

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOU MAMMARI DE TIZI-OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DEPARTEMENT DES BIOCHIMIE -MICROBIOLOGIE



## *Mémoire de fin d'études*

Spécialité : Microbiologie appliquée

### *Thème*

# **Effet des huiles essentielles sur les biofilms des *Klebseilla pneumoniae***

#### **Présenté par :**

Saad Dihia

Louhi Sadia

Iflissen Dehbia

#### **Devant le jury :**

Président : P<sup>r</sup> HOUALI. K

PROFESSEURE

Promoteur : D<sup>r</sup> BARIZ. K

MCA UMMTO

Examineur: D<sup>r</sup> MSELA. A

MCB UMMTO

2022-2023



## Remerciement

*Un immense remerciement doit être adressé à Dieu tout-puissant, qui nous a dotés de la force, de la volonté et de la patience nécessaires, et qui a éclairé notre chemin tout au long de notre parcours jusqu'à ce jour.*

*Je souhaite exprimer ma gratitude en premier lieu envers mon encadreur, BARIZ KARIM, pour avoir généreusement accepté de nous guider et de nous soutenir tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

*Je tiens également à remercier chaleureusement tous les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail, ainsi que tous ceux qui nous ont accueillis et apporté leur aide précieuse tout au long de la réalisation de ce modeste travail. Leur contribution est inestimable, et je leur en suis extrêmement reconnaissant.*

*Enfin, je souhaite rendre hommage à tous les enseignants du primaire, du secondaire et de l'université qui ont joué un rôle essentiel en nous transmettant le goût des études. Leur dévouement et leur travail souvent peu reconnu ont eu un impact significatif sur notre parcours académique, et je leur suis profondément reconnaissant pour tout ce qu'ils ont fait pour nous.*

# Dédicace

*Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du cœur  
à ceux qu'on aime jusqu'à les frontières de l'imagination ;*

*Ma chère mère « NACERA », mon cher père « RAMDANE », sans eux, je  
n'aurais pas abouti à ce stade d'étude, que Dieu puisse m'aider à les honorer, les  
servir et les combler.*

*A toute la famille : LOUHI.*

*A mes chers frères BELKACEM, MOUMOUH et LYNA.*

*A mes chers amis et voisins.*

*A mon trinôme « IFLISSENE DEHBLA et SAAD DIHIA », A qui je souhaite  
tout le bonheur, ainsi qu'à leurs familles.*

*À tous les enseignants et professeurs qui ont fortement contribué à ma formation  
depuis l'école primaire jusqu'à l'université.*

*A tous mes collègues de la promotion 2022/2023.*

*Sadja.*

# *Dédicace*

*Avec l'aide de DIEU, j'ai pu réaliser ce modeste travail de fin d'étude à que je dédie :  
A MA chère Maman « KARIMA » c'elle qui s'est sacrifiée durant sa vie afin de me voir  
réussir, c'elle qui m'a éclairé mon chemin de ma vie par ces conseils*

*A Mon très chère papa « MOUSTAPHA » Pour m'avoir soutenu moralement et  
matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, Et ses encouragements Qu'ALLAH,  
t'accorde Santé, bonheur et te protège de tout mal*

*A mes frères : HASSAN ET LOUNIS*

*À l'amour de ma vie : MAKHLOUF pour ses conseils et sa motivation*

*A mes chers binômes : SADIA ET DIHIA,*

*A mes chers copains : malha et Karima.*

*A ma grand-mère et grands père Que dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie.*

*A mon oncle KADER ainsi sa femme MARILA et ses enfants : NUMIDIA, LYCIA ET  
WAAMAR*

*A tous mes cousins et cousines*

*A mes tantes et leurs familles*

*A tous mes amis qui m'ont soutenu, aidé et encouragé*

*A toute la promo 2023 du MICROBIOLOGIE Appliqué*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire. Je vous dis  
merci*





## Dédicace

*Avec la grâce de Dieu, j'ai réussi à achever cet humble travail de fin d'études, et j'aimerais le dédier avec gratitude aux personnes suivantes :*

*À ma chère mère, Rezika, dont le dévouement tout au long de ma vie a été une source constante d'inspiration, et dont les précieux conseils ont illuminé mon chemin.*

*À mon cher père, Mouloud, pour son soutien inébranlable sur le plan moral et matériel, pour son amour inconditionnel, et pour ses encouragements constants. Puisse-tu être comblé de santé, de bonheur, et protégé de tout mal.*

*À ma sœur bien-aimée, Cérina, dont la présence a toujours été un réconfort et une source de joie dans ma vie. Ta bienveillance est inestimable.*

*À cette personne extraordinaire, Juba, dont les conseils avisés et la motivation sans faille ont été un moteur essentiel dans la réalisation de ce travail et ainsi que pour tous les soutiens que tu m'as toujours apportés.*

*À mes précieux binômes, Sadia et Dehbia, dont la collaboration et le soutien ont été précieux tout au long de ce parcours académique.*

*À mon amie proche, Souhila, pour sa sincérité, son amitié inestimable et ses encouragements constants.*

*À ma grand-mère et mon grand-père, dont l'amour pour l'apprentissage et les conseils avisés continuent de m'inspirer. Même si vous n'êtes plus parmi nous, ce mémoire est dédié à vous en reconnaissance de l'héritage précieux que vous m'avez légué. Vous demeurez éternellement dans nos cœurs.*

*À tous mes cousins et cousines, merci pour votre soutien et votre amitié.*

*À mes tantes et à leurs familles, en particulier Zouina et Ouiza, pour leur affection et leur encouragement constants.*

*À tous mes amis qui m'ont soutenu, aidé et encouragé tout au long de ce voyage académique.*

*À la promotion 2023 de Microbiologie Appliquée, avec laquelle j'ai partagé cette expérience unique.*

*Et enfin, à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire, je vous adresse ma plus profonde gratitude.*

## Sommaire

Résumer

Liste Des Abréviations

Liste Des Tableaux

Liste Des Figures

Introduction

### **I- Généralités sur les biofilms**

1.Définition .....	3
2.Historique .....	4
3.Composition du biofilm .....	6
3.1 Les microorganismes .....	6
3.2 La matrice .....	6
4.Organisation : .....	7
5.Etape de formation de Biofilm .....	7
5.1- Adhésion réversible .....	8
5.2- Adhésion irréversible .....	8
5.3-Formation de colonies et maturation .....	8
5.4- Détachement des bactéries .....	9
6.Facteurs influencés sur la formation du biofilm .....	9
6.1-Caractéristiques de la surface .....	10
6.2-Caractéristiques du milieu aqueux environnant.....	10
6.3-Caractéristiques des microorganismes.....	10
7.Impacte des biofilms .....	10
8.Les domaines d'intervention des biofilms .....	12
8.1- Dans l'environnement et le domaine industriel .....	12
8.2-Dans le domaine médical .....	13
8.2.1-Les biofilms sur les dispositifs médicaux .....	13
8.2.2-Résistance aux antibiotiques.....	13
9.Régulation de la formation de biofilm : Le Quorum sensing.....	14
9.1-Définition du quorum sensing.....	15
9.2-Molécules du quorum sensing .....	15

9.3-Qurum sensing chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	17
9.4-Rôles du quorum sensing .....	18
10. Les méthodes de détection de biofilm.....	18
10.1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	18
10.2. La méthode en tube (TM) .....	19
10.3. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA).....	19
10.4. Le Biofilm Ring Test (BFRT).....	20

## **II. Bactérie formatrice de biofilm : *Klebsiella pneumoniae***

1. Généralités sur <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	21
2. Habitat .....	21
3. Systématique et Taxonomie .....	22
4. Caractères des <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	22
4.1. Caractères biologiques .....	22
4.2. Caractères biochimique et enzymatique.....	23
4.3. Génétique .....	24
4.4. Caractères antigénique .....	24
5. Pouvoir pathogène .....	25
6. Structure de la surface de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	26
6.1. La capsule .....	26
6.2. Les fimbriae (pili) .....	26
7. Virulence et résistance aux antibiotiques chez <i>Klebsiella Pneumoniae</i> .....	27
8. Biofilm chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	31

## **CHAPITRE II - Les Huiles Essentielles et Les Plantes médicinales**

Généralités sur les Huiles Essentielles .....	35
1. Définition .....	35
2. Historique .....	35
3. Répartition et Localisation des huiles .....	36
4. Composition Chimique des Huiles Essentielles.....	37
5. Activité Antimicrobienne des Huiles Essentielles .....	37
6. Mode d'Action Antimicrobien des Huiles Essentielles .....	38
7. Activité Antibiofilm .....	38
8. Domaines d'Utilisation des Huiles Essentielles.....	38
9. Extraction des Huiles Essentielles .....	39

9.1. Distillation.....	39
9.1.1. Par Hydrodistillation .....	39
9.1.2. Distillation à la Vapeur d'Eau .....	40
9.2. Expression à Froid.....	40
9.3. Extraction Assistée par Micro-Ondes .....	41
9.4. Extraction par Fluide à l'État Supercritique.....	42
9.5. L'Hydrodistillation Assistée par Ultrasons .....	42
10. Rôle des Huiles Essentielles.....	42
<b>Généralités sur les Plantes Étudiées</b>	
<b>Syzygium Aromaticum</b>	
1. Origine du Nom.....	43
2. Systématique .....	44
3. Description Botanique du Giroflier.....	45
4. Localisation.....	46
5. Composition et Propriétés du Clou de Girofle .....	47
<b>Eucalyptus Globulus</b>	
1. Origine.....	49
2. Systématique .....	49
3. Description Botanique.....	50
4. Localisation .....	51
5. Propriétés.....	52
6. Composition Chimique .....	52
<b>Le Thym</b>	
1. Définition .....	53
2. Origine.....	54
3. Systématique .....	54
4. Caractéristiques Botaniques .....	55
5. Composition Chimique .....	58
<b>Thymus Algeriensis</b>	
1. Description Botanique.....	58
2. Systématique de Thymus Algeriensis .....	59
3. Répartition Géographique .....	59
4. Composition Chimique .....	60

### **CHAPITRE III- Activités Anti-Biofilms des Huiles Essentielles**

1. La Lutte contre les Biofilms.....	65
1.1. L'Hygiène .....	65
1.2. L'Antibiotique.....	66
1.3. Élimination Mécanique du Biofilm.....	66
1.4. La Désinfection .....	67
1.5. Ultrasons et Potentialisation de l'Action des Antibiotiques .....	67
1.6. Utilisation d'Enzymes pour Dégrader les Exopolysaccharides de la Matrice .....	67
1.7. Les Vaccins .....	68
2. Mode d'Action des huiles essentielles.....	68
Conclusion.....	70
Références bibliographiques : .....	71

## Résumé

Les biofilms sont des communautés structurées de micro-organismes fixées à une surface biotique ou abiotique grâce à la sécrétion d'une matière exo-polysaccharidique. Ces derniers semblent être l'élément clé de nombreuses infections. Malgré la mise en œuvre de mesures préventives, les biofilms sont difficiles à éradiquer en raison de leur tolérance caractéristique à des doses élevées d'antibiotiques.

L'objectif de notre travail vise à étudier par différentes méthodes qualitatives et quantitatives l'évaluation de la formation de biofilm par les bactéries des *Klebsiella Pneumonia* isolées au niveau de CHU de tizi ousou, et en deuxième lieu on va s'intéresser à tester l'effet anti biofilm des huiles essentielles de quelques plantes médicinales eucalyptus globulus, clou de girofle et le thymus algériensis sur les souches isolées formatrices du biofilm.

Compte tenu en manque de matériels, la deuxième partie n'a pas été réalisé, donc les résultats des travaux antécédents montrent d'une part que la capacité de souches à former des biofilms est diversifiée en fonction des méthodes utilisés (Technique de microplaque 96 puits (**TCP**), méthode de rouge Congo agar (**CRA**).

D'une autre part les travaux réalisés sur le potentiel antibiofilm des huiles essentielles (**HE**) de clou de girofle, d'Eucalyptus globulus et de thymus sur les souches formatrices de biofilms ont montré une meilleure activité antibactérienne et antibiofilm. Les dernières avancées montrent que les HE possèdent un intérêt sans équivoque dans la lutte future contre les biofilms.

**Mots clés :** activité antibiofilm, *Klebsiella Pneumonia* (KP), Rouge Congo (**CRA**), plaque de culture tissulaire 96 puits (**TCP**), huiles essentiels (**HE**) : eucalyptus globulus, clou de girofle et le thymus algériensis

## Abstract

Biofilms are structured communities of microorganisms attached to a biotic or abiotic surface thanks to the secretion of an exo-polysaccharide material. These appear to be the key element in many infections. Despite the implementation of preventive measures, biofilms are difficult to eradicate due to their tolerance characteristic at high doses of antibiotics.

The objective of our work aims to study by different qualitative and quantitative methods the evaluation of biofilm formation by *Klebsiella Pneumonia* bacteria isolated at Tizi Ouzou University Hospital, and secondly we will be interested in testing the The anti-biofilm effect of the essential oils of some medicinal plants eucalyptus globulus, clove and Algerian thymus on isolated biofilm-forming strains.

Given the lack of materials, the second part was not carried out, therefore the results previous work shows on the one hand that the capacity of strains to form biofilms is diversified depending on the methods used (96-well microplate technique (**TCP**), Congo red agar method (**CRA**).

On the other hand, the work carried out on the potential antibiofilm essential oils (**EO**) of clove, Eucalyptus globulus and thymus on biofilm-forming strains showed better antibacterial and antibiofilm activity. The latest advances show that EOs have an unequivocal interest in the future fight against biofilms.

**Key words:** antibiofilm activity, *Klebsiella Pneumonia* (**KP**), Congo Red (**CRA**), tissue culture plate (**TCP**), essential oils (**EO**): eucalyptus globulus, clove and thymus algeriensis.

# Les Abréviations

<b>EPS</b>	Exopolysaccharides.
<b>PH</b>	Potentiel d'Hydrogène.
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium.
<b>Na<sup>2+</sup></b>	Ion sodium.
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	Ferrique.
<b>H<sub>2</sub>S-</b>	Sulfure d'hydrogène.
<b>VP+</b>	Voges-Proskauer.
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé.
<b>QS</b>	Quorum sensing.
<b>KP</b>	klebsiella pneumoniae.
<b>AI</b>	Auto-Inducteurs.
<b>AHL</b>	Acyl Homoserine Lactones.
<b>GC-MS</b>	Chromatographie en phase gazeuse-spectroscopie de masse.
<b>MICA</b>	La Concentration Minimum Inhibitrice d'Adhérence.
<b>AMP</b>	Ampicilline.
<b>BFRT</b>	Biofilm Ring Test.
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide.
<b>RCA</b>	Rouge Congo Agar.
<b>DO</b>	Densités Optiques.
<b>TCP</b>	Plaque de culture de tissu.

## Liste Des Tableaux :

<b>Tableau N° 01</b>	Constituants de la matrice du biofilms	7
<b>Tableau N° 02</b>	Liste partielle d'infections humaines impliquant des biofilms	12
<b>Tableau N° 03</b>	La classification scientifique de <i>kleibsiella pneumoniae</i>	22
<b>Tableau N° 04</b>	Principeauxcaractères biochimiques de <i>Kleibsiella pneumoniae</i>	23
<b>Tableau N° 05</b>	La classification phylogénétique du Clou de girofle.	34
<b>Tableau N° 06</b>	Composition chimique de l'huile essentielle des Clous de girofle.	48
<b>Tableau N° 07</b>	La répartition géographique du Thymus en Algérie.	57

## Liste Des Figures

<b>Figure N° 01</b>	Biofilms bactériens et santé	3
<b>Figure N° 02</b>	Représentation graphique de la composition du biofilm	5
<b>Figure N° 03</b>	Étapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien	8
<b>Figure N° 04</b>	Les différentes infections causées par les biofilms	10
<b>Figure N° 05</b>	Les biofilms dans l'environnement naturel et artificiel	12
<b>Figure N° 06</b>	Molécule de communication entre les bactéries	15
<b>Figure N° 07</b>	Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de <i>Klebsiella</i> sp.	25
<b>Figure N° 08</b>	Répartition géographique des souches résistantes aux carbapénèmes chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
<b>Figure N° 09</b>	Acquisition des gènes de résistance contre quelques antibiotiques chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> à travers le temps	29
<b>Figure N° 10</b>	Présentation schématique des facteurs de virulence chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
<b>Figure N° 11</b>	Représentation des sous-unités protéiques impliquées dans l'assemblage du fimbriae de type 3	31
<b>Figure N° 12</b>	Interactions entre les sous-unités mrkA, mrkH et mrkI à des concentrations basses et élevées de c-di-GMP	32
<b>Figure N° 13</b>	Facteurs impliqués dans la formation d'un biofilm chez <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
<b>Figure N° 14</b>	Restes de clous de girofles provenant de l'épave du Gribshunden	44
<b>Figure N° 15</b>	Allure d'un giroflier	45
<b>Figure N° 16</b>	Portrait de Pierre Poivre, lithographie d'E. Conguy, XIX <sup>e</sup>	47
<b>Figure N° 17</b>	Composé majeur de l'huile essentielle Des clous de girofle	47
<b>Figure N° 18</b>	<i>Eucalyptus globulus</i>	50
<b>Figure N° 19</b>	Distribution géographique du thym dans le monde	56
<b>Figure N° 20</b>	Chez <i>Red Tymus algeriensis</i> Boiss et Reut. Distribution maghrébine	59



# Introduction

## **Introduction**

**Au** cours des dernières décennies, les microbiologistes ont réalisé que le mode de croissance bactérien utilisé en laboratoire ne reflétait pas fidèlement la manière dont les micro-organismes se développent dans leur environnement naturel (**Maria Eduarda Souza Guerra et al ; 2022**)

Ils se développent selon deux modes : la forme planctonique (libre) et la forme sessile représentée par les biofilms (**Bellifa, 2014**).

80 % des bactéries sont organisées à coloniser des surfaces. Après attachement à un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle **Costerton** a donné le nom « biofilm » (**Fillox et vallet, 2003**).

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface. Ces derniers protègent les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles, ils sont particulièrement connus par leurs effets néfastes dans les domaines tels que l'industrie alimentaire, les systèmes de distribution et le traitement des eaux, les équipements de refroidissements, notamment le domaine médical qui provoque des infections touchent majoritairement les personnes légèrement ou fortement immunodéprimés et impliquent souvent des bactéries telles que *Les klebsiella* (**COSTERTON, STEWART et GREENBERG, 1999**).

Les *klebsiella* sont les souches les plus fréquemment isolées des infections urinaires. Parmi elles, *Klebsiella pneumoniae*, naturellement présente à faible concentration dans l'environnement, peut favoriser la formation de biofilm. Ce type de bactérie se diffuse dans l'environnement hospitalier via des objectifs souillés comme : sondes urinaires, cathéters veineux, tubes de ventilation artificielle, prothèses orthopédiques etc...

On estime que 65 à 80 % des infections bactériennes sont liées au biofilm (**Maria Eduarda Souza Guerra et al ; 2022**)

L'éradication des biofilms pose de réels problèmes dans le domaine médical. En effet, les recherches s'orientent aujourd'hui vers des nouvelles alternatives thérapeutiques entraînant moins d'effets secondaires et de résistance bactériennes, et présentant moins de danger pour la santé. Des produits d'origine naturelle, issus des plantes médicinales, tels que les huiles essentielles et les composés phénoliques, utilisés en médecine traditionnelle, peuvent être considérés comme une bonne alternative thérapeutique.

Notre travail va s'intéresser principalement à l'effet des huiles essentielles et des composés phénoliques de - *Eucalyptus globulus*, *Thymus algeriensis* et *Syzygium aromaticum* - en raison de leur importance économique et alimentaire, ainsi que de leur impact positif sur la santé. L'objectif de notre recherche est de démontrer la richesse en composés actifs de ces plantes, ainsi que leurs capacités antibiofilm, en utilisant des données générées à partir d'études scientifiques antérieures. Pour ce faire, nous allons extraire les huiles essentielles de ces plantes par entraînement à la vapeur d'eau, afin d'identifier les composants actifs qui peuvent inhiber la formation de biofilms bactériens causé par *Klebsiella pneumoniae*.

Cette synthèse bibliographique est subdivisée en trois parties

Le premier Chapitre parle des Généralités des biofilms et sa formation par les klebsiellapenomonie, aussi le deuxième chapitre représente les huiles essentielles et les plantes médicinales et le dernier chapitre sur l'activité anti-biofilms des huiles essentielles.

# **Synthèse bibliographique**



# *Chapitre I*

*Généralités sur les biofilms.  
Et Formation de Biofilms par  
Klebsiella pneumonia*





## **I- Généralités sur les biofilms**

Chaque organisme vivant sur Terre a des besoins physiologiques indispensables pour sa survie et sa reproduction, les microorganismes sont également conditionnés par leur instinct de survie qui les pousse à réagir en situation de stress pour éviter les dommages cellulaires et l'altération de leur croissance. A cet effet, les microorganismes adoptent différents mécanismes de réponse aux stress, y compris la formation de biofilms qui est en est un exemple.

### **1. Définition**

Étymologiquement, le mot vient du grec « bios », la vie, et de l'anglais « film » qui signifie pellicule. Un biofilm est donc, étymologiquement parlant, « une pellicule de vie » (**Jouenne, 2008**).

Un biofilm est une population de micro-organismes homogènes ou hétérogènes qui, en réponse à des conditions environnementales défavorables, peuvent coloniser des supports biotiques ou abiotiques pour s'adapter à un environnement stressant. Une fois fixées, ces populations sont assimilées dans la matrice extracellulaire dit exo-polysaccharide « EPS » qui forme un réseau dense et protecteur contre les agressions extérieures. (**Ruhal et Kataria, 2021**)



**Figure 01 : Biofilms bactériens et santé (AUMERAN Claire et al ; 2020)**

## **2. Historique**

D'après les récentes investigations scientifiques, les bactéries auraient pu émerger sur notre planète il y a environ 3,6 milliards d'années, bien avant la naissance de l'homme, dont l'apparition remonte à plus de 100 000 ans. Cependant l'homme n'a commencé à prendre pleinement conscience des microorganismes jusqu'au 17<sup>ème</sup> siècle, lorsque le biologiste néerlandais Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) a développé le premier microscope fonctionnel, les microorganismes (animalcules) issus d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire avant et même après nettoyage de ceux-ci, ces dépôts opaques sont connus aujourd'hui sous le nom de la plaque dentaire (**Donlan 2002**).

Vers les années 1800, Louis Pasteur a observé des amas microbiens qui acidifiaient le vin. A cette époque-là, les biofilms ne suscitaient pas l'intérêt qu'ils représentent aujourd'hui. Le terme « film » a été utilisé pour la première fois dans le domaine de la microbiologie marine et ce n'est qu'en 1922 qu'Angst a déclaré dans son rapport que les bactéries étaient responsables des couches visqueuses se formant sur les navires.

Par la suite, en 1940, des études ont mis en évidence que les microorganismes marins connaissent une croissance stimulée lorsqu'ils sont fixés à une surface, un phénomène qui a été baptisé "l'effet de bouteille" (**Heukelekian et Heller, 1940**).

En 1943, Zobell observa que la quantité relative de biomasse bactérienne présente sous forme planctonique était moindre que celle des bactéries attachées aux surfaces. Cette observation a révélé deux étapes distinctes dans le processus d'adhésion bactérienne : l'adhésion réversible et l'adhésion irréversible (**Zobell, 1943**).

Cependant, il faut attendre jusqu'à 1969 pour démontrer après l'examen des filtres bactériens d'une usine de traitement des eaux usées par le microscope électronique à balayage, que les biofilms sont constitués de microorganismes hétérogènes et que la matrice dont ils sont enrobés est composée principalement de polysaccharides (**Jones et al, 1969**).

Pour ceci, une étude microscopique a été menée par Henrici sur les biofilms, mettant en évidence leur adhérences aux surfaces, la découverte des biofilms en médecine remonte à 1977, lorsque des biopsies de patients atteints de fibrose kystique ont été analysées par microscopie, des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* ont été formés au niveau des poumons de ces patients (**Hoiby, 2017**).

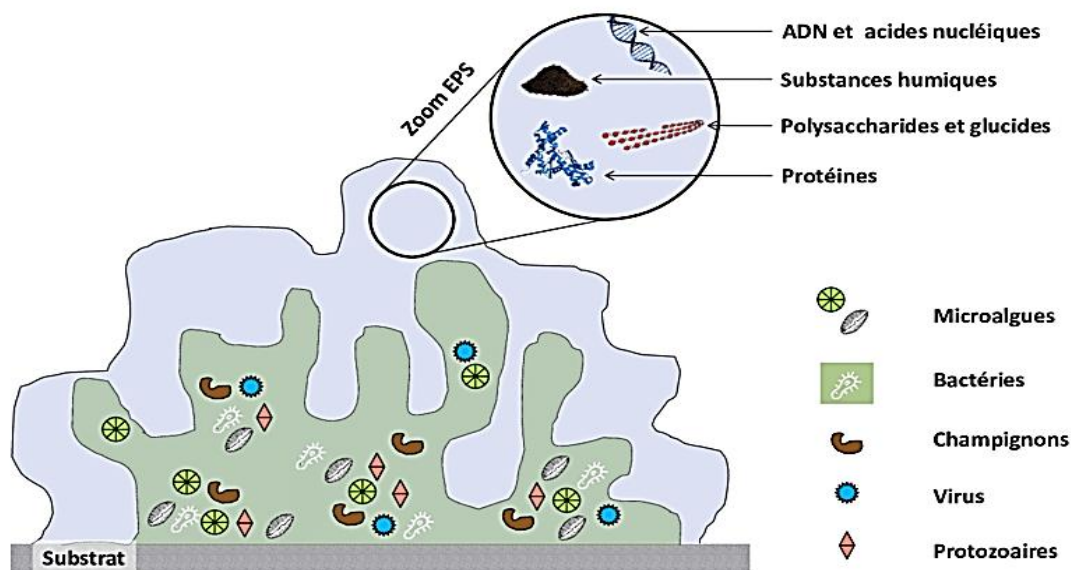
## Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae*

Costerton (1978), sur la base de l'observation de l'ultrastructure de la plaque dentaire et de communautés microbiennes sessiles dans les torrents de montage, propose **la théorie des biofilms (costeron et coll. 1973)**.

