



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



❖ **Présenté par :**

SAMER Imene

LADJ Ouiza

❖ **Devant le jury**

Président de jury : Mr. HOUALI. K

Promoteur : Mr. BARIZ. K

Examineur : Mr. MOUALEK. I

Promotion : 2020/2021

Remerciement

Nous tenons à remercier le Bon Dieu tout puissant de nous avoir offert l'opportunité de franchir ce stade de savoir, et de nous avoir donné la foi, la force et le courage, de réaliser ce modeste travail dans de bonnes conditions.

Notre profonde expression de reconnaissance et de remerciements est destinée à notre promoteur Mr BARIZ qui nous a fait l'honneur de diriger notre travail, pour son aide, ses conseils, sa disponibilité, son suivi mais surtout sa patience.

Notre reconnaissance va également à tous ceux qui nous ont apporté leur aide, notamment les enseignants qui ont assuré notre parcours d'études, les membres du département BMC, l'équipe de la bibliothèque pour l'aide apportée dans la recherche bibliographique.

Nos remerciements également avec grande gratitude, les membres de jury pour avoir aimablement accepté de juger ce travail.

Notre reconnaissance s'étend également à nos familles, nos amies et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail de fin d'études aux personnes les plus chères A mon cœur :

*A la mémoire de mes grands-parents, puisse Dieu tout puissant vous accorder sa miséricorde
et vous accueillir dans son vaste paradis.*

*A mes parents « SERHAN » et « NORA », mon cher père, qui a cru en moi et a su me guider
et me faire confiance, qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Ma très chère mère qui m'a soutenue durant mes études et ne m'a jamais privée de son
amour, de son attention, de ses encouragements et de ses prières C'est à travers vos
encouragements que j'ai opté pour cette noble tâche, et à travers vos critiques que je me suis
épanouie J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi, je vous rends
l'hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini
amour.*

*A mes deux frères « boukhalfa » et « islam » qui m'ont apportées leur soutien tout au long de
mes études*

*À mon cher mari, pour la patience et le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de
ce travail et à qui je voudrais exprimer mes affections et mes gratitude.*

*A Mes meilleures amies mes sœurs « HASSIBA », « NASSIMA », « AMIRA », HASSIBA même si
nous sommes loin l'une de l'autre désormais, cela n'a aucune importance tu es toujours dans mon
cœur merci pour votre soutien mes chères amies.*

*A ma chère binôme « OUIZA », ton aide, tes efforts, ta générosité, ton soutien ont été pour
moi une source de courage et de confiance.*

*Et enfin toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin, à la réalisation de ce
travail.*

Imene

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance. Je dédie ce modeste travail ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui ainsi à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

La prunelle de mes yeux, celui qui a changé les nuits en jours pour m'assurer de bonnes conditions la personne qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager et m'aider, ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Que ce travail soit un témoignage de mon profond amour et respect pour tes grands efforts : mon cher père FERHAT

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargnée aucun effort pour me rendre heureuse quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guides, ta présence est ma source de vie, ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, que ce travail soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir : mon adorable mère
HNIFA*

A mes chers frères « YAZID », « MIMOU » et « MOURAD » et mes chère sœur « LYNDA » et « LIZA » qui n'ont jamais cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.

A ma meilleur amie « KATIA » merci d'être dans ma vie et merci pour ton soutien.

A ma cher binôme « IMENE », ta patience, ta générosité, tes efforts fournis pour notre travail ont été pour moi le plus beau des cadeaux.

Ouiza

Liste des abréviations

KP : *Klebsiella pneumoniae*

KPc : *Klebsiella pneumoniae* classique

hvKP : *Klebsiella pneumoniae* hyper virulente

MDR : souche multirésistante

CRKP : *Klebsiella pneumoniae* résistante aux carbapénèmes

XDR : souche extrêmement résistante

QS : le quorum sensing

AHL : acyle homoserine lactones

ISO : l'organisation internationale de standardisation

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

HE : huile essentielle

BHIB : bouillon brain heart infusion

GN : gélose nutritive

AFNOR : L'Association française de normalisation est l'organisation française

CMI : concentration minimale inhibitrice

Liste des figures

Figure		Page
01	Micrographie électronique à balayage d'un biofilm sur une surface métallique à partir d'un système d'eau industriel	04
02	Mécanisme de formation des biofilms. Les quatre étapes de la formation d'un biofilm	10
03	Cellules de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
04	Aspect des colonies de <i>K. Pneumoniae</i> sur gélose	13
05	Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
06	Molécules de communication entre les bactéries	23
07	Allure d'un giroflier de Madagascar	27
08	Les clous de girofle	28
09	Bourgeons floraux séchés de <i>S.aromaticum</i>	31
10	Les souche bacterienne fournies par le laboratoire de recherche de la faculté des science biologiques et agronomique	32
11	Préparation de l'inoculum	35
12	Lecteur ELIZA	37
13	Première microplaque pour former les biofilms	39
14	Deuxième microplaque pour effectuer les dilutions semi logarithmique de l'huile	39
15	Souches de <i>K. Pneumoniae</i> sur gélose nutritive	42
16	Souches de <i>K. Pneumoniae</i> sur milieu Macconkey	42
17	Formation de biofilm sur microplaque	43
18	Microplaque pour déterminer la CMI	46

Liste des tableaux

Tableaux		Page
01	Constituants de la matrice du biofilms	05
02	Principales caractères biochimiques de <i>K. Pneumoniae</i>	14
03	Caractéristiques démographiques et cliniques qui peuvent aider à différencier une infection due à <i>Kp</i> hypervirulente et <i>Kp</i> classique	18
04	Récapitulatif des quantités, famille et propriétés des principaux composants de HE des clous de girofle	29
05	Principales caractéristiques de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
06	Milieu utilisés pour faire l'activité anti biofilm d'huile <i>S.aromatica</i>	34
07	Caractéristique de l'huile essentielle du clou de girofle	40
08	Calcul du rendement	40
09	Résultats de rendement	41
10	Résultats des DO de la microplaque au lecteur ELIZA	43
11	Effet des différentes concentrations d'huile essentielle sur la croissance des Bactéries	45
12	Valeurs des CMI	45
13	Effet de l'huile des clous de girofle sur la formation du biofilm différentes Concentrations.	46

Remerciements	I
Dédicace.....	II
Liste des abréviations	IV
Liste des figures	V
Liste des tableaux	VI

Sommaire

Partie bibliographique	
Introduction générale.....	1
Chapitre I : Biofilm bactérien	
1. Définition.....	4
2. Composition du biofilm	5
2.1. Les microorganismes	5
2.2. La matrice	5
3. Organisation	6
4. Etapes de formation de biofilm	6
4.1. Mise en place d'un film conditionnant	6
4.2. Transport et déplacement	7
4.3. Phase d'adhésion	7
4.4. Multiplication des bactéries et maturation du biofilm	9
4.5. Dispersion	9
Chapitre II : multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par <i>Klebsiella pneumoniae</i>.	
1. Dénomination de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
2. Présentation du genre	11
3. Classification	12
4. Caractères bactériologiques de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
4.1. Caractères morphologiques.....	12
4.2. Caractères culturels	13
4.3. Caractères biochimiques	14
4.4. Caractères antigéniques.....	14
5. Pouvoir pathogène.....	15
5.1 Facteurs de virulence chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
5.1.1 Antigènes de surface	16

5.1.2 Les adhésines.....	17
5.1.3 Les sidérophores.....	17
5.2. Les <i>Klebsiella pneumoniae</i> hypervirulente (hKp)	17
5.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> classique (cKp)	18
6. Mécanisme de résistance chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	19
6.1. Définition de la résistance	19
6.2. Types de résistance aux antibiotique.....	19
6.2.1. Résistance naturelle.....	19
6.2.2. Résistance acquise.....	20
6.2.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR et XDR.....	20
7. Capacité de formation de biofilm par <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
8. La régulation des biofilms.....	21
8.1. Définition du quorum sensing	22
8.2. Molécules du quorum sensing.....	22
8.3. Quorum sensing chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
9. Relation entre la multirésistance et la formation des biofilms	24

Chapitre III: effet antibactérien et antibiofilms des clous de girofle

1. Généralités	26
2. Définition des huiles essentielles	26
3. L'huile essentielle des clous de girofle	27
3.1. Taxonomie du giroflier.....	27
3.2. Définition des clous de girofle	28
3.3. Composition chimique de l'huile essentielle de clou de girofle	29
3.4. Utilisation de l'huile de clou de girofle.....	29

Partie expérimentale

Matériel et méthode

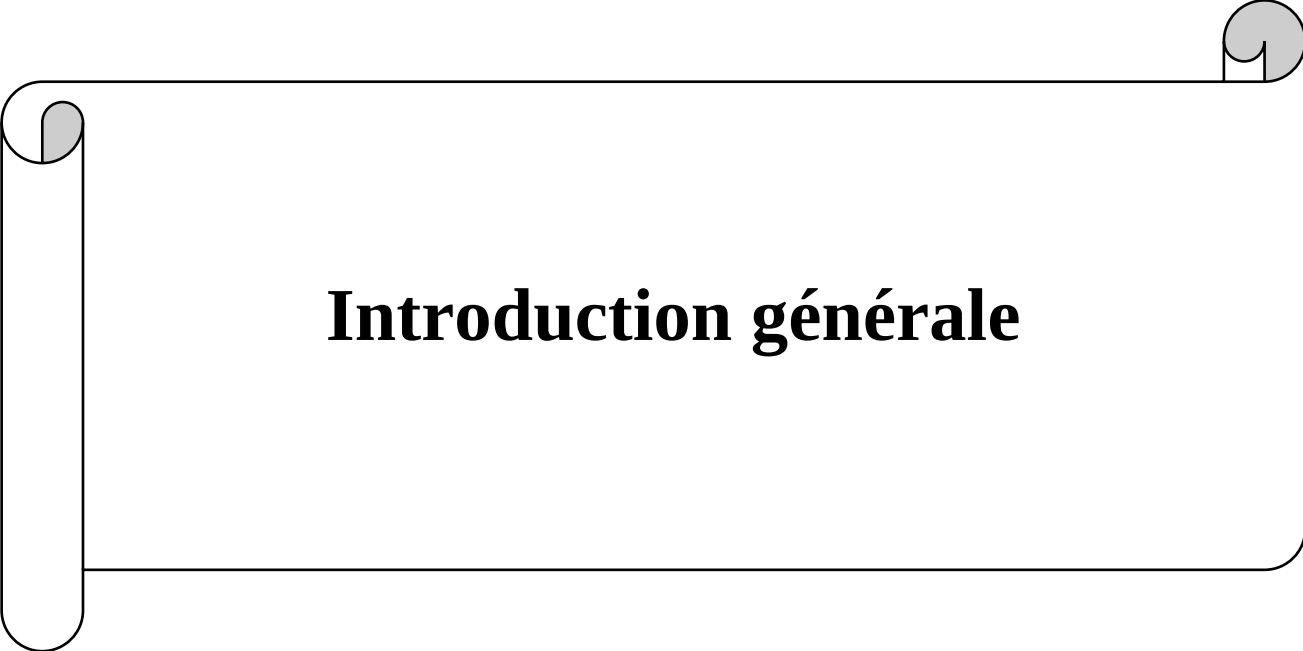
1. Matériels.....	31
1.1. Matériels biologiques	31
1.1.1. Matériel végétal	31
1.1.2. Les souches	32
1.2. Appareillage	33

1.3. Verreries et autres matériels Milieux de culture	33
1.4. Milieux de culture	34
1.5. Colorants et réactifs.....	34
2. Méthode	34
2.1. Extraction de l'huile essentielle	34
2.1.1. La conservation de l'huile essentielle	35
2.2. Préparation de l'inoculum	35
2.2.1. Encensement.....	36
2.3. Tests de formation de biofilm sur microplaque	36
2.3.1. Préparation de la suspension bactérienne	36
2.3.2. Évaluation de la capacité de la formation de biofilm par <i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
2.4. La réalisation des tests antibactériens et antibiofilm de l'huile essentielle de clous de girofle	37
2.4.1. Activité antibactérienne (Détermination de la CMI)	37
2.4.2. Activité antibiofilm	38

Résultats et discussion

1. Caractères organoleptiques.....	40
2. Rendement d'huile essentielle des clous de girofle.....	40
3. L'ensemencement.....	41
4. Formation du biofilm	43
5. Activités antibactérienne et antibiofilm de l'huile essentielle des clous de girofle	45
5.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	45
5.2. Activité antibiofilm	46
Conclusion générale	48
Bibliographie.....	49
Annexe	59

Résumé



Introduction générale

Introduction Générale

Les biofilms sont observés depuis longtemps, leurs caractéristiques et leurs structures n'étaient pas encore connues. Durant les années 1600, Antoni Van Leeuwenhoek, commerçant et scientifique néerlandais, a été le premier à observer et décrire les microorganismes (à l'origine appelés « animalcules ») à l'aide d'un microscope fabriqué à la main. Il a utilisé un échantillon issu de sa surface dentaire. Ce sont les formes libres et planctoniques des microorganismes, qui ont été les plus étudiées ; dès lors, l'essentiel des connaissances acquises résulte de travaux principalement réalisés sur ces formes, cultivées dans des milieux nutritifs liquides et agités. Quelques travaux attirent cependant l'attention sur les interactions existantes entre les microorganismes et leur surface (**Roux (1) et al., 2006**). En 1933, Arthur Henrici plonge des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de microorganismes qui s'épaissit progressivement (**HENRICI, 1933**). En 1943, Claude Zobell montre que dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension (**ZOBELL, 1943**).

Enfin, dans les années 1980, les travaux de William Costerton mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes ou homogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines. Présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales (surface des feuilles) ou animales (surfaces des muqueuses, surfaces dentaires etc.) (**Costerton et al., 1999**), elles sont appelées biofilms (**Khalilzadeh, 2009**). Les biofilms représentent également une importante source de nuisance en médecine humaine ou vétérinaire, ainsi que dans l'industrie alimentaire (**Zhao et al., 2013**). Cette communauté structurée d'agents pathogènes, encapsulée dans une matrice, est bien protégée contre les agents antibactériens ce qui les rend difficile à éliminer et rend la prolifération des microorganismes difficile à contrôler.

La résistance aux antimicrobiens (RAM) est apparue comme premier défis majeurs en matière de santé mondiale du 21^{ème} siècle qui menacent l'humanité, les animaux et l'environnement. Selon le Centre de contrôle et de prévention des maladies (CDC) 2019 RAM chaque année, plus de 2,8 millions d'infections se produisent aux États-Unis, La résistance croissante des bactéries aux antibiotiques et la difficulté de découvrir de nouveaux médicaments et des antimicrobiens en cours de développement. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a souligné la RAM comme l'une des dix principales menaces à la santé mondiale

Introduction Générale

en 2019. En cas d'exposition fréquente à des antibiotiques, les bactéries peuvent devenir résistantes aux antimicrobiens génétiquement. (NikkyGoela, et al., 2021).

D'autres agents antibactériens proviennent souvent du règne végétal. De nombreuses études ont été menées sur le potentiel antimicrobien des extraits de plantes et des huiles essentielles et il est bien établi que des nombreuses huiles essentielles ont la capacité de lutter contre les souches pathogènes telle que *Klebsiella pneumoniae* (Afif et al., 2018).

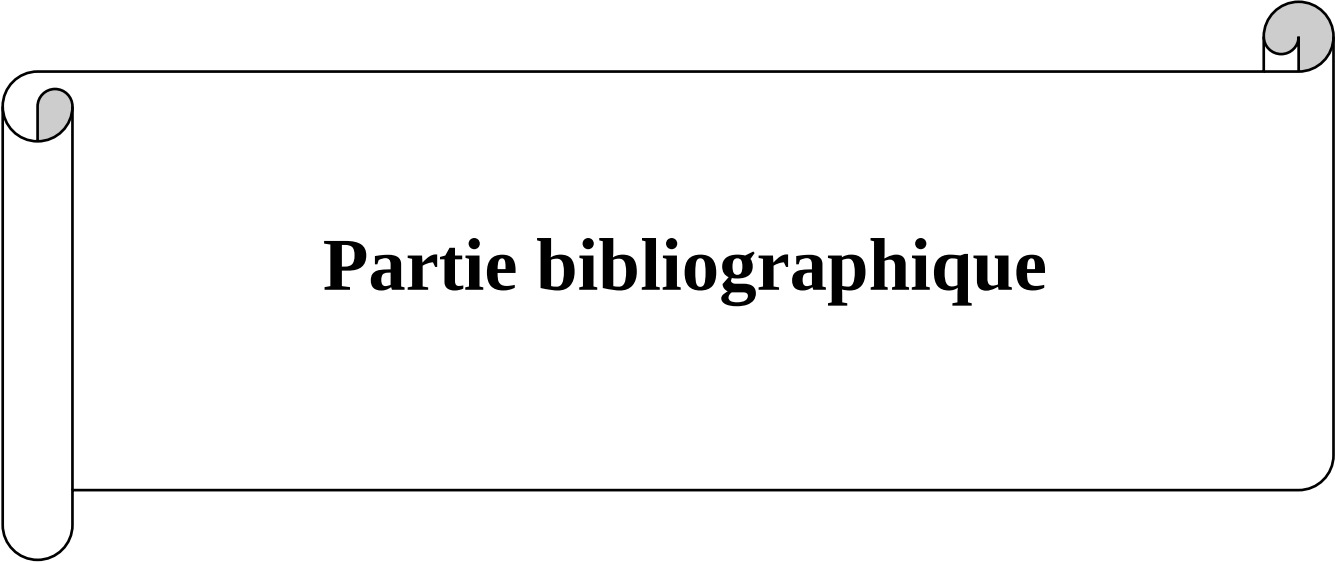
Comme il est déjà connu, de nombreuses espèces de genre bactérien *Klebsiella* provoquent des infections difficiles à traiter en raison de leur capacité de former des biofilms. En effet, ces souches sont bien protégées et deviennent insensibles aux antibiotiques et aux désinfectants, donc difficile à éliminer.

