

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة امحمد بوقرة-بومرداس

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA BOUMERDES



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master académique
en Sciences de la Nature et de la Vie

Option : biotechnologie microbienne

**L'effet des extraits de *Lavandula officinalis* sur l'inhibition de la
formation de biofilms formés par *Klebsiella pneumoniae* isolée des
infections urinaires**

Réalisé par : DOUDAH Hassiba

Soutenu le 30/06/2016 Devant le jury composé de :

Mme. BEHIDJ. N

M. ARAB K.

Mlle AFIF CHAOUCHE T.

Mme LAOUFI R.

Professeur

Professeur

Docteur

Maitre assistant A

UMBB

UMBB

UMBB

UMBB

Présidente

Promoteur

Co-encadreur

Examinatrice

Année Universitaire : 2015/2016.



Remerciements

Mon infinie gratitude et mes remerciements vont à l'endroit de M. Arab K, qui m'a fait l'honneur d'encadrer ce travail et lequel il n'a ménagé aucun effort malgré ses nombreuses responsabilités.

Mes remerciements et mes profondes considérations vont à l'endroit de Mlle Afif Chaouche Thanina, co-encadreur, qui a accepté de donner des critiques sur ce mémoire et de m'éclairer avec leurs commentaires.

Mes profonds respects et remerciement vont vers le responsable de la spécialité BTM de l'université de Boumerdes, pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette formation de Master.

J'exprime mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance à Mme. Behidj N, qui m'a honoré de sa présence en acceptant de présider le jury de cette soutenance.

Je remercie également Mme LAOUFI R., examinatrice, d'avoir contribué à l'enrichissement de ce travail.

Au responsable du laboratoire de l'hôpital de Thenia, qui accepté de m'accueillir, et a facilité mon intégration dans le milieu de la pratique, j'exprime mes gratitudes.

Enfin, mes remerciements vont vers toutes les personnes qui, de près ou deloin m'ont apportés leur soutien, leur conseil et leur contribution dans l'édification de ce mémoire.



DÉDICACE

Les louanges sont à Allah seigneur des mondes qui ma comblé de grâce en me permettant d'achever en bonne santé ce modeste travail que je dédie :

A ceux que j'aime du fond de mon cœur, à qui je dois la vie et qui n'ont cessé, à aucun moment, de me soutenir et de m'encourager par leurs prières et leurs sacrifices : Mes cher parents ;

A mon mari et à mon fils Ayoub pour leurs multiples encouragements et leur patience. Qu'ils trouvent ici toute mon affection et tout mon amour.

A mes beaux-parents pour leurs précieux encouragements.

A mes frères et mes sœurs pour leurs amours et leurs aides.

A mes beaux-frères et belles sœurs pour leurs conseils.

A toute ma famille et à toute mes amies.

A toute la promotion de biotechnologie microbienne (BTM) 2015-2016.

Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	
I. les biofilms bactériens	3
1. Historique.....	3
2. Définition.....	4
3. Les étapes de formation d'un biofilm	4
3.1 Adhésion réversible.....	4
3.2 Adhésion irréversible	4
3.3 Formation de microcolonies	5
3.4 Maturation du biofilm	5
3.5 Dispersion du biofilm	5
4. Les facteurs influençant la formation du biofilm	6
4.1 La surface	6
4.2 Les caractéristiques du milieu	7
4.3 Propriété des cellules	7
5. Régulation de la formation des biofilms : le quorum sensing	8
5.1 Définition et mécanismes	8
6. Bactéries formatrices de biofilm : <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
6.1 Taxonomie	9
6.2 Caractères biochimiques	9
6.3 Structure de la surface de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
6.3.1 La capsule	10
6.3.2 Les fimbriae (pili)	10
✓ Pili de type I	11
✓ Pili de type III	11
6.4 Epidémiologie	11
II. les antibiotiques	
1. Définition	12
2. Types d'antibiotiques	12
2.1 Les β -lactamines	12
2.2. Les aminosides	12
2.3. Les pénicols	13
2.4. Les quinolones	13
2.5. Les monobactames	13
3. Résistances aux ATB	13
3.1 Résistance naturelle	14

3.2. Résistance acquise	14
-------------------------------	----

III. les huiles essentielles et les composés phénoliques

1. La plante étudiée : <i>Lavandula officinalis</i>	15
---	----

1.1. Taxonomie	15
----------------------	----

2. Généralités sur les extraits étudiés	15
---	----

2.1. Les huiles essentielles	15
------------------------------------	----

2.2. Les polyphénols	16
----------------------------	----

3. Données sur l'huile essentielle de <i>Lavandula officinalis</i>	16
--	----

3.1. Composition chimique	16
---------------------------------	----

3.2 Propriétés physico chimiques	16
--	----

3.3. Domaines d'utilisation	17
-----------------------------------	----

3.3.1. Parfumerie et cosmétiques	17
--	----

3.3.2. Phytothérapie	17
----------------------------	----

3.3.2.1 Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles	17
---	----

4. Données sur les composés phénoliques	18
---	----

4.1. Composition chimique	18
---------------------------------	----

4.2. Domaines d'utilisation	19
-----------------------------------	----

4.2. 1. Utilisation thérapeutique	19
---	----

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1. Extractions	20
----------------------	----

1.1. Extraction des huiles essentielles	20
---	----

1.2. Procédé d'extraction	20
---------------------------------	----

1.3. Conservation de l'huile essentielle obtenue	21
--	----

1.4. Détermination du rendement d'extraction	21
--	----

1.5. Extraction des polyphénols	21
---------------------------------------	----

1.6. Dosage	22
-------------------	----

2. Activités antimicrobienne des extraits de <i>Lavandula officinalis</i>	22
---	----

3. Concentration minimales inhibitrices	23
---	----

4. Prélèvements	23
-----------------------	----

4.1. Isolement et purification	23
--------------------------------------	----

4.2. Identification	23
---------------------------	----

4.2.1. Caractères macroscopiques	24
--	----

4.2.2. Caractères microscopiques (Gram)	24
---	----

4.2.3. Identification par galerie classique	24
---	----

4.2.3.1. Milieu TSI	24
---------------------------	----

4.2.3.2. Milieu citrate de Simmons	24
--	----

4.2.3.3. Milieu de clarck et lubs	24
---	----

4.2.3.3.1. Réaction de Vosges-Proskauer (VP)	24
--	----

4.2.3.3.2. Réaction ou rouge de méthyle (RM)	25
--	----

4.2.3.4. Mannitol	25
-------------------------	----

5. Détection de la capsule	25
5.1. Technique	25
6. AntibioGramme	26
6.1. Principe	26
6.2. Technique	26
7. Evaluation de la formation de biofilm in vitro	27
7.1. La méthode tube (TM)	27
7.2. Technique	27
7.3. Lecture	27
8. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices Des Biofilms	27
Chapitre 3 : Résultats et discussion	
1. Extraction des huiles essentielles	29
2. Extraction des polyphénols	29
3. Isolement et identification des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
3.1 Aspect macroscopique	29
3.2. Aspect microscopique	30
3.3. Caractères biochimiques	30
4. Détection de la présence de la capsule des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
5. Résistances aux antibiotiques	32
6. Activité antimicrobienne des extraits de la lavande	34
7. Evaluation de la formation du biofilm in vitro par la méthode tube (TM)	35
8. Etude de l'effet des extraits de <i>Lavandula officinalis</i> sur la forme planctonique et biofilm des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
Conclusion générale	39
Références bibliographique	

La liste des abréviations

AMC :Amoxicilline

OFX : Ofloxacine

P :Pénicilline G

OX : Oxacilline

TE : Tétracycline

IMI : Imipenème

VA : Vancomycine

KZ : Cefazolin

AMP :Ampicilline

CIP :Ciprofloxacine

PBS : Tampon Phosphate Salin

UFC : Unité(s) Formant Colonie(s)

BCP : BromoCresol purple

BHIB:Bouillon cœur-cerveille

La liste des figures

**Figure 1 : observation de bactéries au sein d'un biofilm à *Klebsiella pneumoniae*.
Microscopie Electronique à Balayage (MEB)**

**Figure 2 : représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm
(Phillips PL *et al.* 2010).**

**Figure 3 : représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *Klebsiella* sp.
(Podschun et Ullmann, 1998).**

Figure 4 : évaporation de l'extrait de *Lavandula officinalis* dans un Rotavapor

Figure 5 : antibiogramme

Figure 6 : microplaque de 96 puits

Figure 7: morphotypes de *Klebsiella pneumoniae* sur le milieu BCP

Figure 8 : examen microscopique après coloration de Gram

Figure 9: résultats des quatre tests de la galerie classique

Figure 10 : détection de la capsule par l'encre de chine

**Figure 11 : évaluation de la résistance des souches *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis les
antibiotiques**

Figure 12: effet des disques d'antibiotiques sur *Klebsiella pneumoniae*

Figure 13: l'effet des disques imbibé de l'huile essentielle sur *Klebsiella pneumoniae*

Figure 14: évaluation de la formation de biofilm par la méthode tube (TM)

La liste des tableaux

Tableau 01 : résumé des résultats de la galerie classiques des souches de *Klebsiella pneumoniae*

Tableau 02: les diamètres des zones d'inhibition obtenues par les extraits de *Lavandula officinalis* sur les souches de *Klebsiella pneumoniae*

Tableau 03: l'effet d'huile essentielle de *lavandula officinalis* sur les souches de *Klebsiella pneumoniae*

Tableau 04 : l'effet des extraits phénoliques de la lavande sur les souches de *K. pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae هي واحدة من الأسباب الرئيسية للعدوى المكتسبة من المجتمع و المستشفيات. هذه الجرثومة هي المسؤولة عن الالتهابات الحادة و المزمنة و معظمها بسبب قدرتها على التمسك و الالتصاق على الأجهزة الطبية المزروعة و قدرتها على تشكيل الشريط الحيوي. تشكيل الشريط الحيوي هو عملية حيوية متعددة المراحل من الالتصاق الأول للبكتيرية إلى غاية نضج التراكبات. هذا العمل هو لاختبار المركبات الفينولية و الزيت العطري ل *Lavandula officinalis* على تثبيط تشكيل الشريط الحيوي ل *K. pneumoniae* المعزولة من التهابات المسالك البولية. خلال شهرين تم عزل 6 سلالات من *K. pneumoniae* من المرضى الذين يعانون من التهاب المسالك البولية في قسم الطوارئ بمستشفى الثنية و معظمها كان على مستوى عالي من المقاومة للمضادات الحيوية المستعملة في المستشفى. وفقا للتقنية (MT) معظم سلالات (*K. pneumoniae*) المعزولة من التهاب المسالك البولية اثبت أنها الخلايا الأكثر تشكيلا للشريط الحيوي. السلالات المعزولة أظهرت حساسية ضعيفة اتجاه الزيت العطري و المركبات الفينولية ل *Lavandula officinalis* على فئات العوالق و الفئات المشكلة للشريط الحيوي حيث كان الفرق مرتفع مرتين .

الكلمات المفتاحية الشريط الحيوي. التهابات المسالك البولية. الخزامة.

Résumé

Klebsiella pneumoniae est l'une des causes majeures des infections communautaires et nosocomiales. Ce germe est responsable des infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à sa capacité de former un biofilm. Le développement de biofilm est un processus dynamique à plusieurs étapes, de l'adhésion initiale des bactéries au support à la maturation des agrégats. Ce travail consiste à tester l'effet de l'huile essentielle et des composés phénoliques de *lavandula officinalis* sur l'inhibition de la formation de biofilms de *K. pneumoniae* isolée des infections urinaires. Sur une période de 2 mois, 6 souches de *K. pneumoniae* ont été isolées des patients atteints une infection urinaire au service des Urgences à l'Hôpital de Thenia, dont la plupart présentaient un haut niveau de résistance vis-à-vis les antibiotiques utilisés à l'hôpital. Selon la méthode tube (MT), les souches de *K. pneumoniae* isolées des infections urinaires se sont montrées de très bonnes formatrices du biofilm. Les souches isolées présentaient une faible sensibilité à l'huile essentielle et les composés phénoliques de *Lavandula officinalis* entre les populations planctoniques et populations en biofilm ou elles étaient beaucoup plus élevée.