Characklis (1973) démontre que des dépôts microbiens au sein de conduits d'eau de système industriels apparaissent tenaces et résistants aux désinfectants (**characklis WG.1973**).

Enfin en 1995, le concept « modèle biofilm » était conçue, ce dernier est basé sur le fait qu'il est composé de microorganisme sous forme de microcolonies entourées des exopolysaccharides, entre celles-ci, se localisent des canaux d'eaux dont l'intérêt c'est la favorisation de l'afflux de nutriment et l'efflux de déchet (**Costerton et al, 1995**).

### 3. Composition du biofilm



**Figure 02** : Représentation graphique de la composition du biofilm  
(Betty Chaumet ,2018)

#### 3.1. Les microorganismes

La couche la plus profonde du biofilm est constituée par les cellules pionnières qui se sont initialement fixées. Ces cellules présentent des caractéristiques de petite taille, un métabolisme anaérobie et une croissance lente.

En revanche, la couche superficielle du biofilm est composée de cellules plus grandes qui sont en aérobose et qui affichent une croissance rapide. Entre ces deux couches cellulaires,

## **Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae***

on observe la présence de cellules en microaérobiose (**Chalvet de Rochermonteix A, 2009**).

### **3.2. La matrice**

Le rapport carbone/azote d'un biofilm est cinq fois supérieur à celui d'une suspension bactérienne planctonique en raison de la prédominance de la matrice. Les bactéries qui se fixent à la surface s'agglomèrent dans une matrice polymère hydratée produite par elles-mêmes, formant ainsi des biofilms (**Sutherland I.W. 2001**).

La matrice d'exopolysaccharides joue un rôle structural essentiel, et ses propriétés physico-chimiques varient d'un biofilm à l'autre. Sa forte teneur en eau, attribuable à sa capacité de former des liaisons hydrogène avec de nombreuses molécules d'eau, permet à certains biofilms de résister à la dessiccation dans leur environnement naturel, aux substances bactéricides ainsi qu'aux bactériophages. De plus, la matrice joue un rôle crucial dans les propriétés de résistance des biofilms aux agents biocides, car elle se lie directement aux agents antimicrobiens, les empêchant ainsi de pénétrer dans le biofilm (**Dolan, R.M. et J.W. Costerton, 2002**).

**Tableau 01 : Constituants de la matrice du biofilms (Sutherland I.W. 2001).**

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

### **4. Organisation**

Le biofilm est constitué d'agrégats de microorganismes séparés par des canaux aqueux qui facilitent la circulation des fluides, assurant ainsi l'apport de nutriments aux bactéries et l'élimination de leurs produits de dégradation. Le biofilm n'est pas un environnement homogène, car il présente des zones présentant des teneurs variables en oxygène et en nutriments, ce qui se traduit par des valeurs de pH différentes. Les régions situées au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, tandis 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**).

### **5. Etape de formation de Biofilm**

Les bactéries peuvent adopter deux modes de vie distincts dans leur environnement : le mode planctonique, où elles se trouvent en suspension individuelle, ou le mode de biofilm. Cependant, le passage d'un mode à l'autre est une décision délibérée pour les bactéries, principalement en réponse à la présence d'un support solide propice à leur fixation ou à un changement de leur environnement. L'agglutination des cellules microbiennes est à l'origine de la formation des biofilms, et le détachement de certaines parties du biofilm peut donner naissance à de nouvelles communautés bactériennes fixées.

Le développement du biofilm se fait en quatre étapes : Adhésion réversible, Adhésion irréversible, formation de colonies et maturation, détachement des bactéries (**Albrecht, 2015**).

#### **5.1. Adhésion réversible**

L'adhésion des cellules peuvent se produire sur différentes surfaces, qu'elles soient biotiques ou abiotiques. Cependant, les surfaces hydrophobes favorisent une meilleure adhésion des cellules en raison de leur degré d'hydrophobicité. Des modifications physiologiques près de la surface, telles que des changements de pH, de pression osmotique ou la présence de charges électriques, peuvent rendre la surface plus propice à la décantation, attirant ainsi les bactéries pour se regrouper et former un biofilm. Cependant, à ce stade, l'adhésion reste réversible et instable (**Saur, 2014**).

#### **5.2. Adhésion irréversible**

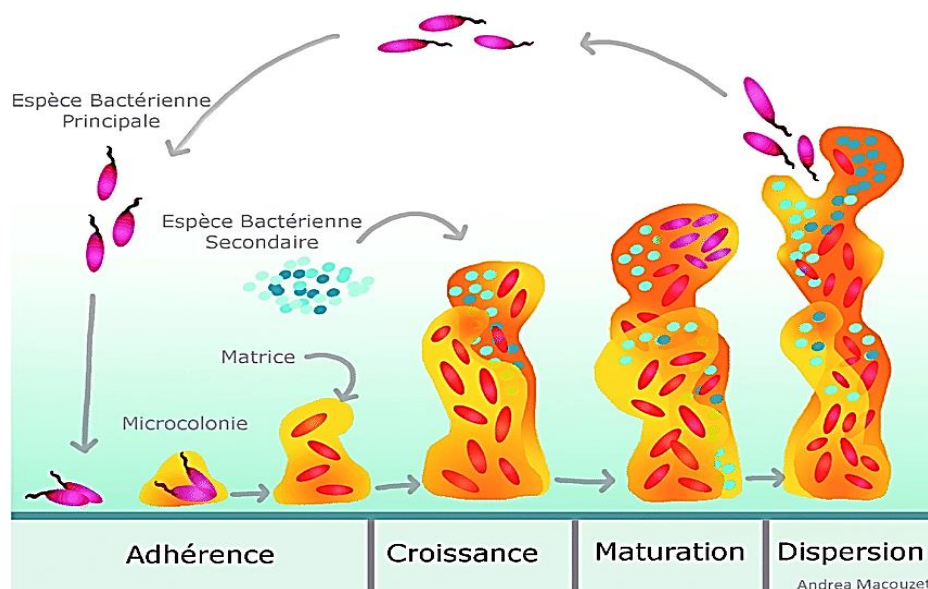
Au cours de cette phase, les interactions entre les cellules et la surface deviennent permanentes. Les gènes responsables de la production de protéines d'adhésion, appelées "adhésines", sont exprimés, tandis que ceux qui codent pour les flagellines, impliquées dans la mobilité cellulaire, sont réprimés. Ainsi, les cellules deviennent immobiles et commencent à se multiplier, formant de petits agrégats (**Goel et al ; 2021**). La présence d'une matrice d'exopolysaccharides (EPS) accompagne ces agrégats, et lorsque cette matrice atteint une certaine épaisseur, elle se solidifie, rendant le biofilm résistant et nécessitant un lavage vigoureux (brossage, raclage) pour sa destruction (**Srey et al ; 2012**). La transition du biofilm de l'état réversible à l'état irréversible est un processus crucial qui se produit en quelques minutes seulement (**Zhao et al ; 2017**).

### **5.3. Formation de colonies et maturation**

Après l'adhésion initiale, les cellules pionnières se multiplient et sécrètent des molécules constituant la matrice extracellulaire, ce qui favorise la formation de la base du biofilm. Par la suite, d'autres cellules microbiennes, appartenant à différentes espèces, s'adhèrent aux cellules pionnières par le biais d'interactions spécifiques de type récepteur/ligand ou non spécifiques. À ce stade, le développement du biofilm se déroule en deux étapes distinctes : la formation et la maturation des micro-colonies. La première étape implique la multiplication cellulaire et la croissance de la colonie microbienne, accompagnée de la sécrétion de la matrice extracellulaire (EPS). Ces structures se développent et forment un biofilm complexe, présentant diverses morphologies et propriétés microbiennes. C'est lors de l'étape de maturation que le biofilm mature se constitue en un système dynamique, présentant un certain degré de stabilité macroscopique (Saur, 2014).

### **5.4. Détachement des bactéries**

Le détachement des cellules à partir du biofilm facilite leur dispersion et la colonisation d'autres zones de l'environnement. Ce processus peut être déclenché par des signaux cellulaires en réponse à une surpopulation au sein du biofilm ou à une limitation des nutriments disponibles (Albrecht, 2015).



**Figure 03 :** Étapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérie. (Yannick DN Tremblay Et al ; 2014).

## **6. Facteurs influencés sur la formation du biofilm**

La formation d'un biofilm par des micro-organismes sur une surface est un processus complexe influencé par de nombreux facteurs internes et externes, dont voici quelques exemples (De Rochemonteix, 2009).

### **6.1. Caractéristiques de la surface**

La texture, la rugosité, la présence d'aspérités, l'hydrophobicité et la préexistence d'un film protéique recouvrant la surface sont des facteurs qui affectent l'adhésion des bactéries à cette surface et, par conséquent, la formation d'un biofilm. Ces caractéristiques physico-chimiques et la présence d'un film protéique préexistant jouent un rôle clé dans le processus d'attachement des bactéries à la surface et dans le développement ultérieur du biofilm (Klein, 2011 ; Bellifa, 2014).

### **6.2. Caractéristiques du milieu aqueux environnant**

Ces conditions environnementales comprennent des facteurs tels que la vitesse du flux, la présence d'un flux laminaire ou non, le pH, la température, la présence de cations tels que  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{2+}$  et  $Fe^{3+}$ , la disponibilité de sources de carbone, ainsi que la disponibilité en oxygène. Ces conditions influencent la disponibilité des nutriments (en excès ou en déficit) et exposent les micro-organismes à différents stress physico-chimiques tels que le pH, la température et la présence de composés bactéricides (Marchal, 2010).

### **6.3. Caractéristiques des microorganismes**

La surface des cellules bactériennes présente une hydrophobicité, des fimbriae et des flagelles, ainsi que des structures polymériques extracellulaires telles que les exopolysaccharides (EPS). La charge négative des bactéries et la présence de zones hydrophobes à leur surface influencent leur adhérence à une surface. Plus la surface est peu polarisée, plus les interactions hydrophobes deviennent importantes. Ces facteurs sont responsables de l'attachement stable des bactéries à la surface. Les structures adhésives, telles que les fimbriae, les pili, les EPS et les capsules, jouent un rôle essentiel dans cette association avec la surface (Perrin, 2009 ; Alyajouri, 2012 ; Liesse Iyamba, 2012 ; Bellifa, 2014).

Il existe des variations significatives dans la capacité de colonisation des surfaces entre différentes souches bactériennes, et même au sein d'une même espèce bactérienne (Kukavica-Ibrulj, 2007).

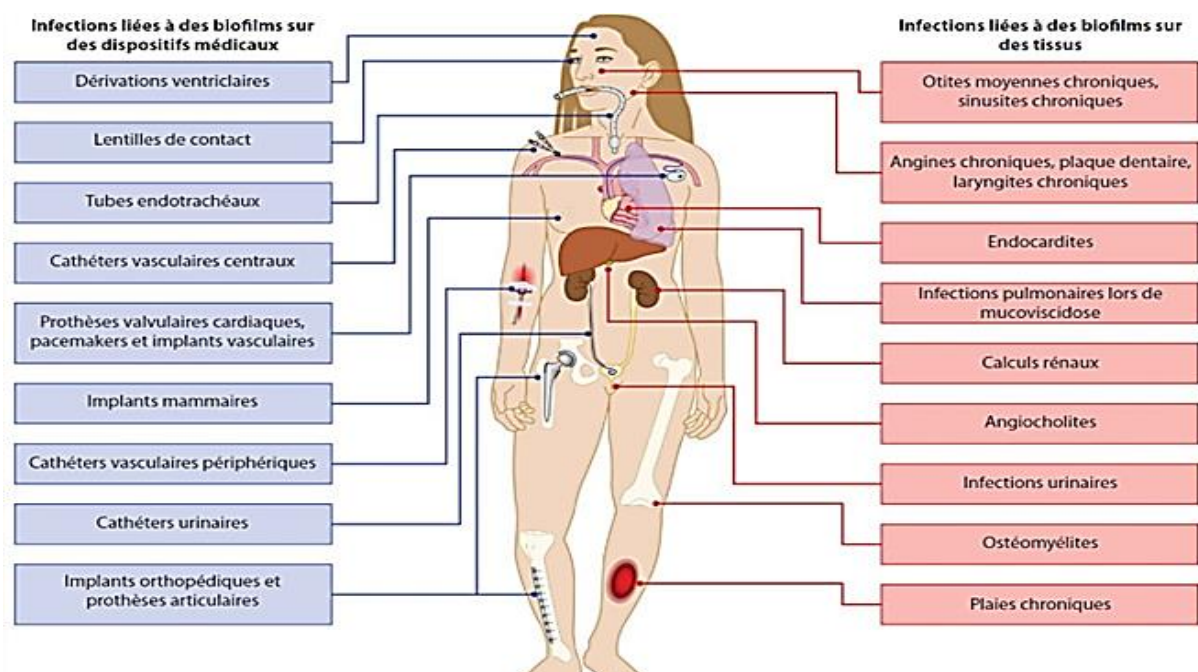
## **7. Impacte des biofilms**

Les biofilms sont des agrégats microbiens formés sur des surfaces et entourés d'une matrice protectrice. Leur impact sur l'environnement et la santé est à la fois bénéfique et néfaste.

Dans certains contextes, la formation de biofilms hautement résistants présente un avantage, notamment dans les environnements industriels. Par exemple, ils sont utilisés dans la production d'acide acétique pour la fabrication du vinaigre, dans le maintien de l'homéostasie intestinale, la digestion des aliments, la biorestauration environnementale et les applications biotechnologiques (Anderson et Toole, 2008 ; Nadji et Mizou, 2015).

Cependant, les biofilms peuvent également provoquer des infections. La bactérie *Klebsiella pneumoniae* est connue pour former des biofilms et engendrer des problèmes de santé. Par conséquent, la présence de biofilms nécessite de nouvelles approches pour prévenir, diagnostiquer et traiter ces infections.

La littérature scientifique a identifié différentes infections associées aux biofilms. Celles-ci peuvent inclure des infections des voies urinaires, des infections pulmonaires, des infections de plaies, des infections liées aux surfaces d'implants médicaux tels que les cathéters, les valves cardiaques, les prothèses articulaires, ainsi que des infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose (Lebeaux et al ; 2016).



**Figure 04 :** Les différentes infections causées par les biofilms.  
(Lebeaux et al ; 2014)

## **8. Les domaines ou les biofilms posent problème**

### **8.1. Dans l'environnement et le domaine industriel**

- Les biofilms peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur l'homme ou ses activités
- Les biofilms sont utilisés dans la production du vinaigre (acide acétique).
- Les réacteurs à biofilm ont également été utilisés dans la production d'antibiotiques

Un exemple significatif est l'utilisation d'un réacteur à biofilm à lit fluidisé qui a montré de meilleurs résultats dans la production de pénicilline.

- Les biofilms sont également utilisés pour le traitement biologique des eaux Résiduaires.
- La formation de biofilms dans les réseaux de distribution d'eau constitue également un problème majeur en ce qui concerne le maintien de la qualité des aliments et la contamination des équipements de l'industrie agroalimentaire (Alnnasouri, 2010).

### **8.2. Dans le domaine médical**

**Tableau 02 :** Liste d'infections humaines impliquant des biofilm (Costerton et al ; 1999).

<b>Infections</b>	<b>Espèces bactériennes communément impliquées</b>
<b>Caries dentaires</b>	Cocci à Gram positif acidogènes (Streptococcus spp.)
<b>Périodonties</b>	Bactéries anaérobies orales, à Gram négatif
<b>Otites moyennes</b>	Souches d'Haemophilus influenzae
<b>Mucoviscidose pulmonaire</b>	P. aeruginosa et Burkholderiacepacia
<b>Endocardites</b>	Streptococcus sp. Et Staphylococcus spp.
<b>Ostéomyélites</b>	Plusieurs espèces bactériennes et fongiques souvent mixés
<b>Infections de tractus biliaire</b>	Bactéries Entériques (Escherichia coli)

## **Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae***

Les biofilms jouent un rôle crucial dans un large éventail d'infections humaines, représentant environ 65 % de toutes les infections. Plus de 80 % des infections bactériennes chroniques sont associées à la présence de biofilms (**Chalvet de Rochemonteix, 2009**). La formation de communautés bactériennes sessiles et leur capacité inhérente à résister aux agents antimicrobiens sont à la base de nombreuses infections bactériennes persistantes et chroniques. Ces infections peuvent être causées par une seule espèce bactérienne ou par des espèces mixtes de bactéries ou de champignons (**Costerton et al ; 1999**).

### **8.2.1. Les biofilms sur les dispositifs médicaux**

Dans le règne microbien, les microorganismes ont une propension intrinsèque à l'adhésion aux surfaces, et cela s'applique également au domaine médical, notamment aux prothèses et aux implants (**Herard, 1998**). Parmi les dispositifs médicaux sur lesquels les biofilms peuvent se former, on retrouve :

- Les cathéters centraux veineux
- Les lentilles de contact
- Les tubes endotrachéaux
- Les stérilets
- Les articulations prothétiques
- Les sondes urinaires (**Donlan, 2001**)

### **8.2.2. Résistance aux antibiotiques**

Les microorganismes présents dans les biofilms présentent une résistance accrue aux agents antimicrobiens par rapport à leur état planctonique. Ils sont moins sensibles aux antibiotiques (ATB) et aux désinfectants (**Haras, 2005**). Les concentrations d'ATB nécessaires pour inhiber les bactéries au sein d'un biofilm peuvent être 10 à 100 fois plus élevées que celles requises pour inhiber les mêmes bactéries à l'état planctonique, et même à ces doses élevées, l'élimination complète n'est pas toujours possible, ce qui engendre de nombreux problèmes dans le domaine médical (**Anger, 2013**).

## Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae*

Cette résistance accrue est multifactorielle et est influencée par les conditions environnementales au sein du biofilm, telles que son hétérogénéité et l'accès aux nutriments et à l'oxygène. Ces conditions altèrent les propriétés physiologiques des microorganismes et induisent des mécanismes de résistance connus. La structure du biofilm facilite le transfert horizontal de gènes entre les bactéries, favorisant ainsi l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques (Roux et Ghigo, 2006 ; Soussereau, 2012).



**Figure05** : Les biofilms dans les environnements naturels et artificiels.

(Imlengan ; 2016)

### **9. Régulation de la formation de biofilm : LeQuorum sensing**

La communication entre les bactéries, appelée "quorum sensing", repose sur la sécrétion et la perception de petites molécules appelées autoinducteurs, leur permettant d'adapter leur comportement en fonction de la densité de population. Cela permet aux bactéries de mutualiser leurs efforts de survie en synchronisant la régulation des gènes impliqués dans des processus tels que la virulence, la résistance aux antimicrobiens et la formation de biofilms. Le quorum sensing est une forme d'interaction chimique entre les organismes au sein d'une communauté microbienne, permettant la communication et la coordination du comportement multicellulaire. (Olivia P et al ; 2021).

## **Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae***

Les interactions chimiques liées au quorum sensing ne se limitent pas aux signaux de coopération, mais englobent également d'autres types de communication, tels que les signaux de manipulation chimique. Ces signaux jouent un rôle crucial dans les conflits qui surviennent à la fois au sein d'une même espèce bactérienne et entre différentes espèces. Lors de l'étude des réponses des bactéries aux produits chimiques émis par leurs semblables, il est essentiel de prendre en compte la complexité de ces interactions chimiques. (**Olivia P et al ; 2021**).

### **9.1. Définition du quorumsensing**

Le quorum sensing (QS) est un mécanisme de communication et de perception utilisé par les bactéries. Il repose sur la production de petites molécules appelées autoinducteurs (AI), qui peuvent se diffuser à travers la membrane cellulaire ou être transportées à l'extérieur de la cellule. Les AI, dont la concentration est proportionnelle au nombre de bactéries, agissent comme des marqueurs moléculaires de la densité bactérienne. Lorsque la concentration de ces molécules atteint un certain seuil, une réponse cellulaire est déclenchée, activant ou réprimant spécifiquement les gènes impliqués dans des phénotypes particuliers, tels que la formation de biofilms, la virulence, la production d'exopolysaccharides, d'exoprotéases et de sidérophores. (**Abisado et al ; 2018**).

Plusieurs composants régulés par le quorum sensing sont libérés dans le milieu extracellulaire, ce qui engendre un vif intérêt au sein de la communauté bactérienne. En effet, ces éléments peuvent faire office de ressources nutritives pour la population ou favoriser la transition d'un mode de vie planctonique (en suspension) à un mode de vie sessile, comme la formation fréquemment constatée de biofilms dans les environnements naturels. (**Abisado et al ; 2018**).

### **9.2. Molécules du quorumsensing**

Une fois qu'une concentration seuil est atteinte, le signal interagit avec une protéine réceptrice, ce qui entraîne une coordination de l'expression génétique au sein de la population bactérienne.

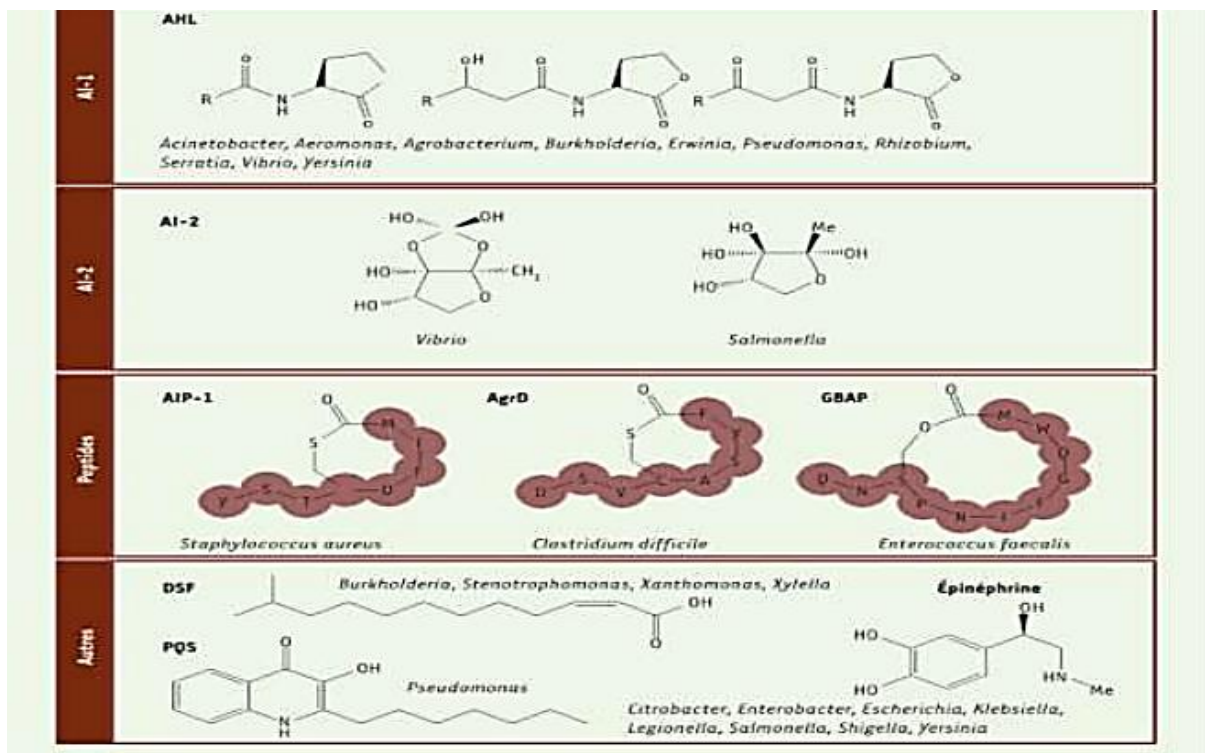
Différentes molécules sont utilisées pour la communication entre bactéries. Les bactéries Gram-positives telles que *Staphylococcus* spp. *Clostridium* spp. Et *Enterococcus* spp. Utilisent souvent des peptides cycliques d'environ 7 à 11 acides aminés. Ces peptides sont

**Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae***

sécrétés à l'extérieur de la cellule bactérienne et sont détectés par les récepteurs à histidine kinase des autres bactéries.