Toutefois, les preuves expérimentales s'accumulent pour trouver des alternatives en utilisant différents extraits à base de plante pour prévenir ou traiter ces infections associées aux biofilms. En effet, on a des extraits qui interfèrent avec l'étape initiale de la formation de biofilm en interférant avec la force qui favorise l'adhésion des bactéries aux surfaces. De plus, des composés phytochimiques peuvent aussi inhiber les molécules du quorum sensing, ce qui provoquera par la suite le blocage des facteurs de virulence (Krichnan et al., 2012 ; Vasavi et al., 2016).

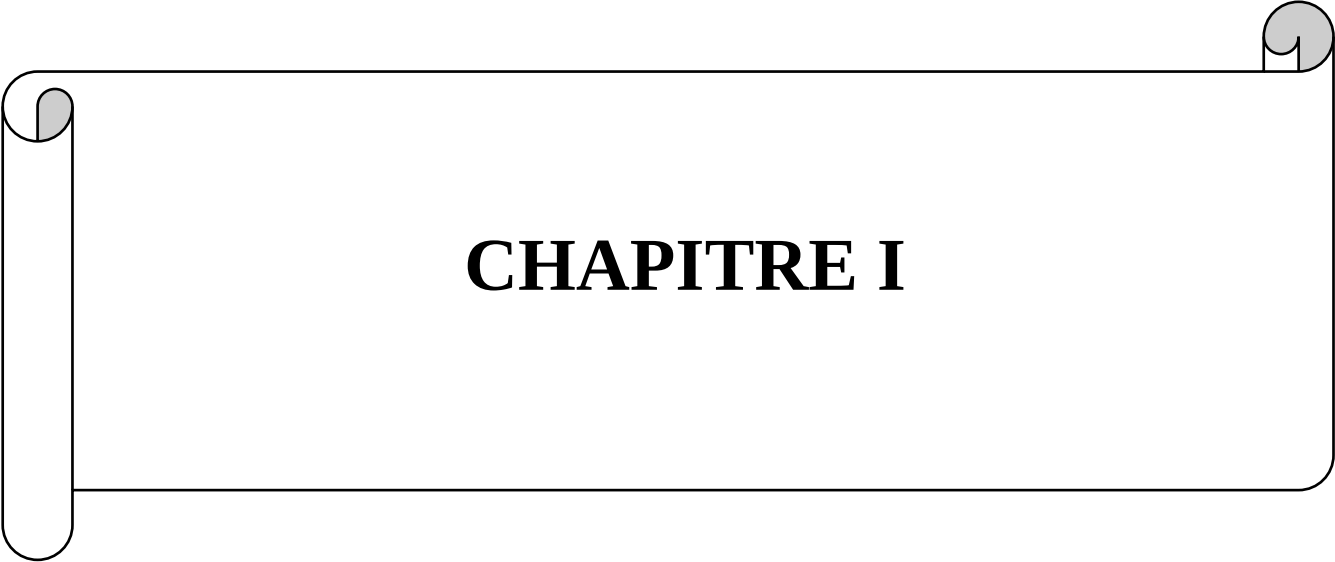
Dans le premier chapitre de ce mémoire, on présentera la physiologie des biofilms et ses étapes de formation. Puis on verra dans le deuxième chapitre les généralités sur *Klebsiella pneumoniae* son pouvoir pathogène, sa multirésistance à différents antibiotiques et le danger qu'elle présente actuellement dans le monde surtout en tant que souche formatrice de biofilms.

Enfin, dans le dernier chapitre de cette partie on présentera la plante des clous de girofle, leur taxonomie, utilisation de son huile essentielle et dans ce mémoire on s'intéressera surtout à l'effet antibactérien et anti biofilm de cette huile essentielle.

Dans la partie expérimentale on a réalisé différents tests, on a commencé par les tests de formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae* et on a eu des résultats satisfaisants. Par la suite on a étudié l'effet anti bactérien et antibiofilm de l'huile de clous de girofle.



Partie bibliographique



CHAPITRE I

1. Définition

Les bactéries forment un biofilm pour entrer dans un habitat qui leur fournit non seulement un abri contre les conditions environnementales difficiles mais aussi favorise l'accumulation de nutriments essentiels (A.D. Ćirić et *al.*, 2021). Les biofilms sont des grappes d'un (homogène) ou plusieurs micro-organismes (hétérogène) tels que des bactéries, des champignons et des virus qui sont attachés à une surface biotique (cellules des muqueuses) ou abiotique (équipement d'un hôpital) et intégrés dans une matrice autoproduite conçue pour la survie des organismes (Nikky Goela, 2021). Sa structure est hétérogène, souvent composée de substances polymère (exopolysaccharides, acides nucléiques et des protéines). Cette dernière permet aux bactéries de survivre dans des conditions environnementales hostiles ; Les bactéries du biofilm ont naturellement des propriétés sensiblement différentes de celles des bactéries "flottantes" de la même espèce, les bactéries formatrice de biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte, la dessiccation et sont beaucoup plus résistantes aux biocides (antibiotiques et désinfectants) que les cellules bactériennes planctoniques. De nombreux travaux ont montré que la formation d'un biofilm induit une expression différentielle des gènes (Aumeran Claire et *al.*, 2020).

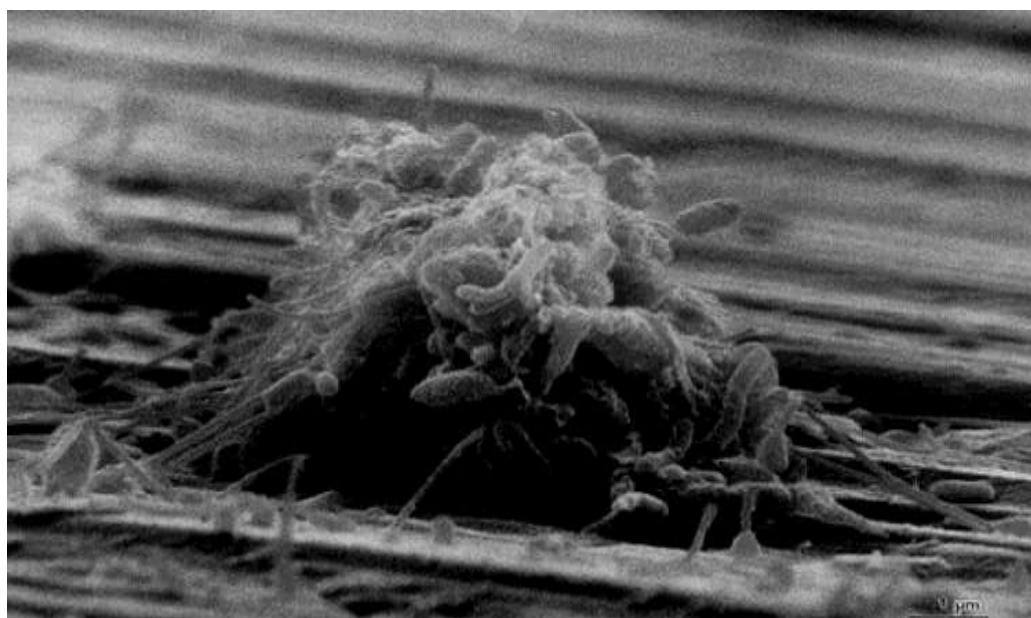


Figure 1 : Micrographie électronique à balayage d'un biofilm sur une surface métallique à partir d'un système d'eau industriel (Rodney M. Donlan, 2002).

2. Composition du biofilm

2.1 Les microorganismes

La couche la plus profonde du biofilm est constituée par les cellules qui se sont fixées en premier. Ces cellules sont petites, leur métabolisme est anaérobie et leur croissance est lente. La couche superficielle du biofilm est constituée de grandes cellules en aérobiose et à croissance rapide. Entre ces deux couches de cellules, on trouve des cellules en microaérobiose (**Chalvet de Rochermonteix A, 2009**).

2.2 La matrice

Le rapport C/N (carbone /azote) d'un biofilm est cinq fois plus élevé que pour une suspension de bactéries planctoniques, ceci étant dû à la prédominance de la matrice. Les bactéries qui se fixent à la surface s'agrègent dans une matrice polymère hydratée de leur propre synthèse pour former des biofilms (**Sutherland I.W. 2001**).

La matrice d'exopolysaccharides joue un rôle structural important, ces propriétés physico-chimiques sont variables d'un biofilm à l'autre. Sa très forte teneur en eau, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet à certains biofilms de lutter contre la dessiccation dans le milieu naturel, les substances bactéricides mais aussi contre les bactériophages. Il joue aussi un rôle majeur dans les propriétés de résistance aux biocides des biofilms, en se liant directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm (**Dolan, R. M. et J. W. Costerton, 2002**) .

Tableau 1 : Constituants de la matrice du biofilms (Sutherland I.W. 2001**).**

Eau	>97%
Cellules microbiennes	2 - 5 %
Polysaccharides	1 -2%
Proteines	<1-2%(compter les enzymes)
ADN et ARN	>1-2% (cellules lysées)
Ions	Liés et libre

3. Organisation

Le biofilm est composé d'agrégats de microorganismes séparés par des « canaux aqueux » assurant la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments à la bactérie et l'élimination de leurs produits de dégradation. Le biofilm n'est pas un environnement homogène, car il présente des zones à teneurs variables en oxygène et en nutriments, (qui présentent des valeurs de pH différentes), les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments (**Roux et Ghigo, 2006**).

4. Etapes de formation de biofilm

Les bactéries initient la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, comme l'indisponibilité en oxygène ou en nutriments, mais aussi face à un traitement destructif. Cette variation de facteurs conduit à des biofilms différents les uns des autres (**Aparna, MS et Yadav, S. 2008**).

4.1 Mise en place d'un film conditionnant

La première étape est la formation d'un film primaire ou « film conditionnant ». Cette étape est rapide, elle a lieu quelque minute après exposition d'une surface propre au fluide contenant des microorganismes. Avant qu'une surface soit exposée à un milieu liquide ; elle est chargée soit négativement ou positivement. Après l'exposition au milieu la surface acquit des molécules avec des charges différentes. Elle adsorbe aussi des molécules à faible poids moléculaire, des molécules hydrophobes, des polysaccharides complexes, des glycoprotéines, des lipides, pouvant être utilisés par les bactéries ce film est qualifié de conditionnant car il peut modifier les propriétés de surface initial du matériau ce qui a pour conséquence soit de prévenir l'approche des bactéries soit au contraire de créer un microenvironnement favorable à l'adhésion stable des bactéries (**Squinazi, 2013**).

Ces constituant qui se trouvent sur la surface vont servir de substrat aux microorganismes, mais il faut souligner que plus le film conditionnant est faible en nutriment plus il sera attractif pour les bactéries, car la limitation de substance du milieu est un paramètre clé dans l'initiation du phénomène d'adhésion (**Branger et al., 2007**).

4.2 Transport et déplacement

Après la formation du film conditionnant, il y'aura transport de microorganisme à proximité de la surface. Ces microorganismes proviennent soit du milieu environnant ou de redistribution des cellules issues de la phase de distribution d'un biofilm situé à proximité (**Branger et al., 2007**). Cette étape est influencée par les conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité, la température, la concentration en oxygène et en nutriment et l'hydrodynamique de fluide (**Beloin et al., 2008**).

Lorsque les forces de cisaillements sont nulles ou faibles (en condition statique ou en écoulement laminaire), les microorganismes peuvent s'approcher de la surface par différents mécanismes (**Characklis et al., 1990**).

- **Passif** : par un mouvement brownien menant à une sédimentation due à la force de gravité s'exerçant sur tous les corps (**Deckson et Daniel, 1991 ; Banks et Bryers 1992**), ou par des mouvements de convection du milieu amenant physiquement les bactéries vers une surface.
- **Actif** : par le déplacement des bactéries grâce à des appareils locomoteurs (pilis, flagelles) vers des substances nutritives par chimiotaxie (**Davies et al., 2000**).

La mobilité flagellaire joue par ailleurs un rôle essentiel dans l'initiation de la plupart des biofilms, et peut aussi contribuer à l'adhésion cellulaire en augmentant la probabilité de contact entre la cellule et la surface (**Pratt et Kolter, 1998**).

4.3 Phase d'adhésion

Zobell (1943) a montré que l'adhésion est composée de deux étapes alternatives : l'adhésion réversible fait intervenir un processus physicochimique et constitue une étape non spécifique et l'adhésion irréversible fait intervenir un phénomène biologique qui est considéré comme une étape spécifique.

- **Adhésion réversible**

En milieu liquide ou exposer à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide (**Hoiby et al., 2011**). La fraction des cellules atteignant la surface s'adsorbe de manière réversible et interagit avec le film conditionnant (**Garrette et al., 2008**).

Elles s'y attachent par des interaction non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques et s'adhèrent plus facilement sur des surfaces rugueuses, hydrophobe et non polaire (**Beloin et al., 2008**).

Les microorganismes non mobiles vont s'adhérer à la surface en utilisant les forces d'interaction ou en utilisant des éléments de leur surface, tandis que ceux qui sont mobiles développe de facteurs d'adhésion impliquant des structures telles que les flagelles, pilis ou protéines membranaire qui sont regroupées sous le terme d'adhesine (**schembri et al., 2003**).

Dans cette phase d'adhésion, les bactéries peuvent être facilement éliminées, ce qui démontre qu'irréversible. L'attachement est crucial dans le développement du biofilm (**Anand et al., 2014**).

- **Adhésion Irréversible**

Cette seconde adhésion correspond à une fixation spécifique des microorganismes sur un support. Cette adhésion stable est rendue possible grâce à la sécrétion de polymères extracellulaires qui vont former des ponts de fixation entre la cellule et la surface ou entre deux cellules. Selon le type de microorganisme, les structure d'adhésion vont varier, pour l'adhésion des bactéries gram négative, seront impliquer les pilis, les curli, les capsules et les glycocalyx. Quant à l'adhésion des bactéries gram positive se sont les acides teichoïques, acides mycolique, la capsule et le glycocalyx qui sont impliqués (**Van Houdtet et al., 2005**).

Un certain nombre de cellules adsorbées de manière réversible reste immobilisées et deviennent irréversiblement adsorbées. Au fur à mesure que les bactéries se multiplient leur adhésion devient plus solide et elle se différencie, en modifiant leur schéma d'expression génétique de manière à favoriser leur survie (**Garette et al., 2008 ; philips et al., 2011**).

4.4 Multiplication des bactéries et maturation du biofilm

Lorsque l'attachement des bactéries à la surface sera définitif, elles vont s'agréger entre elle et se diviser en utilisant les nutriments présents dans le film de conditionnement et l'environnement liquide. Ceci mène à la formation des micro colonies qui s'élargissent et s'unissent pour former une couche cellulaire couvrant la surface (**Otto, 2013 ; Mogha et al., 2014 ; Gotez et al., 2016**).

A Partir d'une concentration suffisamment dense d'individus les micro-colonies commencent à sécréter la matrice extracellulaire environnante (**Philips et al., 2011 ; Tremblay et al., 2014**) cette substance joue un rôle immense dans la protection des biofilms contre les agressions extérieures qu'elle soit mécanique, physique, chimique ou cellulaire ainsi aussi que l'ancrage des cellules à la surface (**Mogha et al., 2014**).

La croissance exponentielle de biofilm se traduisant par une augmentation favorable de son épaisseur jusqu'à la formation d'un film hétérogène tridimensionnel (**Costerton et al., 1995**) pendant cette étape on peut considérer que le biofilm est en équilibre dynamique entre l'accroissement de l'épaisseur par multiplication des bactéries déjà fixer et /ou par l'agrégation des bactéries encore libre dans le milieu aqueux suite à l'arrachement des bactéries dû aux mouvements des fluides environnants (**Branger et al., 2007**).

4.5 Dispersion

Lorsque la densité bactérienne sur une surface devient très élevée, des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant et retournent à l'état planctonique (**kaplan, 2010**). Ce phénomène complexe dit de dispersion représente l'étape ultime de formation des biofilms et il est induit par des événements extérieurs tels que les perturbations mécaniques (force de cisaillement) (**Tremblay et al., 2014**) et l'appauvrissement en nutriment, ces modifications sont perçues par les bactéries ce qui entraîne l'activation de signaux intracellulaires et ultimement le décrochage d'une partie du biofilm. Plusieurs actions peuvent aussi conduire au détachement physique des cellules tel que synthèse et sécrétion d'enzyme de dégradation la matrice (nucléase, glycosidase, protéase) et les modifications de surface des bactéries (détachement actif) (**Aumeran et al., 2020**).

Chapitre I : Biofilm bactérien

Les bactéries peuvent se détacher du biofilm aussi de façon passive par érosion, abrasion et desquamation :

- **L'érosion** : (détachement continu de cellules individuelles ou de petits agrégats) : est le résultat des forces de cisaillement en milieu liquide.
- **L'abrasion** : (la collision de particules) : se réfère au détachement continu de cellules simples ou bien des petits groupes cellulaires et affecte la surface totale du biofilm.
- **Desquamation** : (détachement massif et rapide de quantités importantes de bactéries) : Correspond à la perte instantanée des grandes parties du biofilm, affecte non seulement le biofilm entier mais aussi la surface du biofilm (**mogha et al., 2014**).