Mots clés

Biofilm ; *Klebsiella pneumoniae* ; *lavandula officinalis*; infection urinaire

Abstract

Klebsiella pneumoniae is a major cause of community-acquired and nosocomial infections. This germe is responsible for acute and chronic infections, most of which are due to its ability to form a biofilm. Biofilm development is a dynamic multi-step process, from the initial adhesion of bacteria to support the maturation of aggregates. This work is to test the effect of essential oil and phenolic compounds of *Lavandula officinalis* on the inhibition of *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation isolated from urinary tract infections. Over a period of 2 months, 6 *K. pneumoniae* strains were isolated from patients with urinary tract infection in the Emergency Department at the Hospital of Thenia, where most of which showed a high level resistance to antibiotics used in the hospital. According to the tube method (TM), *K. pneumoniae* strains isolated from urinary infections have proved very good forming of the biofilm. The isolated strains showed low sensitivity to the *Lavandula officinalis* essential oil and phenolic compounds between planktonic populations and populations in biofilm they were much higher.

Keywords

Biofilm, *Klebsiella pneumoniae*, *lavandula officinalis*, essential oil, phenolic compound.

Introduction

Introduction

Un bon nombre de bactéries sont organisées en communautés structurées susceptibles de coloniser des surfaces solides. Cette structure représente le mode de vie normal d'une bactérie. C'est ce mode de comportement qui est prédominant des organismes unicellulaires et non le mode de flottaison libre de type dit planctonique. Après attachement à un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle **Costerton** a donné le nom de « biofilm » (**Filloux et Vallet,2003**).

Les biofilms colonisent des surfaces très variées et sont particulièrement connus pour leurs effets néfastes dans le domaine de la santé publique et de l'industrie. Parmi leurs impacts négatifs les plus connus : les infections urinaires et les contaminations des produits alimentaires.

Les klebsielles sont les souches les plus fréquemment isolées des infections urinaires. Parmi elles, *Klebsiella pneumoniae*, naturellement présentes 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. Elles sont souvent classées pour agent à l'origine d'infections urinaires nosocomiales (**Balestrino, 2006**).

L'éradication des biofilms pose de réels problèmes dans le domaine médical. En effet, si les traitements antibiotiques classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils révèlent le plus souvent une efficacité quasiment nulle sur les biofilms (**silverstein et Donatucci, 2003**).

Ainsi, pour toutes ces raisons, les recherches s'orientent aujourd'hui vers de nouvelles alternatives thérapeutiques entraînant moins d'effets secondaires et de résistances bactériennes, et présentant moins de danger pour la santé. Des produits d'origine naturelle, issus de plantes médicinales, tels que: les huiles essentielles et les composés phénoliques, utilisées en médecine traditionnelle, peuvent être considérées comme une bonne alternative thérapeutique.

Selon des statistiques de 2003 de l'Organisation Mondiale de la Santé (**OMS**), 80% de la population mondiale a recours à la médecine traditionnelle pour satisfaire les soins de santé primaire.

L'utilisation des plantes aromatiques dans la thérapeutique ne datent pas d'aujourd'hui. Les Algériens en particulier et les arabes en général ont utilisé depuis les temps les plus anciens les plantes comme source majeure de médicaments.

Introduction

Leurs propriétés médicinales et biologiques sont prometteuses, certaines ont été mises en évidence à travers plusieurs publications internationales et d'autres font encore l'objet des études de recherche à travers le monde. Aujourd'hui, la recherche de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et les composés phénoliques continue, en les testant sur davantage de microorganismes à l'origine de plusieurs maladies.

Notre travail va s'intéresser principalement à tester l'effet de l'huile essentielle et des composés phénoliques de *lavandula officinalis* sur l'inhibition de la formation de biofilms formés par *K. pneumoniae* isolée des infections urinaires.

Ce travail est réparti en trois parties principales, à savoir :

Une synthèse bibliographique ;

Le matériel et méthodes utilisés ;

Les résultats obtenus ainsi qu'une discussion et en fin une conclusion.

Chapitre I :

Synthèse bibliographique

I. Les biofilms bactériens

Dans certaines situations (températures, humidité), *Klebsiella pneumoniae* peut constituer des agrégats de biofilms notamment sur des surfaces inertes (sondes cathéters).

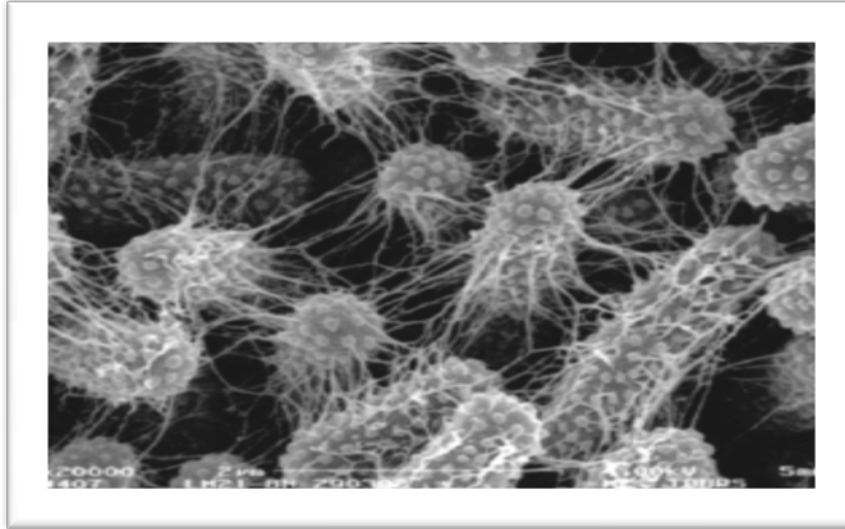


Figure 1 : Observation de bactéries au sein d'un biofilm à *Klebsiella pneumoniae*. Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

1. Historique

La découverte des biofilms est attribuée à l'inventeur du microscope Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723), qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de micro-organismes au niveau de ses dents (**Donlan et al, 2002**).

En 1932 ; **Henerici** observa des communautés bactériennes fixées sur des lames lors d'une expérience visant à observer la croissance des algues sur des lames de verre placées dans un aquarium. Il émit alors une hypothèse que la plupart des bactéries vivant dans des milieux aqueux ne sont pas sous forme planctonique, mais plutôt organisée sous forme de communauté sessile fixe à une surface (**Henerici, 1932**), (**trautner et al, 2009**).

Le terme « biofilm » a été proposé pour la première fois par (**Costerton, 1978**) et son équipe, en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des micro-organismes.

Depuis, un nombre croissant d'études ont été consacrées aux biofilms, aussi bien dans le domaine industriel et environnemental que dans le domaine médical. Le nombre de publications scientifiques annuelles consacrées aux biofilms est passé d'une dizaine en 1996 à plus de 1200 en 2002 (**Donlan et al, 2002**).

2. Définition

Un biofilm est un ensemble de microorganismes, soit de la même espèce, soit d'espèce différentes, qui vivent en symbiose et forment une communauté. Il constitue un ensemble de cellules isolées et de micro colonies de cellules filles, associés entre elles et/ou au surfaces (**Alain Branger et al, 2012**).

Les biofilms sont des communautés microbiennes complexes capables de synthétiser et de sécréter une matrice protectrice en se liant fortement à un support (e.g : un tissu) (**Phillips PL et al.,2010**).

3. Les étapes de formation d'un biofilm

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène ou de nutriments ou la présence d'un traitement. Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surface ; incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou sur tout support retrouvé dans le sol ou les milieux aquatiques. Il existe généralement cinq étapes de formation des biofilms :

3.1 Adhésion réversible

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par sédimentation ou par mobilité active (**Phillips PL et al., 2010**).

Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, la température, la concentration en oxygène et en nutriments (**Beloin et al., 2008**). Les bactéries adhèrent plus facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire.

3.2 Adhésion irréversible

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exopolysaccharides par les bactéries et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes, par exemple les fimbriae et les curli pour *E. coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface (**Beloin et al.,2008 ;Van Houdt et Michiels,2005**).

3.3 Formation de microcolonies

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides. Elles s'agrègent entre elles et forment des microcolonies, qui sont protégées par la matrice exopolysaccharidiques.

3.4 Maturation du biofilm

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les microcolonies, permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance des micro-organismes, ainsi que l'élimination des déchets (**Myriam-Auger, 2012**). La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des tissus environnants de l'hôte et permet ainsi la libération de nutriments (**Jacobsen et al, 2008**). Un biofilm est approximativement constitué de 85% de matrice extracellulaire et de 15% de micro-organismes (**Behlau et Gilmore, 2008**). La matrice extracellulaire est principalement constituée d'eau (97%) et inclue également des polymères d'exopolysaccharides, des protéines, des acides nucléiques, des phospholipides, des nutriments et des métabolites (**Be-loin et al, 2008**). Cette matrice a un rôle protecteur et un rôle structural.

Les bactéries acquièrent un mode de croissance, une physiologie et un métabolisme différent des bactéries planctoniques. Ces changements phénotypiques résultent d'une évolution du profil d'expression de leurs gènes.

Les biofilms matures possèdent une structure tridimensionnelle avec plusieurs microenvironnements différents qui évoluent selon l'osmolarité, pH et la densité cellulaire. Du fait de cette hétérogénéité, l'état métabolique d'une bactérie diffère selon sa localisation : il existe une variété de phénotypes bactériens au sein d'un biofilm.

Les contacts rapprochés entre les micro-organismes favorisent le transfert horizontal de matériel génétique. Ce phénomène pourrait notamment faciliter la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques (**Trautner et Darouiche, 2004**).

3.5 Dispersion du biofilm

La densité bactérienne sur une surface peut atteindre 10^7 cellules/cm³ (**Hall-Stoodley et al., 2004**). Des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique. Traditionnellement, le détachement de bactéries est considéré

comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Ce pendant, le détachement de bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles-mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués (**Kaplan, 2010**). Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries. Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces.

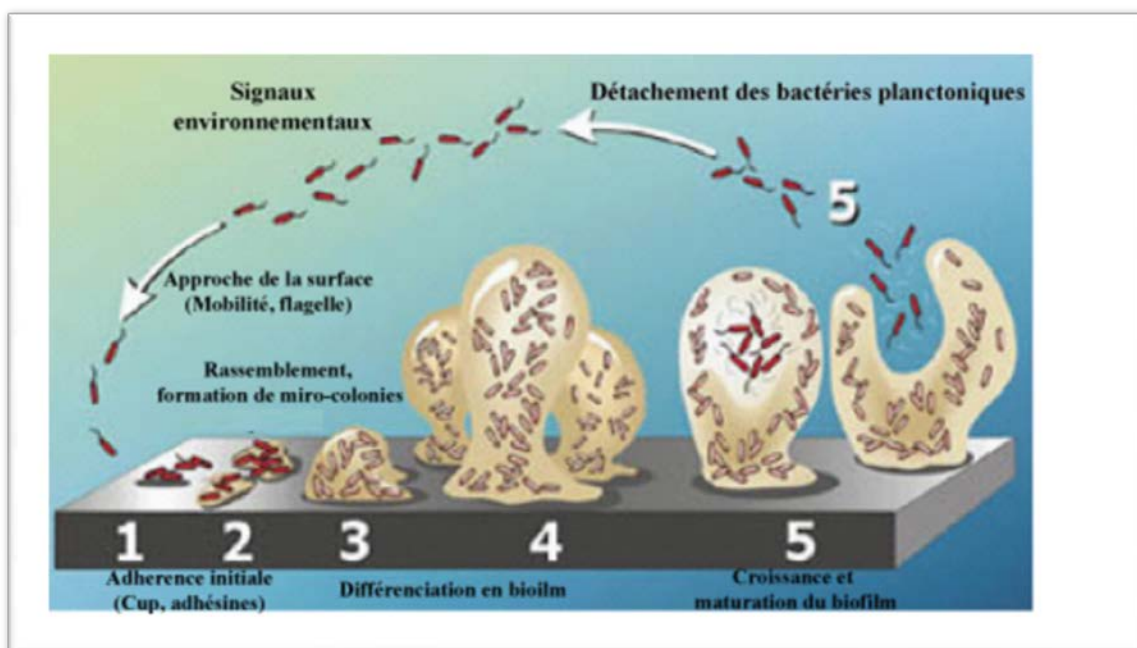


Figure 2 : représentation schématique des différentes étapes de formation d'un biofilm (Phillips PL *et al.* 2010).

