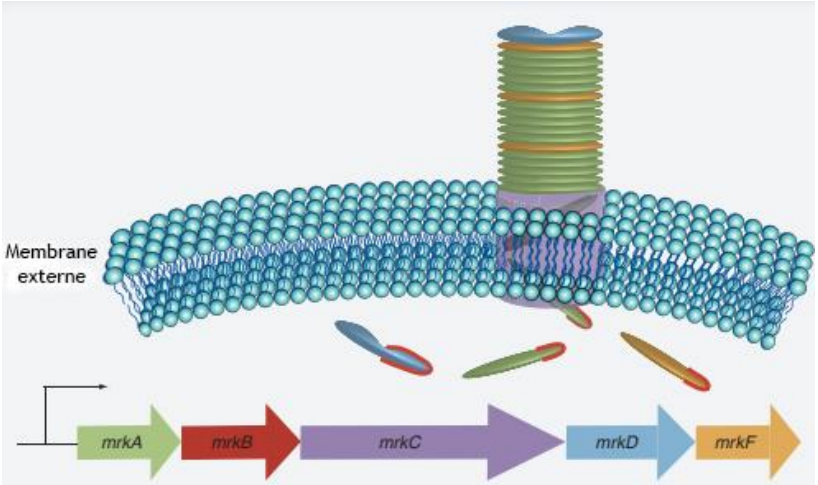

Figure 12 : Représentation des sous unités protéiques impliquées dans l'assemblage du fimbriae de type 3 **(Murphy et Clegg, 2012)**.

Les protéines mrk J, mrk I et mrk H sont également impliqués dans la synthèse du messager cyclic-di-GMP « c-di-GMP » dont les concentrations intracellulaires affecte la production du fimbriae 3 accompagné de synthèse de PilZ liant le c-di-GMP et le fimbriae 3 **(Johnson *et al.*, 2011)**. L'image suivante représente le mécanisme d'action des sous unités mrkA, mrkH et mrkI à différentes concentrations de c-di-GMP :

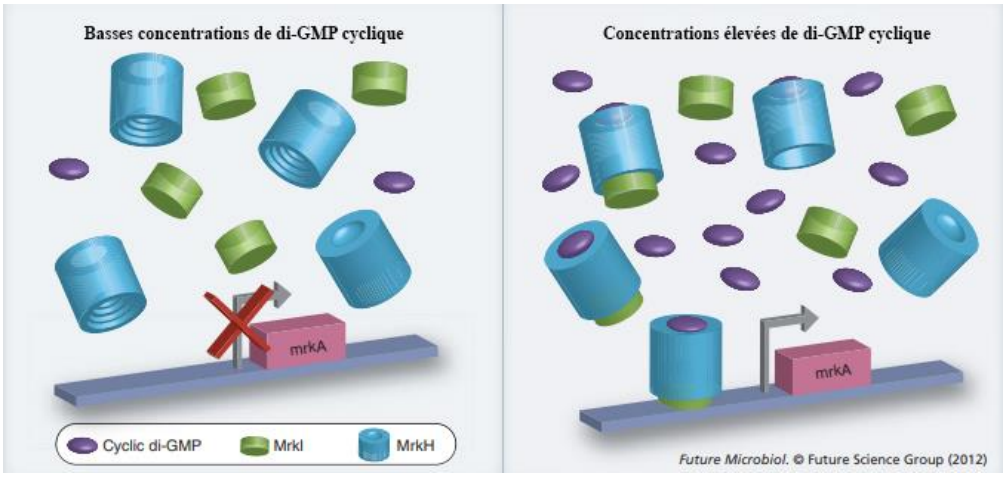

Figure 13 : Interactions entre les sous unités mrkA, mrkH et mrkI à des concentrations basses et élevées de c-di-GMP **(Murphy et Clegg, 2012)**.

La formation du biofilm est aussi dépendante de la diguanylate cyclase YfiN et de l'YfiRNB qui contribuent dans la coordination cellulaire entre les sous unitésmrkH, mrkJ et le c-di-GMP **(Wilksch *et al.*, 2011)**. La figure ci-dessous démontre les facteurs impliqués dans la formation d'un biofilm :

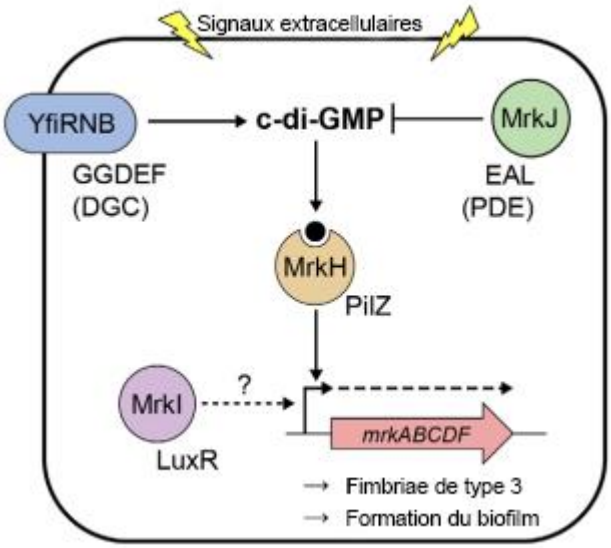

Figure 14 : Facteurs impliqués dans la formation d'un biofilm chez *Klebsiella pneumoniae* **(Wilksch *et al.*, 2011)**.

Klebsiella pneumoniae forme de manière plus efficace des biofilms en présence d'autres espèces microbiennes que lorsqu'elle se trouve sous forme isolée ; il s'avère qu'en présence de multiples espèces, les cellules travaillent en synergie et s'organisent de trois manières différentes : séparées en micro-colonies, en agrégation ou arrangées en couches. *Klebsiella pneumoniae* travaille généralement en synergie avec *Pseudomonas aeruginosa* ce qui améliore le développement, la structure et les fonctions du biofilm le rendant ainsi performant et plus résistant aux traitements. Il existe également d'autres espèces collaborant avec *Klebsiella pneumoniae* telles que *Proteus mirabilis, Escherichia coli, Morganella morganii, Enterobacter cloacae, Candida albicans,* etc. Les interactions entre espèces dans un biofilm doivent être prises en considération lors des traitements d'infections chroniques **(Chung, 2016)**.

NB : il est à noter que les étapes de formation d'un biofilm sont les mêmes chez *Klebsiella pneumoniae* que chez les autres espèces.

Chapitre II : caractéristiques et activité antibiofilm de l'huile essentielle du laurier noble

Le laurier ; la plante symbolisant la victoire et le triomphe est utilisée depuis les temps anciens pour couronner la tête des empereurs et les personnes ayant accompli des exploits remarquables. Le terme « baccalauréat » tient d'ailleurs ses origines d'une locution latine « bacca laurea » qui signifie baies de laurier **(Huet, 2018).** Le mot « laurier » a donc toujours été associé aux réussites et aux gloires et a même été considéré comme un porte bonheur. En dehors de ces choses superstitieuses, le laurier noble est d'une utilisation très diversifiée dans les domaines de la médecine, l'agriculture, la pharmacologie, etc.

I. Laurier noble dans la mythologie grecque

Après avoir exterminé le serpent Python et les monstres les plus terrifiants, Apollon devint l'une des plus importantes divinités grecques « Dieu de lumière, poésie et musique » et l'arc fut désigné sous le nom d'arme d'Apollon. Un jour tandis que celui-ci se promenait, son œil fut attiré par Eros « Dieu de l'amour » qui s'entrainait à mieux viser et qui malgré son apparence enfantine, portait l'arc d'une élégance magistrale lui conférant un énorme prestige. Apollon, se sentant piqué dans sa vanité se mit à se moquer du Dieu-enfant qui maniait l'arc avec magnificence et essayait par tous les moyens de le faire douter de ses pouvoirs talentueux. La patience d'Eros fut épuisée et dès lors, il tira une flèche d'or sur le cœur d'Apollon le soumettant à l'influence de l'amour. Eros ne s'est point contenté de confronter le Dieu de la lumière à cette sorte de faiblesse qu'il ne connaissait pas auparavant, mais a renchérit par une autre flèche de plomb sur le cœur d'une nymphe appelée Daphné, fille de Pénée « Dieu des fleuves » l'emplissant de répulsion envers Apollon. Les poursuites incessantes et abusives du Dieu de la lumière exaspérèrent la nymphe qui fut dans l'obligation de se précipiter dans les fleuves de son père, implorant son aide. Le père face à tant de détresse se trouva attendri et métamorphosa Daphné (en grec signifie Laurier) en un arbre, celui du Laurier noble qui depuis est devenu l'arbre d'Apollon **(Ernest et Fievre, 2017)**.