Lorsque le peptide se lie au récepteur, cela active un régulateur de réponse, par exemple par phosphorylation, ce qui active l'expression des gènes impliqués dans le quorum sensing (QS) (Federle MJ et al ; 2013). Dans les bactéries Gram-négatives, différentes molécules sont utilisées, les plus courantes étant les acyl homoserine lactones (AHL), dont la taille (de 4 à 18 atomes de carbone) et les modifications de la chaîne acyl varient selon les bactéries.

Des gènes impliqués dans la formation de biofilms par *Klebsiella pneumoniae*, un pathogène opportuniste principalement associé aux infections nosocomiales, ont été récemment identifiés (Balestrino et al ; 2008). De plus, il a été démontré que la régulation dépendante de la densité cellulaire, via un processus appelé quorum sensing (QS), contribue à la formation du biofilm chez *K. pneumoniae*, par le biais de la libération de molécules régulatrices de type 2 (autoinducteurs, AI-2) dans l'environnement extracellulaire (Balestrino et al ; 2005). *K. pneumoniae* possède un gène orthologue de luxS et est capable de produire des molécules fonctionnelles de type AI-2. En créant un mutant déficient en luxS chez *K. pneumoniae*, il a été possible de déterminer le rôle du QS de type II dans la formation des biofilms.



**Figure 06 :** Molécule de communication entre les bactéries.

**9.3. Quorum sensing chez *Klebsiella pneumoniae***

Le système de communication bactérien Autoinducer-2 (AI-2) détecte la densité cellulaire et joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes et des processus tels que la formation de biofilm. Nous avons étudié le rôle de luxS dans la formation de biofilm et l'expression des gènes chez le pathogène nosocomial *Klebsiella pneumoniae*.

Ils ont réalisé une délétion du gène  $\Delta$ luxS chez *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 contenant différents glucides. Nous avons étudié les rôles potentiels de luxS dans la formation de biofilm en utilisant un essai de biofilm sur plaque de microtitration et une microscopie électronique à balayage. Nous avons également évalué l'expression des gènes de synthèse des lipopolysaccharides (wzm et wbbM), des polysaccharides (pgaA) et des fimbriae de type 3 (mrkA) dans des extraits de biofilm de type sauvage et du mutant  $\Delta$ luxS à l'aide de la RT-PCR quantitative (**Kiana Karimi et al ; 2021**).

Ils ont constaté que 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 contenant du glucose, du saccharose ou du glycérol. Des modifications de l'architecture du biofilm ont été observées dans le mutant luxS, avec une couverture de surface réduite et une formation de macrocolonies diminuée. Cependant, aucune différence dans la formation de biofilm n'a été observée entre le mutant de type sauvage et le mutant  $\Delta$ luxS dans l'essai sur plaque de microtitration. Dans les extraits de biofilm du mutant  $\Delta$ luxS, nous avons observé une régulation à la baisse de l'expression de wzm et une régulation à la hausse de l'expression de pgaA, qui code pour une porine impliquée dans la sécrétion du polysaccharide poly- $\beta$ -1,6-N-acétyl-D-glucosamine (PNAG). (**Kiana Karimi et al ; 2021**)

Ils ont identifié 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 chez *K. pneumoniae*. Ces processus interconnectés pourraient jouer un rôle important dans le comportement et la persistance des populations bactériennes (**Kiana Karimi et al ; 2021**)

#### **9.4. Rôles du quorum sensing**

Le quorum sensing est un processus crucial qui régule la dynamique des populations de bactéries au sein des biofilms en réponse aux conditions environnementales. Il déclenche la dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm, influence l'épaisseur du biofilm et modifie l'expression de caractéristiques telles que les facteurs de virulence, notamment les protéases. (Clutterbuck et al ; 2007 ; Irie et Parsek, 2008).

Les molécules du quorum sensing ont également été impliquées dans la défense contre les attaques d'autres organismes vivants, tels que les protozoaires (comme observé chez *Serratia marcescens*) (Queck et al ; 2006).

Les interactions synergiques observées au sein des biofilms composés de différentes espèces de microorganismes sont rendues possibles grâce aux molécules impliquées dans le quorum sensing (Bjarnsholt et al ; 2005).

Les biofilms contenant plusieurs communautés bactériennes de différentes espèces présentent des concentrations levées de molécules du quorum sensing, en raison de la densité cellulaire élevée.

### **10. Les méthodes de détection de biofilm**

Diverses approches sont disponibles pour identifier la formation d'un biofilm, parmi lesquelles figurent la technique de culture en plaque de tissus (TCP), la méthode de culture en tube (TM), la culture sur milieu contenant du rouge Congo (RCA) et le test du biofilm par anneau (BFRT).

#### **10.1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)**

La méthode de plaque de culture de tissus (TCP), décrite par O'Toole et al. (2000), permet une évaluation quantitative de la formation de biofilms (Bellifa, 2014). Dans cette approche, des biofilms mono-espèces peuvent se former sur des supports en polystyrène à l'aide de microplaques à 96 puits. Après une culture de 18 heures dans un milieu de bouillon infusion cœur cerveau (BHIB), les bactéries sont inoculées dans les puits de la microplaque. Les microplaques sont ensuite incubées pendant 24 heures à une température de 37°C. Les puits sont ensuite lavés trois fois avec un tampon de solution saline phosphate (PBS).

## **Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae***

Les biofilms résultants, formés par l'adhésion des bactéries sessiles, sont ensuite colorés avec du cristal violet (CV) à une concentration de 0,1%. En fonction des densités optiques (DO) mesurées dans la phase biofilm, les bactéries sont classées en différentes catégories : non-formatrices de biofilm, formation modérée de biofilm, ou formation intense de biofilm (**Mathur et al ; 2006, Afreenich et al ; 2011, Bellifa, 2014**).

### **10.2. La méthode en tube (TM)**

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par **Christensen et al ;1982**). (**Nagaveni et al ;2010 ; Rewatkar et Wadher, 2013, Kara Terki, 2014**). A partir d'une culture de 18-24 heures, une colonie estensemencée dans de BHIB supplémenté de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24 h. Les tubes sont lavés avec du PBS puis séchés. Chaque tube est ensuite coloré par le CV.

La formation du biofilm est considérée comme positive lorsqu'un film visible recouvre le mur et le bas du tube (**Mathur et al ; 2006 ; Alnasouri, 2010, DjelloulDaouadji, 2010 ; Taj, 2012 ; Bellifa, 2014**).

### **10.3. La culture sur Rouge Congo Agar (RCA)**

D'après Freeman et al. (1989), la gélose Rouge Congo est un milieu particulièrement adapté pour la détection des souches produisant du slime (**Nagaveni et al ; 2010 ; Kara Terki, 2014**). Sur ce milieu, les souches qui expriment le Polysaccharide d'Adhésion Intercellulaire (PIA) forment des colonies noires, tandis que les souches dépourvues de PIA forment des colonies de couleur rouge.

Les souches présentant un phénotype variable donnent des colonies avec un centre noir et un contour rouge, ou un centre rouge et un contour noir (**Mathur et al ; 2006 ; Afreenich et al ; 2011 ; Rewatkar et Wadher, 2013 ; Bellifa, 2014**).

### **10.4. Le Biofilm Ring Test (BFRT)**

Une nouvelle technique de détection et d'évaluation quantitative des biofilms, appelée Biofilm Ring Test (BFRT), a été décrite par **Chavant et al ; (2007)** et développée par la Société Biofilm Control (**Liesse Iyamba, 2012 ; Nagant, 2013**). Cette méthode vise à surveiller la formation de biofilms de manière simple et rapide, sans nécessiter d'étapes de lavage ou de coloration (**Perrin, 2009**).

## **Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae***

Le BFRT permet de suivre facilement et rapidement l'immobilisation de billes magnétiques par les cellules bactériennes qui adhèrent au fond du puits. Plus les billes sont capturées, moins elles se déplaceront dans le champ magnétique et moins elles se regrouperont au centre du puits. L'immobilisation des billes peut être due à leur capture par les bactéries adhérant au fond du puits ou à des modifications des propriétés rhéologiques du milieu environnant (**Liesse Iyamba, 2012 ; Nagant, 2013**).

## **II. Formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae***

### **1. Généralités sur *Klebsiella pneumoniae***

Les infections nosocomiales sont largement reconnues comme un problème de santé publique majeur à l'échelle mondiale. Parmi les exemples les plus marquants figurent *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*). En 1882, Carl Friedländer a été le premier à décrire *Klebsiella pneumoniae* comme un bacille encapsulé, l'isolant des poumons de personnes décédées de pneumonie. Initialement, la bactérie a été nommée bacille de Friedländer. Cependant, en 1886, le microbiologiste allemand Friedrich Loeffler a renommé la bactérie *Klebsiella pneumoniae* en l'honneur d'Edwin Klebs, qui avait précédemment travaillé sur la pneumonie.

De nos jours, *Klebsiella pneumoniae* est considérée comme la principale cause de pneumonie nosocomiale aux États-Unis, représentant entre 3 et 8 % de toutes les infections bactériennes nosocomiales (**John V. Ashurst ; Adam Dawson, 2023**). Depuis sa découverte, *Klebsiella pneumoniae* est devenue une bactérie d'une grande importance médicale en raison de sa capacité à provoquer diverses infections, notamment des infections des voies respiratoires, des infections urinaires, des infections sanguines et des infections des plaies, entre autres.

Les souches de ce genre ont été isolées pour la première fois à la fin du 19<sup>e</sup> siècle et nommées par Trevisan (1885) en l'honneur du microbiologiste allemand Edwin Klebs (1834-1913).

### **2. Habitat**

*Klebsiella pneumoniae* est une bactérie ubiquitaire présente dans divers environnements tels que le sol et l'eau. Elle est capable de fixer l'azote atmosphérique. On la retrouve également fréquemment dans les selles, ce qui peut servir d'indicateur de contamination fécale.

Cette bactérie a un statut à la fois commensal et pathogène. Elle se trouve naturellement dans le tube digestif et les voies respiratoires de l'homme et des animaux, sans causer de maladie. Cependant, elle peut également devenir pathogène et provoquer diverses infections, notamment chez les personnes âgées, affaiblies, alcooliques ou hospitalisées. Ces infections peuvent affecter les voies respiratoires (pneumonies), entraîner des septicémies ou

## Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae*

être associées aux infections nosocomiales, et peuvent être extrêmement graves (**Baerwolf et al ; 2002**).

### 3. Systématique et Taxonomie

Tableau 03 : La classification scientifique de *Klebsiella pneumoniae*.

Règne	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gamma Proteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	Enterobacteriaceae
Genre	Klebsiella
Espèce	Pneumoniae. ( <b>Brenner et al., 2005</b> ).

➤ **Les espèces importantes actuellement sous le genre *Klebsiella* sont :**

*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. terrigena*, *K. planticola* (*K. trevisanii*) et *K. ornithinolytica*. *K. pneumoniae* est à l'origine de 75 à 86 % des infections cliniques chez l'homme, suivi de *K. oxytoca* à l'origine de 13 à 25 % des infections. (**Indranil Samanta, Samiran Bandyopadhyay ,2020**)

➤ ***K. pneumoniae* a plusieurs sous-espèces telles que :**

*Pneumoniae*, *ozaenae* et *rhinoscleromatis*.

➤ **Parmi eux :** *K. pneumoniae* ssp. *Pneumoniae* et *K. oxytoca* sont des pathogènes animaux documentés. (**Indranil Samanta, Samiran Bandyopadhyay ,2020**)

## 4. Caractères des *Klebsiella pneumoniae*

### 4.1. Caractères biologiques

#### 4.1.1. Morphologie

Les bactéries du genre *Klebsiella* sont des bacilles à Gram négatif de taille comprise entre 1 et 3 µm de longueur et 0,5 à 1 µm de largeur. Elles peuvent être présentes sous forme isolée, en paires, en chaînes ou parfois en groupes. Les *Klebsiella* possèdent une capsule de polysaccharides qui est observée à la fois in vivo (dans l'organisme) et in vitro (en culture). Elles ne produisent pas de spores et ne sont pas mobiles, c'est-à-dire qu'elles ne possèdent

## Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae*

pas de flagelle. Certaines souches de *Klebsiella* sont pourvues de fimbriae, également appelées pili, qui sont des appendices filamenteux (Indranil Samanta, Samiran Bandyopadhyay, 2020).

### 4.1.2. Cultureux

Elle est cultivée à la fois sur gélose et dans un milieu liquide.

Sur gélose, elle se développe en aéro-anaérobiose, en utilisant des milieux classiques couramment utilisés pour les entérobactéries tels que la gélose nutritive, la gélose Hektoen, la gélose MacConkey, etc. Après une incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures, on observe un changement de couleur du milieu en raison de la fermentation du lactose.

Dans un milieu liquide (bouillon nutritif), la culture se développe généralement rapidement, en quelques heures, à une température de 30 à 37°C. On observe la formation d'un dépôt muqueux et d'un halo visqueux à la surface. Dans un bouillon de lactose bilié brillant à 44°C, il y a fermentation du lactose avec production de gaz (Le Minor and Véron, 1989).

### 4.2. Caractères biochimiques et enzymatique

*Klebsiella pneumoniae* est une bactérie appartenant à la famille des Entérobactéries. Elle se caractérise par son immobilité et sa capacité à fermenter de nombreux substrats glucidiques avec production de gaz. Elle est positive au test de Voges-Proskauer (VP+) et à l'uréase, bien que cette dernière soit moins active que celle des bactéries du genre *Proteus*. *Klebsiella pneumoniae* est également positive aux tests de  $\beta$ -xylosidase et d'ONPG. Elle ne produit pas de sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S-), d'indole, de désaminase oxydative, de lipase, de DNase ni de gélatinase. En revanche, elle est positive au test de KCN. Elle utilise le citrate de Simmons et le malonate comme sources de carbone.

**Tableau 04 :** Principaux caractères biochimique de *K. pneumoniae*.

(Joly et Reynaud, 2003)

Tests biochimiques de <i>K. pneumoniae</i>												
G	IN	OP	G	MOBIL	V	R	T	H	O	A	L	CITR
L	D	NG	AZ	ITÉ	P	M	D	2S	D	D	D	ATE
U							A		C	H	C	
+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+

### **4.3. Génétique**

Il a été démontré que le matériel génétique de *K. pneumoniae* conduit à une grande diversification du genre ainsi que ces mécanismes de défenses.

En effet le génome à une taille de 6mdp et code pour près de 6000 gènes dont 1700 présents dans toutes les espèces de *Klebsiella pneumoniae* (**Henson et al ; 2017**). Ces gènes peuvent codés pour 100.000 protéines (**Holt, 2015**)

Suite à cela, de nombreux clones de *Klebsiella pneumoniae* furent identifiés, un clone cellulaire est défini comme étant un ensemble de cellules d'un même patrimoine génétique obtenu in vitro par mitose successive à partir d'une cellule somatique.

Ces ensembles de clones sont identifiés grâce à la méthode du cgMLST (CoreGenome MLST), qui cible la partie stable du génome présente dans une population bactérienne. Typiquement, cette partie invariable du génome contient environ plusieurs dizaines de milliers de gènes. Dans le contexte de *K. pneumoniae*, le cgMLST permet de comparer de nombreux génotypes au sein d'un groupe de souches. (**Dekker, 2016**).

Les différentes souches de *K. pneumoniae* peuvent être différenciées les unes des autres en fonction de leur profil génétique distinct. (**Holt, 2015**), ceci s'explique par adaptation de niche spécifique au clone par transmission horizontale de gènes (HGI) (**McInerney, 2020**), l'adaptation de ces clones sont également un problème quant à l'émergence de clones multirésistants.

*K. pneumoniae* a été classifié en trois phylogroupes distincts : KPI, KPII et KPIII. Cette classification repose sur la séquence d'un nombre restreint de gènes. (**Brisse, 2001**) (**Fevre et al ; 2005**).

### **4.4. Caractères antigéniques**

*Klebsiella pneumoniae* présente des antigènes communs à ceux des autres entérobactéries, à l'exception de l'antigène flagellaire (H) en raison de son immobilité.

On distingue deux types d'antigènes :

L'antigène O, également appelé antigène somatique, qui représente l'antigène de la paroi des entérobactéries. Il est caractérisé par sa thermostabilité et se compose de deux fractions : une fraction protéinique et une fraction polysidique. Cette combinaison détermine la spécificité

## **Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae***

de l'antigène, tandis qu'une fraction lipidique liée au polyoside est responsable de la toxicité de la bactérie. L'étude de ces antigènes permet de classer les bactéries appartenant à une même espèce en sérotypes ou sérovars.

L'antigène K, également connu sous le nom d'antigène capsulaire ou d'enveloppe, présente au moins 77 antigènes K différents qui ont été décrits chez *Klebsiella pneumoniae*, allant de K1 à K72, K74 et de K79 à K82. Les souches les plus fréquemment pathogènes pour l'homme et les animaux appartiennent aux types capsulaires 1 et 2 (**Freney et al ; 2000**).

### **5. Pouvoir pathogène**

*Klebsiella pneumoniae* est un pathogène opportuniste d'importance clinique, ciblant principalement les personnes alcooliques, immunodéprimées et les patients hospitalisés, notamment en unité de soins intensifs.

Cette bactérie est couramment responsable de pneumonies nosocomiales, en particulier d'abcès pulmonaires, ainsi que de maladies hépatiques, de septicémies, d'infections urinaires et intestinales, avec une prévalence variant de 4 à 20%. Elle peut également causer des infections plus rares, telles que des endocardites, des nécroses faciales et d'autres infections similaires (**Janda, 2006**).

La transmission de *Klebsiella pneumoniae* se fait principalement par contact direct ou indirect avec des objets ou des surfaces contaminées, par voie manuportée ou par contact cutané.

Le pouvoir pathogène et la virulence de cette bactérie sont associés à plusieurs facteurs :

-Sa capsule de polysaccharide ; elle confère à *K. pneumoniae* un fort pouvoir invasif en protégeant les bactéries de la phagocytose et dans une certaine mesure de certains désinfectants.

-La production de sidérophores qui consiste en la capture du fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) et le réduise en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). (**Podschun, 1998**)

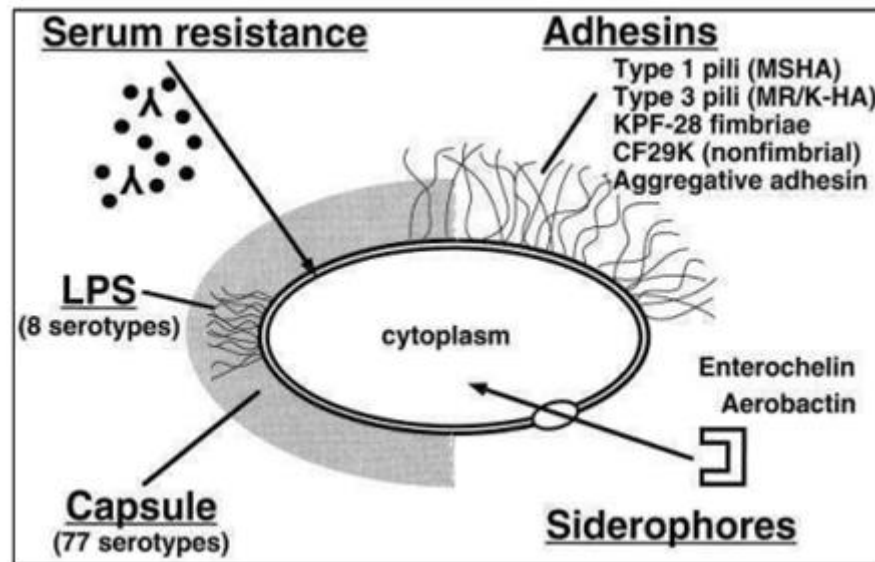
-Production de Lipopolysaccharide (LPS)

-une production d'un complexe extracellulaire toxique pour les tissus pulmonaires, cet effet est lié à la capsule. (**Podschun, 1992**). (**Williams, 1990**)

## Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae*

-La capacité à produire des biofilms est soutenue par la production d'une adhésine par la bactérie, favorisant ainsi la formation de ces structures multicellulaires. (Sebghati et al ; 1998) (Grimont et Grimont, 2005).

### 6. Structure de la surface de *Klebsiella pneumoniae*



**Figure 07** : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *klebsiellasp.*

(Podschun et ullmann ,1998).

#### 6.1. La capsule

La majorité des souches de *Klebsiella pneumoniae* sécrètent une capsule polysaccharidique qui présente une structure fibrillaire et recouvre l'intégralité de la paroi bactérienne. À la coloration de Gram, cette capsule se manifeste sous la forme d'un halo clair. Les sous-unités constituant cette capsule sont composées de quatre ou six sucres, avec une prévalence d'acide glucuronique qui confère à la capsule une charge négative.

#### 6.2. Les fimbriae (pili)

Dans les premières étapes critiques du processus infectieux, les microorganismes doivent s'approcher au plus près des surfaces muqueuses et maintenir cette proximité en se fixant à la cellule hôte par adhésion.

Les entérobactéries utilisent généralement différents types de pili, également appelés fimbriae, pour leurs propriétés adhésives. Les pili sont des projections filamenteuses non

## **Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae***

flagellaires présentes à la surface des bactéries. Ils mesurent environ 10 µm de long pour un diamètre de 1 à 11 nm (Ofek et Doyle, 1994) et sont constitués de sous-unités protéiques globulaires formant des polymères appelés pilines (Jones et Isaacson, 1983). Les deux types de fimbriae les plus couramment rencontrés chez *K. pneumoniae* sont les pili de type 1 et de type 3.

### **6.2.1. Pili de type I**

Les pili de type 1 sont les mieux caractérisés et se retrouvent chez la majorité des entérobactéries. Ce sont des structures fimbriales rigides, avec un diamètre de 5 à 7 nm et une longueur variable de 0,2 à 2 µm. Ils sont disposés de manière péritriche à la surface des bactéries. La base du pilus est ancrée dans la membrane externe de la bactérie et se prolonge par une section hélicoïdale flexible, qui porte l'adhésine FimH à son extrémité (Ofek et al ; 1978).

Les pili de type 1 sont indispensables pour l'attachement initial stable de nombreuses souches de *Klebsiella pneumoniae* à des surfaces inertes, que ce soit dans un milieu riche en conditions statiques ou dans un milieu minimal en conditions dynamiques. Dans *K. pneumoniae*, ces fimbriae jouent également un rôle dans la formation de biofilms (Podshun.R et U. Ullmann, 1998).

### **6.2.2. Pili de type III**

Les pili de type 3 sont largement présents parmi les différentes souches de *Klebsiella*, qu'elles proviennent de l'environnement ou de sources cliniques. Leur rôle dans l'adhésion des bactéries aux cellules endothéliales et épithéliales des voies respiratoires a été démontré (Würker et al ; 1990).

Bien que *Klebsiella pneumoniae* ne soit pas fréquemment associée aux infections urinaires chez les personnes sans cathéter à court terme, elle présente une prévalence plus élevée dans l'urine des patients cathétérisés à long terme.

## **7. Virulence et résistance aux antibiotiques chez *Klebsiella Pneumoniae***

Selon le centre de contrôle et de prévention des maladies aux États-Unis, plus de deux millions de personnes contractent chaque année des infections causées par des microorganismes résistants aux antibiotiques, entraînant en moyenne 23 000 décès.

## **Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* est l'une des bactéries ayant connu une émergence importante de résistance aux antibiotiques et un taux élevé d'infections. L'utilisation de la génomique comparative et des analyses in silico a permis d'identifier plus de 6000 gènes impliqués dans la virulence, la résistance aux antibiotiques, l'infection et la colonisation chez *Klebsiella pneumoniae* (Martin et Bachman, 2018).

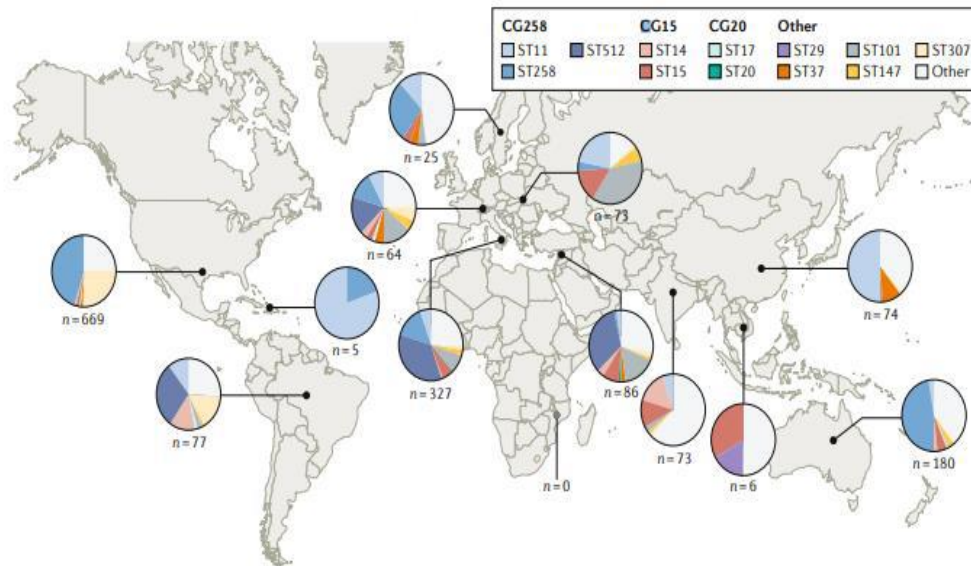
Les plasmides jouent un rôle clé dans l'apparition de la résistance aux antimicrobiens grâce aux transferts horizontaux de gènes. Des études sur *Klebsiella pneumoniae* ont révélé une plus grande diversité plasmidique dans les clones multi-résistants aux médicaments que dans les clones hyper-virulents (Wyres et al ; 2020).