4. Les facteurs influençant la formation du biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules (**Donlan *et al.*, 2002**).

4.1 La surface

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et

la présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (**De Chalvet De Rochemonteix, 2009**).

4.2 Les caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux (**Donlan et al, 2002**)

- La température est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité électrophorétique cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (**bellifa Samia,2014**),
- le pH du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (**bellifa samia,2014**).ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion (**Boutaleb, 2007**),
- concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques,
- sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (**Martinez, 2007**),
- concentrations en nutriments : dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (**Spormann, 2008**).

4.3 Propriété des cellules

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface. L'hydrophobicité d'une surface est importante dans l'adhésion des micro-organismes à cette

dernière. Moins les matériaux sont polarisés, plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes.

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Plusieurs éléments structuraux des bactéries interviennent dans leur attachement à une surface : flagelles, fimbriae, polysaccharides. Il peut y avoir des compétitions ou des coopérations entre cellules lorsque plusieurs espèces de bactéries sont concernées. Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives) semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes.

Les exopolysaccharides et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (**Donlan et al, 2002**).

La synthèse de fimbriae de type I par des bactéries est un processus complexe gouverné par les statuts nutritionnels des cellules (stimulation de la synthèse si déficit carboné ou en acides aminés chez les souches uropathogènes d'*Escherichia coli*) et par les conditions environnementales (pas de synthèse si pH bas ou température basse).

L'expression des curli est sous le contrôle de cascades de phosphorylation. Les conditions environnementales répriment ou stimulent l'expression de gènes codant pour des caractères de motilité. La synthèse de curli est stimulée dans les conditions environnementales suivantes : faible osmolarité, basse température, faible disponibilité du milieu en azote, phosphate, fer et croissance ralentie (**Goller, 2008**).

5. Régulation de la formation des biofilms : le quorum sensing

5.1 Définition et mécanismes

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de quorum sensing.

Le Quorum Sensing est un mécanisme régulateur très répandu parmi les bactéries à Gram négatif. Il contrôle la sécrétion de facteurs de pathogénicité, la formation de biofilm, le mécanisme de conjugaison et la bioluminescence (**Miller et Bassler, 2001**).

Il s'agit de mécanismes de contrôle des processus ayant lieu au sein des cellules, matérialisés par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception du quota. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (**Costerton et al., 1999**). Une fois que les signaux atteignent une valeur seuil (valeur critique), des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (**Costerton, 1999**). La nature et la fonction des molécules signalant les

échanges de cellule-à-cellule changent à partir d'une concentration donnée des bactéries (**Cos-terton, 1999**).

6. Bactéries formatrices de biofilm : *Klebsiella pneumoniae*

6.1 taxonomie

Le genre *Klebsiella* appartient à la famille des Enterobacteriaceae, l'ordre Enterobacteriales, le phylum proteobacteria, et le domaine des Bacteria (**Yang et al., 2011**).

Le genre *Klebsiella* appelée également bactérie de Friedländer. Sa nomenclature est aujourd'hui encore provisoire, car de nouvelles espèces ont été incluses dans ce genre, sur des arguments phénotypiques, mais sans réévaluation globale de sa position taxonomique au sein des entérobactéries, ni entre les différentes espèces.

A l'origine, l'importance médicale du genre *Klebsiella* le conduisit à être subdivisé en quatre espèces correspondantes aux maladies engendrées : *K. pneumoniae*, *K. Ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. oxytoca* (**Jean. L. Avril et al., 2000**).

6.2 caractères biochimiques

Les *Klebsiella* sont généralement identifiées en fonction de leurs réactions biochimique. Le genre est défini comme : non mobile, bactéries Gram négatif encapsulées généralement en forme de tige faisant partie de la famille des Enterobacteriaceae (**Peter M. Hawkey et al., 2006**).

K. pneumoniae possède les caractères suivants : oxydase négative, catalase positive, fermentation du D-glucose et réduction des nitrates en nitrites

Les caractères biochimiques utile au diagnostic de l'espèce sont les suivants : β -galactosidase positive, uréase positive, VP positive (réaction de Voges-Proskauer : production d'acétoïne), lysine-décarboxylase (LDC) positive, ornithine-décarboxylase (ODC) négative, arginine dihydrolase (ADH) négative, indole négative, gélatinase négative, une absence de production d'H₂S et fermentation de nombreux sucres dont le saccharose, le rhamnose et le mélibiose. (**Jean. L. Avril et al., 2000**).

6.3 structure de la surface de *Klebsiella pneumoniae*

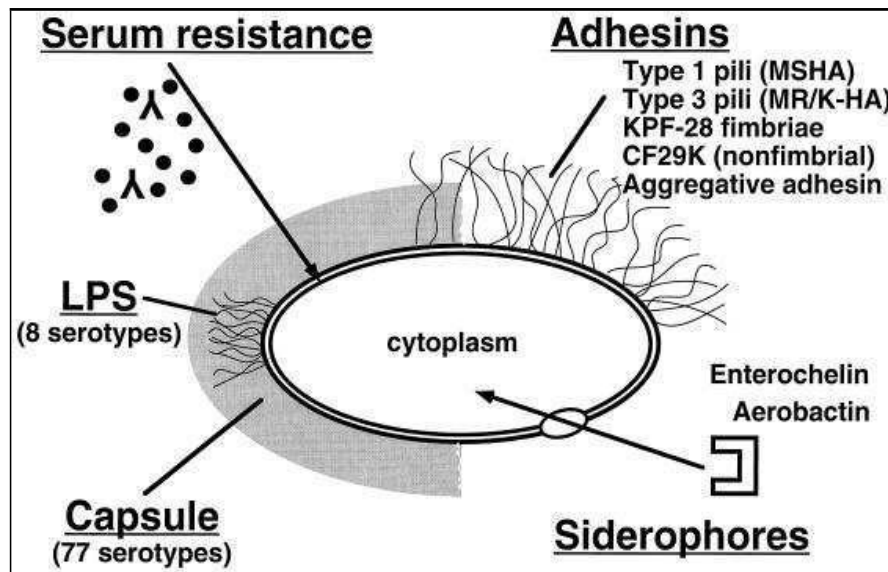


Figure 3 : Représentation schématique des facteurs de pathogénicité de *Klebsiella sp.* (Podschun et Ullmann, 1998).

6.3.1 la capsule

La plupart des souches de *Klebsiella pneumoniae* produisent une capsule polysaccharidique, de structure fibrillaire, recouvrant la totalité de la paroi bactérienne et apparaissant à la coloration de Gram sous la forme d'un halo clair. Les sous-unités de cette capsule sont composées par quatre ou six sucres, avec une prédominance d'acide glucuronique conférant une charge négative à la capsule.

6.3.2 les fimbriae (pili)

Dans une première étape dans le processus infectieux critique, les microorganismes doivent se rapprocher autant que possible des surfaces muqueuses et maintenir cette proximité en se fixant à la cellule hôte (d'adhérence).

Les propriétés adhésives des entérobactéries sont généralement médiées par différents types de pili. Pili (autrement connu comme fimbriae) sont non flagellaires, filamenteux, projections sur la surface bactérienne.

Ces structures sont de 10µm de long et ont un diamètre de 1 à 11 nm (Ofek et Doyle, 1994), ils sont constitués de sous-unités protéiques globulaires de polymères (piline) (Jones et

Isaacson, 1983). Les deux types de fimbriae les plus rencontrés chez *K. pneumoniae* sont le type 1 et le type 3.

✓ Pili de type I

Le pili de type 1 sont les mieux connus et sont présents chez la majorité des entérobactéries. Ils sont des fimbriae de structure rigide de 5 à 7 nm de diamètre et de longueur variable (0.2 à 2 µm), disposés se façon pérित्रiche 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 essentiels à l'attachement initial stable de plusieurs souches de *Klebsiella pneumoniae* sur des surfaces inertes que soit en milieu riche dans des conditions statiques ou en milieu minimum dans des conditions dynamiques. Chez *K.pneumoniae*, ces fimbriae sont également impliqués dans la formation des biofilms (**Podshun.R et U.Ullmann, 1998**).

✓ Pili de type III

Les pili de type 3 sont très largement répandus parmi les souches de *Klebsiella*, d'origine clinique ou environnementale.

Leur rôle a été mis en évidence dans l'adhésion des bactéries aux cellules endothéliales et aux cellules épithéliales de l'arbre respiratoire (**Würker et al.,1990**).

Cette espèce n'est pas une cause commune des infections urinaires chez les personnes à court terme, cathétérisées ou non cathétérisées, mais à une prévalence beaucoup plus élevée dans l'urine des patients cathétérisés à long terme.

6.4 Epidémiologie

K. pneumoniae est fréquemment isolée des eaux, du sol et des végétaux. Elle est présente dans la flore fécale de l'homme et est souvent commensale de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires (**Jean L. Avril et al., 2000**).

K. pneumoniae peut être isolée lors de pathologie communautaires ou nosocomiales.

Au cours des infections liées aux soins, les principaux réservoirs de transmission sont le tube digestif des patients ainsi que les mains du personnel soignant. *K. pneumoniae* est alors capable de diffuser rapidement ce qui lui permet d'être à l'origine d'épidémies nosocomiales.

II. Les antibiotiques

1. Définition

Les antibiotiques sont des substances élaborées par des micro-organismes, ou des substances synthétiques, qui sont bactériostatiques ou bactéricides à dose faible.

Leurs cibles d'activité sont des structures moléculaires spécifiquement bactériennes. Elles ont donc une toxicité sélective pour les cellules procaryotes et une toxicité faible pour les cellules eucaryotes (**Jean .L. Avril et J.L. Fauchere, 2002**).

2. Types d'antibiotiques

Les antibiotiques sont regroupés en familles dans lesquelles les différents produits ont une communauté de structure chimique et un mécanisme d'action identique (ces deux propriétés sont souvent liées). Les antibiotiques actuellement utilisés en médecine sont regroupés en 10 familles (**Jean .L. Avril et J.L. Fauchere, 2002**).

2.1. Les β -lactamines

Il s'agit de la famille la plus vaste et la plus complexe. Elle est caractérisée par le noyau β -lactame. Ces antibiotiques ont un mécanisme d'action identique : l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane de la paroi.

Dans cette famille, on distingue deux groupes principaux : les pénicillines, les céphalosporines et des groupes de produits plus récents apparentés aux β -lactamines (**Jean .L. Avril et J.L. Fauchere, 2002**).

2.2. Les aminosides

La streptomycine a été extraite de *streptomyces griseus* en 1944. De nombreux produits ont ensuite été synthétisés en modifiant les substituants de la molécule de base : la streptomine (**Jean .L. Avril et J.L. Fauchere, 2002**).

Les aminosides ont un spectre large englobant les Gram positif et les Gram négatif.

Trois groupes sont individualisés au sein des aminosides :

- le groupe de la streptomycine
- le groupe de la néomycine
- le groupe de la kanamycine

- les produits les plus utiles actuellement sont ceux du groupe kanamycine (gentamycine, tobramycine, nétilmicine).

2.3. Les phénicols

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à large spectre qui couvrent une grande variété de germes à Gram négatif et à Gram positif. On distingue dans ce groupe le Chloramphénicol et le Thiamphénicol.

2.4. Les quinolones

Ce sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, possédant une structure de base comportant un cycle accolé à un hétérocycle pipérazine en position 7 et un atome de fluor en position 6 (Jean .L. Avril et J.L. Fauchere, 2002). On distingue :

- . Les quinolones anciennes : Acides nalidixiques
- . Les quinolones de deuxième génération ou fluoroquinolones : Norfloxacin, Pefloxacin, Ciprofloxacine.

Leur spectre d'activité concerne les entérobactéries, les staphylocoques et les Pseudomonas.