Les agrégats érodés ou délabrés du biofilm sont susceptibles de conserver certaines caractéristiques du biofilm, tel que les propriétés de résistance aux antimicrobiens (**donlan, 2002**) et seront aussi capables de coloniser d'autres surfaces voir de créer d'autres points infectieux, car les bactéries ainsi libérées sont particulièrement virulentes (**Aumeran et al., 2020**) complétant ainsi le cycle et la phase planctonique peut alors être assimilée à une phase de dispersion transitoire (**Branger et al., 2007**).

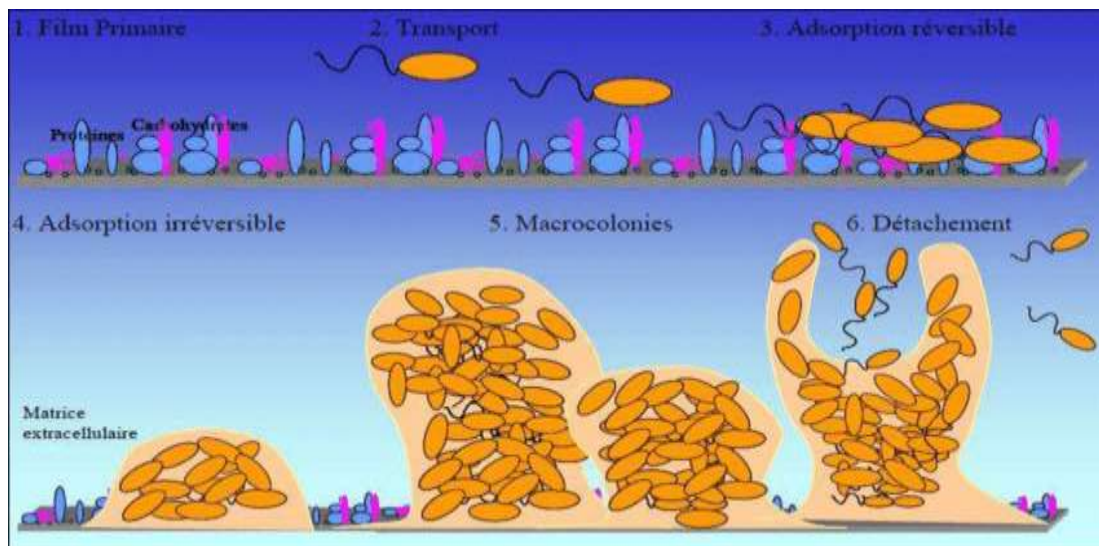


Figure 2 : Mécanisme de formation des biofilms. Les quatre étapes de la formation d'un biofilm (**Nikky Goela et al., 2020**)



CHAPITRE II

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

Introduction

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste responsable de diverses maladies chez l'homme et l'animal ; responsable d'infections des voies urinaires, des voies respiratoires et du sang. (Chew, KL, Lin, RTP et Teo, JWP 2017). Les infections à *K. pneumoniae* ont considérablement contribué à la morbidité et à la mortalité chez les patients souffrant d'infections prolongées, le traitement des infections à *K. pneumoniae* est devenu extrêmement compliqué (Moradigaravand et al., 2017). La capacité de *K. pneumoniae* à provoquer des maladies dépend de la présence d'un ensemble de facteurs de virulence. La coexistence et l'expression de facteurs de virulence et de déterminants génétiques de la résistance aux antibiotiques compliquent les résultats du traitement. Ainsi, l'émergence de la MDR pathogène *K. pneumoniae* constitue une grande menace pour le système de santé. Cependant, le portage de la résistance aux antibiotiques chez les *K. pneumoniae* pathogènes doit encore faire l'objet d'une enquête en Ouganda et beaucoup d'autres pays. Ils ont cherché à étudier les profils de résistance aux carbapénèmes et le potentiel pathogène sur la base des sérotypes capsulaires des isolats cliniques de *K. pneumoniae*. (Kenneth Ssekatawa et al., 2021).

1. Dénomination de *Klebsiella pneumoniae*

Le nom *Klebsiella* provient du nom du bactériologiste Klebs (1877) et l'espèce type dénommée « pneumobacille » par Friedländer qui l'a décrit comme agent de pneumonies mortelles pendant la période 1882-1884 c'est pour cela on l'appelle aussi bacille de Friedländer (BRISSE S et al., 2006).

2. Présentation du genre

Les *Klebsiella* sont des bactéries commensales du tube digestif et des voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux, sont souvent présentes dans les sels et peuvent être à l'origine d'une contamination fécale. Elles font partie de la famille des Enterobacteriaceae et elles se distinguent par leur immobilité constante et leur groupement en diplobacille, se sont des bacilles gram négatif. Elles sont souvent encapsulées et forment des colonies mucoïdes (Janda et Abbott, 2006; Abbott, 2007).

Le genre *Klebsiella* comporte cinq espèces dont l'espèce-type est *Klebsiella pneumoniae*.

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

3. Classification

Selon la classification de la 2ème édition de Bergy's manuel *Klebsiella pneumoniae* appartient au :

Règne : *Bacteria*

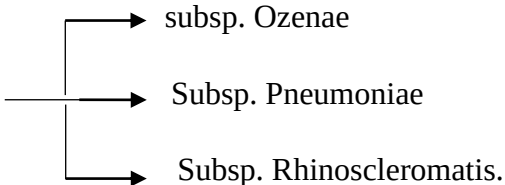
Embranchement : *Proteobactéria*

Classe : *Gamma Proteobactéria*

Ordre : *enterobacterales*

Famille : *enterobacteriaceae*

Genre : *Klebsiella*

Espèce : *Klebsiella pneumoniae* 

(George et al., 2004)

4. Caractères bactériologique de *Klebsiella pneumoniae*

4.1. Caractères morphologique

Ce sont des bacilles à gram négatifs souvent sous forme diplobacille toujours immobiles de dimension comparable à celle de *Escherichia coli* (0,3 à 1,0 µm de diamètre sur 0,6 à 6,0 µm de longueur), très souvent encapsulées (5 % environ de souches non capsulées) et surtout à. Cette capsule de nature polysaccharidique contient des acides hexuroniques (acides glycuronique et galacturonique) et de 2 à 4 sucres (galactose, glucose, mannose, fucose, rhamnose). La culture sur milieu sucré, tel que le milieu hypersaccharosé de Worfel-Ferguson favorise la formation de capsules. Au contraire, l'évolution vers des formes non capsulées peut être obtenue par croissance en bouillon bilié à 50 % (**Richard et Grimont, 1992**).

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

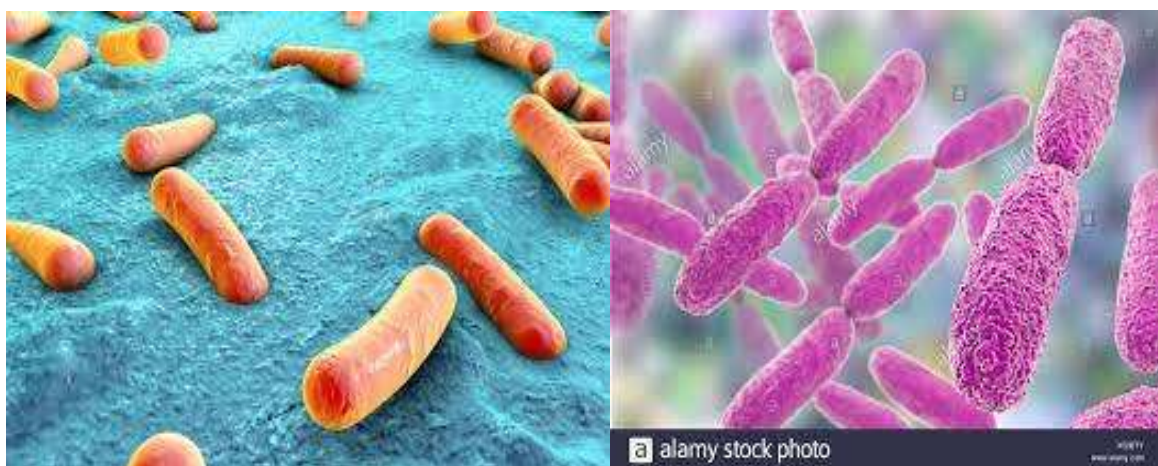


Figure 3 : cellules de *Klebsiella pneumoniae*

<https://sante.journaldesfemmes.f>

4.2.Caractères cultureux

Sur les milieux classiques d'isolement pour les entérobactéries (Drigalski, EMB, Hektoen, Mac Conkey) les colonies de *Klebsiella pneumoniae* sont lactose positifs, ronde, bombées et muqueuse d'un diamètre de 3 à 4 mm en 18 à 24 heures à 37°C. **(Joly et Reynaud, 2002)** En milieu liquide (bouillon nutritif, eau peptonée), la culture est rapide (quelques heures) à 30°-37°C pour *Klebsiella pneumoniae* avec dépôt muqueux et collerette visqueuse en surface, A la différence des autres espèces de *Klebsiella*, plus de 90 % des souches de *Pneumoniae* croissent à 44°C en bouillon lactosé bilié vert brillant et plus de 80 % en fermentant le lactose avec production de gaz (test des « coliformes fécaux » positif). **(LeMinor et Véron, 1989)**

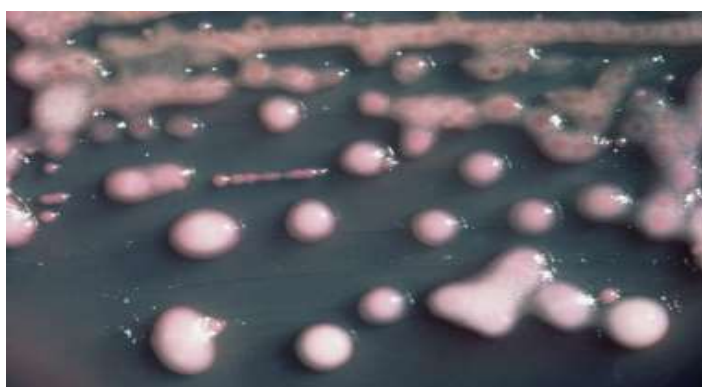


Figure 4 : Aspect des colonies de *K. pneumoniae* sur milieu gélosé **(Gueye, 2007).**

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

4.3.Caractères biochimiques

Klebsiella pneumoniae peut être définie comme une Entérobactérie immobile, VP +, RM -, uréase + lentement (uréase moins active que celle des *Proteus*), ONPG +, β -xylosidase +, H₂ S -, indole -, désaminase oxydative -, LDC +, ODC -, lipase, DNase et gélatinase -, KCN +, fermentant de nombreux substrats glucidiques avec production de gaz, utilisant le citrate de Simmons et le malonate. (Joly et Reynaud, 2002).

Tableau 2 : Principaux caractères biochimiques de *K. pneumoniae* (Joly et Reynaud,2002)

Glucose	Indole	ONPG	Gaz	Mobilité	VP	RM	TDA	H ₂ S	ODC	ADH	Citrate	LDC
+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+

4.4.Caractères antigéniques

K. pneumoniae possède des antigènes communs avec ceux portés par les autres entérobactéries excepté l'antigène flagellaire du fait de son immobilité. Les antigènes présents sont les antigènes O ou somatiques, les antigènes capsulaires (K) et les antigènes d'adhérence appelés aussi fimbriae (Avril et al., 2000).

Au moins 77 antigènes K ont été décrits : les souches les plus souvent pathogènes pour l'homme et les animaux appartiennent au type capsulaire 1 et 2, plus rarement 3 et 4 K (Struve et al. ; 2003). La recherche des antigènes O présente peu d'intérêt pratique, en raison de leur nombre réduit (13 antigènes O différents) et de la difficulté de leur détermination par suite du caractère thermostable des antigènes capsulaires K qui masquent l'agglutination O, La recherche des antigènes K est indispensable à toute enquête épidémiologique).

5. Pouvoir pathogène

Klebsiella pneumoniae est l'un des agents pathogènes Gram négatif les plus courants associés à des infections cliniques telles que la pneumonie, l'infection des voies urinaires, la septicémie, l'infection des plaies et la méningite. Avec l'émergence de souches multirésistantes (MDR) et hypervirulentes de *K. pneumoniae* (hvKP). Les carbapénèmes et autres β -lactamines sont les agents couramment utilisés pour traiter les

Infections à *K. pneumoniae*, et sont également des médicaments de dernier recours pour le traitement des infections bactériennes multirésistantes. Le *K. pneumoniae* résistant aux carbapénèmes (CRKP) a été signalé pour la première fois dans les années 1990, et des souches de CRKP ont été isolées sporadiquement tout au long de cette décennie. Cependant, avec l'utilisation clinique croissante des carbapénèmes ces dernières années, la prévalence de la CRKP a augmenté à un rythme alarmant et cet agent pathogène est désormais considéré comme une menace sérieuse pour la santé humaine dans le monde entier. (Yanyan Hu et al., 2020).

5.1 Facteurs de virulence chez *Klebsiella pneumoniae*

Les termes facteur de pathogénicité et facteur de virulence sont souvent utilisés comme synonymes. Mais certains auteurs font une distinction claire entre les deux : la pathogénicité et le pouvoir d'une bactérie à provoquer une maladie mais la virulence est le degré de la pathogénicité. (Podschun et al., 1998).

Cinq types de facteurs sont présents chez les *Klebsiella pneumoniae* :

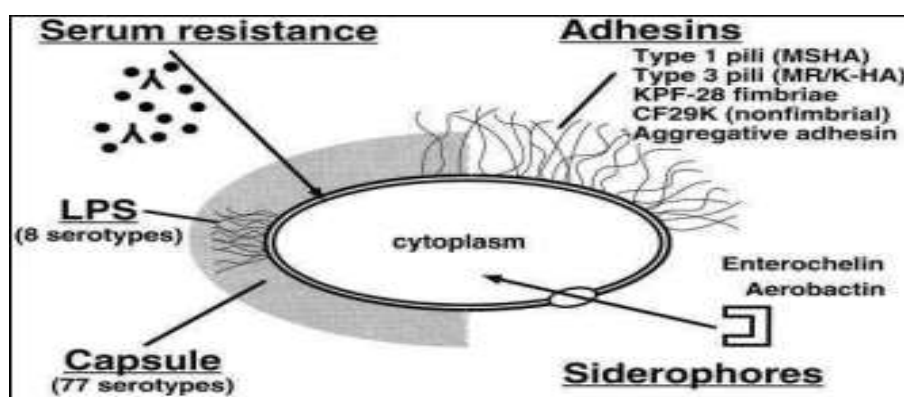


Figure 5 : représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *Klebsiella pneumoniae*. D'après (podschun et al., 1998.)

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

5.1.1 Antigènes de surface

Deux types d'antigènes sont exprimés à la surface de *K. pneumoniae*. Ces deux antigènes contribuent à la pathogénie de cette bactérie. Le premier est l'antigène "O" qui est le composant du lipopolysaccharide et dont 9 types ont été identifiés. Le second est l'antigène capsulaire (K), un polysaccharide capsulaire dont 82 ont été décrits et 77 caractérisés. (Najiby kassis- chikhani 2012).

a. Lipopolysaccharide

sur le plan immunologique, le lipopolysaccharide constitue l'antigène O des bactéries à Gram négatif. Le LPS est un lipide complexe auquel est attaché un polysaccharide qui est responsable de la spécificité antigénique de l'antigène O. Sur le plan physiopathologique, le LPS, extrêmement toxique et Le lipide A correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif, L'antigène O est le composé le plus externe du LPS est formé d'unités répétées de polymères d'oligosaccharide Le rôle principal du LPS in vivo est de protéger *K. pneumoniae* du pouvoir bactéricide du sérum. (Najiby kassis- chikhani 2012).

b. La capsule

Leur capsule a été le premier facteur de virulence décrit (Hennequin et al., 2012 ; Hsieh, 2012). Elle confère à *Klebsiella pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries de la phagocytose. La majorité des souches de *K. pneumoniae* produit une capsule de nature polysaccharidique elle donne aux colonies une apparence plus ou moins muqueuse caractéristique.

Les souches exprimant les antigènes capsulaires K1 et K2 sont particulièrement virulentes dans un modèle murin de péritonite comparées à d'autres sérotypes qui sont peu ou pas virulents. En pathologie humaine, même si les données sont parcellaires, les souches de sérotype K1 et K2, sont actuellement, considérées comme les plus virulentes. (Najiby kassis- chikhani 2012).

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

5.1.2 Les adhésines

Le terme adhesine est utilisé pour la dénomination des différentes molécules qui impliquée dans l'adhésion des bactéries aux cellules de l'hôte, elle joue un rôle essentiel dans le Processus infectieux. Facteurs d'adhésion produits par la majorité des souches dont deux types ont été mis en évidence chez des souches pathogènes pour l'homme : les pili de type 1 et de type 3 qui permettent l'adhérence de la bactérie à la face baso-latérale des cellules trachéales et bronchiques et une adhesine non filamenteuse (adhesine CF 29 K) qui permet l'adhérence de la bactérie aux cellules intestinales et uro-épithéliales (**Joly et Reynaud, 2002 ; Hennequin et al., 2007**). *Klebsiella pneumoniae* peut produire des fimbriae de type 1 qui semblent être impliquées dans l'attachement aux cellules ciliées de l'appareil respiratoire et aux cellules vésicales. Elle peut également produire des fimbriae de type 3 (**Stahlhut, 2012 ; Aartsen, 2012**).

5.1.3 Les sidérophores

Le fer joue un rôle essentiel dans la croissance, l'installation, la multiplication et la progression de l'infection des *Klebsiella pneumoniae* c'est pour cela elles ont développé des systèmes de captation du fer grâce à des structures particulières, les Sidérophores.