*Klebsiella pneumoniae* est considérée comme l'espèce la plus résistante aux carbapénèmes parmi les entérobactéries, une classe d'antibiotiques de la famille des bêta-lactamines. L'émergence des carbapénémases de *Klebsiella pneumoniae* (KPC-1, KPC-2 et KPC-3) pose des problèmes cliniques sérieux et complique le traitement des infections (Chung, 2016).

La résistance aux carbapénèmes chez *Klebsiella pneumoniae* est causée par plusieurs facteurs, tels que des mutations génétiques, la régulation par les pompes à efflux, une diminution de la perméabilité de la membrane externe et une hyperproduction d'enzymes de type AmpC et carbapénème (Martin et Bachman, 2018).

Différents types de carbapénémases ont été identifiés, tels que IMP-1 (découvert au Japon en 1991), GES-4, VIM-1, OXA-48 et NDM-1. Les souches porteuses du gène blaKPC, qui confère la résistance aux carbapénèmes, ont été détectées dans le monde entier, avec une prévalence plus élevée des gènes blaKPC-2 et blaKPC-3 dans les infections nosocomiales. Les gènes blaKPC peuvent se propager par transposition, transfert génétique horizontal (HGT) et propagation de souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes (CRKP). Le plasmide pKpQIL a été le premier plasmide portant le gène blaKPC à être découvert en 2006, suivi d'autres plasmides tels que pBK15692, pBK30683, pKP13d et pKP1034, qui sont des hybrides de pKPCLK30 de Taïwan et de pHN7A8 de Chine. La plupart des gènes blaKPC sont portés par des éléments mobiles qui facilitent leur transfert vers d'autres plasmides (Yang et al ; 2020).

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



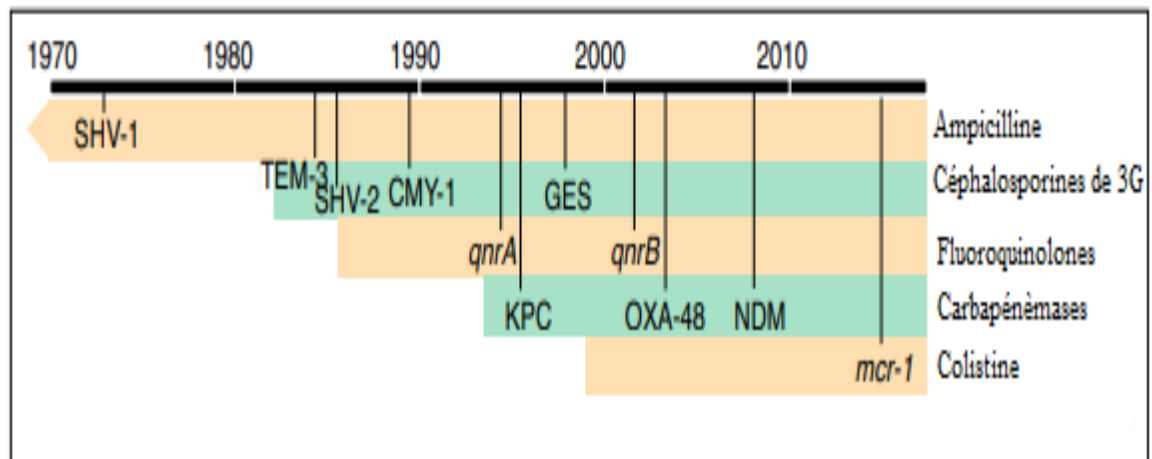
**Figure 8 :** Répartition géographique des souches résistantes aux carbapénèmes chez *Klebsiella pneumoniae* (Wyreset al ; 2020).

La colistine, un antibiotique de la classe des polymyxines, était couramment utilisée dans les années 1960 et 1970 pour traiter les infections causées par des bactéries à Gram négatif. La résistance de *Klebsiella pneumoniae* à la colistine est provoquée par des mutations au niveau des gènes de régulation, tels que le gène *mgrB* qui régule la modification des lipides A.

La première découverte d'un plasmide de résistance à la colistine remonte à 2015, chez *Escherichia coli* en Chine, où le gène *mcr-1* était impliqué. Par la suite, en septembre 2016, un organisme résistant à la colistine a été isolé chez *Klebsiella pneumoniae*, avec un gène différent du *mcr-1* (Martin et Bachman, 2018).

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

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



**Figure 09 :** Acquisition des gènes de résistance contre quelques antibiotiques chez *Klebsiellapneumoniae* à travers le temps (Wyres et Holt, 2018).

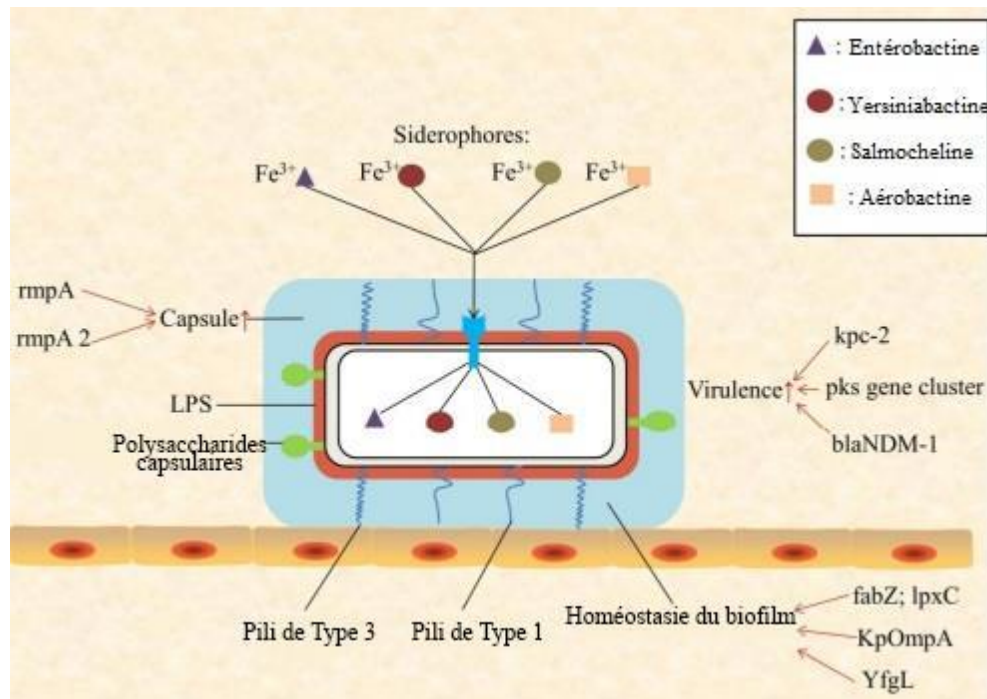
Lors de l'infection, *Klebsiella pneumoniae* déploie plusieurs mécanismes de virulence pour échapper à la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Elle utilise notamment quatre facteurs de virulence : les pilis, la capsule, les lipopolysaccharides (LPS) et les transporteurs de fer :

- **Les pilis de type 1 et de type 3 :** permettent à la bactérie de s'attacher aux cellules et aux surfaces non vivantes. Le plasmide RmpA régule la synthèse de la capsule polysaccharidique, qui est un important facteur de virulence généralement présent chez les souches hypervirulentes de *Klebsiella pneumoniae* (Wang et al ; 2020).
- **La capsule :** joue un rôle crucial dans la protection contre la phagocytose et permet à la bactérie d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Elle est composée de sous-unités répétées de sucres, portées par le gène cps, et plus de 77 types de capsules ont été identifiés par des tests sérologiques.
- **Les lipopolysaccharides (LPS) :** qui recouvrent la membrane des bactéries à Gram négatif, sont des médiateurs majeurs de virulence. Pour échapper à la détection, le LPS modifie sa structure et évite ainsi la reconnaissance par les récepteurs toll-like 4 (TLR4), ce qui entraîne l'inhibition de la réponse inflammatoire. Le LPS est composé de trois parties : un lipide A, un core et un antigène O. Chez *Klebsiella pneumoniae*, il existe neuf sérotypes d'antigène O, dont O1, O2 et O3, responsables de 80 % des infections (Martin et Bachman, 2018).

## Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae*

Étant donné que le fer est essentiel pour la croissance et la reproduction des bactéries, *Klebsiella pneumoniae* produit quatre types de sidérophores (transporteurs de fer) : enterobactin, yersiniabactin, salmochéline et aérobactin (Wang *et al* ; 2020).

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



**Figure 10** : Présentation schématique des facteurs de virulence chez *Klebsiella pneumoniae* (Wang *et al.*, 2020).

### 8. Biofilm chez *Klebsiella pneumoniae*

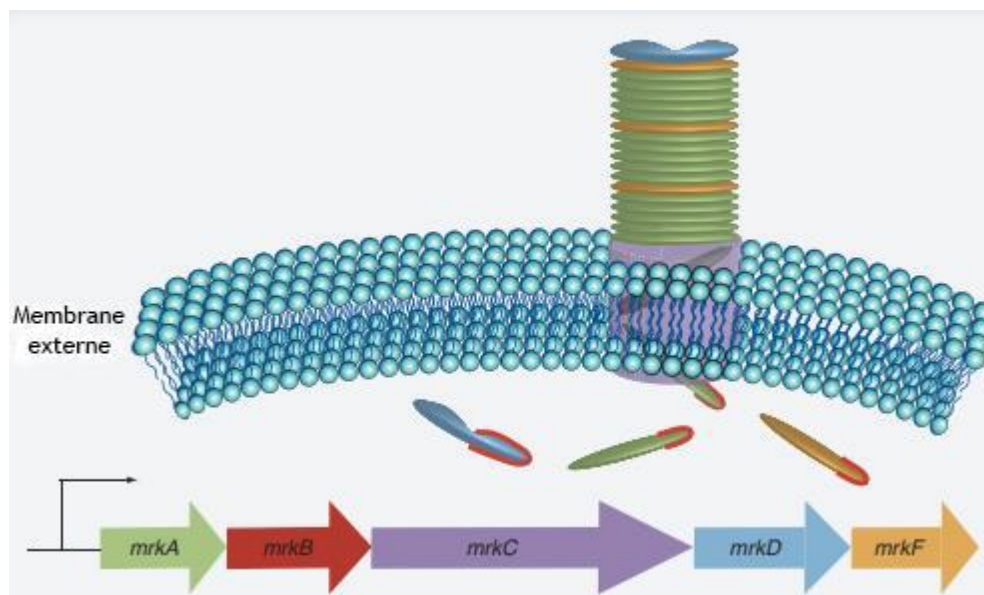
*Klebsiella pneumoniae* démontre sa capacité à former des biofilms et à établir des communications intercellulaires grâce au système de quorum sensing (QS) en utilisant diverses molécules d'acyl-homosérine lactone (AHL) telles que la Noctanoylhomosérine lactone, la N-3-dodécanoyl-L-homosérine lactone et la N-hexanoylhomosérine lactone (C6-AHL). Ces AHL sont responsables de la synthèse d'enzymes lytiques, de toxines et d'exopolysaccharides impliqués dans la pathogénicité, la virulence et la formation de biofilms (Cadavid *et Echeverri*, 2019). Des études ont également démontré que des mutations dans les gènes *fabZ* et *lpxC* inhibent le développement de *Klebsiella pneumoniae* et perturbent l'homéostasie du biofilm. La lipoprotéine *YfgL* joue un rôle dans la formation

## Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae*

du biofilm et la transcription de l'expression des pili de type 1, tandis que la protéine membranaire A, appelée "KpOmpA", est responsable de la reconnaissance des cellules et de leur adhésion (Wang *et al* ; 2020).

Parmi les facteurs contribuant à la formation de biofilms chez *Klebsiella pneumoniae*, les fimbriae de type 3 jouent un rôle clé. La synthèse de ces fimbriae est régulée par un complexe de protéines comprenant mrk A, mrk B, mrk C, mrk D et mrk F (Willsey *et al* ; 2018).

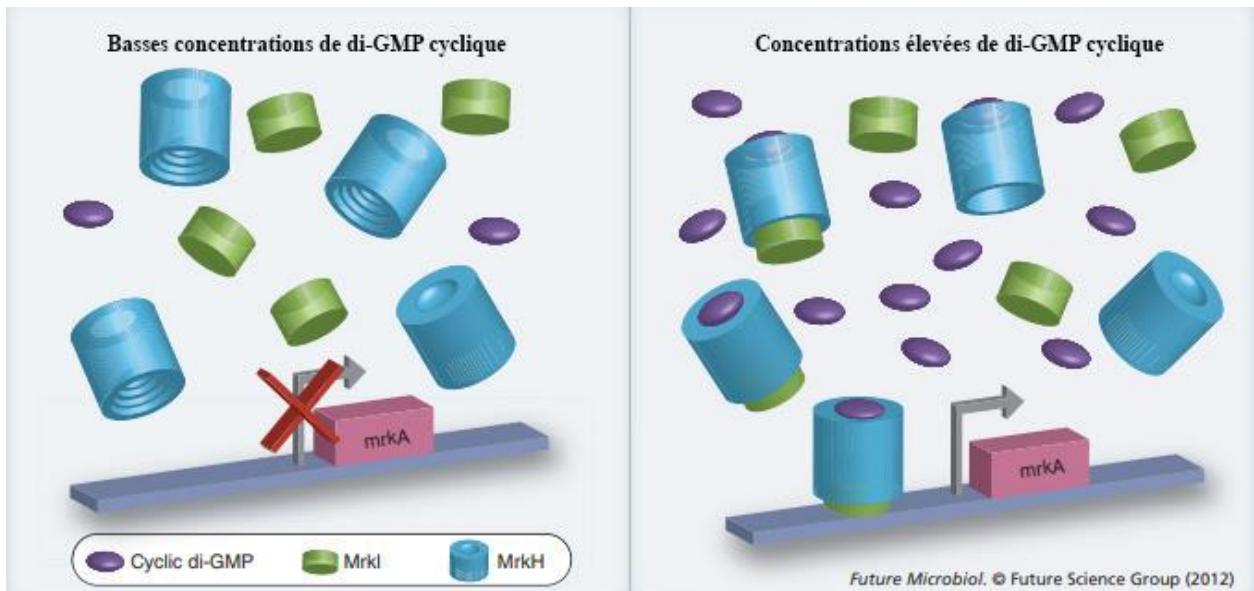
L'image suivante représente les sous unités impliquées dans la production du fimbriae 3 :



**Figure 11** : Représentation des sous unités protéiques impliquées dans l'assemblage du fimbriae de type 3 (Murphy et Clegg, 2012).

Les protéines mrk J, mrk I et mrk H sont également impliqués dans la synthèse du messager cyclic-di-GMP « c-di-GMP » dont les concentrations intracellulaires affecte la production du fimbriae 3 accompagné de synthèse de PilZ liant le c-di-GMP et le fimbriae 3 (Johnson *et al* ; 2011).

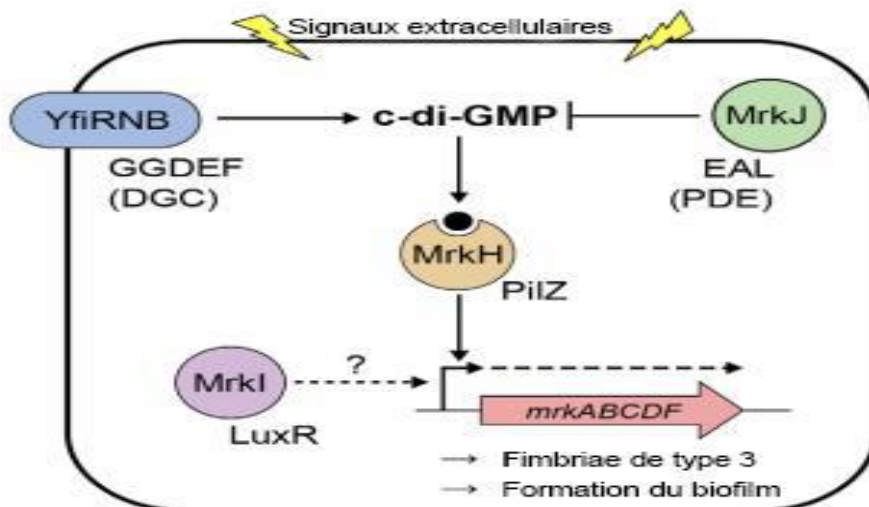
L'image suivante représente le mécanisme d'action des sous unités mrkA, mrkH et mrkI à différentes concentrations de c-di-GMP :



**Figure 12 :** Interactions entre les sous unités mrkA, mrkH et mrkI à des concentrations basses et élevées de c-di-GMP (Murphy et Clegg, 2012)

La formation du biofilm est aussi dépendante de la diguanylatecyclase YfiN et de l'YfiRNB qui contribuent dans la coordination cellulaire entre les sous unités mrkH, mrkJ et le c-di-GMP (Wilkschet *al* ; 2011).

La figure ci-dessous démontre les facteurs impliqués dans la formation d'un biofilm :



**Figure 13 :** Facteurs impliqués dans la formation d'un biofilm chez *Klebsiella pneumoniae* (Wilkschet *al* ; 2011).

## **Chapitre I Généralités sur les biofilms et sa Formation par les *klebsiellapneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* forme de manière plus efficace des biofilms en présence d'autres espèces microbiennes que lorsqu'elle se trouve sous forme isolée ; il s'avère qu'en présence de multiples espèces, les cellules travaillent en synergie et s'organisent de trois manières différentes : séparées en micro-colonies, en agrégation ou arrangées en couches.

*Klebsiella pneumoniae* travaille généralement en synergie avec *Pseudomonas aeruginosa* qui améliore le développement, la structure et les fonctions du biofilm le rendant ainsi performant et plus résistant aux traitements.

Il existe également d'autres espèces collaborant avec *Klebsiella pneumoniae* telles que *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans*, etc. Les interactions entre espèces dans un biofilm doivent être prises en considération lors des traitements d'infections chroniques (**Chung, 2016**).



## **Chapitre II**

# **Les huiles essentielles et les plantes médicinales**



**I. Généralités sur les huiles essentielles**

L'être humain exploite diverses plantes médicinales présentes dans son environnement pour le traitement et la guérison de nombreuses maladies humaines et animales (**Moreau, 2003**). Ces substances végétales médicamenteuses sont largement utilisées en médecine traditionnelle, car elles renferment une vaste gamme de composés chimiques de structures divers (métabolites primaires ou secondaires) (**Gazengel et Orecchioni, 2013**).

Ces plantes présentent un large éventail d'activités thérapeutiques préventives ou curatives, et l'évaluation de ces activités constitue une tâche très intéressante qui suscite l'intérêt de nombreuses études axées sur la découverte de médicaments (**Sanogo, 2006 ; Newman et Cragg, 2007 ; Belkhodja, 2016**).

On estime qu'il existe environ 3000 espèces de plantes contenant des huiles essentielles, dont 10% ont une importance commerciale et sont utilisées dans l'industrie des parfums, des cosmétiques, des médicaments, en tant que conservateurs alimentaires et médicamenteux, ainsi que comme agents aromatisants (**Baudoux D, 2017**).

**1. Définition**

Selon la pharmacopée européenne, une huile essentielle est un produit complexe composé de principes volatils présents dans les végétaux. Elle est obtenue à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse à l'aide de procédés physiques tels que l'entraînement à la vapeur d'eau ou des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des plantes contenant des citrals, ou encore par distillation sèche. Les huiles essentielles sont des liquides huileux volatils, concentrés, aromatiques et hydrophobes qui sont extraits de différentes parties des plantes (**Bouزيد, 2018 ; Mayer, 2012**).

**2. Historique**

L'utilisation des huiles essentielles remonte à l'Antiquité, où les Égyptiens, dès 4500 avant JC, les employaient déjà. Ces huiles étaient obtenues par macération et essorage, et leur utilisation était répandue dans divers domaines tels que la médecine, la parfumerie, la cosmétique et l'embaumement. Au Moyen-Orient, elles étaient principalement utilisées dans l'industrie de la parfumerie. (**Theophane, 2019**).

Au fil du temps, les huiles essentielles ont gagné en popularité dans le domaine médical et ont été utilisées pour traiter les affections cutanées et favoriser le bien-être mental. Les tribus indiennes avaient également recours aux plantes médicinales, y compris aux huiles

essentielles, pour diverses applications thérapeutiques. Après la conquête de l'Égypte, Alexandre le Grand a importé les huiles essentielles en Grèce, où elles ont été appréciées pour leur goût et leur parfum, se diffusant ensuite dans tout l'Empire romain. Au cours de la Renaissance du Moyen-Orient, la méthode de distillation des huiles essentielles a été améliorée, et la Renaissance européenne a été marquée par la création des premiers dispositifs de diffusion des huiles essentielles (**Theophane, 2019**).

En 1928, le chimiste français René-Maurice Gattefossé a introduit le terme "aromathérapie" pour décrire les propriétés curatives des huiles essentielles, suite à sa découverte fortuite de la capacité de la lavande à guérir une brûlure à sa main (**BENABDELKADER, 2012**).

Actuellement, l'aromathérapie est largement répandue et considérée comme une approche naturelle efficace pour combattre les infections microbiennes (**Theophane, 2019**).

### **3. Répartition et Localisation**

Les huiles essentielles sont présentes de manière ubiquitaire dans le règne végétal. Cependant, ces substances volatiles sont particulièrement abondantes au sein de certaines familles de plantes telles que les Rutacées, Ombellifères, Myrtacées, Lamiacées (comme le thym, la sauge, la lavande, les graminées, les conifères, les agrumes) (**Marouf et Tremblin, 2015**).

Les huiles essentielles peuvent être synthétisées et stockées dans divers organes végétaux, notamment les fleurs (rose, lavande, boutons floraux du girofle), les feuilles (eucalyptus, menthe, thym, laurier, sarriette, sauge, pin et sapin), les racines (vétiver, carotte, gingembre), les rhizomes, les fruits (orange, citron, badiane), le bois et les écorces (cannelle, santal, bois de rose), ainsi que les graines (noix de muscade, coriandre) (**Lamamra, 2018**).

### **4. Composition chimique des huiles essentielles**

La composition chimique des huiles essentielles est complexe et peut varier en fonction de plusieurs facteurs, tels que l'espèce botanique, les organes utilisés, les conditions environnementales et le mode d'extraction. Les huiles essentielles sont des mélanges de

constituants appartenant à trois catégories principales : les terpènes, les composés aromatiques et les composés d'origine variée (Naouel, 2015).

- **Les terpènes :** sont des molécules formées par l'assemblage de deux ou plusieurs unités isopréniques. Les HEs sont principalement constituées de monoterpènes et de sesquiterpènes, mais rarement de diterpènes.
- **Les composés aromatiques :** tels que les phénylpropanoïdes, dérivent du phénylpropane. Ces molécules sont moins fréquentes dans les HEs que les terpènes. Ils comprennent plusieurs composés odorants tels que l'estragol, l'anéthol, la vanilline, etc.
- **Les composés d'origine variée :** correspondent à des hydrocarbures aliphatiques à chaîne linéaire ou ramifiée, porteurs de différentes fonctions.

Il est important de noter que la composition spécifique des HEs peut varier considérablement en fonction des plantes et des conditions dans lesquelles elles sont produites.

### **5.8 Activité antimicrobienne des huiles essentielles**

Plusieurs études publiées ont démontré, à travers des recherches en ligne, que certaines huiles essentielles présentent de multiples activités biologiques telles que des activités antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antibiofilm, anticancéreuses, insecticides, et bien d'autres encore.

Le spectre d'action antimicrobienne des huiles essentielles s'est révélé très large, car il a été observé que ces huiles agissent sur de nombreuses espèces bactériennes, y compris celles qui ont développé des mécanismes de résistance aux antibiotiques. De plus, les huiles essentielles possèdent des effets toxiques envers d'autres microorganismes tels que les champignons, les virus et les parasites pathogènes (Naouel, 2015 ; Boucekrit, 2018).

### **6. Mode d'action antimicrobien des huiles essentielles**

Effectivement, les huiles essentielles sont composées de différentes molécules ayant des fonctions variées, telles que les phénols, les aldéhydes, les cétones et les alcools. Il a été constaté que l'activité antimicrobienne des huiles essentielles est étroitement liée à ces composés oxygénés. L'action de ses derniers se déroule en trois étapes distinctes (Naouel, 2015) :

- ❖ Altération de la membrane plasmique : cela entraîne une augmentation de la perméabilité de la membrane, conduisant ainsi à la fuite des constituants cellulaires.
- ❖ Acidification de l'intérieur de la cellule : cela bloque la synthèse des molécules de structure et la production d'énergie au sein de la cellule.
- ❖ Destruction du matériel génétique : cela entraîne la mort de la cellule en endommageant son ADN.

Ces différentes étapes contribuent à l'effet antimicrobien des huiles essentielles en perturbant les fonctions vitales des microorganismes ciblés.

### **7. Activité antibiofilm**

Les biofilms microbiens présentent un état extrêmement difficile à éliminer en utilisant les agents antimicrobiens classiques. Cependant, des recherches ont démontré que les huiles essentielles, même à des concentrations très faibles, sont capables d'inhiber la formation de biofilms par le biais de plusieurs mécanismes (**Niu et Gilbert, 2004**).