2.5. Les monobactames

Le seul représentant de ce genre est l'Aztréonam dont le spectre d'activité concerne :

- . Bacilles à Gram négatif sécrétrices de β -Lactamines
- . Les streptocoques
- . Les staphylocoques

3. Résistances aux ATB

L'efficacité de l'antibiotique dépend d'au moins trois facteurs : la quantité d'antibiotique au contact de la cible, l'affinité de l'antibiotique pour la cible et la production d'enzymes inactivant l'antibiotique. Ces facteurs sont responsables soit d'une résistance naturelle, et donc présents chez toutes les souches de l'espèce, soit d'une résistance acquise par certaines souches, suite à l'apparition de mutations chromosomiques ou à l'acquisition de matériel génétique tels que des plasmides, des transposons ou des intégrons. D'après le Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie : « les souches catégorisées résistantes sont celles pour lesquelles il existe une probabilité d'échec thérapeutique, quels que soient les traitements et la dose d'antibiotique » (Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie).

3.1. Résistance naturelle

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

Concernant les autres antibiotiques, *K. pneumoniae* est sensible aux aminosides, aux fluoroquinolones, à la fosfomycine et au cotrimoxazole.

3.2. Résistance acquise

K. pneumoniae a toujours joué un rôle majeur dans l'apparition et la dissémination des mécanismes de résistance, en particulier vis-à-vis des β -lactamines. Ainsi, dans les années 1970, ces bactéries ont été pionnières pour les résistances aux aminosides(**Christensen et Korner, 1972**). A partir des années 1980, *K. pneumoniae* a largement contribué à la dissémination hospitalière des β -lactamases à spectre étendu (BLSE) qui leur confèrent une résistance aux céphalosporines de 3eme génération (C3G) (**Paterson et Bonomo 2005 ;Sirot1995**), plus récemment, cette espèce occupe une position importante dans l'émergence et la dissémination de certaines enzymes conférant la résistance aux carbapénèmes.

Lorsque l'on fait un bilan des nouvelles β -lactamases décrites depuis 1983, *K.pneumoniae* est dans 80% des cas l'hôte chez qui ont été découvertes ces nouvelles enzymes (de type TEM, SHV ou de la classe C)(**Paterson et Bonomo, 2005**).Lorsqu'elle n'est pas le premier hôte, on retrouve très fréquemment cette espèce comme responsable de la diffusion épidémique de nouvelles enzymes comme les métallo-enzymes de type VIM et NDM-1 (**Kassis-Chikhani et al.,2006 ; Woodford et al.,2004**).

III. Les huiles essentielles et les composés phénoliques

1. La plante étudiée : *Lavandula officinalis*

La lavande est une plante très rustique, que l'on retrouve dans les régions tempérées chaudes; comme par exemple l'Ouest de la méditerranée. Elle pousse sur des sols rocaillieux ou rocheux, garrigue. D'ailleurs, toutes les parties de la plante témoignent d'une excellente adaptation à un milieu sec et aride. Les racines notamment, sont nombreuses et s'enfoncent profondément dans le sol, à la recherche d'un maximum de fraîcheur durant l'été (**Maud BELMONT, 2013**).

1.1. Taxonomie

La lavande officinale appelée encore lavande vraie, lavande femelle, lavande fine, ou en latin: *Lavandula officinalis*. A Rome, les femmes s'en servaient pour adoucir le linge: c'est pour cette raison que le mot lavande vient du verbe latin *lavare* (qui sert à laver), qui a donné dans un premier temps *lavanda* en italien.

Règne : Plantae

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Lavandula*

Espèce : *Lavandula officinalis* = *Lavandula angustifolia*

2. Généralités sur les extraits étudiés

2.1. Les huiles essentielles

Il s'agit d'un extrait pur et naturel provenant de plantes aromatiques et médicinales (**Roulier G, 1990**). Elle concentre l'essence de la plante, autrement dit son parfum. Il s'agit de substances odorantes, volatiles, de consistance huileuse, très concentrées, offrant une forte concentration en principes actifs (**Lardry J-M, Haberkorn V, 2007**). Il faut ainsi une très grande

quantité de plantes fraîches pour obtenir quelques millilitres d'huiles essentielles. Ces produits odorants sont extraits par entraînement à la vapeur d'eau ou par pression.

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraîna- bles à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau (**Thénrad, 1836**).

Leur conservation nécessite de l'obscurité et de l'humidité. De ce fait, l'utilisation de flacons en verre opaque est conseillée (**Dupin et al ., 2012**).

2.2. Les polyphénols

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire.

3. Données sur l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*

3.1. Composition chimique

La composition chimique et la quantité d'huile essentielle de lavande officinale varient en fonction des conditions de culture, de la saison, de la variété culturale et même de la technique d'extraction.

Les principaux constituants de la Lavande officinale sont le linalol et l'acétate de linalyle. Son odeur et sa saveur sont spécifiques, légères et d'une grande finesse grâce à la teneur élevée en linalol par rapport au camphre (**Maud BELMONT, 2013**).

3.2. Propriétés physico chimiques

Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante mais aussi volatiles, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels ainsi que dans l'alcool, entraîna- bles à la vapeur d'eau mais très peu solubles dans l'eau (**AFSSAPS, 2008**). Il faut donc impérativement un tensioactif pour permettre leur mise en suspension dans l'eau.

Elles présentent une densité en général inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction élevé.

Elles sont pour la plupart colorées : ex : rougeâtre pour les huiles de cannelle et une variété de thym, jaune pâle pour les huiles de sauge sclérée et de romarin officinal. Elles sont altérables et sensibles à l'oxydation (**Couic-Marinier F., Lobstein A, 2013**).

Elles sont constituées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15) (**AFSSAPS, 2008**).

3.3. Domaines d'utilisation

3.3.1. Parfumerie et cosmétiques

L'utilisation des huiles essentielles dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable.

L'huile essentielle de *Lavandula officinalis* est utilisée pour :

- Apaiser la peau irritée, le cuir chevelu
- Tonifier et adoucir la peau, soigner les boutons.

Elle convient à toutes les peaux : grasses, sèche ou mixte, elle rétablit l'équilibre (**Catherine Dupin et Danièle Festy, 2012**).

3.3.2. Phytothérapie

Les huiles essentielles sont largement utilisées pour traiter certaines maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine dentaire, plusieurs huiles essentielles ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries.

La listérine qui est une solution constituée des huiles essentielles de thymol et d'eucalyptol possède une grande activité bactéricide sur les microorganismes de la salive et de la plaque dentaire.

3.3.2.1. Pouvoir antimicrobien des huiles essentielles

L'activité des huiles essentielles est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Toutefois, les composés minoritaires pourraient agir de manière synergique

De nombreuses études ont mis en évidence une activité antimicrobienne qualitativement similaire entre les huiles essentielles et leurs composés chimiques testés isolément. Cependant il

existe des différences quantitatives. En effet, il a été prouvé que l'effet antimicrobien des huiles essentielles est supérieur à celui de ses composés majoritaires testés séparément. L'association des principaux composés actifs agirait de façon synergique en potentialisant l'action antimicrobienne de l'huile essentielle (**Lambert *et al.*, 2013**).

Les composés chimiques connus pour leur efficacité antimicrobienne et leur large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol), les alcools, (α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol), les aldéhydes, les cétones et plus rarement les carbures (**Cosentino S. *et al.*, 1999**), (**Dorman H. J. D. et Deans S. G, 2000**).

4. Données sur les composés phénoliques

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'Homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Macheix *et al.*, 2005**).

Les composés phénoliques produits principalement à partir des acides aminés : phénylalanine et tyrosine, sont un groupe de nombreux composés carbonés cycliques dont la structure ne contient pas d'azote (**Nabors, 2004;Macheix *et al.*, 2005**).

Dans la plupart des cas, les composés phénoliques renforcent les plantes ou les protègent de différents dangers (**Nabors, 2004**).

Généralement, ils sont devenus suffisamment importants pour que la plante en produise de grandes quantités. Environ 40 % du carbone circulant dans la biosphère se présente sous des composés phénoliques que l'on trouve dans les parois cellulaires et dans les vacuoles des cellules qui les produisent. Les types principaux de composés phénoliques sont les lignines, les flavonoïdes et les composés allélopathiques (**Nabors, 2004**).

Il existe plusieurs classes de polyphénols dont les principaux sont: les tannins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les mucilages, les coumarines...

4.1. Composition chimique

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances. L'élément structurel fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est

directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (**Bruneton, 1993**).

Les formes phénoliques identifiées chez le genre *lavandula* présentent des structures chimiques allant du simple phénol en C₆ aux flavonoïdes en C₁₅ et à des molécules très proches. Sauf exception, ces substances sont présentes sous forme soluble dans la vacuole (**Macheix et al, 2005**).

Dans le genre *lavandula*, les flavonoïdes se répartissent en deux groupes, principalement dans le feuillage où ils constituent les flavonoïdes glycosides, et dans les fleurs formant les anthocyanidines.

4.2. Domaines d'utilisation

4.2.1. Utilisation thérapeutique

Les propriétés biologiques des flavonoïdes y compris les proanthocyanidines ont été extensivement réexaminées. En plus de leur pouvoir antioxydant, les proanthocyanidines possèdent un effet antibactérien, antiviral, anticancérogène, anti-inflammatoire, antiallergique et vasodilatateur (**Bagchi et al, 1998**)

Les flavonoïdes sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV.

Les polyphénols sont connus pour leur propriété antioxydante vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (LDL). Ils pourraient ainsi jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires (**Frankel et al, 1991**).

Chapitre II :

Matériel et méthode

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Biotechnologie microbienne de l'Université de M'Hamed Bouguerra et le laboratoire de bactériologie à l'Hôpital de Thenia dans le cadre de l'obtention d'un diplôme de Master en Biologie.

1. Extractions

La plante *Lavandula officinalis* provient de la région de Bouira. Elle a été identifiée par un botaniste de l'université de Boumerdès. La récolte est effectuée manuellement durant le mois d'Avril 2016. Une partie est conservée à l'abri de la lumière et à la température ambiante pour l'extraction des huiles essentielles, l'autre partie est séchée, réduite en poudre fine dans un moulin à café de marque Seb puis mise dans un flacon en verre fermé hermétiquement jusqu'à l'extraction des polyphénols. (Anthony Ojeil *et al*, 2010).

Seule la partie aérienne est utilisée pour l'obtention des huiles essentielles et les composés phénoliques.

1.1. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles de *lavandula officinalis* étudiée ont été extraites par hydrodistillation grâce à un appareil de type Clevenger. (Simard. S *et al*, 1988). Cette technique est basée sur l'ébullition d'un mélange de l'échantillon solide et l'eau. La vapeur saturée d'huiles essentielles traverse un serpentin ou elle se condense pour donner deux produits: l'eau florale et l'huile essentielle (N. Chahboun *et al*, 2015), (S. Ram Verma *et al* ; 2010).

1.2. Procédé d'extraction

Quatre cents grammes (400g) de *Lavandula officinalis* sont mises dans un ballon en verre, additionnées de 4000 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition, après l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur, l'huile essentielle est alors entraînée par la vapeur d'eau. Elle est ensuite condensée en passant par un condensateur, fixé par un support approprié en position verticale pour faciliter l'écoulement du distillat. Le temps de cette extraction est d'environ trois heures. (S. Ram Verma *et al* ; 2010), (Mohammedi Zohra *et al* ; 2013).

Le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décanter. Le mélange est laissé au repos quelques minutes, ce qui résulte l'apparition de deux phases, l'une est organique (huile essentielle) et l'autre est aqueuse. En fin, le distillat est recueilli dans un tube à essai et l'huile

essentielle de *Lavandula officinalis* sera par la suite récupérée dans un flacon approprié. (N. Chahboun *et al*, 2015).

1.3. Conservation de l'huile essentielle obtenue

La conservation de l'huile essentielle exige certaines précautions indispensables. (Burt, 2004). C'est pour cela nous avons conservé l'huile essentielle de *Lavandula officinalis* à une température voisine de 4°C, dans un flacon en verre stérile fermé hermétiquement pour la préserver de l'air et de la lumière (en utilisant le papier d'aluminium).