Klebsiella pneumoniae est un agent pathogène bactérien de plus en plus important qui est capable de provoquer des maladies graves des organes et potentiellement mortelles. Un trait critique de *K. pneumoniae* qui a permis son évolution continue est la capacité d'acquérir un nouveau matériel génétique. En conséquence, deux pathotype appelés *K. pneumoniae* classique (cKp) et *K. pneumoniae* hypervirulente (hvKp) circulent actuellement, chacun présentant des défis uniques pour le clinicien. (**Thomas A. Russo et al., 2019**)

5.2 Les *Klebsiella pneumoniae* hypervirulente (hKp)

Les *Klebsiella pneumoniae* hypervirulente (hKp) est un pathotype évolutif qui est plus virulente que le classique Kp (cKp), elle se caractérise par le phénotype d'hyperviscosité qui se mesure par le teste de corde et ce phénotype est typiquement dû à la production accrue de polysaccharides capsulaires et à la présence de gènes de virulence spécifiques. hvKp a acquis un certain nombre de gènes de virulence présents sur de grands plasmides de virulence (par exemple, pK2044 et pLVPK) et au sein d'éléments chromosomiques intégrés (ICE) qui lui confèrent son phénotype hypervirulent.

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

Les infections dues à hvKp ont augmenté régulièrement au cours des 3 dernières décennies dans les pays qui composent la région du Pacifique asiatique, mais sont de plus en plus reconnues en dehors de l'Asie. (Lee et al., 2017).

5.3 *Klebsiella pneumoniae* classique (cKp)

Klebsiella pneumoniae classique est un agent pathogène opportuniste provoquant des infections principalement dans le cadre des soins de santé chez des hôtes présentant des comorbidités, les immunodéprimés. cKp est l'agent incriminé dominant dans les pays occidentaux. (Thomas A. Russo et al., 2019).

Tableau 3 : caractéristiques démographiques et cliniques qui peuvent aider à différencier une infection due à Kp hypervirulente et Kp classique (Thomas A. Russo et al., 2019).

Paramètres	hKp	cKp
Lieu de développement de l'infection	Plus communément la communauté	Le plus souvent un établissement de soins de santé
L'hôte	Toute Age souvent par ailleurs en bonne santé	Plus vieux, avec une certaine forme de compromis
L'origine ethnique	souvent asiatique, insulaire du Pacifique, hispanique	Aucune prédilection ethnique
Abcès hépatique	Survient généralement en l'absence de maladie biliaire	Survient généralement en présence d'une maladie biliaire.
Nombre de site d'infection	Souvent plusieurs	Généralement célibataire
Syndrome non habituel pour les Kp	Endophtalmie, méningite, abcès cérébral, fasciite nécrosante, abcès splénique, abcès périurinaire	Rien
Copathogène au site d'infection	Rare, généralement monomicrobienne	Pas rare, en particulier en cas d'infection abdominale, des tissus mous ou de la sonde urinaire

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

6. Mécanisme de résistance chez *Klebsiella pneumoniae*

6.1 Définition de la résistance

Un micro-organisme est considéré résistant lorsque sa concentration minimale inhibitrice est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce. (Carl S. 2009)

6.2 Types de résistance aux antibiotiques

L'efficacité de l'antibiotique dépend d'au moins trois facteurs : la quantité d'antibiotique au contact de la cible, l'affinité de l'antibiotique pour la cible et la production d'enzymes inactivant l'antibiotique produit par la souche. Ces facteurs sont responsables soit d'une résistance naturelle, et donc présents chez toutes les souches de l'espèce, soit d'une résistance acquise par certaines souches, suite à l'apparition de mutations chromosomiques ou à l'acquisition de matériel génétique tels que des plasmides, des transposons ou des intégrons.

6.2.1 Résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les souches. Elle est stable, transmise à la descendance mais pas obliger par le transfert horizontal dans ce cas il peut être transférer ou pas ce n'est pas automatique comme la descendance. Elle est programmée sur le génome bactérien. Les bactéries naturellement sensibles définissent le « spectre d'activité » de l'antibiotique. (Messai A.2006.)

K. pneumoniae possède naturellement un gène codant pour une pénicillinase chromosomique qui lui confère une résistance à bas niveau aux pénicillines (amino-, carboxy- et uréido- pénicillines). Cette pénicillinase est sensible à l'action des inhibiteurs (acide clavulanique, tazobactam). Ainsi, le phénotype sauvage de *K. pneumoniae* est sensible aux associations amoxicilline (ou ticarcilline) + acide clavulanique et pipéracilline + tazobactam ainsi qu'à l'ensemble des céphalosporines. Elle est également sensible aux céfamycines, à l'aztréonam et aux carbapénèmes (Courvalin et al., 2006)

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

6.2.2 Résistance acquise

La résistance acquise est un caractère qui ne concerne que quelques souches d'une espèce donnée. Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien, par l'acquisition des nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotique. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN de plasmide conjugatif ou de transposons, comme par exemple la production de la pénicillinase chez staphylocoque touche plus de 90% des souches (**Courvalin, 2008**).

6.2.3 *Klebsiella pneumoniae* MDR et XDR

Au cours des dernières années, presque tous les pays européens ont enregistré des infections causées par des entérobactéries multiresistante (MDR). (**Vuotto et al., 2017**).

Les souches de *K. pneumoniae* MDR et les souches extrêmement résistantes aux médicaments (XDR) présentent une résistance à un large spectre de b-lactamines (pénicillines, troisième et quatrième générations céphalosporines, carbapénèmes et monobactames) en raison de présence des enzymes qui inhibent l'activité des antibiotiques tel que les bêta-lactamases à spectre étendu codées par un plasmide (BLSE) et carbapénémase qui inactivent les carbapénèmes, ainsi qu'à d'autres classes d'antibiotiques, y compris les sulfamides, les fluoroquinolones et les aminoglycosides (**Rawat et Nair, 2010**).

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* suivent différentes stratégies pour développer la résistance aux carbapénèmes, y compris :

- La production des carbapénémase de type KPC (partiellement inhibées par l'acide clavulanique) (**Patrice Nordmann**) décrites tout d'abord aux États-Unis chez et maintenant une diffusion mondiale. Les carbapénémase de type métallo-enzymes (VIM, IMP...) ont été également décrites dans le monde entier avec une forte prévalence en Europe du Sud et en Asie. OXA-48 est l'une des carbapénémases les plus récemment décrites. (**Rawat D.2010**).
- La non expression ou la mutation du gène porines : Dans les bactéries à Gram négatif, les porines sont une des voies principales d'entrée pour les antibiotiques usuels comme les β -lactamines et les fluoroquinolones. C'est pour cela les KP utilise cette stratégie de modification de porine pour résister aux antibiotique.

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

On a aussi les dex système combine avec des niveaux élevés d'autres types de B-lactamase (exp Ampc)

7. Capacité de formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est un important pathogène opportuniste à Gram négatif fréquemment associé aux infections nosocomiales. Cette entérobactérie ubiquitaire est impliquée dans les infections des voies urinaires, la pneumonie, les infections des plaies chirurgicales, la bactériémie et la septicémie. Le premier stade des infections nosocomiales dues à *K. pneumoniae* consiste en la colonisation du tractus gastro-intestinal du patient par la production de plusieurs types distincts de facteurs d'adhérence et de grandes quantités de polysaccharide, qui lui permettent de s'adhérer aux cellules épithéliales. Cet agent pathogène opportuniste peut générer une épaisse couche de biofilm comme l'un de ses facteurs de virulence importants, permettant aux bactéries de se fixer aux surfaces vivantes ou abiotiques. Régulation de biofilm chez *Klebsiella pneumoniae* (Kimia Seifi et al., 2016).

8. La régulation des biofilms

La plupart des bactéries utilisent un système de communication, « le quorum sensing » fondé sur la sécrétion et la perception de petites molécules appelées autoinducteurs qui leur permettent d'adapter leur comportement en fonction de la taille de la population. Les bactéries mutualisent ainsi leurs efforts de survie en synchronisant entre elles la régulation de gènes impliqués notamment dans la virulence, la résistance aux antimicrobiens ou la formation du biofilm. Quorum sensing :

Les bactéries individuelles peuvent modifier leur comportement par le biais d'interactions chimiques entre les organismes d'une communauté microbienne, ce que l'on appelle souvent le quorum sensing. Habituellement, ces interactions sont interprétées comme la communication et la coordination du comportement multicellulaire.

Nous montrons que la nature de l'interaction des substances chimiques par le quorum sensing implique non seulement des signaux coopératifs, mais aussi d'autres interactions, telles que des signaux et des manipulations chimiques. Ces signaux peuvent jouer un rôle dans les conflits au sein et entre les espèces. Lorsqu'on étudie les raisons et les façons dont les bactéries réagissent aux produits chimiques produits par d'autres bactéries, il est important de prendre en compte la nature des interactions chimiques. (Olivia P et al., 2021).

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

8.1 Définition du quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est un mode de communication et de perception utilisé par les bactéries. Il se fonde sur la production de petites molécules, les autoinducteurs (AI), qui peuvent diffuser à travers la membrane ou être transportés à l'extérieur de la cellule. Les AI, dont la concentration est proportionnelle au nombre de bactéries, servent d'indicateur moléculaire de la densité bactérienne. À partir d'une certaine concentration de ces molécules, une réponse cellulaire est enclenchée par l'activation et la répression de gènes efficaces seulement lorsque la densité cellulaire est importante, pour mettre en place des phénotypes particuliers, comme la formation de biofilm, la virulence, la production d'exopolysaccharides, d'exoprotéases et de sidérophores.

De nombreux facteurs induits par le QS sont sécrétés dans l'environnement de la cellule. Ils ont un intérêt global pour la communauté bactérienne pour fournir des nutriments à la population ou pour la transition du mode de vie planctonique (c'est-à-dire en suspension) vers un mode sessile, appelé biofilm, plus fréquemment rencontré en milieu naturel. (Abisado et al., 2018).

8.2 Molécules du quorum sensing

Une fois qu'une concentration seuil est atteinte, le signal interagit avec une protéine réceptrice, provoquant un changement coordonné de l'expression génétique dans la population.

Il existe une grande diversité de molécules de communication entre bactéries. Les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp.) utilisent souvent des peptides cycliques d'environ 7 à 11 acides aminés. Ces peptides sont transportés hors de la cellule bactérienne puis sont perçus par le senseur membranaire des autres bactéries (senseur à histidine kinase).

La fixation du peptide au senseur entraîne l'activation d'un régulateur de réponse (par exemple sa phosphorylation) activant l'expression des gènes du QS (Federle MJ et al., 2013). Chez les bactéries à Gram négatif, différentes molécules sont utilisées, les plus communes étant les acyl homoserine lactones (AHL), dont les tailles (de 4 à 18 atomes de carbone) et les modifications de la chaîne acyl varient selon les bactéries.

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

Une délétion du gène $\Delta luxS$ a été réalisée dans *K. pneumoniae* KP563, un isolat extrêmement résistant aux médicaments (XDR). La production d'AI-2 a été évaluée dans des souches de type sauvage et *luxS* cultivées dans des milieux supplémentés avec différents glucides. Rôles potentiels de *luxS* dans la formation de biofilm ont été étudiés à l'aide d'un essai de biofilm sur plaque de microtitration et d'une microscopie électronique à balayage. La RT-PCR quantitative a évalué l'expression des gènes de synthèse des lipopolysaccharide (*wzm* et *wbbM*), des polysaccharides (*pgaA*) et des fimbriae de type 3 (*mrkA*) dans des extraits de biofilm de type sauvage et mutant $\Delta luxS$. (Kiana Karimi et al. ; 2021)

La production d'AI-2 dépendait de la présence de *luxS*. L'accumulation d'AI-2 était la plus élevée au début de la phase stationnaire dans les milieux supplémentés en glucose, saccharose ou glycérol. Des changements dans l'architecture du biofilm ont été observés dans *luxS* mutant, avec une couverture de surface moindre et une formation de macrocolonies réduite ; cependant, aucune différence dans la formation de biofilm entre le mutant de type sauvage et le mutant *luxS* à l'aide d'un essai sur plaque de microtitration n'a été observée. Dans les extraits de biofilm mutant $\Delta luxS$, l'expression de *wzm* était régulée à la baisse et l'expression de *pgaA*, qui code une porine pour la sécrétion de polysaccharide poly- β -1,6-N-acétyl-d-glucosamine (PNAG), était régulée à la hausse.

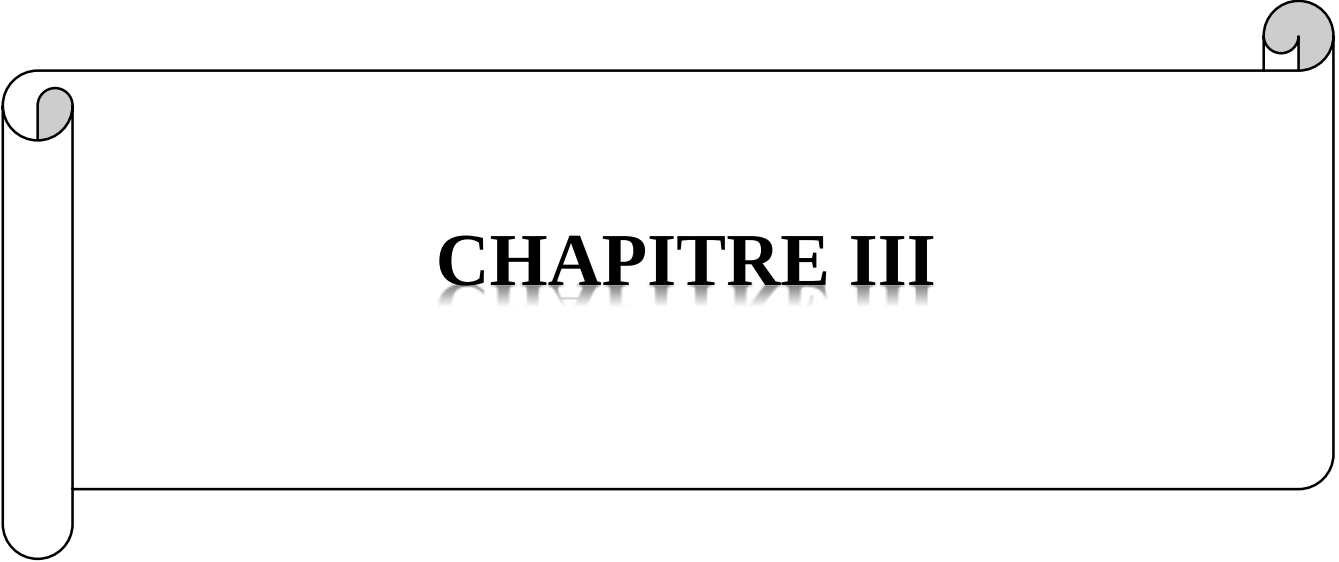
Des relations entre la détection du quorum médiée par AI-2, la formation de biofilm et l'expression génique des composants de la membrane externe ont été identifiées chez *K. pneumoniae*. Ces processus interconnectés pourraient être importants pour le comportement et la persistance des groupes bactériens. (Kiana Karimi et al., 2021).

9. Relation entre la multirésistance et la formation des biofilms

Des études antérieures ont montré que les souches de *K. pneumoniae* résistantes à un large spectre d'antibiotiques se développent rapidement, en particulier lorsque les bactéries sont capables de former un biofilm. Ces bactéries peuvent former une épaisse couche de biofilm extracellulaire qui les aide à se fixer aux surfaces vivantes et abiotiques. Le traitement des infections causées par les souches de *K. pneumoniae* formant un biofilm est plus difficile que les autres souches. La résistance aux antibiotiques et la tendance bactérienne à la formation de biofilms peuvent jouer un rôle clé dans l'émergence des souches MDR- *K. pneumoniae*.

Chapitre II : Multirésistance aux antibiotiques et formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

En raison de la caractéristique anti phagocytaire du biofilm, il est plus difficile pour l'immunité de l'hôte d'éliminer ce type d'agents pathogènes bactériens. Une autre conclusion de l'étude était que la force de formation de biofilm dans les souches résistantes aux antibiotiques était plus élevée que les souches sensibles, et une corrélation remarquable a été observée entre la résistance aux antibiotiques et la formation de biofilm.



CHAPITRE III

1. Généralité

L'art de soigner par les plantes constitue l'une des médecines les plus anciennes. Les huiles essentielles, quant à elles, sont utilisées depuis des millénaires à des fins thérapeutiques. Depuis l'Antiquité, les huiles essentielles sont reconnues pour leur valeur médicinale et ce sont des produits végétaux naturels très intéressants et puissants. Ils continuent à être d'une importance primordiale jusqu'à nos jours. Les huiles essentielles sont utilisées comme parfums, arômes pour les aliments et les boissons, ou pour soigner le corps et l'esprit depuis des milliers d'années (**Baris et al., 2006 ; Margaris et al., 1982 ; Tisserand 1997 ; Wei & Shibamoto 2010**). Des découvertes record en Mésopotamie, en Chine, de traitements sous diverses formes. Par exemple, dans l'Egypte ancienne, la population extrayait les huiles par infusion. Plus tard ; Les Grecs et les Romains utilisaient la distillation et donnaient ainsi aux plantes aromatiques une valeur supplémentaire. Avec l'avènement de la civilisation islamique, les techniques d'extraction ont été encore affinées. A l'ère de la Renaissance, les Européens ont repris la tâche et avec le développement de la science, la composition et la nature des huiles essentielles ont été bien établies et étudiées (**Burt, 2004 ; Peeyush et al., 2011 ; Steven, 2010 ; Suaib et al., 2007**). De nos jours, les huiles essentielles de menthe poivrée, lavande, géranium, eucalyptus, rose, bergamote, bois de santal et camomille sont les plus commercialisées.