Ces mécanismes comprennent notamment l'activation des gènes de réponse au stress, ce qui entraîne une diminution des polysaccharides extracellulaires, ainsi que l'interaction des huiles essentielles avec les protéines présentes à la surface des microorganismes, ce qui inhibe leur fixation (**Benbelaid, 2015**).

De plus, des études ont montré que l'activité antibiofilm des huiles essentielles dépend de plusieurs facteurs tels que la nature et la concentration des huiles essentielles utilisées, la souche microbienne traitée et l'âge du biofilm (**Barchan et al ; 2014**).

### **8. Domaines d'utilisation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont actuellement employées dans diverses applications industrielles et pharmaceutiques en raison de leurs propriétés médicinales. Dans le domaine de la parfumerie et de la cosmétique, les huiles essentielles sont couramment utilisées non seulement pour leur parfum, mais aussi pour préserver les produits pendant leur stockage, grâce à leurs activités antiseptiques et antioxydantes. De plus, les huiles essentielles trouvent leur utilisation dans l'industrie agro-alimentaire.

## 9. Extraction des huiles essentielles

Il existe différentes méthodes d'extraction des huiles essentielles, basées principalement sur l'entraînement à la vapeur, l'expression, la solubilité et la volatilité. Le choix de la méthode appropriée dépend de plusieurs paramètres, tels que la nature de la plante à traiter, les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle à extraire, ainsi que l'utilisation finale de l'extrait et l'arôme souhaité pendant le processus d'extraction. Parmi les méthodes d'extraction, la distillation est l'une des plus couramment utilisées pour ses propriétés alimentaires (Naouel, 2015 ; Bouchekrit, 2018).

### 9.1. Distillation

Le procédé de distillation repose sur la propriété des huiles essentielles d'être volatiles lorsqu'elles sont exposées à la chaleur, ce qui permet à l'huile d'être entraînée par la vapeur d'eau. Une fois que la vapeur d'eau contenant l'huile essentielle se refroidit et se condense, l'huile essentielle se sépare du distillat par décantation (Boukhatem et al ; 2019). Il existe deux principaux modes de distillation utilisés : l'hydrodistillation et la distillation à la vapeur d'eau.

#### 9.1.1. Par hydrodistillation

La méthode de l'hydrodistillation implique l'immersion directe de la matière végétale dans un bain d'eau distillée qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs résultantes sont ensuite condensées sur une surface froide, ce qui permet la séparation de l'huile essentielle en raison de la différence de densité. Cependant, cette méthode présente certains inconvénients liés à l'effet de la vapeur d'eau. Certains organes végétaux fragiles tels que les fleurs ne supportent pas bien ce processus d'entraînement à la vapeur et risquent de se calciner. De plus, le contact direct entre l'eau et les composés de l'huile peut provoquer des réactions chimiques entraînant des changements dans la composition finale de l'extrait. Il convient également de noter que la durée de la distillation a un impact sur le rendement de l'huile, mais cette technique est limitée car un chauffage intense et prolongé peut entraîner la dégradation des matériaux végétaux ainsi que des composés aromatiques (Boukhatem et al ; 2019).

#### 9.1.2. Distillation à la vapeur d'eau

La distillation à la vapeur d'eau est le procédé le mieux adapté pour extraire les essences, notamment lorsqu'elles sont destinées à des applications thérapeutiques. Dans ce procédé, la

matière végétale n'est pas directement en contact avec l'eau, mais est traversée par un courant de vapeur d'eau. Les plantes aromatiques sont placées sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. Sous l'effet de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes, entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. La vapeur d'eau chargée d'essence se condense ensuite pour revenir à l'état liquide. Ce procédé permet de séparer le produit de distillation en deux phases distinctes : l'huile essentielle, de faible densité, et l'eau condensée, connue sous le nom d'eau florale ou hydrolat.

Ce procédé de distillation à la vapeur d'eau permet d'obtenir un parfum plus délicat. Sa régularité et sa rapidité favorisent l'apparition de notes de tête, qui sont des fragrances très volatiles riches en esters. Ces molécules légères se manifestent en premier lieu. En général, une demi-heure suffit pour recueillir 95% des molécules volatiles, ce qui satisfait les besoins de l'industrie de la parfumerie. Cependant, en aromathérapie, il est nécessaire de prolonger l'opération afin de récupérer la totalité des composants aromatiques volatils (**Boukhatem et al ; 2019**).

Une variante de l'entraînement à la vapeur d'eau est l'hydrodiffusion, qui implique l'utilisation de vapeur d'eau à très faible pression (0,02-0,15 bar). Cette méthode consiste à pulser la vapeur d'eau à travers la masse végétale, de haut en bas. La composition des produits obtenus par cette méthode diffère qualitativement de celle des produits obtenus par les méthodes classiques. De plus, ce procédé permet de gagner du temps et de l'énergie (**Boukhatem et al ; 2019**).

## **9.2. Expression à froid**

La technique d'expression à froid est utilisée spécifiquement pour l'extraction des essences volatiles présentes dans les péricarpes d'agrumes. Elle implique le traitement mécanique des fruits afin de rompre ou de dilacérer les parois des sacs oléifères situés dans le mésocarpe, juste sous l'écorce du fruit. Cette méthode permet de recueillir le contenu des sacs oléifères sans qu'il subisse de modifications. Des systèmes récents, tels que le système « Food Machinery Corporation-in-line » (FMC), permettent d'extraire le jus de fruit et l'essence de manière quasi-simultanée sans qu'ils entrent en contact. C'est pourquoi l'expression à froid est la méthode préférée pour extraire ces essences, d'autant plus que la distillation n'est plus considérée comme une technique appropriée.

En effet, la distillation produit des huiles aromatiques de moindre qualité, principalement en raison de la présence importante d'aldéhydes, des composés sensibles à l'oxydation et à la chaleur. Ainsi, afin de préserver la qualité des huiles essentielles extraites des agrumes, l'expression à froid est préférée à la distillation (**Boukhatem et al ; 2019**).

### **9.3. Extraction assistée par micro-ondes**

Ce procédé présente l'avantage notable de réduire considérablement la durée de distillation et d'augmenter le rendement. Cependant, jusqu'à présent, aucun développement industriel n'a été réalisé dans ce domaine.

La distillation assistée par micro-ondes suscite actuellement un grand intérêt et fait l'objet de nombreuses recherches visant à son amélioration continue, en raison de ses nombreux avantages. Cette technologie est considérée comme écologique, permettant des économies d'énergie et de temps, tout en réduisant les dégradations thermiques et hydrolytiques. De plus, l'utilisation des micro-ondes constitue une méthode d'extraction à part entière en plein essor.

Par exemple, la méthode SFME (Solvent Free Microwave Extraction) est une combinaison innovante de chauffage par micro-ondes et de distillation sèche. Elle consiste à placer le matériau végétal dans un réacteur à l'intérieur d'un four à micro-ondes, sans ajout d'eau ni de solvant. Le chauffage interne de l'eau présente dans la plante permet de dilater ses cellules, entraînant la rupture des glandes et des réservoirs oléifères. Ainsi, l'huile essentielle est libérée et évaporée avec l'eau végétale. Comparée à la méthode d'hydrodistillation traditionnelle, la SFME se caractérise par une réduction de la consommation d'énergie et des émissions de CO<sub>2</sub>, mais surtout par un temps d'extraction environ 9 fois plus rapide. Les huiles essentielles obtenues par ce procédé présentent une plus grande quantité de composés oxygénés et des valeurs odorantes plus significatives, tandis que les monoterpènes sont présents en moindre quantité (**Boukhatem et al ; 2019**).

### **9.4. Extraction par fluide à l'état supercritique**

La technique d'extraction par fluide supercritique, connue sous le nom de SFE, se distingue par l'utilisation de solvants à leur état supercritique. Cela signifie que les solvants se trouvent

dans des conditions de température et de pression où ils se situent dans un état intermédiaire entre liquide et gazeux, présentant ainsi des propriétés physico-chimiques différentes, notamment une capacité de solvation accrue. Bien que de nombreux solvants puissent être utilisés en pratique, environ 90% des SFE sont réalisées avec du dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), principalement pour des raisons pratiques.

En plus de sa facilité d'obtention grâce à ses basses pressions et températures critiques, le CO<sub>2</sub> est relativement non toxique, disponible en haute pureté et à faible coût. De plus, il présente l'avantage d'être facilement éliminé de l'extrait obtenu (**Boukhatem et al ; 2019**).

### **9.5. L'hydrodistillation assistée par ultrasons**

Lorsque des ondes ultrasonores se propagent à travers un liquide, les oscillations moléculaires entraînent la formation de zones de raréfaction. Lorsque ces cycles de raréfaction augmentent, les forces de cohésion du liquide sont surmontées, ce qui conduit à la formation de bulles de cavitation. Ces bulles implosent ensuite à la surface de la matière végétale, provoquant la rupture des membranes cellulaires et la libération de leur contenu à l'extérieur (**DOLATOWSKI et al ; 2007**). Étant donné que les glandes contenant les huiles essentielles sont généralement situées à la surface des plantes aromatiques, l'implosion détruit ces glandes, permettant ainsi la libération de l'huile dans l'environnement (**VEILLE et al ; 2010**).

L'avantage majeur de ce procédé est la réduction significative du temps d'extraction, l'augmentation du rendement en extrait et la facilitation de l'extraction des molécules thermosensibles (**LAGUNEZ RIVERA, 2006**).

## **10. Rôle des huiles essentielles**

Les huiles essentielles jouent un rôle biologique évident dans l'écologie. Leur odeur participe à la pollinisation en agissant comme un attractif ou un répulsif envers les prédateurs tels que les herbivores et les insectes. Grâce aux substances toxiques qu'elles contiennent, elles peuvent paralyser les muscles masticateurs des agresseurs, entraînant ainsi une réduction de leur appétit. De plus, elles offrent une protection aux cultures en inhibant la multiplication des bactéries et des champignons. Les huiles essentielles empêchent également la déshydratation des plantes en limitant l'évaporation excessive de l'eau et protègent la plante contre les effets nuisibles de la lumière en régulant sa concentration ou sa diminution.

De plus, les composés présents dans les huiles essentielles interviennent dans les réactions d'oxydo-réduction en tant que donneurs d'hydrogène. Par exemple, l'isoprène réagit rapidement avec l'ozone et les radicaux hydroxyles. De plus, les huiles essentielles émettent du carbone et de l'énergie en excès (**Ouis, 2015**)

## **-Syzygium aromaticum**

### **1. Origine du nom**

Le clou de girofle est l'extrait obtenu à partir du girofler (*Syzygium aromaticum*), un arbre de la famille des Myrtacées. Originaire d'Indonésie orientale, des Philippines méridionales, des îles de Moluques, d'Afrique et d'Amérique du Sud (**Penot et al ; 2014**), il se développe principalement dans des régions à climat tropical. Chaque bourgeon floral de cette plante représente un clou de girofle (**Barbelet, 2015**).

Le clou de girofle a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle indienne et chinoise pour rafraîchir l'haleine. Au XIII<sup>e</sup> siècle, il est devenu un composant essentiel de la phytothérapie, en particulier pour les traitements bucco-dentaires. De nos jours, l'Indonésie et Madagascar sont les principaux acteurs mondiaux dans la production de clous de girofle (**Jesus Cardenas, 2017**).

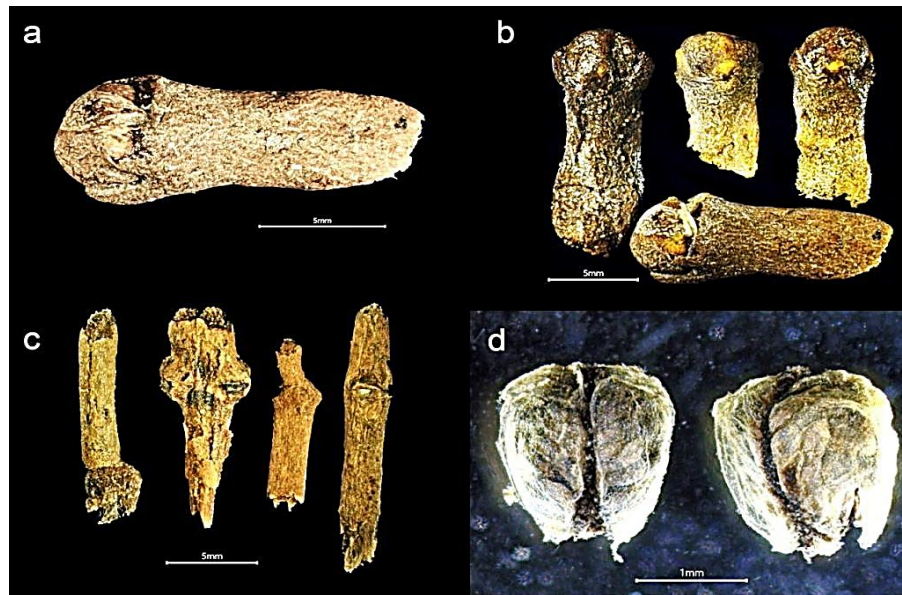


Fig 6. Clove from the *Gribshunden* shipwreck. Plant parts of clove: a-b) flower buds, c) stalks, d) side view of complete ovaries.

**Figure 14** : Restes de clous de girofles provenant de l'épave du Gribshunden.

➤ source: *M. Larsson & B. Foley, 2023*

➤ *PLoS ONE 18(1): e0281010. [https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0281010/](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281010/)*

## 2. Systématique

Classe leclou de giroflecommesuit : (*Ghedira et al; 2010*)

**Tableau 05** : La classification phylogénétique du clou de girofle.

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Embranchement	<i>Syzgiumaromaticum</i>
Sous-embranchement	Magnoliophytina
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Espèce	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	<i>Syzgium</i>
Ordre	Magnoliophyta

Comme beaucoup d'espèces, le giroflier a porté plusieurs noms scientifiques avant d'être nommé *Syzygium aromaticum* :

- ✿ *Caryophyllus aromaticus* L. (1753)
- ✿ *Eugenia caryophyllata* Thunb. (1788)
- ✿ *Eugenia caryophyllus* Spreng. (1825)
- ✿ *Eugenia aromatica* (L.) Baill. (1876)
- ✿ *Jambosacaryophyllus* (Thunb.) Nied. (1893)
- ✿ *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry, (1939)

Actuellement, les noms *Syzygium aromaticum* et *Eugenia caryophyllus* sont tous les deux employés.



**Figure15** : Allure d'un giroflier (barbelet s.2015).

### 3. Description botanique du giroflier

Le giroflier (*Syzygium aromaticum*) est un arbre de grande taille atteignant une hauteur de 20 mètres, caractérisé par de larges feuilles mesurant jusqu'à 12 cm. Ses branches portent des fleurs blanches ou roses qui sont disposées en grappes denses. Les boutons floraux de couleur rose, récoltés avant leur éclosion, sont utilisés à des fins spécifiques (Jesus Cardenas, 2017).

Les fleurs du giroflier dégagent un parfum puissant de clou de girofle lorsqu'on les froisse. Elles sont regroupées en grappes compactes contenant environ 25 fleurs, avec un calice tubulaire de couleur blanc cassé qui se teinte de rouge, et une corolle d'un blanc rosé (Ghedira et al ; 2010).

Les clous de girofle correspondent aux boutons floraux du giroflier avant leur épanouissement. S'ils ne sont pas récoltés, ils mûrissent pour se transformer en drupes d'un rouge foncé. Bien que le giroflier soit originaire d'Indonésie, il est cultivé à Madagascar. Les boutons floraux du giroflier ont une forme quadrangulaire, avec un hypanthium mesurant environ 10 à 12 mm de long et 2 à 3 mm de diamètre. Ils sont entourés de quatre lobes sépales divergents et composés de quatre pétales imbriqués renfermant de nombreuses étamines recourbées (Jesus Cardenas, 2017).

#### **4. Localisation**

L'utilisation du clou de girofle remonte à une période de plusieurs milliers d'années. Des découvertes archéologiques en Syrie ont révélé la présence d'un clou de girofle datant de 1700 av. J.-C. En Chine, à partir de 200 av. J.-C., il était importé de Java et largement utilisé dans les domaines culinaires et médicaux traditionnels.

En Europe, le clou de girofle était connu des Grecs, des Phéniciens et des Romains, bien que sa description précise demeure incertaine. Au Moyen Âge, il est devenu une épice très prisée parmi les élites européennes. Les explorateurs portugais ont découvert les îles Moluques, où le clou de girofle était cultivé, au XVI<sup>e</sup> siècle. Par la suite, les Néerlandais ont monopolisé le commerce des clous de girofle au XVII<sup>e</sup> siècle. Malgré cela, Pierre Poivre, un français, a réussi à introduire clandestinement des plants de girofle dans d'autres régions.

Actuellement, l'Indonésie occupe la position de premier producteur mondial de clous de girofle, suivi de près par Madagascar. L'Inde est le plus grand importateur de cette épice aromatique (ALAIN, 2023).

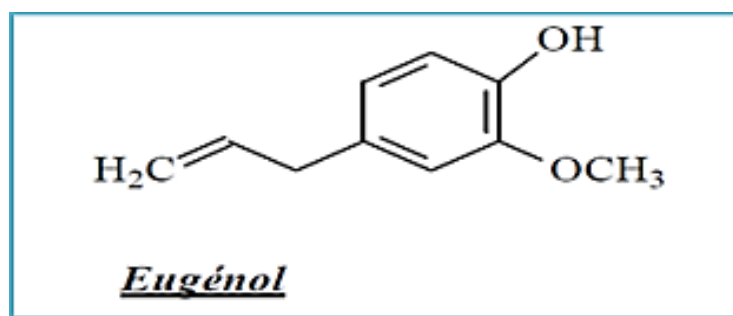


**Figure16** : Portrait de Pierre Poivre, lithographie d'E. Conguy, XIXe.

## 5. Composition et propriété de clou de girofle

### 5.1. Composition Chimique

Le clou de girofle présente une composition chimique intéressante, comprenant une concentration élevée en huile essentielle, représentant environ 15 à 20% voire 16%. Cette huile contient principalement de l'eugénol, constituant majoritaire, représentant de 70 à 85% de la composition totale de l'huile de girofle. Par ailleurs, on trouve également d'autres composés terpéniques, tels que le caryophyllène, à une concentration d'environ 10%. D'autres composés présents comprennent des composés aliphatiques, aromatiques et hétérocycliques. En plus de ces composés, le clou de girofle contient également des tanins, une petite quantité d'amidon et des matières fibreuses cellulose.



**Figure 17** : Composé majeur de l'huile essentielle Des clous de girofle.

D'après la pharmacopée européenne 3e édition, l'huile essentielle des clous de girofle

Contient de 75 à 88 % d'eugénol, de 5 à 14 % de  $\beta$ -caryophyllène, et de 4 à 15 % d'acétate d'eugényle.

**Tableau 06 :** Composition chimique de l'huile essentielle des clous de girofle.

Constituants	Pourcentages
<b>Eugénol</b>	91,2
<b>B-caryophyllène</b>	4,1
<b>a-humulène</b>	0,6
<b>Eugényl acétate</b>	2,9
<b>B-caryophyllène époxyde</b>	0,5
<b>Total</b>	99,3

## 5.2. Propriété

Les propriétés du clou de girofle sont principalement attribuables à la présence d'eugénol. Ce composé est rapidement métabolisé et excrété par l'organisme, et il est considéré comme non cancérigène. L'eugénol peut être présent dans les aliments jusqu'à une concentration maximale de 1500 ppm (parties par million)

### ➤ Antalgique (eugénol)

L'huile essentielle de clou de girofle contient de l'eugénol, une molécule qui présente une puissance supérieure à celle de la lidocaïne, un anesthésique local agissant sur la transmission des signaux nerveux. En d'autres termes, l'eugénol bloque la transmission de la douleur. L'huile essentielle de clou de girofle est particulièrement efficace dans le traitement des douleurs dentaires.

### ➤ Anti-infectieux majeure (eugénol)

L'huile essentielle de clou de girofle présente une grande efficacité dans le traitement des infections intestinales, urinaires et respiratoires. Cette efficacité est due à l'action bactéricide rapide de l'eugénol, constituant principal de l'huile de clou de girofle. Il a notamment une activité contre plusieurs germes présents dans la flore buccale, tels que Staphylococcus

aureus, *Pyogenes aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilusodontolyticus*, *Escherichia coli* et *Monilia albicans* (Indranil Samanta, Samiran Bandyopadhyay ; 2020).

➤ **Antifongique à large spectre (eugénol)**

L'huile essentielle de Clou de Girofle détruit les champignons à l'origine de certaines mycoses. L'huile essentielle de Clou de Girofle est active contre : *Cryptococcus neoformans*, *Dermatophytes sp.*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mantagrophytes*, *Trichophyton rubrum* (Indranil Samant, Samiran Bandyopadhyay ; 2020).

➤ **Anti-inflammatoire et anti-oxydante (eugénol)**

L'huile essentielle de clou de girofle exerce une action inhibitrice sur les molécules impliquées dans le processus inflammatoire déclenché par l'organisme en réponse à une agression. Cette action prévient l'apparition de rougeurs cutanées et réduit la sensation de chaleur associée à l'inflammation.

Antispasmodique ; calmante et sédative (Indranil Samanta, Samiran Bandyopadhyay ; 2020).

### ***-Eucalyptus globulus***

#### **1. Origine**

L'arbre connu sous le nom d'*Eucalyptus globulus*, appartenant à la famille des Myrtacées, est également appelé "gommier bleu", "arbre au koala" et "arbre à la fièvre". Le terme "eucalyptus" dérive du grec "eu" signifiant "bon" et "kalypto" signifiant "couvrir", en référence à la soudure des pétales et des sépales de cette espèce. Originaire d'Australie, de Tasmanie et de Malaisie, cet arbre a été introduit en France en 1828. On le trouve principalement dans les régions méditerranéennes, notamment en Corse, ainsi que dans d'autres régions plus septentrionales (MICHEL CARON, 2011).

#### **2. Systématique**

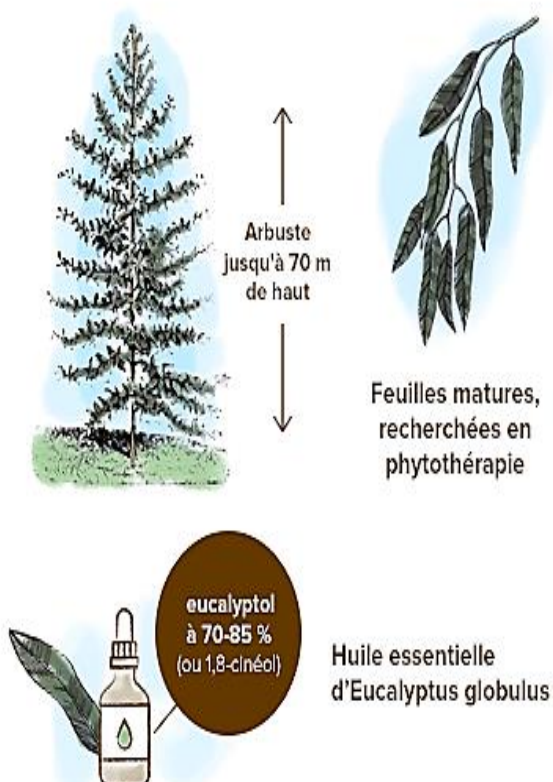
D'après la classification phylogénétique APG (2009), la classification de l'*Eucalyptus globulus* est comme suit :

- ✿ **Règne :** plantes
- ✿ **Embranchement :** Spermaphytes
- ✿ **Sous-embranchement :**  
Angiospermes
- ✿ **Classe :** Eudicots
- ✿ **Sous-classe :** Rosidées
- ✿ **Ordre :** Myrtales
- ✿ **Famille :** Myrtacées
- ✿ **Genre :** *Eucalyptus*
- ✿ **Espèce :** *Eucalyptus globulus*



**Figure 18 :** *Eucalyptus globulus*.

### 3. Description botanique



L'eucalyptus est un arbre remarquable caractérisé par son tronc droit, lisse et de couleur grisâtre, orné de rameaux dressés. Il se distingue par sa croissance rapide, son agréable odeur aromatique qui repousse les insectes, ainsi que sa capacité à absorber l'humidité environnante.

Cet arbre peut atteindre une hauteur impressionnante allant de 30 à 70 mètres. Son écorce, de teinte gris-brun, présente une tendance naturelle à se détacher par plaques.

Les feuilles persistantes de l'eucalyptus sont coriaces et dégagent un parfum agréable. Elles sont initialement opposées et ovales lorsqu'elles sont jeunes, puis s'allongent en grandissant. Les fleurs de l'eucalyptus se composent d'un grand nombre d'étamines et peuvent présenter

une palette de couleurs allant du blanc, crème, jaune, rose au rouge. (MICHEL CARON, 2011). Les feuilles de l'eucalyptus commun renferment 1 à 3 % d'huile essentielle.8



Surnommé « fever tree »  
(« arbre à fièvre »)

Les fruits de l'eucalyptus prennent la forme de capsules ovoïdes et ligneuses, mesurant environ 1 centimètre, contenant de nombreuses graines minuscules (MICHEL CARON, 2011).