*"Eh bien ! dit le dieu, puisque tu ne peux plus être mon épouse, tu seras du moins l'arbre d'Apollon. Le laurier ornera désormais mes cheveux, ma lyre et mon carquois : il parera le front des guerriers du Latium, lorsque des chants d'allégresse célébreront leur triomphe et les suivront en pompe au Capitole : tes rameaux, unis à ceux du chêne, protégeront l'entrée du palais des Césars ; et, comme mes cheveux ne doivent jamais sentir les outrages du temps, tes feuilles aussi conserveront une éternelle verdure."***(Ernest et Fievre, 2017)**.

Chapitre II : caractéristiques et activité antibiofilm de l'huile essentielle du laurier noble

II. Généralités

II.1. Plante du laurier noble

Le laurier noble, laurier-sauce ou laurier d'Apollon est une plante appartenant à la famille des lauracées cultivée un peu partout dans le monde (région méditerranéenne, Asie, Australie, etc.) soit par graines ou bien par bouturage. Son arbre peut atteindre jusqu'à 10m de hauteur avec de petites fleurs, un fruit noir et des feuilles lancéolées avec une face supérieure d'un vert foncé brillant et une face intérieure matte d'un vert plus clair **(Tomar *et al.*, 2020)**. Ces dernières dégagent une odeur spécifique lorsqu'elles sont froissées **(Taarabt *et al.*, 2017)**. Cette plante aromatique est utilisée dans la production industrielle : fabrication de denrées alimentaires, médicaments, produits de beauté, etc. La classification botanique du laurier noble est représentée ci-dessous :

Règne : *Plantae*

Division : *Magnolids*

Ordre : *Laurales*

Famille : *Lauraceae*

Genre : *Laurus*

Espèce : *nobilis* **(Patrakar *et al.*, 2012)**.

Les figures suivantes représentent un arbre et des feuilles sèches de laurier respectivement :

Figure15 : Arbre de laurier noble **(Bruno, 1999).**

Figure 16 : Feuilles de laurier noble sèches **(Bernard, 2019).**

II.2. Vertus du laurier noble

Les plantes médicinales sont celles qui contiennent des molécules qui peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques. L'utilisation de ces plantes est en continuel développement du fait que les populations s'intéressent de plus en plus à la médecine traditionnelle afin d'éviter les produits industriels pour leurs effets secondaires d'une part, et pour leurs couts onéreux d'une autre part **(Saraiva *et al.*, 2021)**. Les feuilles de laurier sont cueillies et séchées

à l'ombre pour des utilisations culinaires surtout en cuisine Française (pulvérisées pour les soupes ou condiment), l'écorce peut être utilisée dans les préparations de thés médicinaux et les arbres pour les haies des fleuristes en raison de leur beau feuillage **(Chahal *et al*., 2017)**. Le laurier est également utilisé comme bio-pesticide botanique pour la protection des cultures **(Nabila *et al*., 2020)** et s'avère être d'une importance majeure dans le traitement de maladies tels que : l'épilepsie, la névralgie, le parkinsonisme, l'aménorrhée, l'hystérie, la sclérose, les spasmes, les rhumatismes articulaires, la lèpre, la cystite, la syphilis, les plaies, les brulures, les saignements, les inflammations, les soins contre le cancer, la réduction d'anxiété, les insomnies, etc.**(El-Tarabily *et al*., 2021)**.

II.3. Huile essentielle du laurier noble

L'huile essentielle, ou essence végétale est un métabolite secondaire produit par la plante pour des besoins non nutritionnels. Il s'agit d'une huile aromatique, éthérée, liquide à température ambiante, ayant une densité inférieure à celle de l'eau et très soluble dans les solvants organiques. Elle est généralement colorée (jaunâtre dans le cas du laurier) et dotée d'une grande volatilité grâce à laquelle elle peut facilement être diffusée dans l'air et dégager une odeur agréable. Une essence végétale peut contenir de 20 jusqu'à 60 composés aromatiques responsables de la saveur **(Chahal *et al*., 2017)**.

L'extraction des huiles des plantes existe depuis la nuit des temps. L'alchimiste suisse Von Hohenheim a décrit le processus de distillation au XVI^{e}siècle, ce qui a permis la commercialisation des huiles essentielles, et à partir du XX^{e} siècle plus de 100 pays sont devenus producteurs d'huile essentielle **(El-Tarabily e*t al*., 2021)**.

Les huiles essentielles du laurier noble peuvent être volatiles dans le cas d'extraction des huiles des feuilles, ou fixées lorsqu'il s'agit d'une extraction des huiles du fruit **(Alejo-Armijo *et al*., 2016)**. Plusieurs études ont démontré que la technique d'extraction (Hydro-distillation/entrainement à la vapeur) affecte de manière considérable la qualité et la quantité d'huile essentielle ; le choix de la technique d'extraction est basée donc sur plusieurs paramètres tels que : la réduction du temps d'extraction, la consommation d'un plus faible taux d'énergie possible et l'évitement de dégradation des composants de l'huile **(Taban *et al*., 2018)**.

Une analyse par chromatographie en phase gazeuse a permis de détecter les composants principaux de l'huile essentielle du laurier noble : 1,8-cineole, camphene, linalool, methyl eugenol, sabinene, α-pinene, β-pinene et terpinen-4-ol **(Belasli *et al.*, 2020)**.

La composition du laurier en huile essentielle varie en fonction de facteurs environnementaux, génotypiques et temps de séchage. Le tableau ci-dessous représente le rendement, les propriétés chimiques, physiques et organoleptiques de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. :

Tableau I : Caractéristiques de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. **(Belasli *et al.*, 2020).**

Rendement (% poids sec)	**Propriétés**	**Propriétés physiques et chimiques**
1.13 ± 0.03	Odeur : aromatique Aspect : liquide Couleur : jaune transparent	Densité (20°C) : 0.916 ± 0.006 Indice de réfraction (20°C) : 1.467 ± 0.002 Indice d'acides : 5.1 ± 0.05 Indice d'esters : 40.6 ± 0.35 Phénols totaux : 26.4 ± 0.22 µg/mg

III. Activité antibiofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L.

Plusieurs études concernant l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. ont démontré que celle-ci possède de nombreuses activités biologiques qui se définissent par la capacité d'une substance à altérer chimiquement ou physiologiquement les fonctions des cellules, tissus ou organismes. En plus de leur utilisation en médecine traditionnelle, les plantes de Laurier sont connues pour leur contenance en d'importantes substances bioactives ayant une grande toxicité utilisée en agriculture comme biopesticides **(Chahal *et al.*, 2017)**. Parmi ces nombreuses activités, on distingue l'activité antifongique, antibactérienne, anti-inflammatoire, antioxydant, et antibiofilm **(Alejo-Armijo *et al.*, 2017)**.

III.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. semble être en rapport avec le taux de 1,8-Cinéole qui représente le composant le plus abondant de l'huile de laurier **(Alejo-Armijo *et al.*, 2017)**. Une étude ayant pour but la détermination de l'effet de l'huile essentielle du laurier sur plusieurs espèces bactériennes dont *Klebsiella pneumoniae* a montré une forte activité antibactérienne principalement contre les bactéries Gram négatif **(Chahal *et al.*, 2017)**. La sensibilité remarquée chez les bactéries Gram négatif est due au fait qu'elles sont riches en lipopolysaccharides qui facilitent l'entrée des agents antibactériens (huile essentielle de laurier) ayant la capacité d'endommager la structure des lipides membranaires **(Saraiva *et al.*, 2021)**.

III.2. Activité antibiofilm

Les cellules au sein d'un biofilm, adoptent un aspect qui les rend 1000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens que lorsqu'elles sont isolées dans la nature. Les huiles essentielles semblent avoir un rôle significatif dans l'éradication et le contrôle de formation des biofilms et peuvent également complémenter les désinfectants et les antibiotiques qui sont utilisés à de faibles concentrations. L'hydrophobicité des huiles essentielles a un impact sur leur activité de sorte à ce qu'elles augmentent la perméabilité des cellules, modifiant ainsi la paroi membranaire. Ceci provoque un changement dans l'équilibre interne et externe de l'ATP et influe sur la fluctuation du pH et la synthèse des protéines ; causant des changements cytoplasmiques internes tels que la coagulation du matériel cytoplasmique, la rupture de l'ADN et l'inhibition du QS. Les huiles essentielles affectent également la régulation de la croissance et la nutrition chez les bactéries **(El-Tarabily *et al.*, 2021)**.

Afin de déterminer l'activité de l'eugénol, une étude se basant sur le traitement de souches résistantes de *Klebsiella pneumoniae* en présence et en absence d'eugénol a été réalisée. Les souches non traitées semblent avoir une forte expression pour les gènes : pgaA, luxS, wbbM et wzm, tandis que chez les souches traitées, ces gènes sont réprimés **(Qian *et al.*, 2020)**.