2. Définition des huiles essentielles

Une huile essentielle est définie par l'Organisation internationale pour Standardisation (ISO) en tant que « produit obtenu à partir d'une matière première naturelle matière d'origine végétale, par distillation à la vapeur (qui comprend hydrodistillation), par des procédés mécaniques à partir du péricarpe (écorces) d'agrumes, soit par distillation sèche, après séparation des phases aqueuse, le cas échéant, par des procédés physiques (**Anton de Groot et al., 2016**).

Chapitre III : L'huile essentielle des clous de girofle

Les huiles essentielles sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés par hydrodistillation ou par expression mécanique (**Kalemba, 2003**). Elles sont obtenues à partir de feuilles, De graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits (**Burt, 2004**). Mais également à partir de gommages qui s'écoulent du tronc des arbres. De nouvelles techniques permettant d'augmenter le rendement de production. Ont été développées. Comme l'extraction au moyen de dioxyde de carbone liquide à basse température et sous haute pression (**Santovo *et al.*, 2005**) ou l'extraction assistée par ultrason Ou micro-ondes (**Kimbaris *et al.*, 2010**)

3. L'huile essentielle des clous de girofle

3.1 Taxonomie du giroflier

- Règne : plante
- Embranchement : spermatophytes
- Sous embranchement : angiosperme
- Classe : dicotylédone
- Sous-classe : rosidae
- Famille : Myrtaceae
- Genre : Syzygium
- Espèce : *S. aromaticum* (L.)



Figure 7 : Allure d'un giroflier de Madagascar (**Sophie Barbelet, 2015**)

3.2. Définition des clous de girofle

Cultivés depuis longtemps sur les îles Moluques, le giroflier fait partie de la médecine ayurvédique (1500 av. J-C.). Les asiatiques savent que le girofle est “ôn ty vi”, c’est à dire qu’il calme les maux de ventre, les nausées ainsi que les diarrhées. De tout temps, cette épice mondialement connue a notamment servi à traiter les caries dentaires, les infections buccales et la combler les dents creuses. L’huile essentielle sert aujourd’hui en pharmacie, en agro-alimentaire ainsi qu’en parfumerie. (**Clémentine,2021**).

Le giroflier est un arbre originaire des îles Moluques en Indonésie, ses fleurs sont récoltées avant leur épanouissement pour obtenir les “clous de girofle”.

Le clou de girofle est une épice très appréciée pour ses qualités alimentaires. Il en est extrait une huile essentielle (HE) connue surtout en médecine dentaire. Il s’agit d’une HE renfermant en grande majorité de l’eugénol, un phénol considéré comme doux mais anti-infectieux puissant et à large spectre. Elle est de couleur jaune à jaune pâle. (**Lobstein et al., 2017**).

- a. **Organes producteurs** : boutons floraux non encore épanouis (“clous”) et séchés à l’air. (**Lobstein et al., 2017**).
- b. **Rendement** : 15 à 20 %, après 16 à 18 heures de distillation, soit environ 150 mL d’HE par kg de clous de giroflier. (**Lobstein et al., 2017**).
- c. **Caractères organoleptiques** : liquide jaune limpide, au parfum puissant et caractéristique, chaud, épicé et sucré, de saveur brûlante, légèrement amère et fortement aromatique. (**Lobstein et al., 2017**).



Figure 8 : les clous de girofle (**Lobstein et al., 2017**)

3.3. Composition chimique de l'huile essentiel de clou de girofle

Pharmacologiquement, le clou de girofle a été documenté comme la principale source de molécules phénoliques comme acides hydroxibenzoïque, flavonoïdes, propens-hydroxiphényliques, acides hydroxicinamiques et eugénol (C₁₀H₁₂O₂) principale molécule bioactive et dérivés de l'acide gallique comme l'hydrolizable tanins qui se trouvent en grande quantité dans la plante fraîche (**voir annexe 1**) (**Cortés-Rojas., et al 2014 ; Shan., et al 2005 ; Neveu et al 2010**). De plus, le clou de girofle contient les flavonoïdes à savoir la quercétine et le kaempférol et les acides phénoliques comme les acides férulique, caféique, ellagique et acides salicyliques (**Cortés-Rojas., et al 2014**). Les boutons floraux de girofle contiennent jusqu'à 18 % d'huile essentielle composée d'eugénol, acétate d'eugénol et β -cariofileno (**Jirovetz., et al 2006**).

Tableau 4 : Récapitulatif des quantités, famille et propriétés des principaux composants de HE des clous de girofle. (**Sophie Barbelet, 2015**)

Nom de la molécule	Quantité	Famille chimique	Propriétés
Eugénol	75-88%	Phénylpropanoïde (phénols)	Anti-infectieux Anesthésiant Antiagrégant plaquettaire
Acétate d'Eugényle	4-15%	Ester aromatique	Antispasmodique musculotrope et neurotrope Stimulant général
B-caryophyllène	5-14%	Sesquiterpènes	Calmant et anti-inflammatoire

3.4. Utilisation de l'huile de clou de girofle

L'utilisation de l'HE de Clou de girofle est à rapprocher de celle des clous seuls et de son principal constituant, l'eugénol.

a) Propriétés anti-infectieuses

De par sa forte teneur en eugénol, l'HE de Clou de girofle possède des propriétés bactéricide, fongicide et acaricide. L'eugénol et l'eugényle acétate ont démontré leur activité sur de nombreuses souches bactériennes, provenant aussi bien de bactéries à Gram + (*Staphylococcus aureus*) que de bactéries à Gram - (*Pseudomonas aeruginosa*) (**Oussalaha M et al., 2007**).

Cette HE fait partie de celles qui ont le plus fort pouvoir bactéricide (parmi celles de Cannelle, Origan, Sarriette et Thym CT thymol) et a l'avantage de ne pas présenter de

résistance de la part de ces différents germes. Ces propriétés antibactériennes pourront être utilisées par voie locale, en cas de panaris par exemple, ou par voie orale, pour traiter une cystite. **(Pinto E et al., 2009).**

b) Maladies parodontales

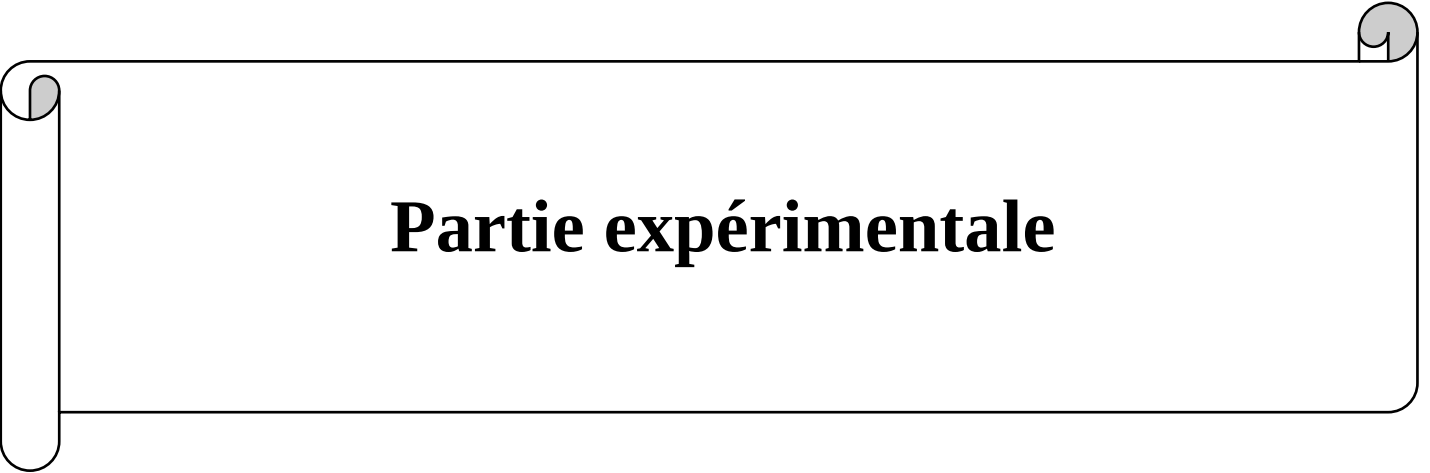
L'intérêt de l'HE de Clou de girofle en cas de problèmes dentaires repose sur la combinaison de propriétés antibactériennes et anesthésiantes. Au niveau de la flore buccale, elle agit préférentiellement sur *Streptococcus mutans*, responsable de la plaque dentaire et des caries, quand l'eugénol et le β -caryophyllène procurent un effet anesthésiant local sur la gencive ou la dent.

c) Sphère digestive

Le Clou de girofle et son HE peuvent être utilisés en cas de digestion difficile car ils augmentent la vidange gastrique au même titre que le métoclopramide **(Agbaje EO 2008)**. Plusieurs études s'accordent également sur le rôle gastroprotecteur de l'HE de Clou de girofle et de l'eugénol : les modèles expérimentaux in vivo présentent en effet une diminution de la surface de lésions ulcéreuses, accompagnée d'une augmentation de production de mucus au niveau stomacal **(Santin JR et al., 2011)**.

d) Pouvoir antioxydant

L'eugénol montre une action protectrice sur la cirrhose hépatique en inhibant la prolifération cellulaire et en diminuant le stress oxydatif **(Ali S et al., 2014)**. Ce serait un excellent agent de prévention des métastases liées au stress oxydatif : il réduit les phénomènes d'inflammation en inhibant le tumor necrosis factor (TNF) et la production de prostaglandine E2 (PGE2), et en modulant l'action de la cyclo-oxygénase 2 (Cox-2) **(Sung B et al., 2012, Bachiega TF et al., 2012)** ; il capte les radicaux libres oxygénés et réduit les dégâts au niveau de l'acide désoxyribonucléique **(Nam H et al., 2013)**.

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and a light gray fill. It features a vertical strip on the left side and rounded ends. The text "Partie expérimentale" is centered within the scroll.

Partie expérimentale

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and a light gray fill. It has rounded ends and a small circular detail on the left side. The text "Matériels et méthode" is centered within the scroll.

Matériels et méthode

Matériels et méthode

Notre étude expérimentale a été réalisée au niveau de Laboratoire de Biochimie Appliquée et Biotechnologie de l'université de Mouloud Mammeri Tizi Ouzou. L'objectif de notre travail est de mettre en évidence l'activité antibiofilm de l'huile essentielle des bourgeons floraux séchés de *Syzygium aromaticum* autrement appelé les clous de girofle. Notre expérimentation a été réalisée en 2 parties :

-Une partie qui consiste en l'extraction de l'huile essentielle à partir des bourgeons floraux séchés de *S.aromaticum*.

-Une partie microbiologique dans laquelle des tests antibiofilm ont été réalisés sur deux souches bactériennes.

1. Matériels

1.1 Matériels biologiques

1.1.1 Matériel végétal

Bourgeons floraux séchés de *S.aromaticum* commercialisé.



Figure 9 : bourgeons floraux séchés de *S.aromaticum*

a. Rendement d'huile essentielle des clous de girofle

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle (Rd), est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue après extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M). Il est donné par la formule suivante :

$$Rd = M' / M \cdot 100$$

Rd : Rendement en huile essentielle exprimée en pourcentage (%) ;

Matériels et méthode

M' : Masse de l'huile essentielle obtenue en gramme (g);

M : Masse de la matière végétale sèche utilisée en gramme (g)

1.1.2 Les souches

On a utilisées quatre souches de *Klebsiella pneumoniae* :

- a) *K. pneumoniae* 2458
- b) *K. pneumoniae* 1216
- c) *K. pneumoniae* 1115
- d) *K. pneumoniae* 4328

- **Origine des souches**

Ce sont des souches isolées à partir des urines des patients au laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou en 2013.

- Les caractéristiques de l'espèce bactérienne *Klebsiella pneumoniae* sont résumées dans le tableau qui suit :

Tableau5 : principales caractéristiques de *Klebsiella pneumoniae*

Famille	Enterobacteriaceae
Gram	Négatif
Culture	Aero-anaérobie facultatif
Genre	<i>Klebsiella</i>
Espèce	<i>Pneumoniae</i>
Habitat	tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud: peut se trouver dans l'eau, le sol et la poussière
mobilité	Immobile
Taille	0,3 à 1,0 µm de largeur et de 0,6 à 6,0 µm de longueur
Capsule	Capsulée
Résistance	Souche multirésistante

1.2 Verreries et autres matériels

- Micropipettes 50, 100 et 1000 µl ;
- Tubes à essai à vis stériles ;
- Pipettes Pasteur ;
- Anses à boucle ;

Matériels et méthode

- Boîtes de Pétri en plastique à 90 mm de diamètre Spatule ;
- Barreau magnétique ;
- Erlenmeyers de 500 et 1000 ml ;
- Entonnoirs ;
- Béchers ;
- Papier aluminium ;
- Ecouillons ;

Milieux	Milieux	Utilisation
Liquide	Bouillon BRAIN HEART INFUSION (BHIB)	Préparation de l'inoculum de la souche bactérienne.
Solide	Gélose nutritive (GN) ; Milieu Macconkey	Couler dans des boîtes Pétri pour l'ensemencement de l'inoculum des quatre souches bactériennes.

1.3 Milieux de culture

Tableau 6 : Milieu utilisés pour faire l'activité anti biofilm d'huile *S.aromatica*

1.4 Colorants et réactifs

- Violet de Gentiane ;
- Ethanol 96% ;
- Rezasurine 0.015% ;
- PBS 1% ;
- Eau physiologique ;
- Eau distillée stérile ;

2. Méthodes

2.1 Extraction de l'huile essentielle

L'entraînement à la vapeur d'eau est la technique utilisée pour extraire l'huile essentielle. Pour cela on fait bouillir de l'eau dans un ballon appelé chaudière pour générer de la vapeur d'eau qu'on fait passer à travers 150g bourgeons floraux séchés de *S.aromaticum* dont on veut récupérer l'huile. La vapeur va détruire la structure des cellules végétales qui vont libérer leurs huiles essentielles. Sous l'effet de la chaleur, les huiles s'évaporent et comme deux gaz

sont toujours miscibles, les vapeurs d'eau et d'huile vont se mélanger et la vapeur d'eau entraîne avec elle l'huile essentielle du matériel végétal

On n'a alors plus qu'à récupérer le distillat dans un récipient tel une burette ou une éprouvette. On obtient deux phases puisque l'eau et l'huile ne sont pas miscibles. L'eau apparaît alors sur le dessus car elle est moins dense que l'huile (densité de 1,05 pour l'huile essentielle des clous de girofle contre 1 pour l'eau). On peut alors récupérer l'huile par décantation.

2.1.1 La conservation de l'huile essentielle

La conservation des huiles essentielles exige certaines précautions indispensables, après l'extraction l'HE avait été conservée dans des flacons en verre opaques bien scellés de manière à les protéger de la lumière, il faut également éviter le contact avec l'air (pas d'ouverture prolongée des flacons), par la suite il faudra garder les flacons à une température basse entre (4 -5 C°).

2.2 Préparation de l'inoculum

En respectant les conditions d'asepsie, à savoir que la souche bactérienne (*K. pneumoniae*) utilisée est pure une pré-culture de celle-ci est réalisée. Les souches bactériennes ont été ensemencées dans des tubes contenant 9ml de (BHIB). Puis, sont incubés à une température de 37°C pendant 24h (notre but est l'enrichissement et la revivification des souches).

2.2.1 Ensemencement

Sur deux boîtes contenant la gélose nutritive (GN) d'une épaisseur de 2 mm bien sèches on a repiqué les quatre souches (*K. pneumoniae* 1115, *K. pneumoniae* 4328).

On a également réalisé un ensemencement de deux souches de *Kp* (*K. pneumoniae* 1216, *K. pneumoniae* 2458) sur deux boîtes couler avec du **MacConkey** pour vérifier la pureté des souches.

Incubées toutes les boîtes pendant 18h à une température de 37°C afin d'obtenir une culture jeune et des colonies pures et bien isolées.

2.3 Tests de formation de biofilm sur microplaque

On commence par la préparation de la suspension bactérienne :

2.3.1 Préparation de la suspension bactérienne

En respectant les conditions d'asepsie à partir d'une culture jeune de 18h sur gelose nutritive on a prélevé à l'aide d'un écouvillon 2 à 3 colonies bien isolées et parfaitement identiques. Décharger l'écouvillon dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%, agité à l'aide d'un vortex pour bien homogénéiser la suspension bactérienne. La standardisation de la suspension est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625nm. On admet qu'une densité optique (DO), comprise entre 0.08-0.1, qu'elle correspond à une concentration qui avoisine 10^8 UFC/ml. Une dilution 1/10 est ensuite réalisée (1ml de la suspension dans 9ml d'eau physiologique stérile). (landeta et al 2013).

2.3.2 Évaluation de la capacité de la formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*

Ces tests sont réalisés sur une microplaque de polystyrène à 96 puits stérile :

On commence par encensement sur plaque :

- On met 100 µl du BHIB dans les deux premier puits (contrôle négatif).
- On met 100µl du BHIB + 50 µl de la suspension (staphylocoque) (contrôle positif).
- Par la suite on met dans chaque trois puits 100µl du BHIB +50µl de différentes suspensions de souches *Klebsiella pneumoniae*.
- Incubation de la plaque 24h à 37°.