#### 4. Localisation

*Eucalyptus globulus* est une espèce indigène de Tasmanie et du sud-est de l'Australie, mais elle est désormais largement cultivée et naturalisée dans les régions subtropicales du monde entier. En Afrique tropicale, on la trouve dans les régions d'altitude à climat frais.

Cette espèce a été introduite en Algérie en 1854 et implantée dans la plaine marécageuse de la Mitidja dans le but de lutter contre la malaria. Cela s'explique par son pouvoir desséchant et les émanations balsamiques produites par l'essence de ses feuilles. Le genre *Eucalyptus* comprend plus de 700 espèces, dont la plus répandue est *E. globulus*.

Cet usage serait, selon certains auteurs, à l'origine du surnom « fevertree » (littéralement « arbre à fièvre » en français). D'autres auteurs expliquent que ce surnom viendrait plutôt de l'usage des feuilles d'*Eucalyptus globulus* dans la médecine aborigène pour soulager différents maux dont la fièvre.

## 5. Composition chimiques

L'huile essentielle d'Eucalyptus globulus a la composition suivante :

- Eucalyptol (ou cinéol ou 1,8-cinéol) à 70-85 %
- Triterpènes
- Monoterpènes comme l'alpha-pinène et le limonène
- Sesquiterpènes comme l'aromadendrène
- Cétones
- Aldéhydes

## 6. Propriétés :



Décongestionnant



Antiseptique  
aérien



Anti-inflammatoire



Antalgique

### ➤ Décongestionnant respiratoire (infusion, inhalation, diffusion, massage)

Les feuilles et l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus sont particulièrement prisées pour leurs effets bénéfiques au niveau des voies respiratoires.

L'association du 1,8-cinéole (eucalyptol) et de l'alpha-pinène au sein de l'huile essentielle permet de capitaliser sur des propriétés antitussive, expectorante et mucolytique. Autrement dit, les principes actifs contribuent à fluidifier les sécrétions bronchiques, soulager la congestion nasale et calmer la toux.

En diffusion, en inhalation ou en massage, l'huile essentielle d'eucalyptus commun est idéale pour traiter toute sorte d'affections au niveau des voies respiratoires. Par exemple : les bronchites, la grippe, les laryngites, les pharyngites, les rhinites, la toux...

➤ **Antiseptique aérien (diffusion)**

L'huile essentielle d'eucalyptus commun a aussi une action antiseptique idéale pour assainir l'air intérieur.

➤ **Activité anti-inflammatoire et antalgique (massage)**

Diluée dans une huile de massage, l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus peut être employée localement pour soulager des douleurs rhumatismales.

➤ **Autres bienfaits de l'huile essentielle**

Au-delà des propriétés largement reconnues ci-dessus, d'autres effets sont également attribués à l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus :

- Stimulante et rafraîchissante
- Positivante

## **-Le Thym (Le thymus)**

L'Algérie, en tant que pays du bassin méditerranéen, se distingue par sa biodiversité florale exceptionnelle, notamment en ce qui concerne les plantes d'intérêt aromatique et médicinal, grâce à la diversité de ses étages bioclimatiques (**MOKKADEM, 1999**). On recense environ 4125 espèces de plantes vasculaires réparties en 123 familles botaniques (**NOUIOUA, 2011 ; KAABÈCHE, 2013**).

La famille des Lamiacées joue un rôle majeur dans la flore algérienne. Cette famille de plantes appartient à l'ordre des Tubiflorae des Gamopétales et compte environ 6970 espèces réparties en 240 genres (**MEYER et al ; 2004**).

Le thym, également connu sous le nom de farigoule, est un arbrisseau rustique originaire du bassin méditerranéen. Il pousse de manière spontanée dans les régions méridionales, sur des terrains chauds, secs et rocailleux de la garrigue, ainsi que dans les prairies et les champs d'altitude.

### **1. Définition**

Le genre *Thymus* est largement reconnu pour ses utilisations en tant qu'épice et conservateur alimentaire, ainsi que pour ses propriétés protectrices et curatives dans de nombreux produits alimentaires (**Hamdani et al ; 2014**). Ce genre présente une variété d'activités

biologiques, notamment des propriétés antibactériennes, antifongiques, analgésiques, carminatives, antioxydantes, spasmolytiques et anti-mutagènes (**Messaoudi et al ; 2019**).

On observe différents écotypes de thym, caractérisés par des variations morphologiques et une composition en huiles essentielles distinctes. Ces écotypes se distinguent par leur odeur forte et pénétrante, ainsi que parfois une saveur balsamique et épicée très prononcée. De nombreuses espèces présentent également des chémotypes spécifiques, avec une composition chimique des huiles essentielles variable en fonction du stade de développement de la plante, du moment de la récolte et des conditions environnementales du champ (**De Lisi et al ; 2011**).

## **2. Origine**

Thymus est un genre de plantes (d'arbrisseaux) de la famille des lamiacées et comporte environ 300 espèces. Ce sont le plus souvent des plantes en coussinets ou rampantes avec des petites fleurs blanches ou bien rose pâle. Elles sont gorgées en huiles essentielles, ce qui en fait des plantes aromatiques.

Le goût de la plante est différent selon le terroir et porte très souvent le nom du lieu où il pousse. Le thym peut croître sur des milieux arides et jusqu'à 1 500 voire 2000 m d'altitude. Ce nom, « Thym » vient de Thymus qui en latin désignait plusieurs plantes aromatiques de la famille des lamiacées, qui lui-même vient de thumon en grec, qui signifiait « offrande à brûler » et « parfum », en raison de l'agréable odeur que la plante dégage de manière naturelle. Ce nom provient lui-même de tham en égyptien, qui était le nom d'une plante qui servait à embaumer les corps.

## **3. Systématique**

La classification botanique de thym est représentée ci-dessus : (**Touhami, 2017**)

- ✿ **Règne** : Plantea (végétal)
- ✿ **Embranchement** : Spermatophytes (phanérogames)
- ✿ **Sous embranchement** : Angiospermes
- ✿ **Classe** : Dicotylédones
- ✿ **Sous classe** : Métachlamydées (gamopétales)
- ✿ **Ordre** : Tubiflorales (Lamiales)
- ✿ **Sous ordre** : Verbéninées

✿ **Famille** : Labiacées (labiées)

✿ **Genre** : Thymus

#### 4. Caractéristiques botaniques

##### 4.1. Description morphologique

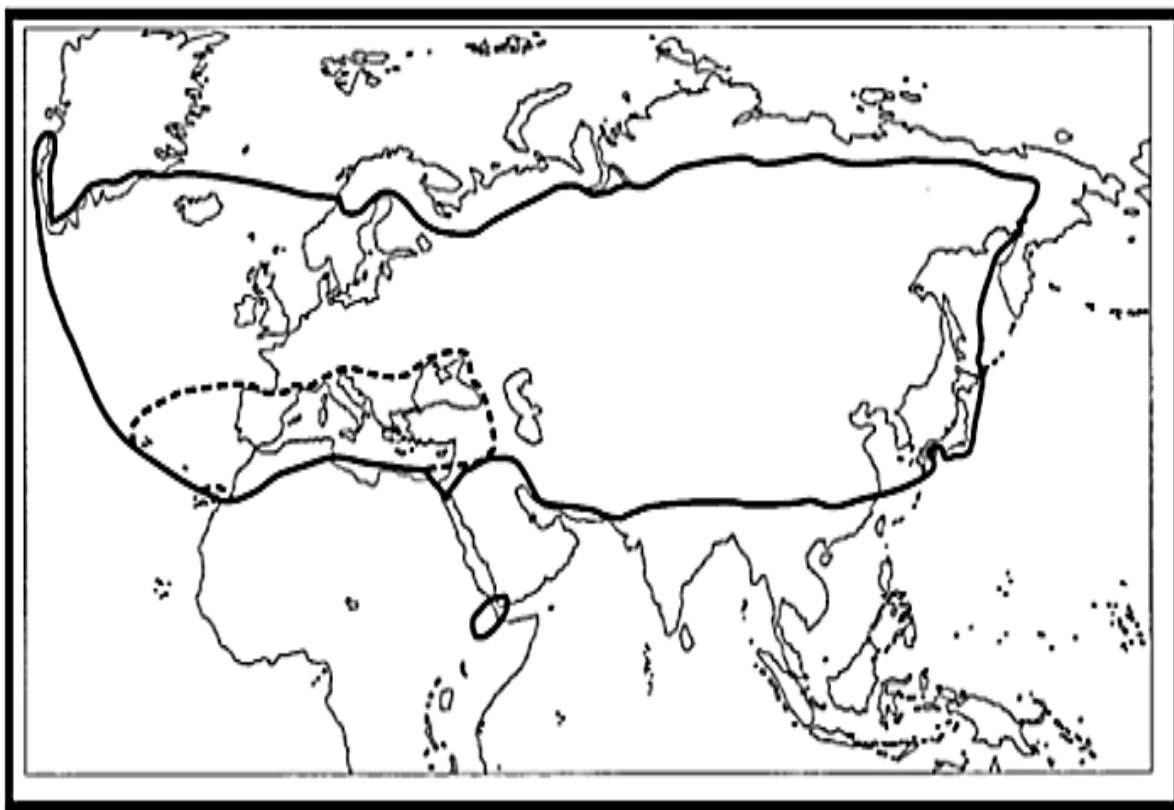
Le thym (genre *Thymus*) se caractérise par des tiges ramifiées, minces et sinueuses, qui deviennent ligneuses à leur base. Elles sont ornées de petites feuilles étroites de couleur gris-vert, persistantes et odorantes. Durant la période allant de mars à août, de petites fleurs blanches ou rose pâle s'agrègent en capitules au sommet des tiges.

Malgré leur petite taille, les feuilles persistantes du thym se distinguent par leur résistance aux sécheresses et au froid. Elles sont étroites, linéaires, vertes sur la face supérieure et grises sur la face inférieure. Ces feuilles, associées aux fleurs hermaphrodites blanches ou roses formant des bouquets terminaux, sont utilisées pour aromatiser les recettes culinaires. Il convient de noter que les arômes dégagés peuvent varier et se révéler camphrés et puissants en fonction de l'espèce de thym utilisée.

##### 4.2. Répartition géographique

###### 4.2.1. Dans le monde

Le *Thymus* sp. (Thym) est un groupe d'herbes thérapeutiques de petite taille, originaires du bassin méditerranéen, notamment du sud de l'Italie et de l'Asie. Il appartient à la famille des Lamiaceae, qui est l'une des familles les plus vastes parmi les plantes à fleurs, comprenant près de 220 genres et 4000 espèces dans le monde (Messaoudi et al ; 2019).



**Figure 19 :** Distribution géographique du thym dans le monde (Morales, 2002).

Le genre *Thymus* L. (Lamiaceae) est considéré comme l'un des plus importants genres au sein de la famille des Lamiacées, englobant des plantes médicinales et aromatiques (MAP) utilisées dans divers domaines. Ce genre compte environ 220 espèces (Pavela et al ; 2019) originaires d'Europe et cultivées dans le bassin méditerranéen, le nord de l'Europe, ainsi que dans d'autres régions du monde telles que l'Asie, l'Amérique du Sud et l'Australie (Nabavi et al ; 2015). La région méditerranéenne est considérée comme le centre de diversité du genre *Thymus* (Bartolucci et al ; 2013) Le cercle noir représente la zone de distribution du genre *Thymus* dans le monde.

#### 4.2.2. En Algérie

L'Algérie se distingue par sa biodiversité et sa vaste étendue territoriale, ce qui en fait un réservoir important de plantes médicinales. Le genre *Thymus*, présent sur l'ensemble du littoral ainsi que dans les régions internes jusqu'aux zones arides, englobe plusieurs espèces botaniques (Hammaz et Nafa, 2017).

Sa répartition géographique est représentée dans le tableau ci-dessus :

Tableau 07 : La répartition géographique du thymus en Algérie. (Dob et al ; 2006)

Espèce	Découverte par	Localisation	Nom local
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région de Tlemcen.	Auteure
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie	Auteure
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran	-
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous-secteur de l'atlas tellien, La grande et la petite Kabylie de Skikda à la frontière tunisienne Tell constantinois.	Tizaàtarte
<i>Thymus guyoni</i>	Noé	Rare dans le sous-secteur des Hauts plateaux algérois, oranais et Constantinois.	-
<i>Thymus lancéolatus</i>	Desfontaine	Rare dans : Le secteur de l'atlas tellien (Terni de Médéa Benchicao) et dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois, Oranais (Tiaret) et constantinois	Zaàteur
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous-secteur de L' Atlas Saharien et constantinois	Tizerdite
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral.	DjertilHamry

Thymus glandulosus	Lag	Très rare dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois.	-
Thymus algériensis	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois, oranais.	DjertilZaitra
Thymus munbyanus	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord algérois.	Djertil

Pour la région algérienne, Quezel et Santa décrivent 12 espèces de Thymus dont huit sont endémiques (Dob et al ; 2006),

#### 4. Composition chimique

La composition chimique du thym est caractérisée par deux principales catégories de composés secondaires, à savoir les huiles essentielles volatiles et les polyphénols non volatils. En tant que produit naturel, les rendements en huiles essentielles et en polyphénols, ainsi que les proportions des différents constituants, peuvent varier. Ces variations sont dues à des facteurs intrinsèques tels que les variations saisonnières et ontogénétiques, ainsi qu'à des facteurs extrinsèques tels que le sol, le climat et la lumière (Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012).

### -Thymus algeriensis

#### 1. Description botanique

Le Thymus algeriensis est une plante herbacée parfumée qui représente l'épice aromatique (ElHadjal et al ; 2010). Il se reproduit par graines et peut atteindre 15 à 30 cm de haut par 40 cm de large, c'est un sous-arbuste à feuilles persistantes buissonnant à base de bois avec de petites feuilles très aromatiques gris-vert et des grappes de fleurs violettes ou roses au début de l'été. La floraison eu lieu entre avril et juin (Zouari et al ; 2011).

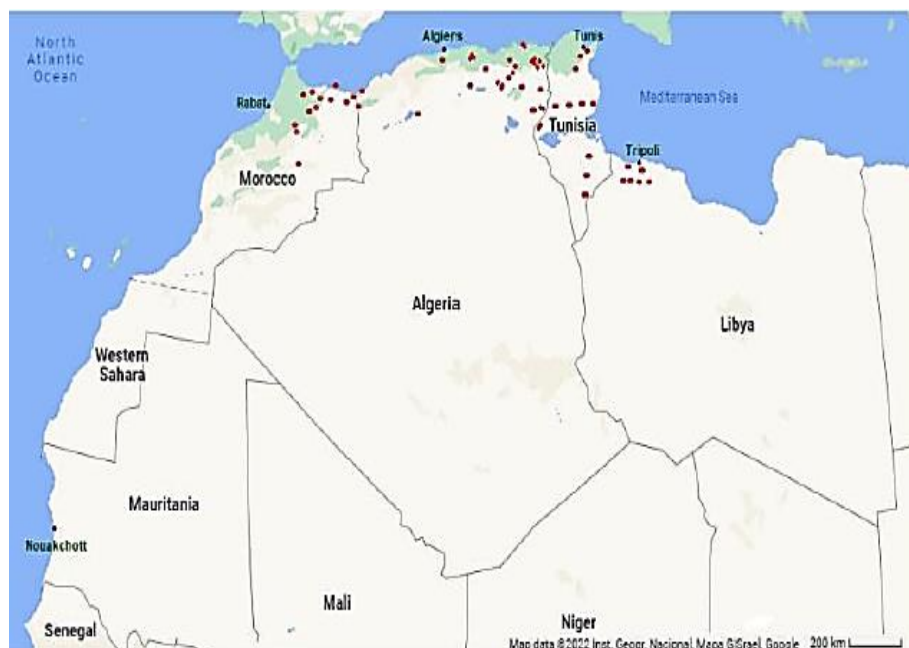
En Algérie et en Afrique du Nord, cette plante aromatique est bien connue sous le nom de « Zaater » (Khadraoui et al ; 2016).

## 2. Systématique de *Thymus algeriensis* (Quezel et Santa 1963)

- ✿ **Embranchement** : Spermaphytes
- ✿ **Sous embranchement** : Angiospermes
- ✿ **Classe** : Eudicotes
- ✿ **Sous classe** : Astérides
- ✿ **Ordre** : Lamiales
- ✿ **Famille** : Lamiacées
- ✿ **Genre** : *Thymus*
- ✿ **Espèce** : *Thymus algeriensis*

## 3. Répartition géographique

Le *Thymus algeriensis* est une espèce endémique de l'Algérie, de la Tunisie, de la Libye et du Maroc. Elle est largement répandue en Afrique du Nord et est considérée comme l'espèce la plus courante dans cette région (Sobeh et al ; 2020). En Algérie, elle est particulièrement commune dans les hauts plateaux algérois et oranais (Khlefi et Medjani, 2018).



**Figure20** : Chez Red *Thymus algeriensis* Boiss et Reut. Distribution maghrébine.

**4. Composition chimique**

En 2006, Dob et ses collaborateurs ont étudié une huile essentielle dérivée des parties aériennes de *T. algeriensis*, collectée dans la région de Media pendant la période de floraison. Cette huile essentielle contient cinquante-cinq composés qui représentent 94,3% de l'huile totale.

L'huile essentielle se caractérise par un pourcentage élevé de monoterpènes (87,8%), en particulier les monoterpènes oxygénés (79,5%). Les principaux composants de ces monoterpènes oxygénés sont le linalol (47,3%), le thymol (29,2%) et le carvacrol (1,7%). Les hydrocarbures monoterpéniques représentent 8,3% de l'huile, avec le p-cymène (6,8%) comme composé principal.

En revanche, la fraction de sesquiterpènes est inférieure (5,2%). Les hydrocarbures (3,5%), représentés principalement par le b-caryophyllène (2,9%), présentent une concentration plus élevée que les sesquiterpènes oxygénés (1,7%).



## **Chapitre III**

# **Activités anti-biofilms des huiles essentielles.**



Dans cette perspective, une étude bibliographique a été réalisée afin d'explorer les activités biologiques de trois huiles essentielles de plantes. Cette analyse s'est appuyée sur des articles scientifiques récents, permettant ainsi de recueillir des informations pertinentes sur ces substances.

Ce chapitre a pour but de former la synthèse des données récentes sur l'utilisation des 3 huiles essentielles (*Syzygium aromaticum*, *Eucalyptus globules*, *Thymus algeriensis*) pour lutter contre les biofilms des *Klebsiella pneumoniae*.

En commençant par le clou de girofle. Étant donné qu'il a toujours été développé pour ses puissantes propriétés antimicrobiennes et antibiofilm, il est utilisé en toute sécurité dans les aliments (**Weidong Qian et al ; 2020**).

Une étude préliminaire a révélé qu'il y a un composant dans cette plante qui est l'eugénol exerçant une activité antibiofilm contre *Klebsiella pneumoniae*. Cependant, le mécanisme d'action de l'eugénol contre *K. pneumoniae* reste encore inexploré (**Weidong Qian et al ; 2020**).

**L'eugénol** s'est avéré être un phytochimique bioactif important dans les huiles essentielles du clou de girofle, qui présentent diverses activités pharmacologiques.

Après divers tests et expérience, des chercheurs ont observé que ce composant (L'eugénol) a induit la mort bactérienne en endommageant la membrane cellulaire, la surface des bactéries normales était lisse, intacte et présentait des caractéristiques typiques, tandis que les bactéries traitées avec EG étaient gravement endommagées. Certaines bactéries présentaient des fuites, des structures déformées et des membranes fragmentées. (**Wei Liu et al ; 2023**).

✚ Aseel Qassim Hussein et al en 2023 ont fait une étude pour évaluer l'efficacité de combinaisons d'antibiotiques existants avec l'acide cinnamique et l'huile essentielle de clou de girofle pour inhiber les biofilms de *Klebsiella pneumoniae*. Les résultats ont montré que l'huile de clou de girofle, à quatre fois la CMI, a été la plus efficace pour empêcher la formation du biofilm, suivie de près par l'acide cinnamique à 0,25 fois la CMI. Cette huile essentielle a également réduit l'activité métabolique des biofilms. L'ajout simultané d'huile de clou de girofle et d'acide cinnamique a fortement réduit la quantité de cellules de biofilm, suggérant leur perturbation (**Aseel Qassim Hussein et al ; 2023**).

✚ Une autre étude a été faite en 2021 par Eligio Venanda Ginting et al, visait à déterminer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du Clou de girofle et de la Cannelle contre

les souches résistantes aux isolats *E. Coli* et *K. pneumoniae* producteurs de BLSE. Le Résultat de cette étude montre qu'il y'avait des changements morphologiques dans chaque cellule bactérienne testée avec un rétrécissement et une lyse cellulaire, et pour cela ont conclu que ces deux huiles essentielles ont devenues des agents efficaces contre des isolats d'*E. Coli* et *K. pneumoniae* (**Eligio Venanda Ginting et al ; 2021**).

Le composant essentiel du *Thymus* c'est le thymol qui est un composé aromatique particulièrement présent dans le thym. Dès l'Égypte Ancienne, le **Thymol** était utilisé pour la conservation des momies. Aujourd'hui, ça a bien changé heureusement et le Thymol est dans la composition de différents médicaments grâce à ses propriétés antibactérienne, antiseptique et antifongique. On le trouve par exemple en traitement contre les aphtes, les irritations de la gorge et les piqûres d'insecte.

✚ Une combinaison entre des antibiotiques de la classe des céphalosporines et des huiles essentielles du *Thymus algeriensis* et *Salvia officinalis* ont été fait par Sabrina Zeghichi-Hamri et al en 2022, contre les souches de *Klebsiella pneumoniae* et d'autres microorganismes à fin d'inhiber leurs croissances antimicrobiens et antibiofilm. Les résultats de cette étude démontrent que les huiles essentielles, combinées avec leurs Composants ou des antibiotiques, peuvent agir de manière synergique, possédant ainsi la capacité de cibler différents mécanismes d'action. Ces combinaisons pourraient être utilisées pour traiter les infections causées par des micro-organismes pathogènes résistants aux antibiotiques (**Sabrina Zeghichi-Hamri et al ; 2022**).

✚ Borel Bissondezo et al on fait une combinaison du thymol avec trois antibiotiques Aminoglycosides contre un biofilm de *Klebsiella pneumoniae* en 2021. Cette combinaison a montré une réduction de 16 à 64 fois de sa concentration minimale inhibitrice du biofilm (MBIC). Le résultat de cette étude d'association de thymol avec certains antibiotiques a révélé un effet Synergique puissant, tant dans l'inhibition de la formation de biofilm que dans la destruction du biofilm préexistant de *K. pneumoniae*. Ces résultats montrent qu'il pourrait constituer une thérapie alternative prometteuse pour résoudre le problème des infections liées au biofilm de *K. Pneumoniae* (**Borel Bissondezo et al ; 2021**).

✚ D'autre part SH Mohamed en 2018 a testé les activités d'inhibition du biofilm de chacune des huiles essentielles de menthe poivrée et du thym à fin d'inhiber/éradiquer les biofilms chez *Klebsiella pneumoniae* multirésistantes. Les Résultats ont démontré

que l'huile de menthe poivrée a montré un effet inhibiteur robuste du biofilm, provoquant une inhibition allant de 69,2 à 98,2 % à 5  $\mu\text{l ml}^{-1}$ , par contre L'huile de thym est avérée avoir la meilleure capacité d'éradication du biofilm, provoquant une éradication allant de 80,1 à 98,0 % à 10  $\mu\text{l ml}^{-1}$  et aussi il on a constaté que le menthol pur provoquait 75,3–97,5 % d'inhibition du biofilm à 2,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , tandis que le thymol provoquait 85,1–97,8 % d'éradication du biofilm à 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Onconcluqueleshuiles essentielles de thym et de menthe poivrée et leurs composants actifs sont des agents antibiofilm prometteurs seuls et/ou en association pour inhiber/éradiquer les biofilms de *K. pneumoniae* (**SH Mohamed ,2018**).

- ✚ A fin d'évaluer l'effet antibactérien de quatre huiles essentielles de *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus globulus*, *Menthapiperita* et *Thymus vulgaris*, une étude à été faite par Ramona Iseppi et al en 2020 contre des souches de bactéries à Gram négatif produisant des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) et des carbapénémases impliquées dans les infections nosocomiales humaines. L'activité des huiles essentielles a été testée contre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Leshuiles essentielles de *M. alternifolia* et *T. vulgaris* ont montré une forte activité antibactérienne, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 0,5 à 16  $\mu\text{g/mL}$  et 1 à 16  $\mu\text{g/mL}$  respectivement. Ceshuiles essentielles ont également été efficaces contre la formation de biofilms. Les résultats suggèrent que les HE de *M. alternifolia* et *T. vulgaris* pourraient être utilisées pour traiter ces infections, potentiellement en combinaison avec des antibiotiques (**Ramona Iseppi et al ; 2020**).
- ✚ Zahra Obeizia et al en 2020à démontrer l'importance de l'utilisation des huiles essentielles pour la synthèse verte facile et rapide de nanoparticules de ZnO avec moins de produits chimiques toxiques et présentant des activités biologiques intéressantes avec des applications potentielles comme alternative efficace pour lutter contre la résistance aux antibiotiques et éradiquer les biofilms bactériens de l'environnement hospitalier (**Zahra Obeizia et al ; 2020**).
- ✚ L'objectif de cette étude était l'évaluation de l'action des huiles essentielles de trois plantes médicinales connues pour leur activité antibactérienne (*Thymus serpyllum*, *Eucalyptus globulus*, *Syzygium aromaticum*) vis-à-vis des souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE

ainsi que l'effet de la combinaison de ces huiles avec les antibiotiques. Les résultats ont montré une forte activité de l'huile de thym et une activité plus modérée des huiles d'eucalyptus et de clou de girofle. Une synergie importante a été enregistrée entre l'huile essentielle de thym et l'amoxicilline + acide clavulanique. Cette synergie est traduite par une augmentation de 2 à 4 mm des zones d'inhibition par rapport aux disques d'antibiotiques et d'huiles seuls. En revanche, les résultats des combinaisons d'huiles de clou de girofle et d'eucalyptus avec les autres antibiotiques ont montré principalement un effet antagoniste. L'utilisation des huiles essentielles en combinaison avec les antibiotiques pourrait donc être une alternative à l'utilisation excessive d'antibiotiques en thérapeutique pour traiter les infections à germes multirésistantes (**Ben Bekkou Lydia et al ; 2020**).