Les graphiques ci-dessous représentent l'activité de l'eugénol sur les biofilms en tenant compte de l'expression et de la répression des gènes déjà cités :

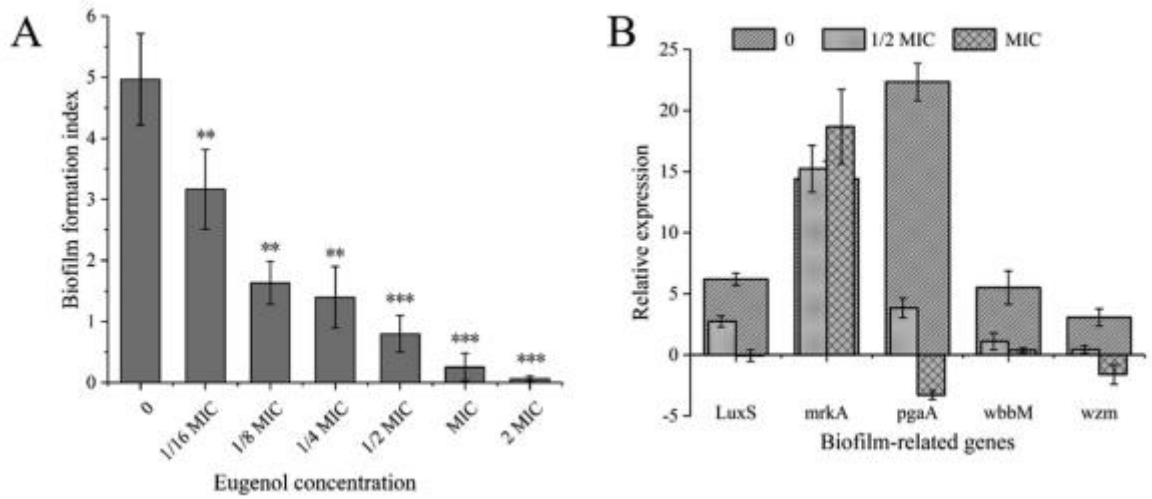

Figure 17 : Graphiques démontrant l'activité d'eugénol. A) L'activité antibiofilm à différentes concentrations d'eugénol. B) Expression et répression de 5 gènes en présence et en absence d'eugénol **(Qian *et al*., 2020)**.

L'eugénol est d'un grand impact sur la viabilité des cellules au sein d'un biofilm et cause la dispersion des cellules de la matrice. Il agit sur les membranes cellulaires des bactéries en les endommageant **(Qian *et al*., 2020)**. La figure suivante démontre l'effet d'eugénol sur la morphologie cellulaire dans un biofilm :

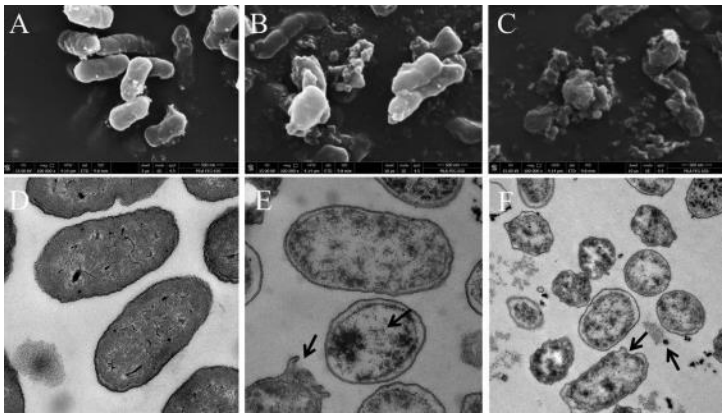

Figure 18 : Modification de la morphologie cellulaire à différentes concentrations d'eugénol **(Qian *et al*., 2020)**.

PARTIE II

PARTIE EXPERIMENTALE

Etant donné que les biofilms ont longtemps été une sérieuse contrainte dans plusieurs secteurs, notamment en industrie agro-alimentaire, ainsi que les établissements hospitaliers, causant ainsi des problèmes économiques et sanitaires. Pour y remédier, on a d'abord eu recours aux différents détergents et agents chimiques qui se sont avérés non seulement inefficaces mais aussi nocifs et polluants. De ce fait, la recherche tente, de nos jours, de mettre en évidence des substances contenant des molécules bioactives d'origine naturelles pour substituer aux précédents agents. Parmi, ces substances, l'huile essentielle du laurier noble semble être prometteuse avec son activité antibiofilm.

L'huile essentielle du laurier, possède-t-elle vraiment une activité antibiofilm ? Et comment l'évaluer *in vitro* ?

Ce travail a, donc, pour but l'évaluation de l'activité inhibitrice de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. sur des biofilms formés par les deux souches A et B de *Klebsiella pneumoniae* au stade du développement. Pour ce faire, nous avons :

- Extrait l'huile essentielle du laurier au moyen de la distillation par entraînement à la vapeur ;
- testé la faculté des deux souches A et B de *Klebsiella pneumoniae* à former des biofilms sur microplaque ;
- déterminé la CMI de l'huile essentielle du laurier ;
- évalué l'activité inhibitrice du développement du biofilm de l'huile essentielle du laurier.

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de biochimie analytique et biotechnologies « LABAB » au sein de l'université de MOULOUD MAMMERI de Tizi-Ouzou durant la période allant de Juin à Septembre 2021.

I. Matériel

I.1. Plante

1.1kg de *Laurus nobilis* L. a été récolté dans la région de Yatafen à 43 km au sud-est de Tizi-Ouzou en Kabylie, durant le mois de Mai, ensuite séché à l'ombre pendant une semaine. La plante (Figure 19) a été identifiée par la botaniste SMAIL Noria au niveau de l'Université MOULOUD MAMMERI.

Figure 19 : Feuilles de laurier noble (image personnelle).

I.2. Souches bactériennes

Dans l'objectif de réaliser ce travail, deux souches ont été sélectionnées : *Klebsiella pneumoniae* A, *Klebsiella pneumoniae* B, la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a été utilisée comme témoin positif (formatrice de biofilm).

Les deux souches de *Klebsiella pneumoniae* sont multi-résistantes et ont été prélevées au niveau du Centre Hospitalier Universitaire Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou, et identifiées par leurs caractères biochimiques et la méthode Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Specttrometry (MALDI-TOF-SM) en 2013 **(Bariz, 2020)**.

II. Méthode

II.1. Distillation par entrainement à la vapeur

L'extraction de l'huile essentielle de 1.1kg de matière sèche de laurier noble a été réaliséevia la distillation par entrainement à la vapeur. Le dispositif de distillation est constitué de trois éléments principaux : une colonne par laquelle une eau courante passe, une cocotte dotée d'un thermomètre et d'un baromètre et enfin un alambic pour la matière végétale.

Nous avons mis 6l d'eau dans la cocotte que nous avons placée sur feu moyen, la température est réglée à 100°C et la pression entre (0.2-0.4Bar). La cocotte est branchée au moyen d'un tuyau métallique à un alambic qui est également branché à la colonne. Cette dernière possède une structure serpentine par laquelle nous avons récupérés l'huile essentielle en plus de l'eau résultante de la liquéfaction de la vapeur, et un vide servant à l'entrée (en haut de la colonne) et la sortie (en bas de la colonne) d'eau froide servant à refroidir le dispositif. La vapeur entrainée par le chauffage d'eau de la cocotte passe à l'alambic engendrant ainsi l'humidification du laurier et l'entrainement de ses huiles vers la colonne et qui sont récupérées dans un erlenmeyer au bout de 3h de distillation. L'extraction est suivie de 30min de repos du liquide afin que les phases huile et eau se séparent d'elles-mêmes selon leur densité. Nous avons par la suite pipetés la couche huileuse que l'on a conservés dans une petite bouteille en verre ambré à l'abri de la lumière au frais. La figure suivante représente le dispositif de distillation :

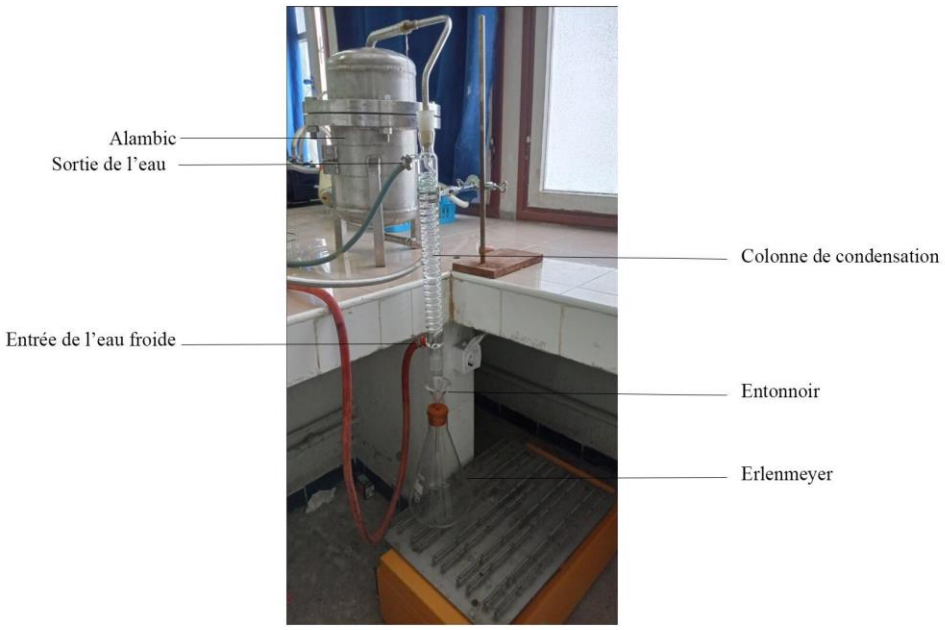

Figure 20 : Dispositif de distillation (image personnelle).