Après 24h d'incubation la plaque va subir un lavage tout en faisant attention aux biofilms former au fond des puits :

- On aspire le contenu de la plaque à l'aide d'une micropipette (BHIB + suspensions).
- Lavage avec 200µl PBS trois fois pendant 10 minute avec agitation.
- Le PBS est aspirer et les biofilms sont fixer avec l'addition de 200µl de l'éthanol absolu à 96% pendant 10 minutes.
- L'éthanol est aspiré et la microplaque est colorée avec 200µl du cristal violet (1%) pendant 20minutes
- Le colorant est ensuite jeté et la microplaque est lavée 4 fois avec de l'eau distillée.
- Additionner 200µl de l'éthanol absolu pour solubiliser le biofilm. Laisser agir 30 minute.
- Lecture à 560nm sur un lecteur Elisa. (landeta et al 2013)

2.4 La réalisation des test antibiofilm de l'huile essentielle de clous de girofle

2.4.1 Détermination de la CMI

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 h. La technique de dilution semi logarithmique dans des microplaques à 96 puits est la méthode choisie pour déterminer la CMI de l'huile testé. (Fadipe et al., 2015).

Ce test a été réaliser sur une microplaque à 96 puit :

- On a préparé un milieux BHIB + 1% du tween 80
- On a préparé l'huile dans un eppendorf (400µl de l'huile + 400µl du BHIB additionné de 1% de tween 80) c'est la solution mère.
- On prépare le control négatif BHIB+ suspension bactérienne.
- On commence par le premier puit on met 100µl la solution mère + 50µl la suspension bactérienne.
- Dans le reste des puits on met 50µl du BHIB additionné de 1% de tween 80 et 50µl de la suspension bactérienne.
- Par la suite on va réaliser des dilution semi logarithmique on prend 50µl du premier puit on le dilue dans 100µl (50µl BHIB et 50µl de la suspensions) et on fait la même chose pour le reste des puits.
- On incube la microplaque 24h / 37°
- Apes l'incubation on ajoute 30ul de la rezasurine à 0.015% dans les puits et on incube 2 à 4h à 37°c.

2.4.2 Activité antibiofilm

L'activité antiadhésive est évaluée sur microplaque de 96 puits (Greinerbio-one CELLSTAR), utilisant la méthode d'**Islamet al. (2008)** modifier selon le protocole suivant : Deux suspensions de souches *K.pneumonaie*(*K. pneumoniae* 2458, *K. pneumoniae* 1216)ont étépréparéesdans 10ml d'eau physiologique et une standardisation des suspensions est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625nm.On admet qu'une densité optique (DO) comprise entre0.08 et 0.1 ensuite 1 ml de la suspension est ajouter à 9ml de BHIB dans le but d'effectuer une dilution 1/10 pour les 2 souches, deux microplaque sont nécessaire pour réaliser ce test.

- La première plaque estensemencée par le BHIB contenant la souche et l'incuber 4h / 37°.

Matériels et méthode

- Une deuxième plaque est préparé pour les dilution d'huile pour cela une solution mère est préparé (400µl d'huile des clous de girofle est ajouter à 400ul de BHIB+tween80), en prenant deux ligne de la microplaque (une ligne pour chaque souche), 200µl de la solution mère sont ajouter dans le premier puit seul et 100µl de (BHIB) sont ajoutés aux 11 puits restants ,ensuite à partir du premier puit à l'aide d'une micropipette 100 µl on prélève 100 µl et on l' introduit dans le deuxième et du deuxième dans le troisième ainsi de suite jusqu' à arriver au dernier puit la ou les 100 µl sont jeter dans le but d'effectuer des dilutions semi logarithmique.
- Enfin, 100 µl sont prélevé de la 2^{ème} microplaque sont ajouté aux deux lignes de la première microplaque puis incubé 24 h.
- Après l'incubation la microplaque va subir un lavage
- La plaque est d'abord vidée avec la micropipette.
- Les puits sont lavés trois fois avec un tampon PBS afin d'éliminer les Bactéries libres (planctoniques). Pendant 10 minute.
- Réaliser une coloration avec du Cristal violet pendant 15 min,
- L'excès du colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec du PBS
- Avant la mesure de la DO au moyen d'un lecteur ELIZA à 590 nm, les puits Sont remplis avec l'éthanol a 96% pour solubiliser les biofilms.

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and a light gray fill. It has rounded ends and a small circular detail on the left side. The text "Résultats et discussion" is centered within the scroll.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Caractères organoleptiques

Tableau7 : caractéristique de l'huile essentielle du clou de girofle

	Aspect	Couleur	Odeur
Norme AFNOR Limpide parfois, Légèrement Visqueux	Liquide mobile Limpide parfois, Légèrement visqueux	Jaune très clair	Epicée Caractéristique de l'eugénol
Huile Essentielle Etudiée	Liquide mobile	Sans couleur	Epicée

Selon le (**tableau 7**) On remarque que notre huile essentielle obtenu par la technique d'entraînement à la vapeur d'eau respecte les normes d'AFNOR.

Le rendement des clous de girofle est présenté dans le tableau suivant :

Tableau8 : calcul du rendement

Méthode d'extraction	Masse de plante sèche (g)	Masse des HE(g)	Rendements(%)
Entrainement à la vapeur d'eau	150	4,8	3.2

Le (**Tableau 8**) nous montre une comparaison entre les caractéristiques de notre huile essentielle extraite des clous de girofle avec les normes d'AFNOR

Tableau 9 : Résultat de rendement

	Huile étudié	Norme AFNOR	
		Minimum	Maximum
Rendement (%)	3.2	5	8

On a pu récupérer une quantité huileuse de 3.2 % (**tableau 9**) cette valeur est acceptable selon les normes AFNOR.

Résultats et Discussion

Le rendement a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec. D'après nos résultats, Le rendement est élevé pour les clous de girofle de l'huile essentielle de 3.2%. Notre résultat est nettement inférieur à celui reporté par (Merghacheet *al.*, 2009) Qu'il est obtenu de rendement de 4,2% ; et supérieur à celui reporté par (Zwaving et Smith.,1971) qui ont obtenus un rendement de 2.95%. Toutefois, il est difficile de comparer les résultats du rendement avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, ainsi qu'à l'origine géographique de l'épice.

2. L'ensemencement

K. pneumoniae présente tous les caractères généraux des entérobactéries. C'est un bactérie aero-anaerobiefacultative. On a utilisé le milieu « Macconkey » et « gélose nutritive » pour isoler les Kp car c'est des souches non exigeantes. Après 18-24 heures à 37°C, elle forme des colonies arrondies, muqueuses, généralement bombées et brillantes.

Codes des souches :

- a) *K. pneumoniae* 2458
- b) *K. pneumoniae* 1216
- c) *K. pneumoniae* 1115
- d) *K. pneumoniae* 4328

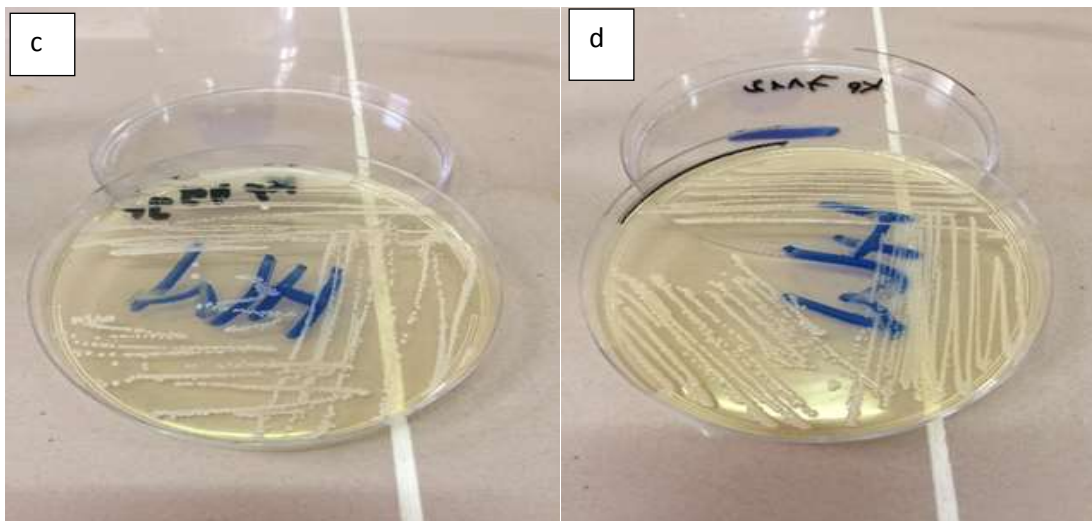


Figure 15 : Souches de *K.pneumoniae* sur (GN)

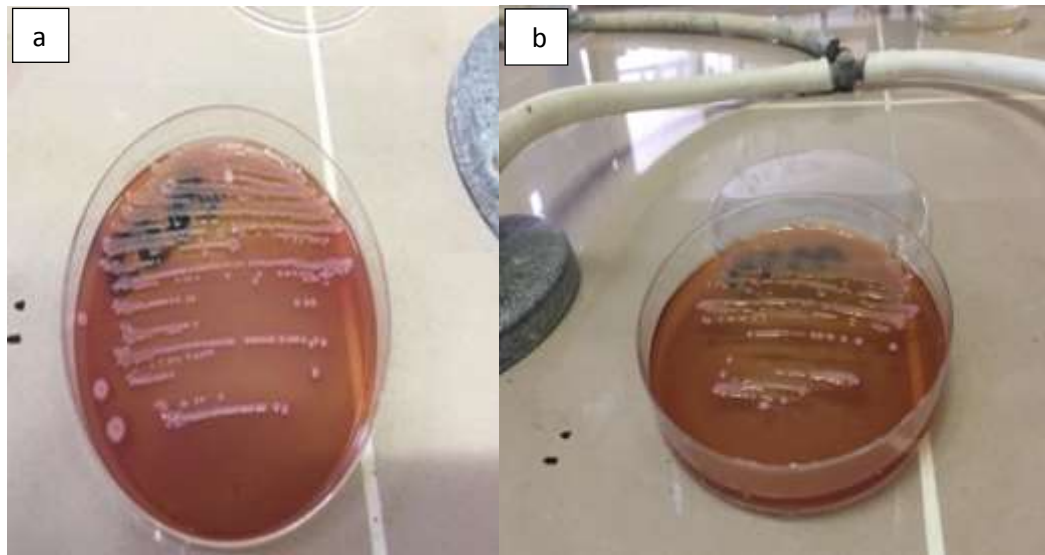


Figure 16 : Souches de *K. pneumoniae* sur Macconkey

3. Formation du biofilm

La formation de biofilm dans les microplaques à 96 puits, est analysée en premier lieu par une simple observation à l'œil nu des puits, après une coloration au cristal violet. Alors que les parois des puits sont moyennement colorées.

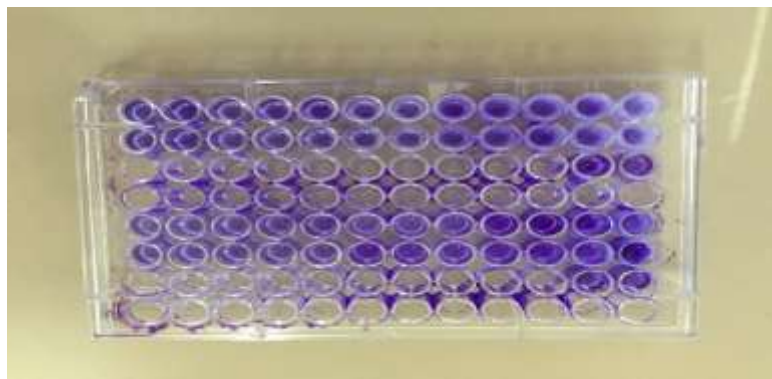


Figure17 : formation de biofilm sur microplaque

Résultats et Discussion

En deuxième lieu une estimation quantitative du taux de formation des biofilms par les souches de *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae*2458, *K. pneumoniae*1216, *K. pneumoniae*1115 et *K. pneumoniae*4328) tout en les compare aux témoins positifs qui sont (*B. cereus* et *S. aureus*) et au témoin négatif qui est le BHIB est obtenue par la mesure de la DO à 560 nm au lecteur de microplaque (ELIZA).

Tableau10 : résultats des DO de la microplaque au lecteur ELIZA

Codes des souches testés	Répétition 1	Répétition 2	Répétition 3	Moyenne
<i>K.pneumoniae</i> 2458	2,808	2,813	2,827	2,816
<i>K.pneumoniae</i> 1216	2,802	2,801	2,801	2,801
<i>K.pneumoniae</i> 1115	2,802	2,806	2,804	2,804
<i>K.pneumoniae</i> 4328	2,745	2,736	2,026	2,5023
Contrôle – (BHIB seul)	1,812	1,812	1,812	1,812
<i>S.aureus</i> (contrôle+)	3.027	2,952	2,92	2,937

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées durant notre étude ont été testées pour leurs capacités à former des biofilms par la méthode de microplaque 96 puits. D'après les travaux de **Lammemet al., (2013)** une DO de 1 est la valeur seuil d'estimation du potentiel de formation du biofilm chez les *K. pneumoniae*. Et d'après **Landeta et al 2013** qui a fait une catégorisation des souches comme suite :

- DO < 1 : Faiblement productrice du biofilm.
- 1 < DO < 2 : faiblement formatrice du biofilm.
- 2 < DO < 3 : moyennement productrice de biofilm.
- 3 < DO : fortement productrice

Selon (**le tableau 10**) et la catégorisation de **Landeta et al 2013** on peut constater que toutes les souches testées montrent un Potentiel de formation de biofilm au sein de la microplaque par rapport aux témoin biofilmogènes, qui a été utilisées comme témoins positif et Le bouillon BHI stérile qui a été incorporé comme contrôle négatif. Et d'après les

catégories on dira que nos souches sont moyennement formatrices de biofilm {2 <2.5, 2.8,2.9< 3}.

D'autres travaux ont montré que plusieurs souches de *K. pneumoniae* sont formatrices de biofilm à un taux élevé, (Bellifa, 2014) a trouvé que sur 115 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 30 sont fortement formatrices du biofilm, 65 modérément formatrices de biofilm et 25 souches sont non formatrices de biofilm.

D'après (KimiaSeifi, et al., 2016) Selon l'analyse du biofilm, 52,1 % (n = 49) des 94 isolats de *K. pneumoniae* testés ont été classés comme des souches produisant modérément un biofilm, 33 % (n = 31) ont formé des biofilms pleinement établis, 8,5 % (n = 8) ont produit biofilms négligeables, et 6,4 % (n = 6) des souches n'étaient pas productrices de biofilms

Après l'analyse des résultats des tests de formation de biofilm on en déduit que les quatre souches sont modérément formatrices de biofilm. Cette capacité de formation de biofilm est dû à l'expression différentielle des gènes comparée à celle des bactéries planctoniques et aussi à la présence des adhesine fimbriales qui joue un rôle dans l'initiation de formation du biofilm.

La capacité des micro-organismes opportunistes nosocomiaux tels que *K. pneumoniae* à produire des biofilms sur les surfaces des tissus hôtes est une étape critique dans le développement de l'infection. La formation de biofilm affecte l'efficacité des thérapies antimicrobiennes et les résultats des infections ultérieures

4. Activités antibiofilm de l'huile essentielle des clous de girofle

5.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Afin de pouvoir utiliser l'effet antibactérien de l'huiles essentielles ; il nous a paru nécessaire de déterminer la valeur de CMI de cette huile pour qu'on puisse tester leur effet antibiofilm en utilisant des valeurs qui ont démontré avoir une activité antimicrobienne.

Les CMI ont été réalisé uniquement sur 2 souche (*k. pneumoniae* 2458 et *K. pneumoniae* 1216).

Résultats et Discussion

Tableau11 :Effet des différentes concentrations d'huile essentielle sur la croissance des Bactéries

L'huile Souche	1 S M	2 ½	3 1/ 4	4 1/ 8	5 1/1 6	6 1/3 2	7 1/6 4	8 1/12 8	9 1/25 6	10 1/51 2	11 1/102 4	12 1/204 8	T -
<i>K.pneumoniae</i> 1216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>K.pneumoniae</i> 2458	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

(-) inhibition ;

(+) croissance ;

Cette étude a marqué la limite d'inhibition au niveau de la **dilution 1/512** pour les deux souches *K. pneumoniae*.

Tableau 12 : valeur des CMI

Bactéries	Valeur de la CMI (µg/ml)
<i>K.pneumoniae</i> 1216	1,030
<i>K.pneumoniae</i> 2458	1,025



Figure 18: microplaque pour déterminer la CMI.

Selon les résultats obtenus, l'huile des clous de girofle est active vis-à-vis des souches *K. pneumoniae* à l'état planctonique avec une CMI d'ordre de 1,025 µg/ml pour *K. pneumoniae* 2458 et d'ordre de 1.030 µg/ml pour *K. pneumoniae* 1216. d'après ces résultats

Résultats et Discussion

l'huile essentielle des clous de girofle a une activité inhibitrice vis-à-vis les deux souches de *klebsiellapneumoniae*, notre résultat pourrait s'expliquer par la présence du composé majoritaire des clous de girofle « l'eugénol » qui a une activité antibactérienne.

Et aussi Dans l'étude de **prabuseenvasan s, jayakumar M Et IgnacimutuS**, les chercheurs ont testé l'activité bactéricide de certaine H.E. sur ces bactéries, pour des concentrations allant de 0,8 à 12,8 mg/ml par palier de 0,8 mg/ml. Les valeurs obtenues pour la CMI de l'H.E. de clou de girofle sont respectivement 3,2 – 6,4 – 3,2 – 1,6 mg/ml pour *B.subtilis*, *K.pneumoniae*, *P.vulgaris* et *P.aeruginosa*.

D'après **Fabio et al. (2007)** la valeur obtenu pour la CMI de l'HE de clous de girofle sur les KP est de MIC : 0.050 mg/ml.