1.4. Détermination du rendement d'extraction

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

$$Rd = M'/M.100$$

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

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

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

1.5. Extraction des polyphénols

Dans un flacon en verre, recouvert de papier aluminium et bien fermé, 30g de poudre est mélangé avec 100 ml de méthanol 85%. Le flacon est mis au réfrigérateur pendant 72h (Anthony Ojeil *et al*, 2010).

Après 72h, l'extrait est filtré à la mousseline puis au papier filtre ensuite évaporé à 45°C à l'aide d'un Retavapor.



Figure 4 : évaporation de l'extrait de *Lavandula officinalis* dans un Rotavapor (Originale)

1.6. Dosage

Le dosage des composés phénoliques est fait selon le protocole de Folin-Ciocalteu : 1,58 ml d'eau distillé est mélangé avec 10 μ l de la dilution $\frac{1}{4}$ de notre extrait, 100 μ l de réactif Folin-Ciocalteu ont été ajoutés au mélange. Le mélange obtenu a été laissé 5 minutes à température ambiante puis 300 μ l de la solution saturée en Na_2CO_3 ont été ajoutés le tout est incubé à 20°C pendant 2 heures. L'absorbance a été lue à 765 nm.

2. Activités antimicrobienne des extraits de *Lavandula officinalis*

Le criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles a été réalisé par la technique modifiée de Kirby-Bauer (Carson et Riley, 1995).

Des boîtes de pétris (9 cm de diamètre) remplies par de gélose Muller Hinton sontensemencées par écouvillonnage à partir des suspensions standardisées (108 ufc/mL).

Ensuite, des disques en papier Whatman (No. 3) (6mm) imprégnés par 10 μ L d'huile essentielle ou d'extrait phénolique sont déposés sur la surface de la gélose préensemencée.

Puis, les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24h. Après incubation, les diamètres d'inhibition sont mesurés en millimètres, disques inclus, à l'aide d'un pied à coulisse. Les expériences ont été réalisées en deux fois.

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre (\emptyset) de la zone d'inhibition en mm selon la fourchette proposée par **Ponce *et al.* (2003)** comme suit : $6 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 8 \text{ mm}$: non sensible $9 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 14 \text{ mm}$: sensible $15 \text{ mm} \leq \emptyset \leq 19 \text{ mm}$: très sensible $\emptyset \geq 20 \text{ mm}$: extrêmement sensible.

3. Concentration minimales inhibitrices

Les CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) ont été déterminées par microplaques selon les indications du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2010). 100 μ L de milieu de culture liquide sont déposés dans les 96 puits d'une microplaque stérile à fond rond. 100 μ L de la solution-mère de chaque produit à tester sont déposés dans le premier puits de 2 lignes (essais en double).

Après homogénéisation, des dilutions de raison 2 sont réalisées de la colonne 1 à la colonne 10 incluse. L'inoculation a été réalisée par dépôt de 100 μ L de la suspension mère du microorganisme test ajustée à environ 10⁸ bactéries/ml ou à différentes concentrations, dans chaque puits d'une seconde microplaque (Dépôt de 1 à 3 μ L/puits : concentration finale 10⁶ bactéries/mL pour un inoculum initial à 10⁸/mL). Les colonnes 11 et 12 servent respectivement de témoin de stérilité du milieu (sans produit et sans microorganisme) et de témoin croissance du microorganisme (sans produit et avec microorganisme). Après 24 heures d'incubation à 37°C, les CMI sont déterminées comme les plus petites concentrations avec absence de croissance visible.

4. Prélèvements

Les bactéries ont été prélevées chez les patients atteints d'infections urinaires hospitalisés au niveau des urgences à l'hôpital de Thenia, sur une période allant du 15/03/2016 au 30/04/2016.

4.1. Isolement et purification

Après incubation des milieuxensemencés, on procède à la purification des colonies bactériennes par ré-isolement sur le même milieu afin d'obtenir des souches pures à identifier.

4.2. Identification

L'identification des souches est réalisée, après vérification de leur pureté par :

L'étude des caractères macroscopiques.

L'étude des caractères microscopiques (coloration de Gram).

L'étude des caractères biochimiques (galerie classique).

4.2.1. Caractères macroscopiques

Les caractères visibles à l'œil nu sont: formes, taille, odeur, couleurs et aspect.

4.2.2. Caractères microscopiques (Gram)

La morphologie, l'arrangement des cellules, les types pariétaux des isolats sont déterminés sur des cultures jeunes par la technique de coloration de Gram après observation par microscope optique.

4.2.3. Identification par galerie classique

La galerie est faite selon le protocole de l'hôpital de Thenia. Quatre tests ont été réalisés sur les six souches de *Klebsiella pneumoniae*.

4.2.3.1. Milieu TSI

Le milieu TSI est un milieu glucosé saccharose, contenant du citrate de fer ammoniacal. Il est très utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae*.

Ensemencer une colonie bactérienne par piqûre centrale et stries sur la pente de la gélose.

Laisser les bouchons légèrement dévissés. Incuber 24 heures à 37°C.

La fermentation du glucose provoque un virage au jaune du culot, celle du lactose ou du saccharose, un virage au jaune de la pente. La production d'H₂S provoque un noircissement entre la pente et le culot. Enfin la production de gaz provoque des bulles dans le culot.

4.2.3.2. Milieu citrate de Simmons

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie.

Dans ce dernier, ensemencer une colonie bactérienne par stries sur la pente à l'aide d'une pipette Pasteur fermée. Incuber 24 heures à 37°C, bouchon dévissé. La lecture des résultats se fait par visualisation d'un changement de couleur et la présence d'une culture bactérienne.

4.2.3.3. Milieu de clarck et lubs

A l'aide d'une pipette pasteur ensemencer une colonie bactérienne dans le milieu Clarck et lubs. Incuber à 37°C pendant 24h.

4.2.3.3.1. Réaction de Vosges-Proskauer(VP)

Après incubation, transvaser 1 ml du milieu dans un autre tube et ajouter 0,5 ml d'une solution d' α -naphtol à 6% dans l'alcool à 90° et 0,5 ml d'une solution aqueuse de soude à

16%. Agiter fortement et attendre 15 minutes. L'apparition d'une coloration rouge, indiquant la production d'acétylméthylcarbinol, est considérée comme positive.

4.2.3.3.2. Réaction ou rouge de méthyle (RM)

Après incubation, transvaser 2 ml du milieu dans un autre tube et ajouter 1 à 2 gouttes d'une solution à 0,5% de rouge de méthyle dans l'alcool à 60°. Une coloration rouge du milieu, correspondant à un pH inférieur à 4,2, est considérée comme positive. Une coloration jaune du milieu, correspondant à un pH supérieur à 6,3, est considérée comme négative.

4.2.3.4. Mannitol

Ce milieu de culture caractérisé par l'utilisation de mannitol permet la mise en évidence (ou non) de la mobilité bactérienne.

Ensemencer une colonie bactérienne avec un fil de platine ou d'une pipette Pasteur, par piqûre centrale, jusqu'au fond du tube de gélose. Incuber 18 à 24 heures à 37°C.

La lecture des résultats se fait par une visualisation du virage de couleur.

5. Détection de la capsule

La capsule est mise en évidence par microscope optique sur un état frais à l'encre de chine, qui est une suspension de particules noires de carbone. Les particules noires ne pénètrent pas dans la capsule entourant la bactérie : elle apparaîtra alors comme un halo clair autour des bactéries (**El Fertas-Aissani *et al.*, 2012**).

5.1. Technique

- Déposer une goutte de suspension bactérienne sur une lame;
- Déposer à côté de la suspension une petite goutte d'encre de Chine;
- Déposer la lamelle: on réalise ainsi le mélange des deux gouttes;
- Observer au microscope optique à l'objectif 100.

6. Antibiogramme

6.1. Principe

La technique consiste à utiliser des disques d'antibiotiques déposés à la surface d'une gélose ensemencée avec la bactérie à étudier. Chaque antibiotique diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries croissent sur toute la surface de la gélose, sauf là où elles rencontrent une concentration d'antibiotique suffisante qui inhibe leur croissance (CA-SFM, 2013).

6.2. Technique

Préparer un inoculum bactérien en ensemencant 5 ml d'eau physiologique à partir d'une colonie de la souche à tester isolée sur milieu non sélectif;

- Ajuster la densité par spectrophotomètre afin d'obtenir une culture bactérienne de 0,08 à 0,1 à une longueur d'onde de 625 nm équivalent à 0,5 Mc Ferland. Ceci correspond à une suspension bactérienne de 10⁸ UFC/ml;
- A partir de cette culture, réaliser une dilution au 1/100 dans l'eau physiologique;
- A l'aide d'un écouvillon stérile, introduit dans la suspension bactérienne et essoré contre la paroi interne du tube, réaliser des stries serrées à la surface d'une boîte de Pétri préalablement coulée avec 20 ml de gélose Mueller-Hinton. Répéter l'opération deux fois en tournant la boîte 60° et tournant l'écouvillon sur lui-même;
- Déposer les disques d'antibiotiques à tester à l'aide d'un distributeur ou d'une pince stérile.
- Incuber pendant 18 à 24h à 37°C;
- Après 24 heures d'incubation à 37°C, on mesure les diamètres des zones d'inhibition et on détermine le caractère **Sensible**, **Résistante** ou **Intermédiaire** de la souche à étudier en se référant aux valeurs critiques publiées par le (CA-SFM, 2013).

Les antibiotiques utilisés sont les suivants: Amoxicilline (AMC), Ofloxacin (OFX), Pénicilline G (P), Oxacilline (OX), Tétracycline (TE), Imipenème (IMI), Vancomycine (VA), Cefazolin (KZ), Ampicilline (AMP), Ciprofloxacine (CIP).

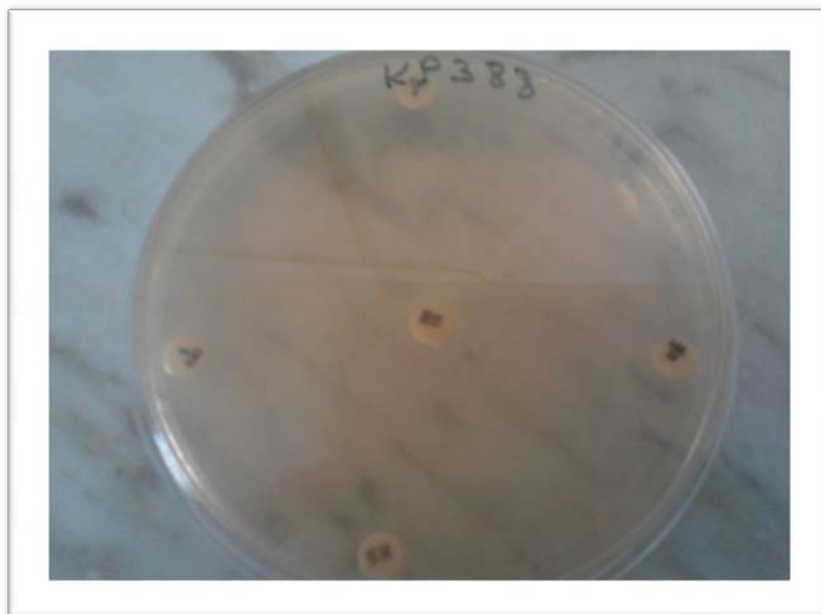


Figure 5 : Antibiogramme (Originale)

7. Evaluation de la formation de biofilm *in vitro*

7.1. La méthode tube (TM)

C'est une technique qui permet une évaluation qualitative de la formation du biofilm décrite par **Christensen *et al.*, 1982**.

7.2. Technique

A partir d'une boîte de culture 18-24 heures, ensemencer une colonie dans 10 mL de BHIB supplémenté de 2% de saccharose puis incubé à 37°C pendant 24 h. Les tubes ont été lavés avec du PBS (pH=7,3) puis séchés. Chaque tube a été ensuite coloré par le cristal violet (0,1%) pendant 15 minutes. L'excès de colorant a été enlevé et les tubes ont été lavés avec de l'eau distillée, puis séchés en position renversée (**Mathur *et al.*, 2006**).