II.2. Test de formation de biofilm

II.2.1. Revivification des souches bactériennes

A partir de trois souches (*Klebsiella pneumoniae* A, *Klebsiella pneumoniae* B et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 issues du CHU en 2013) conservées dans du glycérol à -16°C, nous avons prélevé un petit volume à l'aide d'un écouvillon que nous avons par la suite trempé dans un tube de10ml de BHIB pour chaque souche dans une zone stérile. Les trois tubes ont été mis à incuber pendant 24h à 37°C.

II.2.2. Ensemencement

Dans des boites de pétri coulées au préalable avec le milieu Mueller-Hinton « MH », nous avons réalisés un ensemencement en stries à partir des tubes de BHIB incubés à l'aide d'une anse à boucle dans une zone stérile. Les boites de pétri ensemencées ont été mises à l'étuve pour une incubation de 24h à 37°C.

L'image suivante représente une boite de pétri ensemencée par *Klebsiella pneumoniae* après incubation :

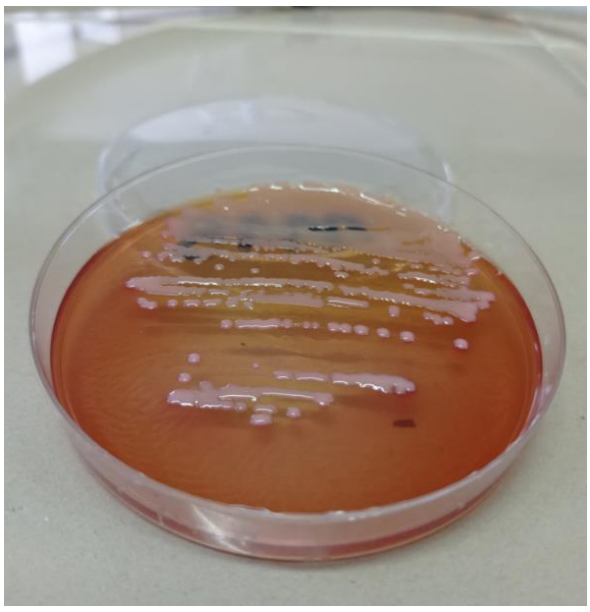

Figure 21 : Culture de *Klebsiella pneumoniae* sur gélose MacConkey (image personnelle).

II.2.3. Préparation des suspensions bactériennes

Dans des tubes d'eau physiologique de 10ml, nous avons préparés des suspensions bactériennes d'une concentration de 10^8UFC/ml à partir de colonies prélevées des boites de pétri. Les suspensions ont été standardisées au moyen de la spectrophotométrie à 0.5McFarland correspondant à une densité optique variant de 0.08 à 0.1.

Dans des tubes d'eau physiologique de 9ml, nous avons réalisés des dilutions des suspensions déjà préparées de sorte à ce que les concentrations deviennent de 10^7UFC/ml.

II.2.4.Formation du biofilm

Sur microplaque ELISA nous avons introduit 100µL de BHIB dans 12puits (trois pour le contrôle négatif, trois pour le contrôle positif et trois pour chacune des deux souches de *Klebsiella pneumoniae*) et avons réalisés des ensemencements en masse pour le témoin positif et pour les deux souches de *Klebsiella pneumoniae.*

Pour le témoin négatif, on s'est contentés de mettre du BHIB dans chacun des trois puits. Tandis que pour le témoin positif, nous avons rajoutés 50µL de la suspension de *Staphylococcus aureus* à 10^7UFC/ml et avons bien mélangés le contenu des puits. Concernant les deux autres souches à tester, nous avons rajoutés également 50µL des suspensions à 10^7UFC/ml de *Klebsiella pneumoniae* A et de *Klebsiella pneumoniae* B dans les puits qui leur correspondent et avons bien mélangés. La plaque ELISA est ensuite mise à l'étuve pour une incubation de 24h à 37°C.

Après avoir incubé la plaque, nous avons versés le contenu des 12puits et avons lavés en rajoutant 200µL de tampon PBS que nous avons laissés agir sous agitation douce pendant 10min. Le PBS a ensuite été aspiré et les cellules ont été fixées par addition de 200µL d'éthanol pur pendant 10min. Après avoir fixé à l'éthanol, le contenu des puits a été encore aspiré et nous avons colorés par ajout de 200µL de cristal violet à 1% pendant 20min et avons lavés 4fois au PBS sous agitation douce toujours. En dernier lieu, nous avons solubilisés le biofilm par addition de 200µL d'éthanol pendant 30min. Nous avons enfin fait une lecture au moyen d'un lecteur ELISA à 560nm **(Landeta *et al.*, 2013)**.

II.3. Détermination des CMI

II.3.1. Préparation de la solution mère de l'huile essentielle du laurier

Afin de préparer la solution mère de l'huile essentielle du laurier, nous nous sommes servis d'une micropipette pour prélever 400µL de BHIB additionné de Tween 80 et 400µL de l'huile essentielle de *Laurusnobilis*L.et les avons mis dans un eppendorf qu'on a vortexé afin de bien homogénéiser.

II.3.2. Test des CMI

Afin de déterminer les CMI nous avons réalisé des dilutions semi-logarithmiques de la solution mère de l'huile essentielle du laurier ; pour ce faire, nous avons utilisés deux lignes de la plaque ELISA dédiées pour les deux souches de *Klebsiella pneumoniae*. Nous avons introduit 200µL de la solution mère dans les deux premiers puits et avons dilués en aspirant à chaque fois la moitié du contenu du puit afin de le mettre dans le puit suivant. Nous avons par la suite introduit 100µL de BHIB additionné de Tween 80 dans chacun des puits des deux lignes, puis 50µL de la suspension de *Klebsiella pneumoniae* A dans tous les puits de la première ligne et 50µL de la suspension de *Klebsiella pneumoniae* B dans tous les puits de la deuxième ligne et avons bien mélangés.

Concernant le contrôle négatif, nous avons introduit 50µL de la suspension de *Klebsiella pneumoniae* A et 50µL de BHIB additionné de Tween 80 dans le premier puit de la troisième ligne. Pour ce qui est du deuxième puit de la troisième ligne nous avons introduit50µL de la suspension de *Klebsiella pneumoniae* B et 50µL de BHIB additionné de Tween 80 et avons bien mélangés. Nous avons ensuite incubé la plaque pendant 24h à 37°C (Figure 21).