✚ Une autre étude qui a été réalisée par Borel NdezoBisso et al en 2021 on extrait principalement de *Thymus* est avéré agir en synergie avec la Streptomycine contre les biofilms de *Klebsiella pneumoniae*. De plus, le thymol pourrait être encapsulé dans des nanoparticules de poly (acide lactique-co-glycolique) (PLGA) pour surmonter les problèmes liés à sa faible solubilité dans l'eau et sa forte volatilité. La présente étude visait à étudier l'activité antibiofilm des nanoparticules de PLGA chargées de thymol (Thy-NPs) seules et en combinaison avec la streptomycine contre les biofilms d'isolats de *K. pneumoniae*. Les résultats révèlent que les Thy-NPs ont une activité antibactérienne et antibiofilm élevée contre les isolats de *K. pneumoniae* et que leur association avec la streptomycine a un effet synergique dans l'inhibition et l'éradication des biofilms. L'activité antibiofilm de la streptomycine en particulier considérablement les valeurs MBIC et MBEC. Les analyses de la biomasse et de la cinétique confirment ces résultats et montrent l'activité bactéricide de la streptomycine en combinaison avec les Thy-NPs (**Borel NdezoBisso et al ; 2021**).

✚ Ce travail avait pour objectif d'entraver la formation de biofilm en ciblant le quorum sensing chez des bactéries pathogènes Gram négatives à l'aide de plantes médicinales qui a été faite par A. Rushdy et al en 2018, 125 isolats cliniques de bactéries Gram négatives ont été collectés et 12 espèces de plantes ont été utilisées. Les résultats indiquent que l'extrait de *Syzygium aromaticum* est révélé très efficace contre la majorité des isolats bactériens testés, inhibant le biofilm à des concentrations de 0,05 à 0,1 ml, suivi de près par *Allium sativum* avec des concentrations de 0,1 à 0,2 ml. De plus, l'extrait de *Syzygium aromaticum* a réussi à désactiver la production de signaux de détection de quorum (AHL)

dans les souches sélectionnées sans détection de signal de lactone, avec une concentration de 20 µl/ml (A. Rushdy et al ; 2018).

- ✚ L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la Concentration Minimum Inhibitrice D'Adhérence (MICA) des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus et d'Eucalyptus citriodora vis-à-vis de la bactérie *Klebsiella pneumoniae*. Les résultats ont indiqué que l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus avait une efficacité significative en termes d'inhibition de l'adhérence de la souche de *Klebsiella pneumoniae*. En revanche, l'huile essentielle d'Eucalyptus citriodora n'a pas démontré d'effet inhibiteur sur la formation de biofilm, quelles que soient les concentrations testées. Les conclusions tirées de l'étude ne soulignent que seule l'huile essentielle dérivée de l'espèce Eucalyptus globulus présentait une capacité notable à empêcher l'adhérence de la bactérie *Klebsiella pneumoniae*, offrant ainsi une perspective prometteuse en tant qu'approche alternative pour contrer les biofilms produits par cette bactérie (Maria Auxiliadora da Silva Ramalho et al ; 2020).

## 1. La lutte contre les biofilms

Dans le domaine médical, les biofilms sont responsables de nombreux dommages et il est donc essentiel de trouver des moyens efficaces et durables pour les combattre. Il y a actuellement de nombreuses recherches en cours pour prévenir la formation de biofilms et ainsi réduire les infections nosocomiales associées aux implants médicaux. Ces infections sont particulièrement difficiles à traiter lorsque des biofilms se forment sur les dispositifs médicaux. Heureusement, il existe des mesures préventives pour empêcher la formation de biofilms, ainsi que des mesures curatives pour les éliminer une fois formées. Il est donc crucial de continuer à étudier ces techniques afin de garantir la sécurité et l'efficacité des traitements médicaux. (Dupin, 2017).

### 1.1. L'hygiène

La formation de biofilms sur des implants médicaux est directement liée à la durée de leur présence dans l'organisme. En effet, plus un implant est en place depuis longtemps, plus il présente un risque de développement de biofilms. Afin de minimiser ce risque, il est impératif que la pose de l'implant soit réalisée dans des conditions d'hygiène strictes, de manière à éviter toute contamination bactérienne. (Maki, 1994).

## 1.2. L'antibiothérapie

La sélection de l'antibiotique adéquat est donc importante pour réussir à traiter une infection associée à un biofilm. Les antibiotiques pouvant pénétrer efficacement dans les biofilms et cibler les bactéries à l'intérieur sont préférables. Cependant, même ces antibiotiques peuvent être moins efficaces aux doses habituelles, nécessitant parfois des doses plus élevées pour obtenir un effet thérapeutique (**Chalvet et Rochemonteix, 2009**).

Il est également important de traiter l'infection de manière continue. L'arrêt prématuré du traitement peut favoriser la sélection de mutants résistants au(x) antibiotique(s) utilisé(s). Les mutations génétiques qui confèrent une résistance peuvent se produire spontanément dans les populations bactériennes, et un traitement interrompu peut permettre à ces mutants résistants de se développer et de provoquer une récurrence de l'infection difficile à traiter (**Römling et al ; 2014**).

En conclusion, la résistance des biofilms aux antibiotiques constitue un défi pour le traitement des infections associées à ces structures microbiennes. Une sélection adéquate de l'antibiotique et une thérapie continue sont nécessaires pour surmonter ces difficultés et prévenir la sélection de mutants résistants. De plus, de nouvelles approches thérapeutiques visant à cibler spécifiquement les bactéries au sein du biofilm et à améliorer la pénétration des antibiotiques sont en cours de développement (**Bellifa, 2014**).

## 1.3. Elimination mécanique du biofilm

Le nettoyage mécanique est l'un des moyens efficaces pour lutter contre les biofilms. Il permet de les éliminer en détachant les micro-organismes de leur support, grâce aux forces de cisaillement importantes créées (**De Chalvet De Rochemonteix, 2009**).

## 1.4. La désinfection

Cependant, il existe des méthodes pour détruire les bactéries du biofilm. Une approche consiste à utiliser des agents antimicrobiens spécifiques qui ont démontré leur efficacité contre les biofilms. Par exemple, l'utilisation du triclosan peut se révéler efficace pour réduire le nombre d'infections dues aux bactéries Gram-négatives (**Stickler, 2002**).

Il est important de noter que toutes les molécules n'ont pas la même efficacité contre les bactéries du biofilm. Certaines ne peuvent pas être efficaces du tout, voire sélectionner des individus résistants à de nombreux agents antimicrobiens. C'est le cas de l'utilisation de la

chlorexidine comme antiseptique, qui n'est pas efficace pour réduire le nombre d'infections dues aux bactéries Gram-négatives.

En conclusion, bien que de nombreux antiseptiques et désinfectants entraînent du mal à pénétrer les biofilms et à agir sur les bactéries qui s'y trouvent, l'utilisation d'agents spécifiques tels que le triclosan peut être efficace pour détruire les bactéries du biofilm. Cependant, il est essentiel de choisir ces agents avec soin afin de réduire la sélection de résistances et d'optimiser l'efficacité de la destruction des bactéries du biofilm.

### 1.5. Ultrasons et potentialisation de l'action des antibiotiques

Des études ont démontré l'action synergique des ultrasons et de la gentamicine dans la réduction des biofilms d'*Escherichia coli*, sur des modèles animaux. Les résultats de ces études ont montré de manière significative que l'association des ultrasons et de la gentamicine était plus efficace que l'administration de la gentamicine seule dans le traitement des biofilms (Carmen *et al* ; 2005).

### 1.6. Utilisation d'enzymes dégradant les exopolysaccharides de la matrice

Prenons l'exemple des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces biofilms produisent un exopolysaccharide appelé alginate, qui présente des propriétés intéressantes. En effet, il retarde la diffusion des aminosides à l'intérieur du biofilm et inhibe leur activité antimicrobienne. Cependant, si l'on ajoute une enzyme appelée alginate lyase au milieu, cette enzyme va dégrader l'alginate et augmenter la capacité de pénétration et l'activité antimicrobienne des antibiotiques (gentamicine, tobramicine) au sein du biofilm (Donlan, 2008).

### 1.7. Les vaccins

La lutte contre les biofilms est donc un objectif majeur. Cependant, les désinfectants, les antiseptiques et les antibiotiques traditionnels sont souvent inefficaces contre les biofilms aux doses habituelles. Il est alors nécessaire d'utiliser des concentrations d'antibiotiques 100 à 1000 fois plus élevées (Dupin, 2017), ce qui les rend toxiques et presque inutilisables pour les humains. La résistance des bactéries aux antibiotiques est une augmentation croissante et concerne toutes les espèces bactériennes. Ainsi, il est important

de trouver de nouvelles stratégies pour lutter contre les biofilms et prévenir la résistance aux antibiotiques (Touré, 2015).

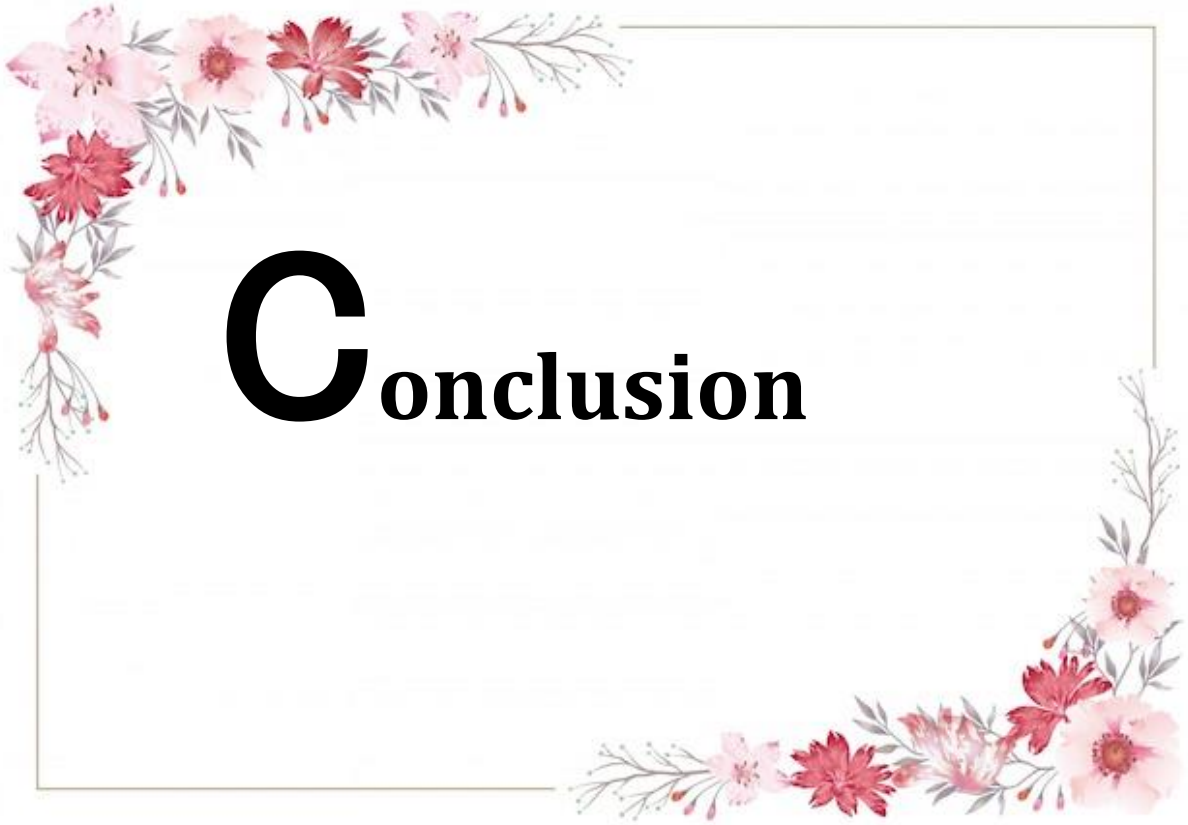
## 2. Le mode d'action des huiles essentielles sur les biofilms

L'action antibactérienne de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus pourrait être due à la composition chimique de l'huile comme impliqué dans les travaux (d'Assaggaf et al ; 2022), il est possible que l'activité antimicrobienne de l'huiles essentielles soit attribuée aux monoterpènes oxygénés, comme le 1,8-cinéole, le  $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -pinène, qui sont des constituants connus pour leurs activités antimicrobiennes. (Djennan et al ; 2011) a démontré que les composés monoterpènes oxygénés, notamment les cymènes et l'acide cinnamique étaient responsables de la désintégration de la membrane externe des bactéries, libérant des lipopolysaccharides et augmentant la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'ATP ce qui accélère ainsi la lyse

La puissance d'activité de clou de girofle pourrait s'expliquer par la composition chimique de l'huile riche en molécules volatiles actives dont l'Eugénol présent en grande quantité, sa présence pourrait justifier cette activité, selon les travaux de (Marchese et al ; 2017) il a été démontré que l'Eugénol était une molécule active dotée d'une puissante activité antimicrobienne. Les travaux de (Bolla et al ; 2011) sur l'action de l'Eugénol sur les souches bactériennes ont montré que la molécule agissait sur la membrane en inhibant l'activité des ATPase ainsi qu'un possible blocage des pompes à efflux réduisant ainsi la virulence bactérienne et empêchant le rejet de la molécule hors de la cellule.

L'activité de thymus s'expliquer par la présence du thymol en grande quantité dans leur l'huile en effet d'après les travaux de (Deeksha et al ; 2021) il a été établi que le thymol ainsi que les composé phénolique agissaient sur les bactéries gram positif et négatif, des études similaires menées par (Langeveld et coll 2014) démontrent que le thymol agis sur les bactéries en désorganisant et perturbant la membrane bactérienne en s'attachant à des cibles intracellulaires potentielles provoquant ainsi la destruction des cellules.

## des huiles essentielles



# **C**onclusion

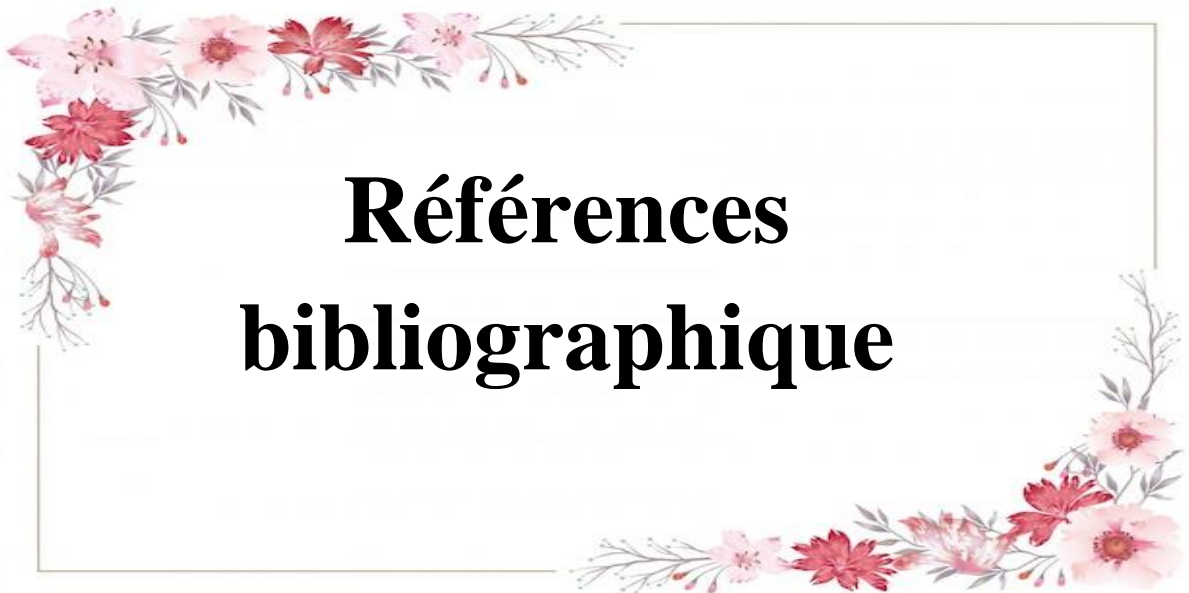
## **C**onclusion

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

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

Quoi qu'il en soit, les HE possèdent un intérêt sans équivoque pour la lutte future contre les biofilms bien que les études cliniques chez l'homme nous font défaut à l'heure actuelle, certains ont bien compris l'intérêt des huiles essentielles et leur efficacité dans le secteur médical. De même, il serait intéressant de mener des études plus approfondie et de voir l'effet des ces huiles sur d'autres microorganismes pathogènes.

Enfin, nous espérons par cette étude donner de l'importance aux plantes, car ces dernières nous réservent encore assurément beaucoup de secrets et de surprises.



# **Références bibliographique**

**A**

**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

**Agha mohammad S, Badmasti F, Solgi H, Aminzadeh Z, Khodabandelo Z, Shahcheraghi F (mars 2020).** Premier rapport de *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêta-lactamase à spectre étendu parmi les transports fécaux en Iran : grande diversité de profils de parenté clonale et de facteurs de virulence. Résistance aux médicaments microbiens ; 26 (3):261-269.

**Adam Dawson, John V. Ashurst ; Adam Dawson. (2023).** Pneumonia, *Klebsiella*. StatPearls [Internet]. Disponibles sur : [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482367/African Plant Database](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482367/AfricanPlantDatabase). Available online : <https://africanplantdatabase.ch/en/nomen/145270> (accessed on 21 June 2022).

**Afree8nish H., Javaid U., Kaleem F., Omair M., Muhammad Iqba A.K. (2011).** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz J Infect Dis; 15(4):305-311.

**ALAIN (AVRIL 2023);** Le giroflier, un trésor qui vieillit bien Biofilms bactériens et santé, 17-03-2020, disponible sur : <https://leschroniquesduvegetal.wordpress.com/2023/04/03/le-giroflier-un-tresor-qui-vieillit-bien/#sdfootnote8sym3,4%>

**Albrecht, a (2015).** Les infections nosocomiales d'origine bactérienne, ce que doit savoir le pharmacien d'officine. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. 114 p.

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

**Anderson G.G., O'Toole G.A. (2008).** Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms [en ligne]. In: Romeo T. (eds) Bacterial Biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin Heidelberg, P. 85-105.

**Anger, H. (2013).** Résistance des biofilms bactériens aux antibiotiques : mécanismes et implications cliniques. *Médecine Sciences*, 29(1), 85-88.

**Aseel Qassim Hussein, Safaa A.L. Al-Meani (2022),**Inhibitory activity of clove oil and cinnamic acid on *Klebsiella pneumonia* biofilm, *Biotechnology dep., College of Science, Anbar University, Al-Ramadi, Iraq.*

**Assaggaf, H.M.; NaceiriMrabti, H.; Rajab, B.S.; Attar, A.A.; Hamed, M.; Sheikh, R.A.; Omari, N.E.; Menyiy, N.E.; Belmehdi, O.; Mahmud, S.; Alshahrani, M.M.; Park, M.N.; Kim, B. Zengin, G.; Bouyahya, A. (2022),** Singular and Combined Effects of Essential Oil and Honey of *Eucalyptus Globulus* on Anti-Inflammatory, Antioxidant, Dermatoprotective, and Antimicrobial Properties: InVitro and InVivo Findings. *Molecules*, 27, 5121. <https://doi.org/10.3390/molecules27165121>.

**AUMERAN Claire,** Maitre de conférences - Praticien Hospitalier, Université Clermont Auvergne CHU Clermont Ferrand. **BALESTRINO Damien,** Enseignant-chercheur à l'Université Clermont-Auvergne, LMGE (Laboratoire Microorganismes : génome et environnement), UMR CNRS 6023 FORESTIER **Christiane,** Professeur des Universités, Université Clermont Auvergne, 17-03-2020, Biofilms bactériens et santé, Généré le 16/05/2023.

## **B**

**B., Pitt W. G. (2005).** Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency Ultra sound and antibiotics. *American journal of infection control*, 33(2), 78-82.

**Baerwolf S, Geffers C, Behnke M. (2002).** Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German university hospital *Shea 216.*

**BALESTRINO Damien,** Enseignant-chercheur à l'Université Clermont-Auvergne, LMGE (Laboratoire Microorganismes : génome et environnement), UMR CNRS 6023

**Barbelet S. (2015).** Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle. *Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de LORRAINE, France. 120 p.*

- Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., et Laglaoui, A. (2014).** Evaluation des propriétés antiadhésives et biocides des huiles essentielles vis-à-vis des biofilms formés sur de l'acier inoxydable. Journées Jeunes Chercheurs 3e Edition, Université Moulay Ismail, Meknès, Maroc.
- Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., et Laglaoui, A. (2014).** Evaluation des propriétés antiadhésives et biocides des huiles essentielles vis-à-vis des biofilms formés sur de l'acier inoxydable. Journées Jeunes Chercheurs 3e Edition, Université Moulay Ismail, Meknès, Maroc.
- Bartolucci, F., Peruzzi, L., & Passalacqua, N. (2013).** Typification des noms et des notes taxonomiques dans le genre *Thymus* L. (Lamiaceae). *Taxon*, 62(6), 1308-1314.
- Baudoux D.** Aromathérapie. Dunod ; 2017.
- Belkhouja H. (2016).** Effet des biomolécules extraites à partir de différentes plantes de la région de Mascara : Evaluation biochimique des marqueurs d'ostéoarticulation et de l'activité biologique. Thèse présentée pour l'obtention du grade de docteur : Sciences Biologiques : université de Mustapha Stambouli Mascara. P 27.
- Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen
- Bellifa S. (2014).** Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen.
- Ben Bekkou, Lydia, NOURI Myriam, TERRAS Taoues (2020),** thèse de mémoire, Activité des huiles essentielles seules et en combinaison avec des antibiotiques vis-à-vis des bactéries Gram négatives pathogènes
- BENABDELKADER T. (2012).** Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des Lavandes Ailées, *Lavandula stoechas* Sensus Lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Thèse de doctorat en biologie et ecophysiologie végétale. Ecole normale supérieure, Kouba. Alger
- Berh, T., Huang, X., Xiao, M., & GAO, S. (2017).** Challenges and improvement of efficacy in the prevention of microbial biofilms in dental implants. *Acta Biomaterialia*, 49, 16-27. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives 272-275. (2017).
- Betty Chaumet (novembre 201),** Transfert et distribution des pesticides dans le biofilm En lien avec les effets toxiques associés, Stockholm University

**Bjarnsholt T, Jensen P, Burmolle M, Hentzer M, Haagensen JAJ, Hougen HP, Calum H, Madsen KG, Moser C, Molin S, Hoiby N, Givskov M. 2005.** Pseudomonas aeruginosa tolerance to tobramycin, hydrogen peroxyde and polymorphonuclear leukocytes is quorum sensing dependent. Microbiology, 151 :2, pp 373-383.

**Bolla, P. A., Carasi, P., Bolla, M. L., De Antoni, G. L., & de Urraza, P. J. (2011).** Membrane leakiness in Bacillus subtilis 168 induced by the  $\beta$ -caryophyllene/caryophyllene oxide mixture. Current Microbiology, 63(4), 394-398.

**BorelBissoNdezo, Christian Ramsès, TokamKuaté, Jean Paul Dzoyem (2021),** Synergistic Antibiofilm Efficacy of Thymol and Piperine in Combination with Three Aminoglycoside Antibiotics against Klebsiella pneumoniae Biofilms.

**Boukhatem Mohamed Nadjib, FERHAT Amine et KAMELI Abdelkarim (2019).** Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : Revue de littérature. Revus Agrobiologia : 1653-1659.

**Bouزيد, D. (2018).** Évaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle d'une plante endémique Hélichrysum italicum (Roth) G. DON. Thèse de doctorat. Université de setif. 88p.

**Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007).** Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, Dijon. P.131-164.

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

**Brisse S., Verhoef J. (2001).** Phylogenetic diversity of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping... Int J Syst Evol Microbiol 51, 915–924.

## C

**C.E., Whitchurch C.B., Schembri M.A., Chuah M.L.C., Liang Z.X., Wijburg O.L.,**

**Cadavid E et Echeverri F. (2019).** The Search for Natural Inhibitors of Biofilm Formation.

**Carmen J. C., Roeder B. L., Nelson J. L., Ogilvie R. L. R., Robison R. A., Schaalje G. B., Pitt W. G. (2005).** Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics. American journal of infection control, 33(2), 78-82.