7.3. Lecture

La formation du biofilm est considérée comme positive quand un film visible double et recouvre le mur et le bas du tube. La formation d'un anneau à l'interface liquide n'est pas indicative de la formation du biofilm. La formation de biofilms est notée comme de 0 pour absent, + pour modéré et +++ pour fort (**Stepanovic *et al.*, 2000**).

8. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices Des Biofilms

A partir d'une boîte de culture de 24h, une colonie est ensemencée dans 10 ml de bouillon BHIB puis incubée à 37°C pendant 18 à 24h.

On remplit les puits d'une microplaque de 96 puits avec 100 μ l de bouillon de culture. 100 μ l de la solution mère de chaque produit à tester sont déposés dans le premier puits qui servira de témoin stérile.

Après 24h d'incubation ces derniers sont rincés trois fois avec du PBS avant l'ajout de 10 μ l de l'extrait phénolique de *lavandula officinalis* aux concentrations prédéfinies. Les microplaques scellées ont été incubées à 37° C pendant 24 h. Après incubation, les puits ont été lavés trois fois avec PBS stérile (pH 7,2). Le biofilm traité est gratté et transféré vers une autre microplaque stérile.

Après incubation 24h à 37 ° C, les puits ont été soigneusement rincés, séchés et colorés au cristal violet suivant la technique standard. La densité optique est mesurée à 590 nm par le lecteur ELISA.

La DO initiale après incubation avec différentes concentrations des agents antimicrobiens est comparée à celle du témoin sans antibiotique.

L'élimination de la formation du biofilm par les agents antimicrobiens se traduit par une densité optique inférieure à celle de la DO initiale.

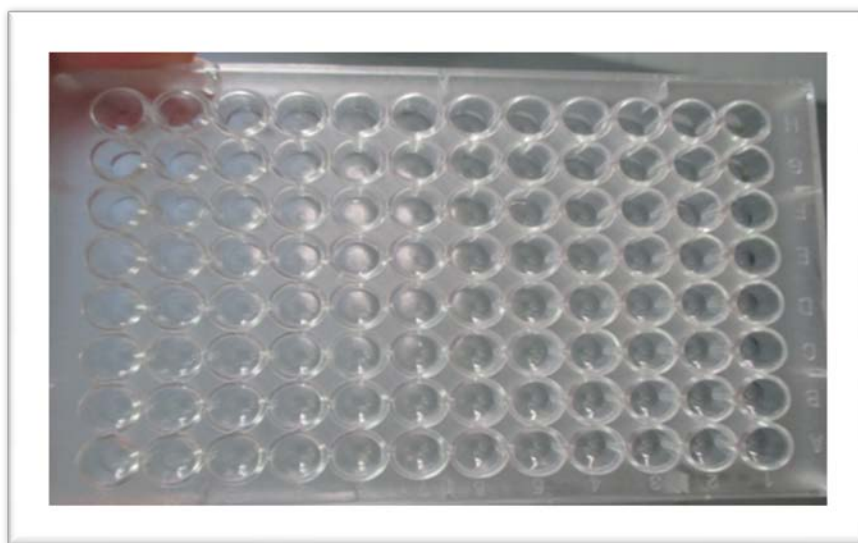


Figure 6 : microplaque de 96 puits (Originale)

Chapitre III :

Résultat et discussion

1. Extraction des huiles essentielles

Nous avons obtenu une huile de couleur jaune pâle avec une odeur âcre. La plante a donné un bon rendement en huile essentielle qui est de 1.02 ± 0.01 %.

La variation de teneur dépend de plusieurs facteurs biotiques et abiotiques comme le degré de maturité de *Lavandula officinalis*, l'interaction avec l'environnement (type de climat, sol), le moment de la récolte et la méthode d'extraction....(**Besombes, 2008 ; Silano et Delbò, 2008; Marzoukia et al., 2009; Olle et Bender, 2010**).

Les plantes de cette famille sont assez riches en huiles essentielles, d'après **mohammedi Zohra et al en 2011**, une extraction faite de la plante *Lavandula stoechas L* a donné un rendement de $2.01g \pm 0.02$.

2. Extraction des polyphénols

L'extraction des polyphénols a donné un extrait marron légèrement gélatineux. Le rendement est de 45%. Un autre travail a montré une teneur de 19.29% de polyphénols chez *Lavandula stoechas* récoltée de la même région (**Menaceur F et al, 2012**).

La réaction de Folin-Ciocalteu est utilisée pour le dosage des composés phénoliques totaux. L'ensemble de ces composés est oxydé par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier, de couleur orange, est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite est proportionnelle au taux de composés phénoliques et possède une absorption maximale aux environs de 750 nm (**Waterhouse, 2001**).

Le dosage de l'extrait obtenu a donné une concentration 30mg d'équivalent en acide gallique.

3. Isolement et identification des souches de *Klebsiella pneumoniae*

3.1 Aspect macroscopique

Toutes les souches de *K. pneumoniae* présentent les caractères généraux des entérobactéries. C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, qui se cultive sur milieux usuels non-enrichis. Après 24 heures à 37°C, elle forme des colonies arrondies, muqueuses, généralement bombées et brillantes sur Milieu BCP. (Figure 07)

Elles présentent des également des colonies muqueuses, lactose positif, épaisses, opaques, bombées, de consistance visqueuse et confluent.

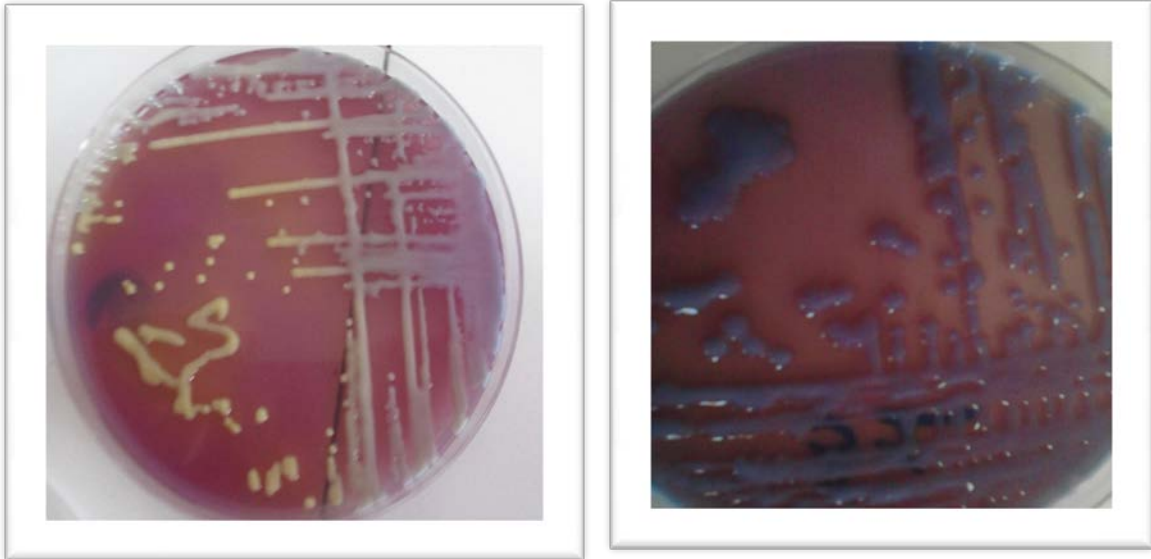


Figure 7: morphotypes de *Klebsiella pneumoniae* sur le milieu BCP (originale)

3.2. Aspect microscopique

Toutes les souches isolées sont des bacilles à Gram négatif (Figure 08), toujours immobile, donnant un aspect muqueux, assez typique.

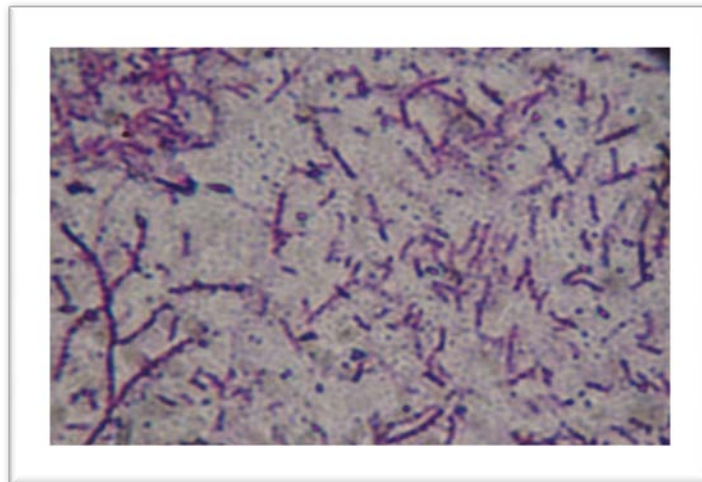


Figure 8: examen microscopique après coloration de Gram (originale)

3.3. Caractères biochimiques

L'identification par la galerie classique a permis de caractériser 6 souches de *Klebsiella pneumoniae*.



Figure 9: résultats des quatre tests de la galerie classique (originale)

Le tableau suivant résume les caractères biochimiques des souches de *K. pneumoniae*.

Tableau 01: résumé des résultats de la galerie classiques des souches de *Klebsiella pneumoniae*

	<i>Résultats</i>	<i>Interprétation des résultats</i>	
<i>Milieu TSI</i>	Virage de la couleur vers le jaune	Fermentation de lactose	Lac +
	Présence des bulles de gaz	Production de gaz	Gaz++
<i>Milieu Citrate de Simmons</i>	Changement de la couleur du milieu vers le bleu	L'utilisation de citrate comme une seule source de carbone	Citrate +
<i>Milieu Clark et lubs</i>	Après 24h d'incubation le milieu devient trouble	Deux tests d'après le tube de 24h	
		*Voges Proskauer	VP+
		*Rouge de Méthyle	RM-
<i>Milieu Mannitol</i>	Virage de la couleur vers l'orange		Mobilité -

Dans la période d'isolement, six souches de *K. pneumoniae* ont été isolées des infections urinaires et identifiées par les techniques citées ci-dessus.

4. Détection de la présence de la capsule des souches de *Klebsiella pneumoniae*

Après lecture au microscope, la capsule était visible comme un halo clair entourant chacune des 6 souches identifiées (Figure 10). En effet, presque toutes les souches de la famille des *Enterobacteriaceae* sont capables de produire une capsule. Ce résultat se concorde avec celui obtenu par **Bellifa S. et al.,(2013)**, l'auteur a trouvé que dans toutes les souches identifiées de *K. pneumoniae*(115), il y a présence de la capsule. Cette capsule est un moyen de défense de ces germes contre les différents antibiotiques.

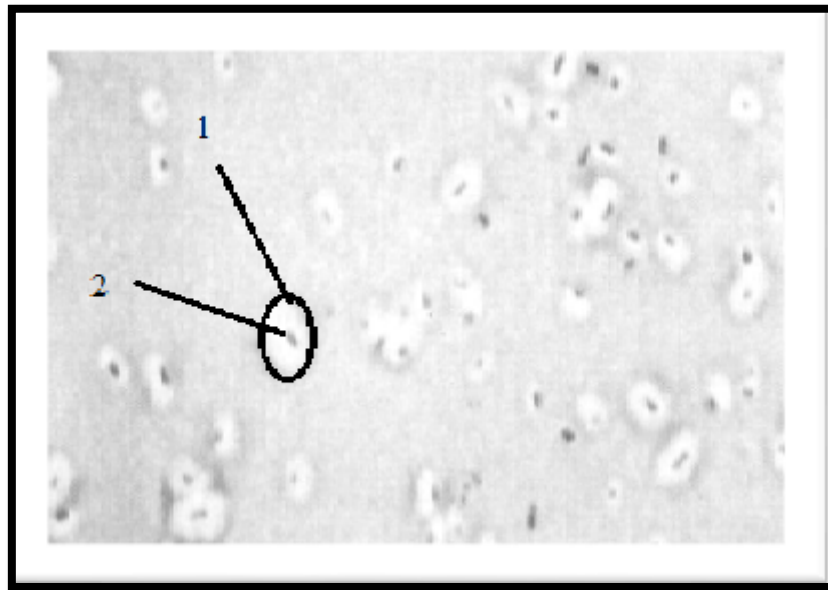


Figure 10:détection de la capsule par l'encre de chine ; (1) : Capsule ; (2) : La bactérie (originale)

5. Résistances aux antibiotiques

L'évaluation de la sensibilité des antibiotiques à l'hôpital est une phase primordiale, elle oriente le choix des traitements. *Klebsiella pneumoniae* est naturellement résistante aux pénicillines (Amoxicilline, Ticarcilline) par production d'une β -lactamase

Certains antibiotiques n'exercent aucun effet sur les souches de *K. pneumoniae*, ceci est dû à la résistance de ces souches à ces traitement (**Courvalin et al.,2006**).