5.2. Activité antibiofilm

Tableau 13 : Effet de l'huile des clous de girofle sur la formation du biofilm différentes Concentrations.

Puit Souche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
K.pneumoniae 1216	0,37	0,36	0,48	0,62	1,04	1,02	1,23	1,38	2,07	2,38	2,76	1,82
K.pneumoniae 2458	0,64	0,70	0,62	0,76	0,97	2,69	1,80	1,89	2,02	2,52	2,65	2,90

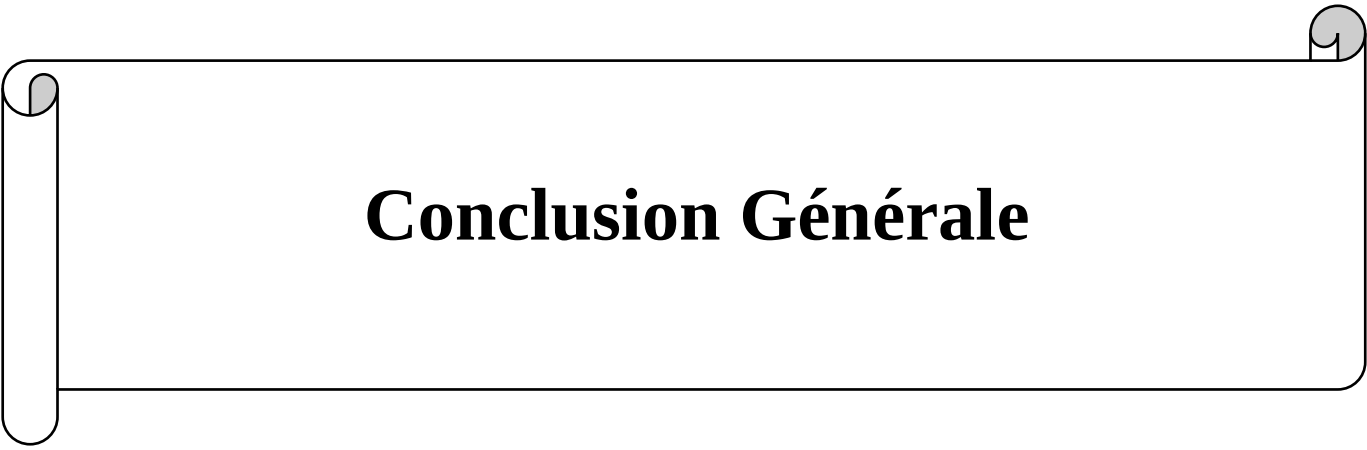
L'huile essentielle du clou de girofle a inhibé la croissance de *K. pneumoniae*. Cette inhibition se traduit par la sensibilité du biofilm à cette huile avec un taux d'inhibition de l'ordre de 30% pendant 24h d'incubation et cela pour une CMI de 1,025 µg/ml pour *K. pneumoniae* 2458 et 1.030 µg/ml *K. pneumoniae* 1216.

En effet, **Rhayour et al (2002)** ont démontré que l'huile essentielle de Clou de Girofle est fortement antibactérienne. Cette activité pourrait être attribuée à son composé majoritaire qui est "l'eugénol". Les travaux de **Valero et Giner en 2006**, ont prouvé que l'eugénol parmi d'autres composés a provoqué l'inhibition de la croissance des bactéries *Escherichia coli*.

D'après **(Afif et al.,2018)** il est bien établi que des nombreuses huiles essentielles ont la capacité de lutter contre les souches pathogènes telle que *Klebsiella pneumoniae*.

Résultats et Discussion

D'une manière générale, l'inhibition de formation du biofilm de *K. pneumoniae* en présence de différentes concentrations de l'huile essentielle du clou de girofle comparée aux témoins - pourrait s'expliquer par la présence dans cette huile essentielle des composés à activité antibiofilm et antibactérien tel que l'eugénol et eugényle acétate. La synergie entre les différentes biomolécules actives de clous de girofle peut aussi inhiber la formation des biofilms.

A decorative horizontal scroll graphic with a black outline and rounded ends. On the left side, there is a vertical strip representing the scroll's binding. At each of the four corners (top-left, top-right, bottom-left, and bottom-right), there is a small gray circle with a black outline, suggesting a pin or fastener.

Conclusion Générale

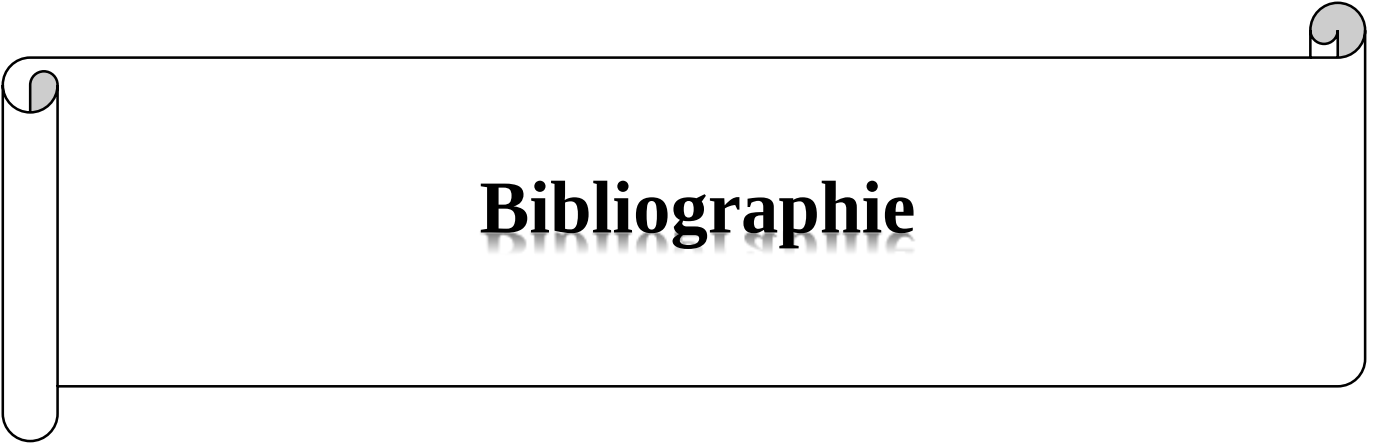
Conclusion Générale

Les biofilms ont un impact écologique et économique considérable. Ils jouent un rôle dans la survie et la sélection des bactéries dans l'environnement, mais ont aussi de nombreux effets indésirables, notamment en santé publique.

Pour toutes ces raisons, de nombreuses équipes de recherche s'intéressent au mode de développement des biofilms et aux facteurs d'adhésion impliqués dans les différentes étapes de leur formation. Les travaux issus de ces recherches ont permis de faire progresser très considérablement notre compréhension de ce mode de vie, dans ces aspects les plus moléculaires et de mettre en évidence des fonctions et réponses physiologiques caractéristiques de cet environnement (échanges génétiques, adhésion, communication inter bactériennes, modalités de résistance aux antibiotiques). La caractérisation de tels facteurs devrait fournir des pistes pour le développement de stratégies destinées à prévenir ou contrôler la formation de biofilms bactériens dans des situations où ceux-ci constituent un problème sanitaire, industriel ou écologique.

Les échecs thérapeutiques et les coûts de plus en plus élevés des traitements des infections dues aux bactéries résistantes, appellent à trouver d'autres alternatives de soin. De ce fait, l'utilisation de la phytothérapie est devenue une nécessité, et la recherche de nouvelles molécules possédant un pouvoir antibactérien et antibiofilm est depuis quelques années très active. Les huiles essentielles ont toujours été employées par les civilisations du monde entier pour leurs traditionnelles vertus thérapeutiques. Leur efficacité n'est plus à prouver et de nombreuses publications ont étayé scientifiquement leurs différentes propriétés.

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* jouent un rôle important dans la dissémination de résistance particulièrement vis-à-vis des bêta-lactamines surtout dans les biofilms qui est l'une des formes qui permet aux *Kp* d'être plus résistante et plus pathogène et donc pour éviter l'apparition de nouvelle résistance au même temps lutter contre ces pathogènes on a utilisé l'huile essentielle des clous de girofle qui est connue pour son effet antibactérien. L'HE de clou de girofle présente des propriétés très intéressantes en tant qu'antibactérien grâce à sa composition en eugénol et en eugényl acétate. Elle pourrait ainsi être une alternative à l'utilisation d'antibiotique afin de lutter contre l'apparition de souches résistantes.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and rounded corners on the right, framing the title.

Bibliographie

Reference bibliographique

1. **A.D. Ćirić, J.D. Petrović, J.M. Glamočlija, M.S. Smiljković, M.M. Nikolić, D.S. Stojković, M.D. Soković 2021.** Natural products as biofilm formation antagonists and regulators of quorum sensing functions: A comprehensive review update and future trends
2. **Abisado, RG, Benomar, S., Klaus, JR, Dandekar, AA et Chandler, JR (2018).** Détection du quorum bactérien et interactions microbiennes avec la communauté. *mBio*, 9(3). pp 1-2
3. **Afif Chaouche Thinina Arab ,Karim Laoufi Razika, Malek Malya.(2018).** Inhibition du biofilm formé par *Klebsiella pneumoniae* responsable d'infection urinaire par l'huile essentielle et les polyphenols de *Lavandula officinalis*. Vol 02, No 02, pp 39-45
4. **Agbaje EO 2008.** Gastrointestinal effects of *Syzygium aromaticum* (L) Merr & Perry (Myrtaceae) in animal models. *Nig Q J Hosp Med.*;18(3):137-41.
5. **Al- Shuneigat, M. Usai, P. Bradesi, C. Juliano, G. Boatto, F. Tomi, M. Chessa, R. Cerri, J. Casanova, Flavour Fragr. J., 2005, 17, 15**
6. **Ali S, Prasad R, Mahmood A et al. 2014.** Eugenol-rich Fraction of *Syzygium aromaticum* (clove) reverses biochemical and histopathological changes in liver cirrhosis and inhibits hepatic cell proliferation. *J Cancer Prev*;19(4):288-300.
7. **Amandeep Kaur ,Neena Capalash et Prince Sharma. 2018.** Détection de quorum chez les thermophiles : prévalence du système autoinducteur-2
8. **Anand S, Singh D, Avadhanula M, Marka S. 2014.** Development and control of bacterial biofilms on Dairy Processing Membranes. *Revi in Food. Science and foodSafty.* 13, pp 18-33.
9. **Aparna, MS et Yadav, S. (2008).** Biofilms : microbes et maladies. *Journal brésilien des maladies infectieuses*, 12 (6), 526-530.
10. **aSarre B, Federle MJ 2013.** Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev pub med* ; 77 :73–111.
11. **Aumeran C., Balestrino D., Forestier C. 2020.** Biofilms bactériens et santé encyclopedie de l'environnement. pp 1-7
12. **Avril J.L., Dabernat H., Denis F. & Monteil H., 2000.** *Bactériologie clinique*, Ellipses 2ième édition, Paris, France, 602 p.

Bibliographie

13. **Bachiega TF, de Sousa JP, Bastos JK et al 2012.** Clove and eugenol in noncytotoxic concentrations exert immunomodulatory/ anti-inflammatory action on cytokine production by murine macrophages. *J Pharm Pharmacol.* 64(4) :610-6.
14. **Balestrino, D., Ghigo, J.-M., Charbonnel, N., Haagensen, JAJ, & Forestier, C. (2008).** La caractérisation des fonctions impliquées dans l'établissement et la maturation du biofilm in vitro de *Klebsiella pneumoniae* révèle un double rôle pour les exopolysaccharides de surface. *Microbiologie environnementale*, 10 (3), 685-701.
15. **Banks KM., Bryers JD. 1992.** Deposition of bacterial cells onto glass and biofilm surface. *Biofouling*. 6, pp 81_86.
16. **Barbelet S. 2015.** Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle. [Thèse d'exercice de pharmacie]. Nancy: Université de Lorraine;
17. **Bellifa Samia (2014).** Evaluation de la formation de biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de Doctorat Université Abou Beker Belkaid Tlemcen.
18. **Beloin C, Roux A, Ghigo J.M. 2008.** *Escherichia coli* biofilms. *Curr top microbial immunol.* 322, pp 249-289.
19. **Ben Jaballah N., Bouziri A., Kchaou W., Hamdi A., Mnif K., Belhadj S., Kazdaghi K. (2006).** Epidémiologie des infections bactériennes nosocomiales dans une unité de réanimation néonatale et pédiatrique tunisienne. *Médecine et maladies infectieuses.* 36(7) : 379-385.
20. **Benlmouden A. et Hakkou F. 2007.** Antibiotiques : Mécanismes d'action et de résistance. Service de Pharmacologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Casablanca, Maroc. *La Chronique Ibn Rochd*; 1: 46-54.
21. **Bezoui mouna 2016.** Biofilms bactériens ; Résistance ; infections chroniques ; implants médicaux anti-biofilms. pp 10,11,12
22. **Branger A, Richer M-M, Roustel S. 2007.** Microbiochimie et alimentation. Ed educagri. Pp 131-140.
23. **Brisse S, Grimont F Et Grimont P. A. D. (2006).** The Genus *Klebsiella*. *Procaryotes*. Chapitre 3.3.8.
24. **Burt SA, Reinders RD. 2003.** Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 36 pp 162–167.
25. **Carl S. 2009.** La Résistance aux antibiotique : un enjeu de santé publique imporant.le parrainage des antimicrobiennes .p47 .

Bibliographie

26. **Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2007).** The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum*, L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy research*, 21, 501-506.
27. **Chalvet de Rochermonteix A (2009).** Les Biofilms et peaux. Thèse pour obtention de Doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil. Paris Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort. P147.
28. **Characklis W.G, Marshall K.C. 1990.** Biofilms. Pp 341-394.
29. **Chew KL, Lin RTP, Teo JWP (2017).** MPT64 gene mutations leading to non-reactivity on a rapid immunochromatographic assay. *J Infect Dev Ctries* 11:371-373.
30. **Clementine, 2021.** Huile essentielle de Giroflier, l'anti-biofilm bactérien par excellence.
31. **Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott, H.M. 1995.** Microbial biofilms. *Annual Rev in Microbiol.* 49(1), 711-745.
32. **Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
33. **Cressy HK, Jerrett AR, Osborne CM, Bremer PJ. 2003.** A novel method for the reduction of numbers of *Listeria monocytogenes* cells by freezing in combination with an essential oil in bacteriological media. *J Food Protect* 66: 390–395.
34. **D ALBAYRAK., Ponce A.G., De Valle C.E., Rouba S.I., 2015,** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Lebensmittel-Wissenschaft und -TechnologieLWT*, 38, p: 565–5
35. **Davies G., Eds Allison DG, Gilbert P, Lappin_Scott HM, Wilson M. 2000.** Physiological event in biofilm formation. In community structure and Co-operation in biofilms. *Society for General Microbiology Symposia*. Pp 37-52.
36. **Donlan, RM et Costerton, JW (2002).** Biofilms : Mécanismes de survie des micro-organismes cliniquement pertinents. *Revue de microbiologie clinique*, 15 (2), 167-193.
37. **Feres M, Figueiredo LC, Barreto IM, Coelho MN, Araujo MW, Cortelli SC. 2005.** antimicrobial activity of plant extracts and propolis in saliva samples of healthy and periodontally-involved subjects. *J Int Acad Periodontol* 7: 90–96.

Bibliographie

38. **Fu, Y.; Zu, Y.; Chen, L.; Shi, X.; Wang, Z.; Sun, Z.; Effert, T 2007.** Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother. Res.* 21, 989–994.
39. **Garret TR. 2008.** Bacterial adhesion and biofilm on surface. Sci direct.
40. **Gautier V., 2007.** Caractérisation et expression des gènes codant pour les β -lactamases chromosomiques au sein des entérobactéries de l'environnement, Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, 25 p.
41. **George M Garrity., Julia A Bell et Timothy G Lilburn. 2004.** Taxonomic Outline of the Procaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition.DOI: 10.1007/bergeysouline 200405.
42. **Goetz K. 2005., Dufour S., Archambault M., Malouin F., Jacques M. 2016.** Importance et control de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intramammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique. *Revue Méd. Vét.* 167, pp 7-8, pp 215-229.
43. **HennequinC., Forestier C. 2007.**Influence of capsule and extended-spectrum betalactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology* 158(2007) 339-347.
44. **Henrici AT., (1933).** Studies of freshwater bacteria. I. A direct microscopic technique. *Journal of Bacteriology* 25, 277-287.
45. **Hoiby, N, Ciofu, O, Johanson, H. K, Song, Z, J, Moser, C, Jensen,P .and Bjarnsholt, T . 2011.** the clinical impact of bacterial biofilms. *Intern J of oral sci.* 3(2), pp55-65.
46. **Hu, Y., Liu, C., Shen, Z., Zhou, H., Cao, J., Chen, S., ... Zhang, R. (2020).** Prévalence, facteurs de risque et épidémiologie moléculaire de *Klebsiella pneumoniae* résistant aux carbapénèmes chez des patients du Zhejiang, Chine, 2008-2018. *Microbes et infections émergents*
47. **Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2006).** The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. The Enterobacteria (2nd ed., pp. 115-129). Washington, USA: ASM Press.
48. **Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2006).** The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. The Enterobacteria (2nd ed., pp. 115-129). Washington, USA : ASM Press.