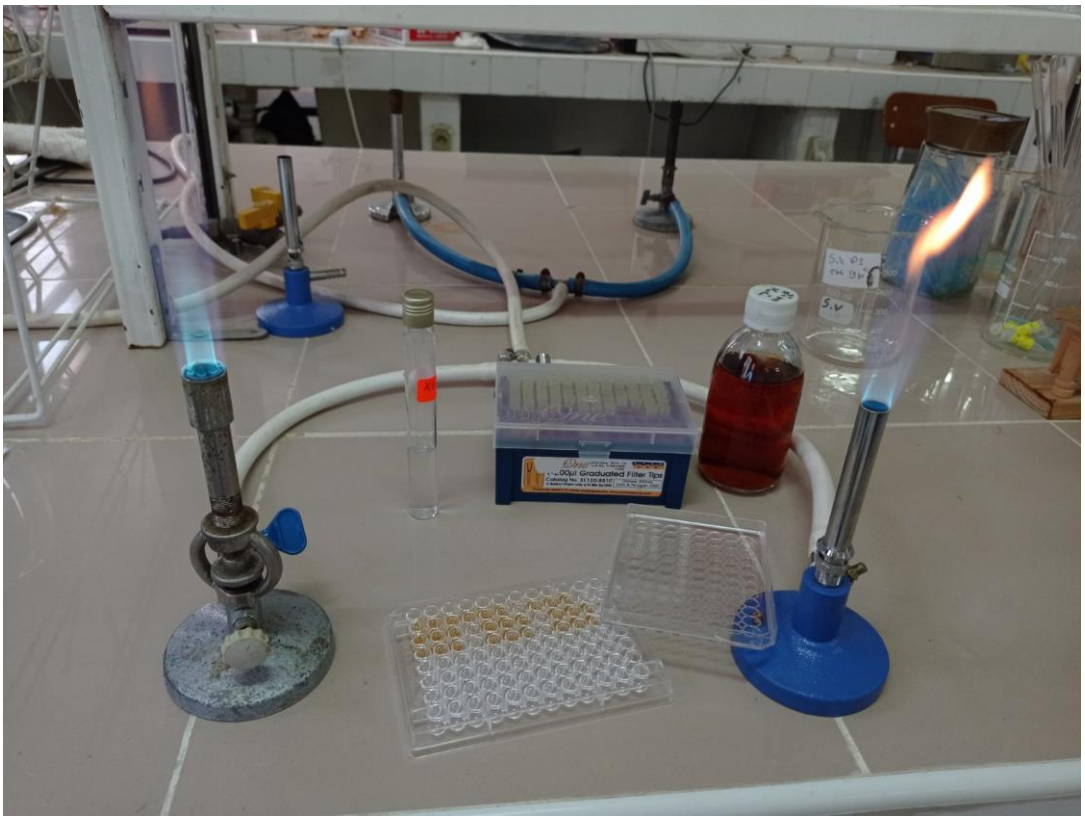

Figure 22 : Plaque ELISA avant incubation (image personnelle).

Après incubation de la plaque, nous avons rajoutés dans tous les puits 30µL de rézasurine à 0.015% et avons incubés une deuxième fois pendant 2h à 37°C **(Landeta *et al.*, 2013)**.

II.4. Activité antibiofilm de l'huile essentielle du laurier

II.4.1. Préparation des suspensions bactériennes

Dans des tubes d'eau physiologique de 10ml, nous avons préparés des suspensions bactériennes d'une concentration de 10^8UFC/ml à partir de colonies prélevées des boites de pétri. Les suspensions ont été standardisées au moyen de la spectrophotométrie à 0.5McFarland correspondant à une densité optique variant de 0.08 à 0.1.

Dans des tubes de BHIB de 9ml, nous avons réalisés des dilutions des suspensions déjà préparées de sorte à ce que les concentrations deviennent de 10^7UFC/ml.

II.4.2. Inhibition du développement du biofilm

Dans cette étape nous avons utilisés deux plaques ELISA. Dans la première plaque nous avons utilisé deux lignes dédiées pour les deux souches de *Klebsiella pneumoniae*. Nous avons introduit 100µL de la suspension de *Klebsiella pneumoniae* A à 10^7UFC/ml à base de BHIB dans chacun des puits de la première ligne, puis 100µLde la suspension de *Klebsiella pneumoniae* B à 10^7UFC/ml à base de BHIB dans tous les puits de la deuxième ligne et avons bien mélangés. Et deux contrôles négatifs dans la troisième ligne (le premier puit contient 100µL de la suspension de *Klebsiella pneumoniae* A à 10^7UFC/ml à base de BHIB et le deuxième puits, 100µL de la suspension de *Klebsiella pneumoniae* B à 10^7UFC/ml à base de BHIB toujours).

La plaque est ensuite mise à l'étuve pour une incubation de 4h à 37°C (Figure 22).

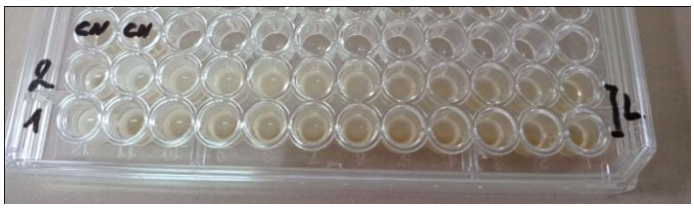

Figure 23 : Plaque ELISA après incubation de 4h (image personnelle).

Pour la deuxième plaque, nous l'avons utilisée pour réaliser les dilutions semi-logarithmiques. Nous avons introduit 200µL de la solution mère dans les deux premiers puits des deux premières lignes de la plaque et avons dilués en aspirant à chaque fois la moitié du contenu du puits afin de le mettre dans le puits suivant.

L'huile essentielle contenue dans les puits de la deuxième plaque est introduite dans la plaque incubée de sorte à ce que chaque huile soit introduite dans le puits qui lui correspond. La plaque est encore incubée pendant 24h à 37°C.

Après avoir incubé la plaque, nous avons versés le contenu des puits et avons lavés en rajoutant 200µL de tampon PBS que nous avons laissés agir sous agitation douce pendant 10min. Le PBS a ensuite été aspiré et les cellules ont été fixées par addition de 200µL d'éthanol pur pendant 10min. Après avoir fixé à l'éthanol, le contenu des puits a été encore aspiré et nous avons colorés par ajout de 200µL de cristal violet à 1% pendant 20min et avons lavés 4fois au PBS sous agitation douce toujours. En dernier lieu, nous avons solubilisés le

biofilm par addition de 200µL d'éthanol pendant 30min. Nous avons enfin fait une lecture au moyen d'un lecteur ELISA à 560nm **(Landeta *et al.*, 2013)**.

Le résultat est exprimé par la formule suivante :

$$\frac{DOblanc - DOexpérimentale}{DOexpérimentale} \text{x } 100$$

DO_{blanc} : densité optique du contrôle positif.

$DO_{expérimentale}$: densité optique du biofilm formé au contact de l'huile essentielle du laurier.

I. Rendement et densité de l'huile essentielle

L'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. obtenue par la distillation par entraînement à la vapeur des feuilles sèches est d'une couleur jaune translucide, fortement aromatique avec un rendement de 0,32% et une densité de 0,86 g/ml.

Le rendement obtenu par cette technique d'extraction est relativement inférieur à celui que Franco-Vega *et al*. 2018 ont obtenu lors de leur étude, où ils ont employé la technique d'extraction assistée par micro-ondes (MAE), estimé à 1,08 ± 0,04%. De leur côté, Belasli *et al*. 2020 ont obtenu un rendement de 1,13% en employant l'extraction par hydrodistillation dans un Clevenger.

Selon la littérature, la variation du rendement en huile essentielle peut-être due à plusieurs facteurs. Parmi ceux-ci, les plus importants sont les suivants : la technique d'extraction employée, les parties végétales utilisées, les produits et réactifs utilisés pendant l'extraction, l'environnement, le génotype de la plante, son origine géographique, la période de récolte de cette plante, le degré et les conditions de séchage, la température et la durée de séchage, l'éventuelle présence de parasites, de virus et de mauvaises herbes **(Bajpai *et al.*, 2008)**.

II. Evaluation quantitative de la formation des biofilms par *Klebsiella pneumoniae* A et *Klebsiella pneumoniae* B

Les densités optiques des biofilms formés dans les puits de la microplaque par les deux souches de *Klebsiella pneumoniae* A et *Klebsiella pneumoniae* B, sont identiques et d'une valeur de 2,8 à une longueur d'onde de 560 nm,qui est supérieure à celle du témoin positif, à savoir *Staphylococcus aureus* 25923 dont la DO du biofilm était de 1,87.La DO obtenue lors de la formation du biofilmest comprise dans l'intervalle $2 < 2,8 < 3$ ce qui permet de catégoriser ces deux souches bactériennes comme modérément formatrices de biofilm **(Landeta *et al.*, 2013)**.

Deux études similaires ont été menées par Vuotto *et al.* 2017 et par Cepas *et al.* 2019. Les souches MDR de *Klebsiella pneumoniae* ayant fait office d'objet d'études ont formé des biofilms dont les densités optiques sont de 0,3 et de 0,81 à une longueur d'onde de 580 nm respectivement et sont donc remarquablement inférieures à celle que nous avons obtenue au cours de notre étude.

Pour former un biofilm, *Klebsiella pneumoniae* utilise un facteur de virulence d'une importance capitale, à savoir le fimbriae. Il existe deux adhésines fimbriales différentes appelées respectivement fimbriae de type 1 et de type 3. Cependant, La littérature a montré que les fimbriae de type 3 auraient un impact plus évidentsur la formation de biofilms chez *Klebsiella pneumoniae* que les fimbriae de type 1. Il serait également impliqué dans la colonisation des surfaces abiotiques ainsi que dans l'adhérence dépendante des fimbriae de type 3, qui est la première étape de la formation du biofilm de *Klebsiella pneumoniae* **(Fang *et al.*, 2021)**. Ensuite, la matrice d'exopolysaccharides est formée (phase d'attachement irréversible), et ce, à partir de mannose, de galactose et de glucose qui sont les hydrates de carbone les plus abondants, suivis de N-acétyl-glucosamine, d'acide galacturonique, d'arabinose, de fucose, de rhamnose et de xylose, formant ainsi un échafaudage pourd'autres glucides, protéines, acides nucléiques et lipides qui y adhéreront par la suite **(Rabin *et al.*, 2015)**.