Un antibiogramme a été réalisé sur la totalité des souches. Leurs phénotypes de résistance vis-à-vis chaque antibiotique sont représentées dans la figure ci-dessous.

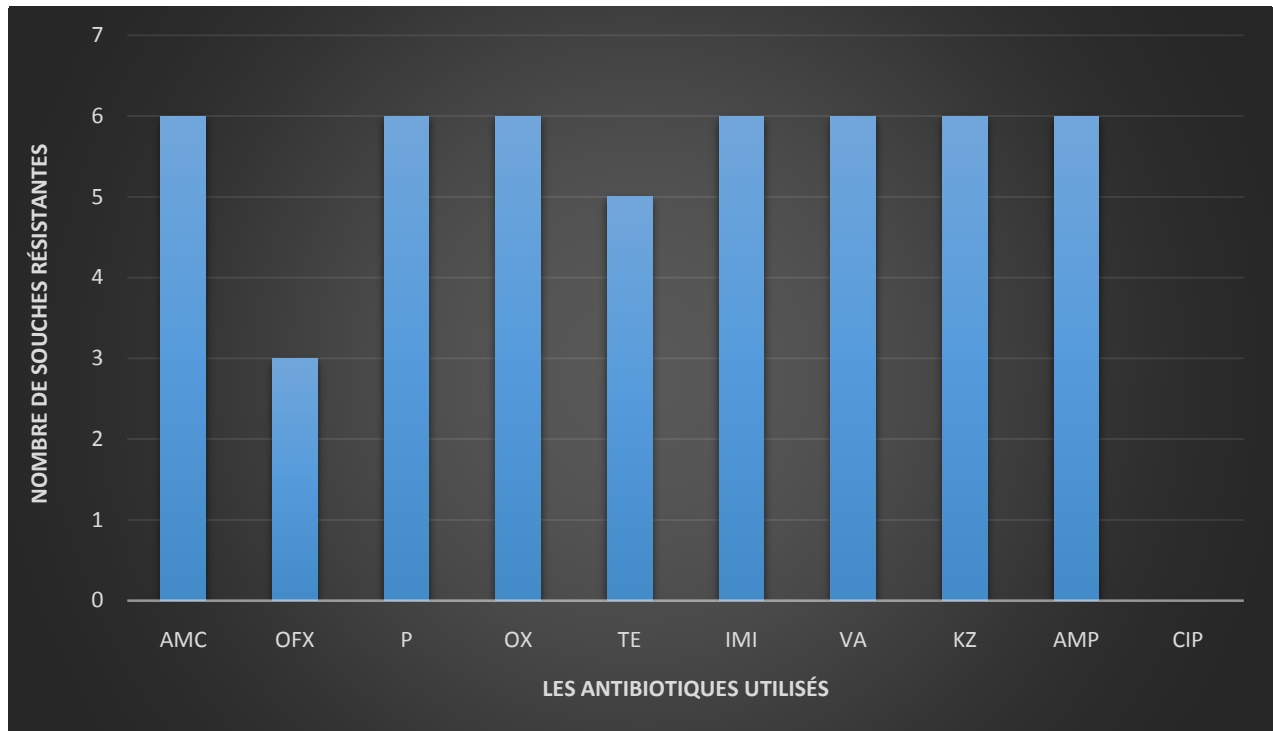


Figure 11: évaluation de la résistance des souches *Klebsiella pneumoniae* vis-à-vis les antibiotiques

Les six souches révèlent des taux de résistance très élevés pour amoxicilline, pénicilline, oxacilline, imipénème, vancomycine, cefazoline et ampicilline.

- Trois souches sont résistantes à l’Ofloxacine (OFX).
- Cinq souches sont résistantes à la tétracycline (TE).
- Les six souches sont très sensibles à ciprofloxacine (CIP).

La résistance des bactéries gram négatif dont *K. pneumoniae* aux antibiotique est un phénomène récurrent, une étude menée en 2009 sur une totalité de 560 souches dont 178 étaient productrices de BLSE ou 31,8 % contre 405 souches en 2005 dont 96 productrices de BLSE ou 23,7 %. L’auteur avait noté aussi une diminution de la sensibilité des souches hospitalières à la piperacilline-tazobactam (TZP), cefotaxime (CTX) et AZT entre 2006 et 2009, et une augmentation sensible du taux de BLSE entre 2008 et 2009 (**Hamouche et al., 2012**).

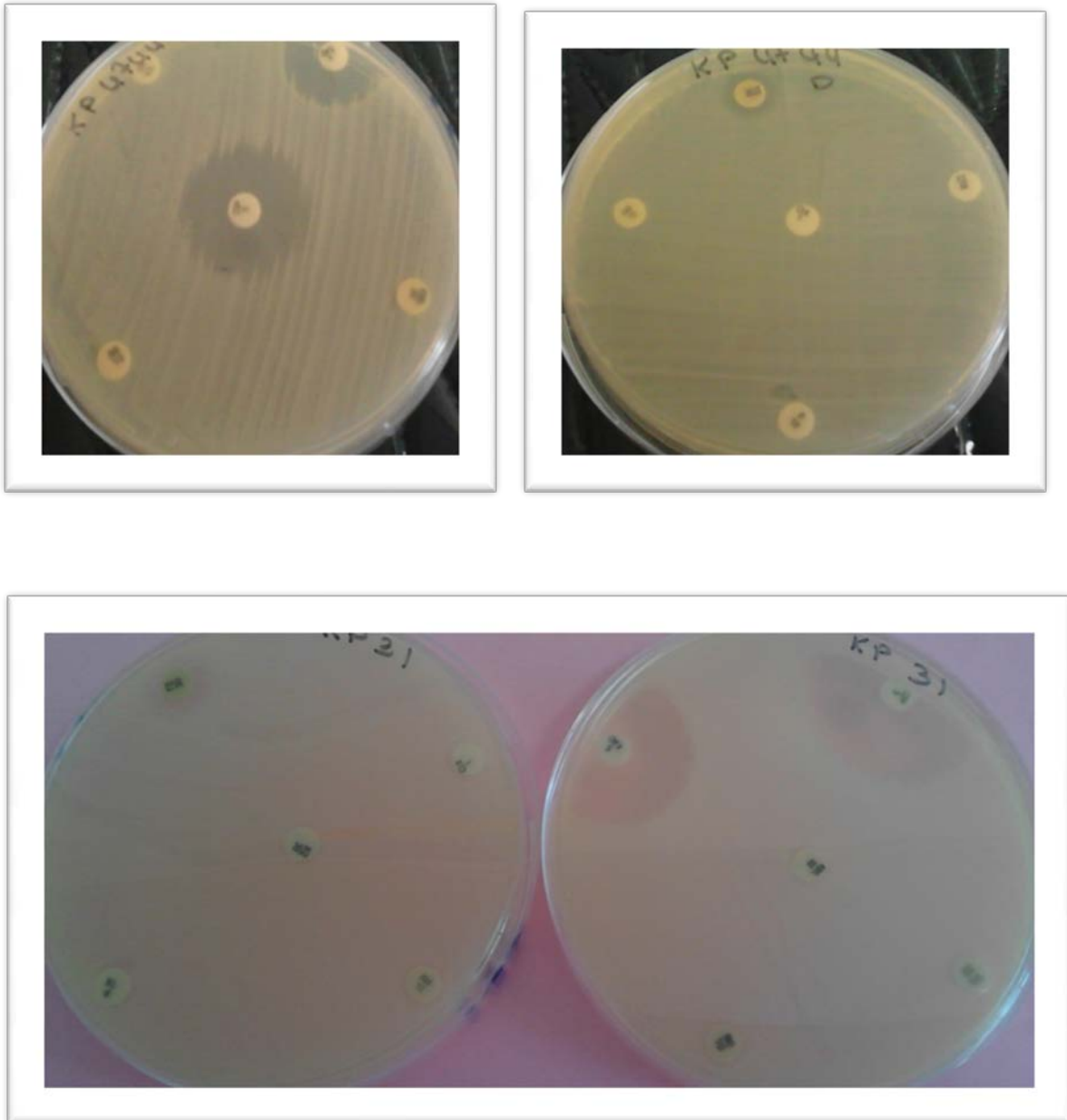


Figure 12: effet des disques d'antibiotiques sur *Klebsiella pneumoniae* (originale)

6. Activité antimicrobienne des extraits de la lavande

La méthode de diffusion sur gélose nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et des polyphénols de *lavandula officinalis* vis-à-vis des bactéries testées. Selon la classification de **Ponce et al. (2003)**, toutes les souches sont peu sensibles à l'huile essentielle de *lavandula officinalis*.

Pour les deux extraits utilisés, l'activité antimicrobienne contre *K. pneumoniae* était faible. Le tableau suivant montre les zones d'inhibition obtenues.

	H.E. (Diamètre mm)	Polyphénols (Diamètre mm)
<i>Kp1</i>	9	7
<i>Kp2</i>	7	8
<i>Kp3</i>	11	9
<i>Kp4</i>	9	10
<i>Kp5</i>	8	9
<i>Kp6</i>	12	11

Tableau 02: les diamètres des zones d'inhibition obtenues par les extraits de *Lavandula officinalis* sur les souches de *Klebsiella pneumoniae*

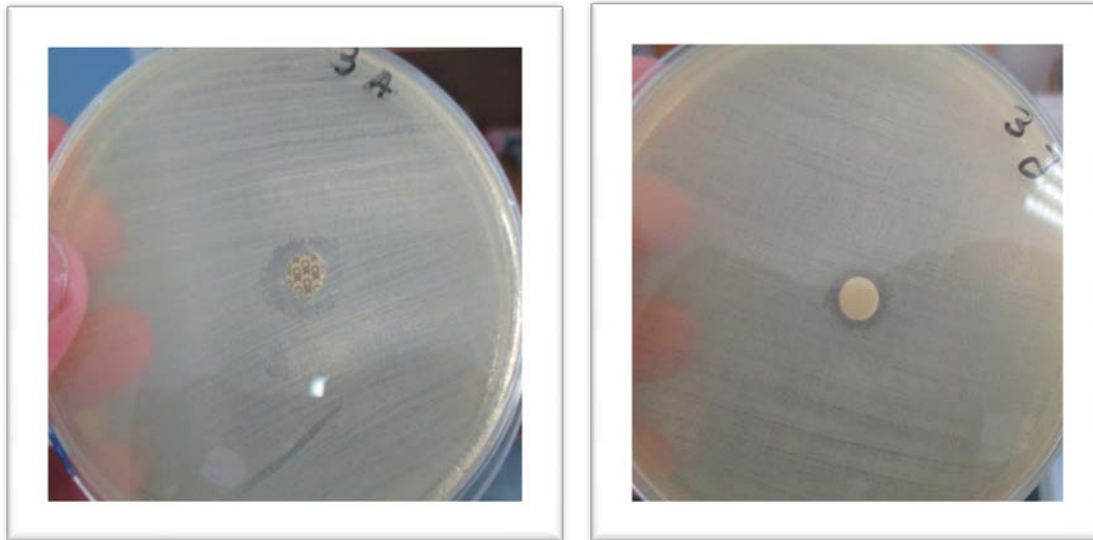


Figure 13: l'effet des disques imbibé de l'huile essentielle sur *K. pneumoniae* (originale)

D'autres travaux comme N. Chahboun *et al.* ; 2015 ont montré que l'huile essentielle de *lavandula officinalis* a un faible effet sur *Klebsiella pneumoniae* (zone d'inhibition de 12mm). Il est clair alors que l'huile essentielle de la lavande peut ne pas être très efficace contre des germes résistants aux antibiotiques de synthèse.