Bibliographie

49. **Joly B et Reynaud A. 2002.** Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic. P : 79-80-83.
50. **Kaplan J. B. 2010.** Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implication, and potential therapeutic uses. J Dent Res. 80. pp 205-218.
51. **Karpanen C., Singh R.K., Bhunia A.K., Stroshine R.L., 2008,** Efficacy of chlorine dioxide, ozone, and thyme essential oil or a sequential washing in killing escherichia coli O157:H7 on lettuce and baby carrots. LebensmittelWissenschaft und -Technologie, 35, p: 720–72
52. **Kenneth Ssekatawa ,Denis K. Byarugaba, Jesca L. Nakavuma ,Charles D. Kato ,Francis Ejobi , Robert Tweyongyere &Wampande M. Eddie. 2021.** Prévalence de *Klebsiella pneumoniae* pathogène basée sur le typage capsulaire PCR hébergeant des gènes codant pour les carbapénémases dans les hôpitaux tertiaires ougandais 57.
53. **Khalilzadeh P. (2009).** Formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* : evaluation d'inhibiteurs potentiels du quorum sensing. Thèse de doctorat en microbiologie.
54. **Kiana Karimi , Omid Zarei , Parinaz Sedighi , Mohammad Taheri , Amin Doosti-Irani et Leili Shokoohizadeh. 2021.** Journal international de microbiologie Enquête sur la résistance aux antibiotiques et la formation de biofilm dans les isolats cliniques de *Klebsiella pneumoniae*
55. **Kimia Seifi , Hossein Kazemian , Hamid Heidari , Fereshteh Rezagholizadeh , Yasaman Saei , Fariba Shirvani et Hamidreza Hourri 2016.** Jundishapur J Microbiol, Évaluation de la formation de biofilm parmi les isolats de *Klebsiella pneumoniae* et caractérisation moléculaire par ERIC-PCR pp9
56. **Klein AH, Carstens MI, Carstens E. 2013.** Eugenol and carvacrol induce temporally desensitizing patterns of oral irritation and enhance innocuous warmth and noxious heat sensation on the tongue. Pain. ;154(10) :2078-87.
57. **Kumari, Sarita, and Prabir K. Sarkar. 2014.** "In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology." Food Control 36.1: 153-158.
58. **Larhsini M, Oumoulid L, Lazrek HB et al. 2001.** Antibacterial activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytother Res* 15: 250–252.
59. **Larry M. Bush , MD, FACP, Charles E. Schmidt** College of Medicine, Florida Atlantic University 2020 Infections à *Klebsiella*, *Enterobacter* et *Serratia*
60. **Le Minor L and Véron M. 1989.** Bactériologie médicale, 2ème édition, Flammarion MédecineSciences, Paris.2 :428-432.

Bibliographie

61. **Lee, C.-R., Lee, JH, Park, KS, Jeon, JH, Kim, YB, Cha, C.-J., ... Lee, SH (2017).** Résistance aux antimicrobiens de *Klebsiella pneumoniae* hypervirulente : épidémiologie, déterminants associés à l'hypervirulence et mécanismes de résistance. *Frontières en microbiologie cellulaire et infectieuse*.
62. **Lobstein, A., Couic-Marinier, F., & Barbelet, S. (2017).** Huile essentielle de Clou de Girofle. *Actualités Pharmaceutiques*, 56(569), 59-61.
63. **Mogha K. V., Shah, N. P., Prajapati, J. B., and Chaudhari, A. R. 2014.** Biofilm a threat to dairy industry. *Indian J. Dairy Sci*.
64. **Moradigaravand, D., Martin, V., Peacock, SJ et Parkhill, J. (2017).** Évolution et épidémiologie de *Klebsiella pneumoniae* multirésistante au Royaume-Uni et en Irlande. *mBio*, 8(1).
65. **Mytle N, Anderson GL, Doyle MP, Smith MA. 2006.** Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control* 17: 102–107.
66. **Najiby kassis- chikhani 2012.** *Klebsiella pneumoniae* pathogène nosocomial résistance et virulence. *Microbiologie et parasitologie. Thèses de doctorat de l'université pierre et marie curie paris 16*. Pp 16-17.
67. **Nam H, Kim MM. 2013.** Eugenol with antioxidant activity inhibits MMP-9 related to metastasis in human fibrosarcoma cells. *Food Chem. Toxicol.* ;55:106-12.
68. **Nikky Goela, Syeda Warisul, Fatimaa Sumit, Kumara Rajeshwari, Sinhab Sunil, K. Kharea. (2021)** Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors.pp (2)
69. **Nordmann, P. (2010).** Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *Médecine/sciences*, 26(11), 950–952.
70. **Nordmann, P. (2010).** Résistance aux carbapénèmes chez les bacilles à Gram négatif. *Médecine/sciences*, 26(11), 950–959.
71. **NOURI Manel, ZIADI CHIBANE Fatma, 2015.** Etude bactériologique et résistance aux antibiotiques de *Klebsiella pneumoniae*, Mémoire pour l'obtention du diplôme master au niveau d'université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biologie Animale. Pp 15-16
72. **Olivia P, Duddy, Bonnie L, Bassler 2021.** Quorum sensing across bacterial and viral domains, *journal plos pathogens*
73. **Otto M. 2013.** Staphylococcal infection: mechanism of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual rev. Med* 64, 175-188.

Bibliographie

74. **Oussalaha M, Cailleta S, Saucier L et al. 2007.** Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria : *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control.* ;18(5):414-20.
75. **Philips P.L., Wolcott RD., Fletcher J., Schultz G.S. 2011.** Biofilm made easy 1(3), pp1-6.
76. **Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C et al. 2009.** Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol.*;58(11):1454-62.
77. **Pitout, J.D., Nordmann, P. and Poirel, L. (2015)** Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 5873–5884.
78. **Podschun, R. and U. Ullmann. 1998.** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin.Microbiol.Rev.* 11:589-603.
79. **Podschun, R. and Ullmann, U. (1998)** *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11, 589–603.
80. **PRABUSEENIVASAN S, JAYAKUMAR M, IGNA-CIMUTHUS S 2006,** In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement Alters Medicine.* ;6 :39.
81. **Pratt L.A., Kolter R. 1998.** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microb.* 30, pp 285-293.
82. **Punithavathy P. M., Nalina K., Menon T. 2012.** Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilm against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. *Indian J. Path and microb.* 55(1), pp72-74.
83. **Rawat, D. and Nair, D. (2010)** Extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *J Global Infect Dis* 2, 263–274.
84. **Rhayour E., Dunman P. M., McAleese F., Macapagal D., Murphy E., Projan S. J., Blevin J. S., Smeltzer M. S. (2016).** Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Bacteriology.* 186 : 4665-4684.
85. **Richard Cl. Et Grimont F. Klebsiella.1992,** *Enterobacter, Hafnia, Serratia*, In : LE MINOR (L). *Bactériologie médicale*, Paris : Flammarion,427-31p. LECLERC H., *Microbiologie générale*, 2e édition, 1983, 95p .
86. **Rodney M. Donlan et J. William Costerton** *Biofilms : mécanismes de survie des micro-organismes cliniquement pertinents*

Bibliographie

87. **Rodney M. Donlan , J. William Costerton aSarre B, Federle MJ.** Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013; 77 :73–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].
88. **ROUX, Agnès ; GHIGO, Jean-Marc 2006.** Les biofilms bactériens
89. **Russo, TA, & Marr, CM (2019).** *Klebsiella pneumoniae* hypervirulente. *Revue de microbiologie clinique*, 32(3).
90. **Santin JR, Lemos M, KleinJúnior LC et al. 2011.** Gastroprotective activity of essential oil of the *Syzygium aromaticum* and its major component eugenol in different animal models. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* ;383(2):149-58.
91. **Schembri MA, Kjaergaard K, Klemm P. 2003.** Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microb.* 48, pp 253-267.
92. **SQUALLI H. J.C. Scheffer, A. Baerheim Svendsen, Pharm. Weekbl., 2007,**
93. **Squinzi F. 2013.** Biofilm et matériaux : des réseaux intérieurs de distribution de l'eau. Pp 4-10.
94. **Ssekatawa, K., Byarugaba, D. K., Nakavuma, J. L., Kato, C. D., Ejobi, F., Tweyongyere, R., & Eddie, W. M. (2021).** Prevalence of pathogenic *Klebsiella pneumoniae* based on PCR capsular typing harbouring carbapenemases encoding genes in Uganda tertiary hospitals. *Antimicrobial Résistance & Infection Control*, 10(1).
95. **Stahlhut S G., Struve C., Krogfelt K A etReisner A.2012.** Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65 (2012) 350–359.
96. **Struve C, Bojer M, Krogfelt K.A. 2008.** Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *J Infect Immun* 76(9): 4055-65.
97. **Sung B, Prasad S, Yadav VR et al. 2012.** Cancer cell signaling pathways targeted by spice-derived nutraceuticals. *Nutr Cancer.* 2012;64(2):173-97.
98. **Sutherland I.W. (2001).** The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology.* 9, 222-227.
99. **Sylvain Brisse, Francine Grimon,Patrick A. D. Grimon (2021).** The Genus *Klebsiella* pp 159-196
100. **Sophie Barbelet 2015.** These de doctorat en pharmacie LE GIROFLIER : HISTORIQUE, DESCRIPTION ET UTILISATIONS DE LA PLANTE ET DE SON HUILE ESSENTIELLE.pp 35

Bibliographie

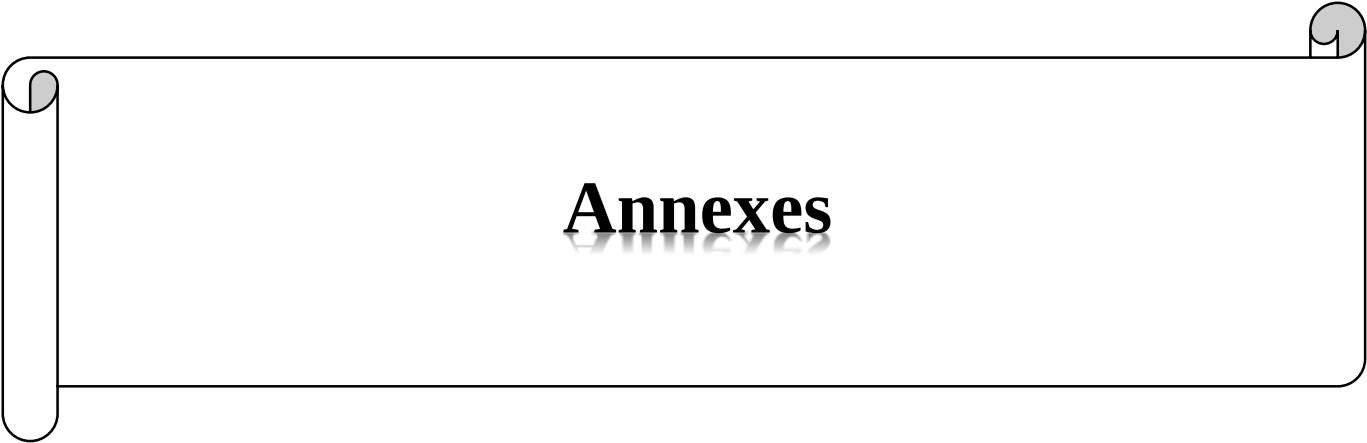
101. **Thomas A. Russo and Candace M. Marr 2019.** *klebsiella pneumoniae* hypervirulente
102. **Tissot P. 2005. Antibiothérapie 1 & 2. I F S I Année 2004 – 2005.** PharmacienHyères U/. sur le lien : ifsi.chhyeres.fr/IMG/pdf/Antibiotherapie.pdf.
103. **Tremblay Y.D Hathroubi S., Jacque M. 2014.** Les biofilms bactériens: leur importance en santé animal et en santé publique. *Canadian J. Vet Res.* 78(2), pp 110-116.
104. **Van Bambeke F. & Tulkens P., 2008.** Pharmacologie et pharmacothérapie anti-infectieuse, Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Université catholique de Louvain, pp 212
105. **Van Houdt R, Michiels C. 2005.** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microb.* 156, pp 626-633.
106. **Vuotto C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, MP, Libori, MF, ... Varaldo, PE (2017).** Formation de biofilm et résistance aux antibiotiques dans les souches urinaires de *Klebsiella pneumoniae*. *Journal de microbiologie appliquée*, 123 (4). Pp 1004-1005.
107. **Walsh C., 2003.** Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington, DC: ASM Press. pp 345.
108. **Wyres, KL, Lam, MMC et Holt, KE (2020).** Génomique des populations de *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Avis Microbiologie*
109. **Xu, J.G. ; Liu, T. ; Hu, Q.P. ; Cao, X.M. 2016.** Chemical composition, antibacterial properties and mechanism of action of essential oil from clove buds against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21, 1194
110. **Yala D, Merad A.S, Mohamadi D, et Ouar Korich M.N. 2001.** Classification et mode d'action des antibiotiques, *Médecine du Maghreb* 91. P1, 2-13.
111. **Yang, D. and Zhang, Z. (2008)** Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Hosp Infect* 68,
112. **Yannick D.N. Tremblay, Skander Hathroubi, et Mario Jacques 2014.** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique *Canadian Journal of Veterinary Research* 78(2) pp 110-116
113. **Zhao G., Usui M L., Lippman S I., James G A., Stewart P S., Fleckman P., Olerud J E. (2013).** Biofilms and inflammation in chronic wounds. *Advances in wound care*; 2: 389-399.

Bibliographie

- 114. Zobell C.E.1943.** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J . bacterial. 46, pp 39.

Webographie

- <https://www.hpci.ch/prevention/bases-theoriques/microorganismes-et-pathologies/ent%C3%A9robact%C3%A9ries-avec-carbap%C3%A9n%C3%A9mase-cre-ou>
- <https://mail.google.com/mail/u/0/www.elsevier.com/locate/btre>
- <https://sante.journaldesfemmes.f>
- <https://www.maxicours.com/se/cours/les-differentes-techniques-d-extraction>
- L'eugénol (page consultée le 23 avril 2013), [En ligne], adresse URL : <http://www.exchem.fr/eugenol.htm>
- Les huiles essentielles (page consultée le 23 avril 2013), [En ligne], adresse URL : http://www.labo-resala.com/fiches/fiches_huiles_essentielles.pdf
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4834130/>

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and rounded corners at the top and bottom, framing the central text.

Annexes

Annexes

Annexe 1 :

Tableau 1. Composition et pourcentage d'huile essentielle de clou de girofle (*Eugenia caryophyllata*) obtenu avec analyse GS-MS (Goetz *et al.*, 2012).

N°	Composant	Pourcentage (%)
1	2-Heptanone	0.93232
2	Ethyl hexanoate	0.66098
3	2-Heptanol	Tr
4	Menthyl octanoate	Tr
5	2-Nonanone	Tr
6	Ethyl octanoate	Tr
7	α -Cubebene	Tr
8	Copaene	Tr
9	2-Nonanol	Tr
10	Linalool	Tr
11	2-Undecanone	Tr
12	β -Caryophyllene	1.38830
13	Menthyl benzoate	Tr
14	Ethyl benzoate	Tr
15	α -Humulene	0.19985
16	Menthyl chavicol	Tr
17	α -Amorphene	Tr
18	α -Terpinyl acetate	Tr
19	α -Muurolene	Tr
20	Benzyl acetate	Tr
21	Carvone	Tr
22	γ -Cadinene	Tr
23	2-Phenylethyl acetate	Tr
24	(E)-Anethole	Tr
25	Calamenene	0.10538
26	Benzyl alcohol	Tr
27	Calacorene	0.11437
28	Caryophyllene oxide	Tr
29	Menthyl eugenol	Tr
30	Humulene oxide	Tr
31	Cinnamic aldehyde	Tr
32	Ethyl cinnamate	Tr

Annexes

33	Benzyl tiglate	Tr
34	Eugenol	88.58535
35	Eugenyl acetate	5.62086
36	Humulenol	0.27527
Total identifie		98.2769

Tr : trace (<0.1%)

Annexe 2 :

$DO \text{ contrôl Négatif} - DO_{\text{Experimental}} \times 100$

Percentage % inhibition = $\frac{\text{DO contrôl Négatif} - DO_{\text{Experimental}}}{DO \text{ contrôl Négatif}} \times 100$

Annexe 3 :

Appareillage

- Autoclave ;
- Bain-marie ;
- Etuve 37°C ;
- Bec-Bunsen ;
- Réfrigérateur ;
- Spectrophotomètre ;
- Balance de précision ;
- Agitateur magnétique ;
- Agitateur de plaques ;

Annexe 4 :



Figure 12 : lecteur ELIZA

Annexe 5:



Figure 11 : préparation de l'inoculum

Résumé

Klebsiella pneumoniae est l'une des causes majeures des infections communautaires et nosocomiales. Ce germe est responsable des infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à sa capacité de former un biofilm. Le développement de biofilm est un processus dynamique à plusieurs étapes, de l'adhésion initiale des bactéries au support à la maturation des agrégats. Ce travail consiste à tester l'effet de l'huile essentielle des clous de girofle sur l'inhibition de la formation de biofilms de *K. pneumoniae*. Selon la méthode de microplaque, les souches de *K. pneumoniae* se sont de bonnes formatrices du biofilm. Les souches isolées sont moyennement sensibles à l'huile essentielle des clous de girofle et entre les populations planctoniques et populations en biofilm on a eu la même CMI.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is one of the major causes of community and nosocomial infections. This germ is responsible for acute and chronic infections, most of which are due to its ability to form a biofilm. Biofilm development is a dynamic, multi-step process, from the initial adhesion of bacteria to the substrate to the maturation of aggregates. This work involves testing the effect of clove essential oil on the inhibition of the formation of *K. pneumoniae* biofilms. According to the microplate method, *K. pneumoniae* strains are good formators of the biofilm. The isolated strains are moderately sensitive to clove essential oil and between planktonic and biofilm populations the same MIC was observed.