III. Détermination de la CMI

La CMI correspond à la concentration en huile essentielle dans le dernier puit où la rézasurine n'a pas viré du bleu au rose, tel qu'on l'observe au niveau des puits F1 et F2 exempts d'huile essentielle (Figure 23) contenant les deux contrôles négatifs, ce qui a permis la croissance de *Klebsiella pneumoniea* A et *Klebsiella pneumoniae* B. Dans ce cas-là elle correspond au premiers puits de chaque série de dilution à savoir H1 et G1 respectivement (Figure 23). La rézasurine n'a pas été réduite en résofurine (absence de virage de couleur) indiquant l'absence de croissance bactérienne. Il s'agit là de la solution mère elle-même dont la concentration s'élève à 217.5 mg/ml. Cette valeur est considérablement supérieure à celle des travaux de Merghni *et al*. 2016 et de Reis *et al.* 2020 qui ont obtenu respectivement des CMI de 31,24 mg/ml et de 12 mg/ml.

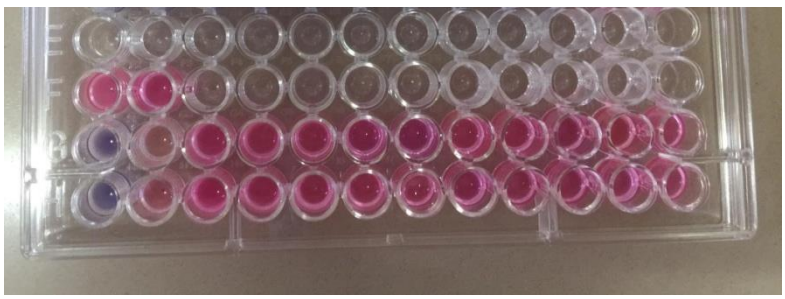

Figure 24 : Détermination de la CMI sur microplaque au moyen de la résazurine (image personnelle).

La réduction irréversible de la résazurine en résofurine (indicateur coloré rose fortement fluorescent) témoigne de la viabilité des cellules **(Chen *et al*., 2015)**. Cette réaction se produit en présence de l'enzyme NADPH déshydrogénase ou NADH déshydrogénase, où le NADPH et le NADH réduisent la résazurine en résofurine respectivement **(Shahangian *et al*., 1984)**.

L'huile essentielle de laurier est réputée pour son activité inhibitrice contre un large spectre de micro-organismes. Son activité antibactérienne peut être expliquée par le fait qu'elle perturbe la stabilité de la membrane cellulaire, ainsi quepar l'augmentation de sa perméabilité. Elle pourrait également altérer les protéines membranaires, et par conséquent, perturber le transport membranaire des molécules. Il a été démontré précédemment que les terpènes seraient parmi les constituants responsables de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de laurier. Le taux d'inhibition de la croissance bactérienne pourrait être dû à plusieurs facteurs, tels que : la saisonnalité, la variabilité de la matière végétale et la composition de l'huile essentielle. La capacité d'inhibition de cette dernière sur la croissance microbienne serait probablement due à l'effet synergique du 1,8-cinéole avec les terpènes oxygénés de l'huile **(Fidan *et al*., 2019)**.

IV. Evaluation de l'activité inhibitrice de la formation du biofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L.

La lecture effectuée via le lecteur ELISA à une longueur d'onde de 560 nm a donné les densités optiques dans le tableau suivant :

Tableau II: Densités optiques à une longueur d'onde de 560 nm des biofilms formés après 4h d'incubation par *Klebsiella pneumoniae* A et *Klebsiella pneumoniae* B après l'ajout des dilutions semi-logarithmiques de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L.

Souche	**DO**											
K.pneumoniae A	1,04	1,87	2,34	1,28	1,14	0,86	0,81	0,8	0,71	0,6	0,6	0,54
K.pneumoniae B	1,31	1,98	2,32	1,67	1,29	1,05	0,97	0,8	0,79	0,72	0,65	0,51

Dans les puits correspondant à la CMI, les densités optiques sont inférieures celle du contrôle négatif, qui a donné une DO de 2,3 témoignant de la formation du biofilm en l'absence de l'huile essentielle, à savoir : 1,31 et 1,04 respectivement. On déduira donc que

l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. possède une activité inhibitrice du développement des biofilms formés par ces deux souches, qui est estimé à 58,21%.

Ce résultat est relativement égal à celui obtenu par Merghni *et al*. 2016 avec une concentration correspondant à la CMI x ¼, soit 7.81 mg/ml et une activité inhibitrice du développement du biofilm de 50%, et de 78% dans les travaux menés par Chmit *et al*. 2014 à une CMI estimée à 78.84 mg/ml.

La présence de l'eugénol, qui est un des composants de l'huile essentielle du laurier, réprimerait l'expression des gènes responsables de la régulation et de la formation du biofilm chez *Klebsiella pneumoniae*, à savoir : pgaA, luxS, wbbM et wzm ce qui pourrait induire le détachement des cellules bactériennes de la matrice du biofilm et leur dispersion, facilitant ainsi l'endommagement de leur membranes celluaires **(Qian *et al*., 2020)**.

En effet, celles-ci sont de plus en plus perméables compte tenu de l'hydrophobicité de l'huile essentielle du laurier. A cet effet, le matériel génétique des cellules est détruit, la concentration de l'ATP est déséquilibrée, entrainant ainsi un déséquilibre du pH et une perturbation de la synthèse protéique **(El-Tarabily *et al*., 2021)**.

La réduction de la densité cellulaire serait également due à la forte concentration de l'huile essentielle du laurier en 1,8-Cineol qui présente une importante activité antibactérienne **(Alejo-Armijo *et al*., 2017)**. De ce fait, le QS et la communication intercellulaire sont interrompus et le développement du biofilm est inhibé **(El-Tarabily *et al*., 2021)**.

Outre son activité antibactérienne, le 1,8-Cineol exercerait un effet anti-attachement des cellules planctoniques à la surface du support abiotique colonisé. Cet agent inhiberait également la mobilité des cellules planctoniques qui joue un rôle primordial dans le mécanisme du QS. **(Merghni *et al*., 2018)**.

Il a également été constaté que le 1,8-cinéole avait un effet significatif sur l'EPS. En effet, il réduirait de manière significative la production d'EPS. En même temps, le 1,8-cinéole réduirait considérablement l'activité hydrophobe des cellules planctoniques.**(Karuppiah *et al*., 2021)**.

Conclusion

Ce travail ayant pour but la détermination de l'activité antibiofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. s'est avéré très intéressante.

Les biofilms, du fait qu'ils sont impliqués dans tous les aspects des sciences biologiques, particulièrement en microbiologie ; commencent à être considérés comme un domaine à part entière. Il existe d'ailleurs de multiples modèles, protocoles et techniques d'analyse de données de biofilms.

L'utilisation de composés naturels semble être prometteuse dans le traitement des biofilms surtout en applications cliniques du fait qu'ils présentent une énorme influence sur le contrôle des infections dans le monde entier.

Effectivement, l'huile essentielle du laurier présente une activité antibactérienne avec une CMI s'élevant à 217,5 mg/ml.

De plus, grâce à ses nombreux composants, l'huile essentielle du laurier noble présente également une activité inhibitrice du biofilm qui s'élève à 58,21%. Un pourcentage non négligeable, vu qu'il inhibe pratiquement la moitié du biofilm formé au stade de son développement.

Perspectives futures

- Utilisation de combinaisons entre extraits végétaux et antibiotiques.
- Etude de la synergie entre deux huiles essentielles de deux plantes différentes.
- Les études doivent être orientées vers l'exploration des inhibiteurs naturels du QS et leur mode d'action doit être bien étudié.
- L'identification, la profonde connaissance des éléments d'un biofilm et ses mécanismes moléculaires.
- L'orientation vers les inhibiteurs des pompes à efflux et du c-di-GMP qui est un essentiel messager de la formation du biofilm est également envisageable.

Références bibliographiques

A

Alejo-Armijo A., Altarejos J et Salido S. (2017). Phytochemicals and Biological Activities of Laurel Tree (*Laurus nobilis L.*). Natural Product Communications. Vol 12 (5), 743-757.

Ayan M., Kuzucu C., Durmaz R., Aktas E et Cizmeci Z. (2003). Analysis of three outbreaks due to Klebsiella species in a neonatal intensive care unit. Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 24: 495-50.