**Characklis W.G. (1973).** Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. Water Research. 7, pp 1249-1258.

**Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hébraud M. et Bernardi T. (2007).** Un **Christensen GD., Simpson WA., Bisno AL., Beachy EH. (1982).** Adherence of biofilm producing strains of Staphylococci epidermidis to smooth surfaces. Infection and Immunity 37: 318-326

**Chung P.Y. (2016).** The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. FEMS Microbiology Letters. Cliniquement pertinents. Revues de microbiologie clinique, 15 (2), 167-193. Concern. Food Control. Vol 31, 572-585. Inhibitors. Biotechnology Reports. Vol 30, e00613 culture et entretien du Thym (Thymus), disponible sur:<https://www.conservation-nature.fr/plantes/thymus/8>

**Clutterbuck, AL., Woods, E., Knottenbelt,D., Clegg, PD., Cochrane ,CA.,Percival ,SL.(2007).**Biofilms and their relevance to veterinary medicine. Veterinary Microbiology;121(1-2): 1-17.

**Costerton et coll. 1973.** How bacteria stick. Sci.Am. 238:86-95).

**Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R. et Lappin-Scott H. M. (1995).** Microbial biofilms. Annual Review of Microbiology. 49(1), pp 711-745.

**Costerton J.W. (1999).** Introduction to biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents. 11, pp 217-721.

**COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP (1999),** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284, 1318-1322.nouveau dispositif d'évaluation rapide du potentiel de formation de biofilm par les bactéries. Microbiological Methods. 68 :605–612. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2006.11.010>.

## **D**

**DE CHALVET DE ROCHEMONTEIX A. (2009).** Les biofilms et la peau. Thèse de doctorat Vétérinaire. Faculté de Médecine de Créteil. France.

**De Chalvet de Rochemonteix, C. (2009).** Épidémiologie des infections liées aux biomatériaux. Medecinesciences : M/S, 25(2), 179-186.

**De Lisi, A., Angelo, G., Simona, C., & Antonio, E. (2011).** Différents écotypes de thym : variations morphologiques, compositions en huiles essentielles distinctes, chémotypes spécifiques. *Revue de la Botanique Médicinale et Aromatique*, 45(2), 87-102.

**De Lisi, A., Tedone, L., Montesano, V., Sarli, G., & Negro, D. (2011).** Chemical characterisation of *Thymus* populations belonging from Southern Italy. *Food Chemistry*, 125(4), 1284-1286

**Deeksha Salaria, Rajan Rolta, Chirag N. Patel, Kamal Dev, Anuradha Sourirajan & Vikas Kumar (2021):** In vitro and in silico analysis of *Thymus serpyllum* essential oil as bioactivity enhancer of antibacterial and antifungal agents, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, DOI: 10.1080/07391102.2021.1943530.

**Dekker JP, Frank KM, Youn JH, Drake SK, Weingarten RA, Lau AF (2016)** . Clinical Performance of a Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Method for Detection of Certain blaKPC-Containing Plasmids. *J Clin Microbiol.* ; 54(1) :35-42. Doi : 10.1128/JCM.01643-15.

**Djelloul Daouadji, S. (2010).** Détection de biofilm à staphylocoques sur cathéters veineux. Mémoire de Magister. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.

**Djenane D, Yangüela J, Amrouche T, Boubrit S, Boussad N, Roncalés P. (2011)** Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globulus*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* O157 :H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Sci Technol Int. Dec*; 17(6):505-15. Doi: 10.1177/1082013211398803.

**Dob T., Darhmane D., Benabdelkader T., Chelgoum C. (2006)** Studies on the essential oils and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss & Reut. *Int. J. Aromath.*, 16 (2), 95-100.

**DOLATOWSKI Z. J., STADNIK J. et STASIAK D. (2007).** Applications of ultrasound in food technology. *ACTA Scientiarum Polonorum*. 63(6): 89–99

**Donlan R. M. (2008).** Biofilms on central venous catheters: is eradication possible in bacterial biofilms (pp. 133-161). Springer, Berlin, Heidelberg.

**Donlan R.M. (2001).** Biofilms and device-associated infections. Emerging infectious diseases, 7(2), 277.

**Donlan R.M., et Costerton J.W., (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. ClinicalMicrobiologyReviews, 15 : 67-193.

**Dupin A. (2017).** Intérêts des huiles essentielles dans la lutte contre l'antibio-résistance Induite par les biofilms (thèse de doctorat).

## **E**

**Eligio Venanda Ginting, Endah Retnangrum, Dyah Ayu Windiasih.(2021).** Activité antibactérienne de l'huile essentielle de clou de girofle et de cannelle contre les bactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu.

**Eucalyptus globules, disponible sur:**<https://www.dieti-natura.com/plantes-actifs/eucalyptus-globulus.html>

## **F**

**Fevre C., Passet V., Weill F. X., Grimont P. A., Brisse S. (2005).** Variants of the Klebsiella pneumoniae OKP chromosomal beta-lactamase are divided into two main groups, OKP-A and OKP-B. Antimicrob Agents Chemother 49, 5149–5152.

**Filloux A. Et Vallet I., (2003).** Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. Médecine / Sciences, 19, 77-83.

**FORESTIER Christiane,** Professeur Des Universités, Université Clermont Auvergne.

**Frenay J, R. F., Hansen W, and Bollet TC. (2000).** Précis de bactériologie clinique.

## **G**

**Gazengel JM, Orecchioni AM. (2013).** Le préparateur en pharmacie. 2e édition. Paris : de Lavoisier. Genes from environmental to clinically important bacteria. Current Opinion in Microbiology. Vol 45, 131-139.

**Ghedira K., Goetz P. et Le Jeune R. (2010).** *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry (Myrtaceae) Giroflier. *Phytothérapie*, 8(1) : 37-43.

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

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

## H

**Hamdani, K., Ayachi, A., & Zarrouk, H. (2014).** Les utilisations du genre *Thymus* en tant qu'épice et conservateur alimentaire, ainsi que ses propriétés protectrices et curatives dans de nombreux produits alimentaires. *Revue de la Recherche en Alimentation et Nutrition*, 58(3), 275-292.

**Hammaz, F., & Nafa, S. (2017).** Contribution à l'essai de fabrication de pâte de volaille à base de conservateurs naturels (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).

**Haras, D. (2005).** Résistance des biofilms bactériens aux agents antimicrobiens. *Bulletin de l'Académie nationale de médecine*, 189(7), 1393-1402.

**Henson, S.P., et al. (2017).** Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Invasive Infections over a Decade at Kilifi County Hospital in Kenya. *Int. J. Med. Microbiol*, 307, 422-429. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.07.006>.

**HERARD A. (1998).** Rôle du biofilm en Urologie. *Progrès en Urologie* 8, 413-414 Service d'Urologie, Centre Hospitalier Universitaire de Reims, France.

**Heukelekian H. et Heller A. (1940).** Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology* 40:547-558.

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

**Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, Jenney A, Connor TR, Hsu LY, Severin J, Brisse S, Cao H, Wilksch J, Gorrie C, Schultz MB, Edwards DJ, Nguyen KV, Nguyen TV, Dao TT, Mensink M, Minh VL, Nhu NT, Schultz C, Kuntaman K, Newton PN, Moore CE, Strugnell RA, Thomson NR.**

(2015), Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. Proc Natl Acad Sci USA 112 : E3574–E3581.

## I

**Imlen gan (2016), Cours écosystème et biofilm (Les biofilms dans les environnements**

Naturels et artificiels)

**Indranil Samanta, Samiran Bandyopadhyay (2020), en Résistance aux antimicrobiens en agriculture,**

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

## J

**Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., & Das, C. R. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. Journal of the Chinese Medical Association, 81(1), 7-11.**

**Janda, J. M., & Abbott, S. L. ,(2006). “The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*,” The Enterobacteria, 2nd ed. 115-129. Washington, USA: ASM Press.**

**Jenney A.W., Lithgow T et Strugnell R.A. (2011).MrkH, a Novel c-di-GMP-Dependent Transcriptional Activator, Controls *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Formation by Regulating Type 3 Fimbriae Expression. PlosPathogens. Vol 7 (8), e1002204**

**Jesus Cardenas ,médecin, ancien directeur médical , Girofle (Validation médicale :27 janvier 2017)**

**John V. Ashurst; Adam Dawson. (2023).Pneumonia, *Klebsiella*. StatPearls [Internet]. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482367/>**

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

**Joly B., & Reynaud A. 2003.** Entérobactéries : systématiques et méthodes d'analyses. Techniques et Documentation, Paris, p356.

**Jondle CN, Gupta K, Mishra BB, Sharma J.** L'infection à *Klebsiella pneumoniae* des neutrophiles murins altère leur clairance efférocitaire en modulant la machinerie de mort cellulaire. *PLoSPathog.* 2018 octobre; 14 (10): e1007338. [Article PMC gratuit] [PubMed]

**Jones H.C., Roth, I.L. et Sanders W.M. (1969).** Electron microscopic study of a slime layer.

**Jones, C. H., & Isaacson, R. E. (1983).** Hierarchy of iron uptake systems: *Yersinia enterocolitica* and *Pseudomonas aeruginosa* contain a new Fc receptor protein. *Infection and immunity*, 41(1), 346-351.

**Jouenne T. (2008).** Biofilms bactériens. 14. *Journal of Bacteriology.* 99 :316-325.

## **K**

**Kaabéche, M. 2013.** La flore d'Algérie : ressource de développement durable ou source de biopiraterie ? The first International Seminar on Medicinal Plants, Health and Environment (SI-PMSE' 13), University of M'sila, October 20-21-2013

**Kara Terki, I. (2014).** Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

**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*

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

**Kukavica-Ibrulj I. (2007).** Chapitre 1. Introduction. Collection mémoires et thèses électroniques. Université Laval. Québec, Canada.

## **L**

**LAGUNEZ RIVERA L. (2006).** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat. Institut national polytechnique de Toulouse.

**Lamamra, M. (2018).** Activités biologiques et composition chimique des huiles essentielles d'*Ammiopsis aristidis* Coss. (Syn. *Daucus aristidis* Coss.) et d'*Achillea santolinoides* Lag. Université de setif. 92 p.

**Langeveld. Wendy T, Veldhuizen. Edwin J.A. & Burt. Sara A., (2014)** Synergy between essential oil components and antibiotics: a review, *Crit. Rev. Microbiol.* ,40 :1,76-94, DOI :10.3109/1040841X.763219.

**Le Minor L and Véron M. 1989.** Bactériologie médicale, 2ème édition, Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 2 :428-432.

**Lebeaux D, Ghigo JM & Beloin C (2014)** Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev.* Sep ;78(3) :510-543. Doi : 10.1128/MMBR.00013-14

**Lebeaux D., Lucet J.-C., Barbier F. S. (2016).** Nouvelles recommandations pour les infections associées au biofilm : implications en réanimation. *Réanimation*, 25(3), P 308–317. DOI 10.1007/s13546-016-1182-7.

**Liesse Iyamba J. M., Takaisi-Kikuni N.B., Dulanto S., Dehaye J.P. (2012):** Study of the Adhesion of Clinical Strains of *Staphylococcus aureus* on an Abiotic Surface Using the Biofilm Ring Test. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology.* 3, 547-556.

**Liesse Iyamba J-M. (2012).** Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.

## M

**Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., & Nabavi, S. F. (2017).** Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol : A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(6), 668-689.

**Maria Auxiliadora da Silva Ramalho, Bernadette Santos, Daniel Fernandes Ramalho, Saraghina Maria Donato da Cunha, Raline Mendonça dos Anjos, Heloisa Mara**

**Batista Fernandes de Oliveira, Alesón Pereira de Sousa, Abrahão Alves de Oliveira Filho (2020)**, Activité antiadhérente des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus et d'Eucalyptus citriodora contre les souches de *Klebsiella pneumoniae*.

**Maria Eduarda Souza Guerra, Giulia Destro, Brenda Vieira, Alice S Lima, Lucio Fabio Caldas Ferraz, Anders P. Hakansson, Michelle Darrieux, Thiago Rojas Converso (1 mai 2022)**, Biofilms de *Klebsiella pneumoniae* et leur rôle dans la pathogénèse de la maladie. **Disponible sur :** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35646720/>

**Marouf, A., & Tremblin, G. (2015)**. Présence et abondance des huiles essentielles dans différentes familles de plantes. *Revue de Botanique*, 42(3), 123-136.

**Marouf, A., Tremblin, G. (2015)**. Abrégé de biochimie appliquée. EDP sciences

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

**Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006)**. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24 (1):25-9

**Maki D. G. (1994)**. Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention, and management. *Infections associated with indwelling medical devices*, 2, 155-21

**Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006)**. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 24 (1):25- 9

**McInerney JO, Hall RJ, Whelan FJ, Ou Y, Domingo-Sananes MR (jul 2020)**. Horizontal Gene Transfer as a Source of Conflict and Cooperation in Prokaryotes. *Front Microbiol.* 17 ;11 :1569. Doi : 10.3389/fmicb.2020.01569

**Marchal M. (2010)**. Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat. Université de Strasbourg, France.

**Messaoudi, M., Benreguiég, M., Merah, M., & Messaoudi, Z. A. (2019)**. Antibacterial effects of *Thymus algeriensis* extracts on some pathogenic bacteria. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 41, e48548-e48548.

**Meyer, S. Reeb, C. Bosdeveix, R. 2004**. Botanique, Biologie et Physiologie Végétales. Editions Maloine, Paris.

**Michael J Federle, Breah LaSarre (mars 2013)**, Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens.

**MICHEL CARON**, INGÉNIEUR AGRICOLE, LE 6 JANVIER 2011, Eucalyptus : qu'est-ce que c'est ? Microbial biofilm formation : a need to act. Journal of internal medicine, 276(2), 98-110.

**Mokkadem, A. 1999**. Cause de dégradation des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie. Vie et Nature, 7, 24–26.

**Morales, R. 2002**. The history, botany and taxonomy of the genus Thymus. In : Thyme : the genus.

**Moreau B In Ghabrier JY. (2010)**. Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat : pharmacie : Université Henri Poincaré-Nancy1 France. P 165.

**Muras A., Parga A., Mayer C., Otero.A(2021)** Utilisation de stratégies d'inhibition de détection de quorum pour contrôler le micro-encrassement. Mar. Drogues.; 19h74 doi: 10.3390/md19020074. [ Article PMC gratuit] [ PubMed] [ CrossRef] [ Google Scholar]

**Murphy C.N et Clegg S. (2012)**. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. Future Microbiology. Vol 7 (8), 991-1002. Thymus. Ed. Taylor & Francis, London. pp. 1-43.

## N

**Nabavi, S. M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., & Nabavi, S.F. (2015)**. Plants belonging to the genus Thymus as antibacterial agents: From farm to pharmacy. Food chemistry, 173, 339-347.

**Nadji N., Mizou A. (2015)**. Détection de la formation de biofilms chez les isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* [en ligne]. Mémoire de Master : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes. Constantine : Université des Frères Mentouri Constantine, 47 P.

**Niu, C., & Gilbert, E. S. (2004)**. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. Applied and Environmental Microbiology, 70(12), 6951-6956.

**Nagant C. (2013).** Contribution à la recherche de nouveaux agents' antibactériens actifs sur les biofilms de *P. aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France.

**NagaveniS, Rajeshwari H., Ajay Kumar Oli., Patil S.A., AND KelmaniChandrakanth R. (2010).** Evaluation of biofilm forming ability of the multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *The Bioscan* ; 5(4) : 563-566

**Naouel, O. (2015).** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et persil. Thèse de doctorat en chimie organique, université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. 198p.

**Newman DJ, Cragg GM. (2007).** Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, *Journal of Natural Products*, vol. 70, n° 3, p 461-477.

**Nouioua, A. 2010.** Biodiversité ET ressources phytogénétiques d'un écosystème forestier « *Paeoniamascula (L.) Mill.* ». Pour l'obtention du diplôme de Magister, Option : Biodiversité et gestion des écosystèmes, Université Ferhat Abbas de Sétif, 65 p.

## O

**Ofek, I., Beachey, E. H., Jefferson, W., & Campbell, G. L. (1978).** Attachment of Pili from *Escherichia Coli* to Human Urinary Tract Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 22(1), 30-35.8

**Olivia P, Duddy, Bonnie L, Bassler 2021.** Quorum sensing across bacterial and viral domains, *journal plos pathogens*

**Ouis, N. (2015).** Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, des fenouils et de persil. Diss. Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bella-Oran, Alge.

## P

**Ofek I, Beachey EH. (1978).** Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 22(1) :247-254.

**Pavela, R., et al. (2019).**Le genre *Thymus L.* (Lamiaceae) : une perspective sur ses plantes médicinales et aromatiques (MAP). *Journal of Ethnopharmacology*, 238, 111876.

**Paeoniamascula (L.) Mill.** ». Pour l'obtention du diplôme de Magister, Option : Biodiversité et gestion des écosystèmes, Université Ferhat Abbas de Sétif, 65 p. biopiraterie ? The first International Seminar on Medicinal Plants, Health and Editions Maloine, Paris.

**Perrin, C. (2009).** Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'*Escherichia coli* K-12. L'Université Lyon I - Claude Bernard, France.

**Podschun, R, Penner I, and U. Ullmann. (1992).** Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorpho nuclear leucocytes- *Microb pathogene*-1992; 13 :371-379.

## Q

**Queck SY, Weitere M, Moreno AM, Rice SA, Kjelleberg S. 2006.** The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environmental Microbiology*, 8:6, and pp 1017-1025

## R

**RadhiaAitfellaLahlou, Nsevolo Samba,Pedro Soeiro [...] Maria Isabel Ismael (octobre 2022), Figure de:** Chez *Red Tymusalgeriensis*Boisis et Reut. Distribution maghrébine, disponible sur le site : [https://www.researchgate.net/figure/In-Red-Thymus-algeriensis-Boiss-and-R2eut-Maghreb-distribution-Coordinates-N26\\_fig1\\_364323877](https://www.researchgate.net/figure/In-Red-Thymus-algeriensis-Boiss-and-R2eut-Maghreb-distribution-Coordinates-N26_fig1_364323877)

**Ramona Iseppi, Alessandro Di Cerbo, Piero Aloisi, Mattia Manelli, VéroniquePellesi, Cinzia Provenzano, Stefania Camellini, Patrizia Messi, Carla Sabia (2020),** In Vitro Activity of Essential Oils Against Planktonic and Biofilm Cells of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)/Carbapenamase-Producing Gram-Negative Bacteria Involved in Human Nosocomial Infections

**Rewatkar A. R., Wadher B. J. (2013).** *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*- Biofilm Formation Methods. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. Volume 8, Issue 5 (Nov. – Dec. 2013), PP 36-40.

**Richards JJ, Melander C. 2009;** controlling bacterial biofilms. *ChemBioChem*10 :2287–2294. [PubMed] [Google Scholar] ; Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique, *Can J VetRes.* 2014 Apr ; 78(2) : 110–116.

**Rochemonteix, A. de C. (2009).** Les biofilms et la peau. Thèse pour le doctorat vétérinaire, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort Paris.

**Rushdy, Fatma, A.A. Shaban, Zeinab. M. H. Kheiralla, Abeer, Khaled, Z. El-Baghdady (2018),** Inhibition of Biofilm Formation in Some Pathogenic Gram Negative Bacteria by Anti-Quorum Sensing Compounds, otany department, Faculty of women for Arts, Science and Education, Ain Shams University

**Römling U., Kjelleberg S., Normark S., Nyman L., Uhlin B. E., Åkerlund B. (2014).** Microbial biofilm formation: a need to act. *Journal of internal medicine*, 276(2), 98-110. Aromatiques médicinales de Côte d'Ivoire (thèse de doctorat). Biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *Journal of applied*

**Roux A. Et Chigo J-M (2006).** Les biofilms bactériens. Communication, *Bull. Acad. Vêt.*, 261-268

**Roux, A., & Ghigo, J. M. (2006).** Utilisation des biofilms bactériens pour l'étude des mécanismes de transfert horizontal de gènes. *Médecine/Sciences*, 22(11), 937-943.

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

## **S**

**Sabrina Zeghichi-Hamri, Fatiha Bedjou. (2022).** Effets antimicrobiens des combinaisons entre les huiles essentielles et les antibiotiques.

**Sanogo R. (2006).** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako-Mali. P 53. Théophile et l'équipe de la compagnie des Sens. « HISTOIRE DES HUILES ESSENTIELLES », [EN LIGNE] ,2019. [<https://www.compagnie-des-sens.fr/histoire-des-huiles-essentielles/>]. (MAI 2022).

**Saur, T. (2014).** Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi-espèces : De l'adhésion au biofilm mature. Thèse de doctorat. Université Montpellier 2(Sciences et Techniques).215.

- Sebghati, T. A., T. K. Korhonen, D. B. Hornick, and S. Clegg. (1998).** Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of Klebsiella strains. *Infect.Immun.* 66 :2887-2894.
- SH Mohamed, M S M Mohamed, MS Khalil, M Azmy, MI Mabrouk (2018),**Combinaison d'huile essentielle et de ciprofloxacine pour inhiber/éradiquer les biofilms chez Klebsiella pneumoniae multirésistant.
- Soussereau, L. (2012).** Résistance aux antibiotiques : les biofilms bactériens, des forteresses imprenables ? *Revue Francophone des Laboratoires*, 2012(442), 49-56.
- Srey S., Jahid I.K et Ha S.D. (2013).** Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control.* Vol 31, 572-585.
- Stahl-Biskup, E., & Venskutonis, R. P. (2012).** Thyme. In *Handbook of herbs and spices* (pp. 499-525). Woodhead Publishing.
- Stickler D. J. (2002).** Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to Biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *Journal of applied microbiology*, 92, 163S-70S.
- Sutherland I.W. (2001).** The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology.* 9, 222-227.

## **T**

- Taj, Y. Essa, F. Aziz F. Shahana Kazmi U. (2012).** Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of Staphylococcus aureus. *J Infect Dev. Ctries* ; 5(6) :403- 409.
- Théophane et l'équipe de la compagnie des Sens (MAI 2022).** « HISTOIRE DES HUILES ESSENTIELLES », [EN LIGNE] ,2019. [<https://www.compagnie-des-sens.fr/histoire-des-huiles-essentielles/>].
- Theophane, J. et al. (2019).** History of Essential Oils. In: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier.
- Toure D. (2015).** Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes Aromatiques medicinales de côte d'ivoire (thèse de doctorat). *Microbiological Research.* Vol 251, 126829.

**Touhami, A. (2017).** Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différents genres *Thymus* récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes de développement. Thèse de doctorat. Université –Badji Mokhtar. Annaba.

## V

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

**VEILLET S., TOMAO V. et CHEMAT F. (2010).** Ultrasounds assisted maceration: An original procedure for direct aromatisation of olive oil with basil. Food Chemistry. Volume 123. Issue 3, pp : 563-958.

**Véronique Julia,** Publié le lundi 5 août 2019 à 07h03. Une bactérie très dangereuse se propage dans les hôpitaux européens, Microbiological Research. Vol 251, 126829. *Vêt*, 261-268, vétérinaire de Maisons-Alfort. Vol 45, 131-139.

## W

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

**Weidong Qian, Soleil de Zhaohuan, Ting Wang, Min Yang, Miao Liu, Jiang Zhang, Yongdong Li (2020),** Activité antimicrobienne de l'eugénol contre *Klebsiella pneumoniae* résistante aux carbapénèmes et son effet sur les biofilms.

**Wei Liu, Guang Chen, Keke Dou, Bingcheng Yi, Danyang Wang, Qihui Zhou, corresponding author, \* and Yunbo Sun corresponding author (2023),** Eugenol eliminates carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* via reactive oxygen species mechanism.

**Williams P, and Thomas JM. (1990).** The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. Rev Med Microbiol. 1990 ;1 :196-204.

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

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

**Würker, M., Stumpe, S., Stiesch, M., Braden, B., Weidenbach, H., & Bremer, E. (1990).** Molecular characterization of a cell-surface-exposed polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 172(12), 7725-7732.

**Würker M., Beuth J., Ko H. L., Przondo-Mordarska A., Pulverer G. (1990).**Type of fimbriation determines adherence of *Klebsiella* bacteria to human epithelial cells. *Zentralblatt für Bakteriologie*. 274(2): 239-245.

**Wyres K.L et Holt K.E. (2018).** *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance.

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

## Y

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

**Yannick D.N. Tremblay, SkanderHathroubi, et Mario Jacques, Shala, A. Y., Gururani, M. A. (2021).** Phytochemical Properties and Diverse Beneficial Roles of *Eucalyptus globules* Labill: A Review. *Horticulturae*, 7(11), 450

**Yannick DN Tremblay, SkanderHathroubi, Mario Jacques (Jan 2014),** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique.

## **Z**

**Zahra Obeizia, Houneida Ben bouzid, Siham Ouchenane, Deniz yilmaz, Mustafa Culha, Mohamed Bououdina. (2020).** Biosynthèse de nanoparticules d'oxyde de zinc à partir d'huile essentielle d'Eucalyptusglobulus aux activités antimicrobiennes et anti-biofilm.

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

**ZOBELL CE (1943)** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol., 46, 39-56.