B

Bajpai V.K., Rahman A et Kang S.C. (2008). Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica Thunb*. to control food-borne pathogenic and spoilage bacteria. International Journal of Food Microbiology. Vol 125, 117-122.

Bariz K. (2020). Etude de la résistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* beta-lactamases à spectre élargi (BLSE) isolées au CHU de Tizi-Ouzou.

Baydaa A.H. (2019). *Klebsiella pneumonia* growth on macconkey agar medium. 10.13140/ RG.2.2.12593.84329.

Belasli A., BenMiri Y., Aboudaou M., AitOuahioune L., Montanes L., Arino A et Djenane D (2020). Antifungal, antitoxigenic, and antioxidant activities of the essential oil from laurel (*Laurus nobilis L.*): Potential use as wheat preservative. Food Science & Nutrition.

Bernard.(2019). Laurier : utilité, culture, entretien, protection. 1000 Arbres.

Brenner D.J et Krieg N.R. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition.

Brindhadevi K., Oscar F.L., Mylonakis E., Shanmugam S., Verma T.N et Pugazhendhi A. (2020). Biofilm and Quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. Process Biochemistry. Vol 96, 49-57.

Bruno P. (1999). Laurier noble (*Laurus nobilis L.*). Vienne Nature.

C

Cadavid E et Echeverri F. (2019). The Search for Natural Inhibitors of Biofilm Formation and the Activity of the Autoinductor C6-AHL in *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884. Biomolecules.

Cepas V., López Y., Muñoz E., Rolo D., Ardanuy C., Martí S et Soto S.M. (2018). Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. Microbial Drug Resistance.

Chahal K.K., Kaur M., Bhardwaj U., Singla N et Kaur A. (2017). A review on chemistry and biological activities of *Laurus nobilis L.* essential oil. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. Vol 6 (4), 1153-1161.

Chen J.L., Steele T.W.J et Stuckey D.C. (2015). Modeling and Application of a Rapid Fluorescence-Based Assay for Biotoxicity in Anaerobic Digestion. Environmental Science and Technology. Vol. 49 (22)17, 13463-13471.

Chmit M., Kanaan H., Habib J., Abbass M., Mcheik A et Chokr A. (2014). Antibacterial and antibiofilm activities of polysaccharides, essential oil, and fatty oil extracted from *Laurus nobilis* L. growing in Lebanon. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, Vol 7, S546-S552.

Chung P.Y. (2016). The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. FEMS Microbiology Letters.

Coenye T., Kjellerup B., Stoodley P., Bjarnsholt T and the 2019 biofilm bash participants. (2020). The future of biofilm research – Report on the '2019 Biofilm Bash'. Biofilm. Vol 2, 100012.

D

Drancourt M., Bollet C., Carta A et Rousseliier P. (2001). Phylogenetic analysis of Klebsiella species delineate Klebsiella and Raoutella gen. nov., with description of *Raoutella ornitholytica* comb.nov., *Raoutella terrigena* comb.nov and *Raoutella planticola* comb.nov. International. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 925-932.

Références bibliographiques

E

El-Tarabily K.A., El-Saadony M.T., Alagawany M., Arif M., Batiha G.E., Khafaga A.F., Elwan H.A.M., Elnesr S.S et El-Hack M.E. (2021). Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. Saudi Journal of Biological Sciences. Vol 28 (9), 5145-5156.

Ernest et Fievre. (2017). Les métamorphoses d'Ovide. Theatre classique. Livre I, 16-18.

F

Fang R., Liu H., Zhang X., Dong G., Li J., Tian X et Zhou T. (2021). Difference in biofilm formation between carbapenem-resistant and carbapenem-sensitive *Klebsiella pneumoniae* based on analysis of mrkH distribution. Microbial Pathogenesis. Vol 152, 104743.

Fidan H., Stefanova G., Kostova I., Stankov S., Damyanova S., Stoyanova A., et Zheljazkov V.D. (2019). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Laurus nobilis* L. Essential Oils from Bulgaria. Molecules. Vol 24(4), 804.

Franco-Vega A., Ramírez-Corona N., López-Malo A et Palou E. (2018). Studying microwave assisted extraction of *Laurus nobilis* L. essential oil: static and dynamic modeling. Journal of Food Engineering.

G

Goel N., Fatima S.W., Kumar S., Sinha R et Khare S.K. (2021). Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. Biotechnology Reports. Vol 30, e00613.

Grimont P et Grimont F. (2005).GENUS XVI KLEBSIELLA. in: Brenner D.J., Krieg N.R., Stanley D.J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer, New York, pp 685-693.

H

Hoiby N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. APMIS 125: 272-275.

Huet A.(2018). Au fait, pourquoi le baccalauréat s'appelle-t-il « baccalauréats » ? Europe 1.

J

Jiang Y., Liu Y., Zhang X., Gao H., Mou L., Wu M., Zhang W., Xin F et Jiang M. (2021). Biofilm application in the microbial biochemicals production process. Biotechnology Advances. Vol 48, 107724.

Johnson J.G., Murphy C.N., Sippy J., Johnson T.J et Clegg S. (2011). Type 3 Fimbriae and Biofilm Formation Are Regulated by the Transcriptional Regulators MrkHI in *Klebsiella pneumonia.* Journal of Bacteriology. Vol 193 (14), 3453-3460.

Jonas D., Spitzmuller B., Daschner F.D., Verhoef J et Brisse S. (2004). Discrimination of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* phylogenetic groups and other Klebsiella species by use of amplified fragment length polymorphism. Res. J. Microbiol. 155: 17-23.

K

Karuppiah V., Thirunanasambandham R et 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. Vol 37(4).

L

Landeta G., Curiel J.A., Carrascosa A.V., Munoz R et Rivas B.(2013). Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from dry cured meat products. Meat Science. 387-396.

M

Martin R.M et Bachman M.A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae.* Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.

Merghni A., Noumi E., Hadded O., Dridi N., Panwar H., Ceylan O et Snoussi M. (2018). Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Microbial Pathogenesis. Vol 118, 74-80.

Murphy C.N et Clegg S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. Future Microbiology. Vol 7 (8), 991-1002.

Références bibliographiques

N

Nabila B., Piras A., Fouzia B., Falconieri D., Kheira G., Fedoul F.F et Majda S.R. (2020). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Laurus nobilis L.* leaves. Natural Product Research.

P

Patrakar R., Mansuriya M et Patil P. (2012). Phytochemical and Pharmacological Review on *Laurus nobilis L.*International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences. Vol 1 (2), 2277-5005.

Q

Qian W., Sun Z., Wang T., Yang M., Liu M., Zhang J et Li Y. (2020). Antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effect on biofilms. Microbial Pathogenesis. Vol 139, 103924.

R

Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E et Sintim H.O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Medicinal Chemistry. Vol 7(4), 493-512.

Reis P.M.C.L., Mezzomo N., Aguiar G.P.S., Hotza D., Baggio-Ribeiro D.H., Salvador-Ferreira S.R et Hense H. (2020). Formation, stability and antimicrobial activity of laurel leaves essential oil (*Laurus nobilis* L.) particles in suspension obtained by SFEE. The Journal of Super Critical Fluids. 105032.

Rohatgi A et Gupta P. (2021). Natural and synthetic plant compounds as anti-biofilm agents against *Escherichia coli* O157:H7 biofilm. Infection, Genetics and Evolution. Vol 95, 105055.

Ruhal R., Kataria R. (2021). Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. Microbiological Research. Vol 251, 126829.

S

Saraiva C.R.N., Nonato C.F.A., Camilo C.J., Araújo A.C.J., Rodrigues F.F.G., Coutinho H.D.M et Costa J.G.M. (2021). Chemical profile and inhibition of MDR bacteria by the essential oil of *Laurus nobilis L.* and its major compound 1,8-cineol. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. Vol 36, 102148.

Shahangian S., Ash K.O et Rollins D.E. (1984). An Enzymatic Method for the Analysis of Formate in Human Plasma. Journal of Analytical Toxicology. Vol. 8 (6),273-276 .

Srey S., Jahid I.K et Ha S.D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control. Vol 31, 572-585.

T

Taarabt K.O., Koussa T et Alfeddy M.N. (2017). Caractéristiques physicochimiques et activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *Laurus nobilis L.* au Maroc. Afrique Science. Vol 13 (1), 349-359.

Taban A., Saharkhiz M.J et Niakousari M. (2018). Sweet bay (*Laurus nobilis L.*) essential oil and its chemical composition, antioxidant activity and leaf micromorphology under different extraction methods. Sustainable Chemistry and Pharmacy. Vol 9, 12-18.

Tomar O.,Akarca G., Gok V et Ramadan M.F. (2020). Composition and Antibacterial Effects of Laurel (*Laurus nobilis L.)*Leaves Essential Oil. Journal Of Essential Oil. Vol 23 (2), 414-421.

V

Vanzieleghem T. (2021). Les biofilms en milieu hospitalier : quels sont les enjeux pour l'hygiène hospitalière ? noso info. Vol 115 (3).

Vuotto C., Longo F., Pascolini C., Donelli G., Balice M.P., Libori M.F et Varaldo P.E. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. Journal of Applied Microbiology. Vol 123 (4), 1003-1018.

W

Wang G., Zhao G., Chao X., Xie L et Wang H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of Klebsiella pneumonia. International Journal Of Environmental Research and Public Health. Vol 17, 6278.

Wilksch J.J., Yang J., Clements A., Gabbe J.L., Short K.R., Cao H., Cavaliere R., James C.E., Whitchurch C.B., Schembri M.A., Chuah M.L.C., Liang Z.X., Wijburg O.L., Jenney A.W., Lithgow T et Strugnell R.A. (2011).MrkH, a Novel c-di-GMP-Dependent Transcriptional Activator, Controls *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Formation by Regulating Type 3 Fimbriae Expression. Plos Pathogens. Vol 7 (8), e1002204.

Willsey G.G., Ventrone S., Schutz K.C., Wallace A.M., Ribis J.W., Suratt B.T et Wargo M.J. (2018). Pulmonary surfactant promotes virulence gene expression and biofilm 2 formation in *Klebsiella pneumoniae*. Infection and Immunity.

Wyres K.L et Holt K.E. (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. Current Opinion in Microbiology. Vol 45, 131-139.

Wyres K.L., Lam M.M.C et Holt K.E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae.* Nature Reviews Microbiology.

Y

Yang X., Dong N., Chan E.W.C., Zhang R et Chen S. (2020). Carbapenem Resistance-Encoding and Virulence-Encoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumonia.* Trends in Microbiology. Vol 29 (1), 65-83.

Z

Zhao X., Zhao F., Wang J et Zhong N. (2017). Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. RSC Advances. Vol 7, 36670.

Annexes

BHIB

Mélanger 37g du milieu BHIB dont la composition est noté ci-dessous avec 1L d'eau distillée et laisser agiter jusqu'à homogénéisation.

Composition

- Protéose-peptone.
- Infusion de cervelle de veau.
- Infusion de cœur de bœuf.
- Glucose.
- Chlorure de sodium.
- Hydrogénophosphate de sodium.

Gélose Mueller-Hinton

Mélanger 37g du milieu MH dont la composition est décrite ci-dessous avec 1L d'eau distillée et laisser agiter tout en chauffant.

Composition

Hydrolysat acide de caséine.

Extrait de viande.

Amidon.

Eau physiologique

Mélanger 9g de NaCl avec 1L d'eau distillée et laisser agiter quelques minutes.

Tampon PBS

Dissoudre 0.26g de NaH_2PO_4, 2.17g de Na_2HPO_4 et 8.17g de NaCl dans 1L d'eau distillée, puis agiter.

Annexes

Cristal violet à 1%

Pour une préparation de 10ml de cristal violet ; mélanger 0.1g de cristal avec 10ml d'eau distillée et bien vortexer afin de dissoudre la poudre.

Rézasurine

Dissoudre 1.5mg de rézasurine dans 10ml d'eau distillée et bien vortexer.

Tableau III : Appareillage et autre matériel utilisé.

Appareillage	Verrerie	Autre
• Vortex • Agitateur magnétique • Agitateur de plaque • Balance à précision • Bain-marie • Spectrophotomètre • Etuve • Autoclave • Lecteur ELISA	• Tubes à essai • Erlenmeyers • Béchers • Eprouvettes • Entonnoirs	• Ethanol pur • Tween 80 • Microplaques ELISA 96 puits • Boites de pétri • Ecouvillons • Micropipettes • Anse à boucle • Cuves • Barreau magnétique • Embouts bleus • Embouts jaunes • Bec bunsen • Cocotte dotée d'un thermomètre et d'un baromètre • Colonne de distillation • Alambic • Ependorfs • Spatule • Pissette • Portoirs

Tableau IV : Composition chimique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. **(Belasli *et al.*, 2020)**.

Composants	Pourcentage (%)	Formule chimique
α-Phellandrene	0.6	$C_{10}H_{16}$
α-Pinene	4.7	$C_{10}H_{16}$
Camphene	13.4	$C_{10}H_{16}$
Sabinene	4.8	$C_{10}H_{16}$
β-Pinene	3.2	$C_{10}H_{16}$
Myrcene	0.2	$C_{10}H_{16}$
δ-3-Carene	0.6	$C_{10}H_{16}$
α-Terpinolene	0.5	$C_{10}H_{16}$
P-Cymene	0.2	$C_{10}H_{14}$
M-Cymene	0.8	$C_{10}H_{14}$
Limonene	1.3	$C_{10}H_{16}$
1,8-Cineole	35.5	$C_{10}H_{18}O$
γ-Terpinene	0.9	$C_{10}H_{16}$
Trans-Sabinene hydrate	0.3	$C_{10}H_{18}O$
Linalool	11.4	$C_{10}H_{18}O$
δ-terpineol	0.2	$C_{10}H_{18}O$
Borneol	0.4	$C_{10}H_{18}O$
Terpinen-4-ol	3.2	$C_{10}H_{18}O$
α-Terpineol	2.2	$C_{10}H_{18}O$
Nerol	0.2	$C_{10}H_{18}O$
Zeta-Fenchene	0.2	$C_{10}H_{16}$
Eugenol	1.0	$C_{10}H_{12}O_2$
β-Elemene	0.3	$C_{15}H_{24}$
Methyleugenol	7.8	$C_{11}H_{14}O_2$
β-Caryophyllene	0.6	$C_{15}H_{24}$
Cinnamicacid	0.3	$C_9H_8O_2$
Bicyclogermacrene	0.2	$C_{15}H_{24}$
δ-Cadinene	0.2	$C_{15}H_{24}$
12-Nor-caryophyll-5-en-2-one	0.2	$C_{14}H_{22}O$

Elemicin	0.6	$C_{12}H_{16}O_3$
Spathulenol	0.9	$C_{12}H_{24}O$
Caryophyllene oxide	0.6	$C_{15}H_{24}$
Valencene	0.2	$C_{15}H_{24}$
(E,Z)-1,2-diethylidenecyclopentane	0.2	C_9H_{14}
T-Muurolol	0.7	$C_{15}H_{25}O$
Longifolene	0.2	$C_{15}H_{24}$

Résumé

Etant donné que les biofilms posent un sérieux problème dans de nombreux secteurs et que leur éradication devient de plus en plus compliquée à cause de l'émergence de souches résistantes ; cette étude a été effectuée dans l'objectif d'explorer l'activité anti-biofilm de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. contre deux souches de *Klebsiella pneumoniae*.

En premier lieu, une expérience ayant pour but de tester la capacité des deux souches de *Klebsiella pneumoniae* à former des biofilms a permis d'obtenir une densité optique de 2,8, une valeur permettant de considérer les deux souches comme modérément formatrices.

Par la suite, la détermination de la CMI au moyen de la rézasurine s'est révélée d'une valeur de 217,5 mg/ml correspondant à la solution mère elle-même.

Enfin, l'évaluation de l'activité inhibitrice de l'huile essentielle au stade de développement du biofilm a permis l'obtention de deux densités optiques: 1,04 pour *Klebsiella pneumoniae* A et 1,31 pour *Klebsiella pneumoniae* B ; valeurs remarquablement inférieures à 2,8 et grâce à lesquelles le pourcentage d'inhibition du développement du biofilm a été calculé et qui correspond à 58,21%.

Mots clés : *Klebsiella pneumoniae*/ *Laurus nobilis* L./Huile essentielle/ Biofilm/ Activité anti-biofilm.

Abstract

Due to the serious problems that biofilms cause in different fields, their eradication become more and more complicated because of the emergence of resistant strains ; this research was carried out in order to explore the anti-biofilm activity of the essential oil of *Laurus nobilis* L. against two strains of *Klebsiella pneumoniae*.

In a first side, an experiment that has for goal testing the ability of the two *Klebsiella pneumoniae* strains to form biofilms resulted in an optical density of 2.8, this value permit the classification of both strains as moderately formative.

Subsequently, the determination of the MIC via the use of rezasurin turned out to a value of 217.5 mg/ml wich corresponds to the stock solution itself.

Finally, the evaluation of the inhibitory activity of the essential oil at the development phase of biofilm showed two optical densities: 1.04 for *Klebsiella pneumonia* A and 1.31 for *Klebsiella pneumoniae* B ; values remarkably lower than 2.8 and thanks to which the percentage of biofilm development inhibition was calculated and which corresponds to 58.21%.

Key words: *Klebsiella pneumoniae/ Laurus nobilis* L./ Essential oil/ Biofilm/ Anti-biofilm activity.