7. Evaluation de la formation du biofilm *in vitro* par la méthode tube (TM)

Les six souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées durant notre étude ont été testées pour leurs capacités à former des biofilms par la méthode tube (TM). (Figure 14)

La technique utilisée a montré les résultats suivants :

Trois souches sont fortement formatrices de biofilm, deux souches sont modérément formatrices de biofilm et une seule souche non formatrice de biofilm.

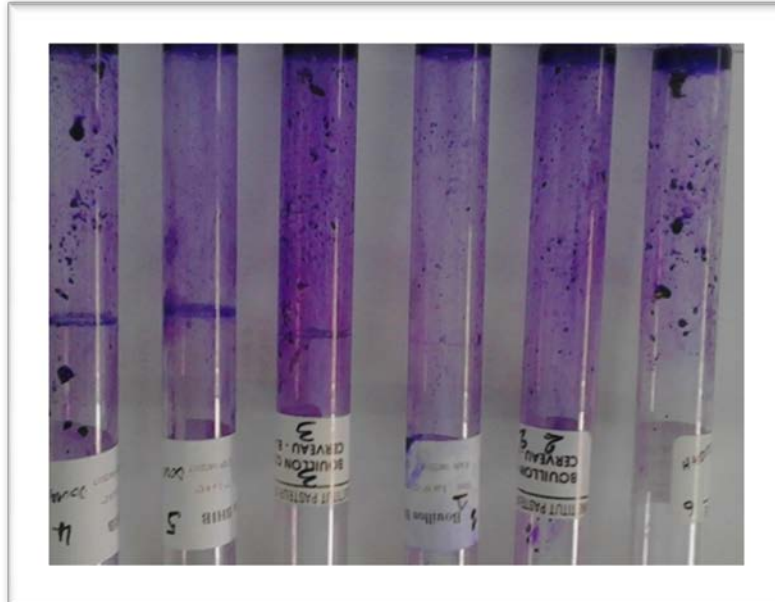


Figure 14 : évaluation de la formation de biofilm par la méthode tube (MT) (originale)

D'autres travaux ont montré que plusieurs souches de *K. pneumoniae* sont formatrices de biofilm à un taux élevé, **Bellifa et al.** (2013) a trouvé que sur 115 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 30 sont fortement formatrices du biofilm, 65 modérément formatrices de biofilm et 25 souches sont non formatrices de biofilm.

De même que pour *E. coli* (*Enterobacteriaceae*), **Myriam AUGER, 2012** a trouvée sur 10 souches de *Escherichia coli*, trois souches sont fortement formatrices du biofilm, 3 modérément et 4 sont non formatrices du biofilm.

8. Etude de l'effet des extraits de *Lavandula officinalis* sur la forme planctonique et biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae*

Toutes les souches(6) de *K. pneumoniae* isolées des infections urinaires ont été retenues pour cette partie, le choix a été fait selon leurs grandes capacités de former le biofilm et la présence d'une capsule.

De nombreux problèmes associés au développement des biofilms en milieu médical, ont pour origine leur résistance extrêmement élevée aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants).

Cette résistance accrue est multifactorielle, est liée aux conditions de vie dans le biofilm (hétérogénéité, accès aux nutriments, oxygène etc.). Elles modifient les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques qui s'ajoutent aux mécanismes de résistance connus (Lewis, 2008).

Afin de comparer l'effet de l'huile essentielles de *Lavandula officinalis* sur les deux formes de bactéries, une détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales inhibitrices du biofilm vis-à-vis l'huile essentielle et les extraits phénoliques a été recherché (tableau 03).

Tableau 03: l'effet d'huile essentielle de la lavande sur les souches de *K. pneumoniae*

	CMI (mg/ml)	CMI de biofilm (mg/ml)
KP1	0.128	0.256
KP2	0.128	0.256
KP3	0.05	0.1
KP4	0.04	0.08
KP5	1.024	2.048
KP6	1.024	2.048

	CMI (mg/ml)	CMI de biofilm (mg/ml)
KP1	0.08	0.16
KP2	0.07	0.14
KP3	0.04	0.08
KP4	0.02	0.04
KP5	0.9	1.8
KP6	1.02	2.04

Tableau 04 :l'effet des extraits phénoliques de la lavande sur les souches de *K. pneumoniae*

De façon générale, nos résultats montrent que les concentrations minimales inhibitrices de la forme biofilm (âgé de 24heures) de toutes les souches étaient plus importantes que les CMI de la forme planctonique.

De même **Singla et al, (2012)** ont montré que *K. pneumoniae* en mode de croissance biofilm était plus résistante à des antibiotiques qu'en mode planctonique, les valeurs CMI de biofilm étaient identiques ou huit fois plus élevée que leurs correspondants CMI.

Les concentrations antimicrobiennes nécessaires pour inhiber les biofilms bactériens peuvent être 10-1000 fois plus élevées que celles qui sont nécessaires pour inhiber les mêmes bactéries sous forme planctonique (**Simoès, 2011**).

Les résultats obtenus montrent que notre huile essentielle a un effet antibactérien sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* plus proche que celui des extraits phénoliques de *Lavandula officinalis*

Conclusion

Les infections bactériennes sont la cause majeure de la morbidité et de la mortalité en milieu hospitalier dont la majorité peut être due à *K. pneumoniae*. L'importance médicale de cette espèce bactérienne est sa capacité à provoquer de nombreux types d'infections chez l'homme. Notre travail nous a permis de montrer que *K.pneumoniae* isolée chez des patients atteints de infections urinaires à l'hôpital de Thénia a une forte résistance aux antibiotiques utilisés à l'hôpital.

Toutes ces souches sont entourées par des capsules, ce qui explique leurs capacités de former les biofilms. Par la méthode tube (MT) nous avons constaté que les souches de *K. pneumoniae* isolées des infections urinaires étaient des bonnes formatrices du biofilm : parmi les six souches que nous avons isolées cinq souches sont formatrices des biofilms.

Comme nous l'avons repris à divers niveaux du présent travail, l'importance des biofilms tient entre autre à leurs fortes résistances (rôle de la matrice d'exopolysaccharides) et à la difficulté d'imprégnation par les antibiotiques.

A côté des substances antimicrobiennes produites par les micro-organismes, différentes plantes médicinales synthétisent des molécules odorantes, qui constituent les huiles essentielles et les extraits phénoliques, capable d'exercer un effet équivalent à celui des antibiotiques, et ce grâce à la nature chimique de ces constituants.

L'évaluation de l'activité antibactérienne, par la méthode de diffusion sur gélose nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et les polyphénols de *Lavandula officinalis* vis-à-vis de six bactéries de *Klebsiella pneumoniae*. Ce pouvoir est relativement faible, avec des zones d'inhibition variant entre 7 et 12mm pour l'huile essentielle et 7 et 11mm pour les composés phénoliques.

L'inhibition de la croissance de *Klebsiella pneumoniae* par l'utilisation des extraits de *Lavandula officinalis* révèle des CMI de biofilm plus élevées vis-à-vis les CMI obtenus à cause de la structure complexe du biofilm, qui nécessite des concentrations plus élevées pour l'attaquer.

Enfin, nos résultats indiquent que l'huile essentielle et les extraits phénoliques de *Lavandula officinalis* n'a pas une très grande activité antibactérienne sur *Klebsiella pneumoniae* isolées des infections urinaires. Selon la classification de toutes les souches sont sensibles à l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*.

Cette faible efficacité est due probablement aux pertes des composés volatils de l'huile essentielle durant le stockage et/ou l'extraction. Cette faible efficacité pourrait être aussi due au fait qu'au cours de la période d'incubation quelques composants volatils de l'huile peuvent

s'évaporer des milieux de culture, ce qui diminuerait sa concentration, et par la suite son activité antibactérienne.

A l'issue de la présente étude, il serait intéressant de mener une étude plus approfondie sur :

- L'huile essentielle et les polyphénols de *Lavandula officinalis* afin d'isoler, de purifier et d'identifier les composés ayant une activité antibactérienne sur des souches cliniques comme *Klebsiella pneumoniae* ;
- Tester l'effet de ces mêmes extraits sur l'inhibition de la formation de biofilms formés par d'autres bactéries telles que *E.coli* et *Acinetobacter baumannii* ;
- Identifier le gène responsable de la formation de biofilm

Référence bibliographique

Agence Française de Sécurité Sanitaire des produits de santé (AFSSAPS). (Mai 2008):"Recommandations Relatives Aux Critères De Qualité Des Huiles Essentielles. Contribution Pour L'évaluation De La Sécurité Des Produits Cosmétiques Contenant Des Huiles Essentielles". 18. PDF.

Alain Branger et Marie-Madeleine Richer et Sébastien Roustel (2007). "Microbiochimie et alimentation." 344.

Anthony Ojeil, Nada El darra, Youssef El Hajj, Paulette Bou Mouncef, Toufic J.Rizk et Richard G.Maroun. (2010). "Identification Et Caractérisation De Composés Phénoliques Extraits Du Raisin Chateau Ksara." (11), 15: 117-131.

Balestrino D. (2006)."Formation De Biofilm Par *Klebsiella Pneumoniae* : Facteurs Impliqués Et Rôle Du Quorum-Sensing." Thèse de doctorat Clermont Ferrand. France 7-9.

Bagchi, D., Garg, A., Krohn, R.L., Bagchi, M., Bagchi, D.J., Balmoori, J., Stohs, S.J. (1998). Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. *Gen. Pharmacol.* 30, 771–776.

Behlau, I. & Gilmore, M.S. (2008) "Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infectious Diseases." *Arch ophthalmol*, 126, 1572-1581.

Bellifa Samia (2014). Evaluation de la formation de biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées des dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de Doctorat Université Abou Beker Belkaid Tlemcen.

Beloin, C. R., A et Ghigo, J.M. (2008). "Escherichia Coli biofilms." 289, 249, 322.

Beloin, C. R., A et Ghigo, J.M. (2008). "Escherichia coli, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract."

Besombes C., 2008. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermomécanique

Boutaleb N. (2007). "Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable." 174.

Bruneton J. (1993). "Pharmacognosie Phytochimie Plantes Médicinales." *Tec et Toc, Lavoisier*, 211-338.

Burt S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review, *International Journal of Food Microbiology*, p.223-253.

Carl A. Batt et Mary-lou Tortorello. (2014). "Encyclopedia of Food Microbiology Second Edition."

Carson, C. F. et T. V. Riley. (1995). "Antimicrobial Activity of the Major Components of the Essential Oil of *Malaleuca Alternifolia*." *J Appl Bacteriol.* 78:264-9.

Catherine Dupin & Danièle Festy (2012). "La lavande, c'est malin: Huile essentielle, Fraîche ou séchée." 30: 112.

Christensen GD., S. W., Bisno AL., Beachy EH. (1982). "Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces." NCBI: 1-9.

Christensen, S. C. a. B. K. (1972). "An endemic caused by multiresistant *Klebsiella* in an urological unit." *Scand.J.Urol.Nephrol*: 6:232-238.

Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie. (1997). <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/bibliotheque/remic/24-Antib.pdf>.

Cosentino S., Tuberoso C. I. G. et al. (1999). "In-Vitro Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Sardinian *Thymus* Essential Oils." *Lett Appl Microbiol.* 29(2).

Costerton J.W., Geesey G-G., Cheng K.J. (1978). "How Bacteria Stick Sci A.M." 238:86-95.

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

Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999). "Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections." *Science* 284, 1318-1322.

Couic-Marinier F., Lobstein A. (2013). "Les Huiles Essentielles Gagnent Du Terrain À L'officine." *Actualités pharmaceutiques* 52 (525). 18-21.

Courvalin, P., R. Leclercq, and E. Bingen (2006). "Antibiogramme." 2:142-162, 227-246, 263-277.

De Chalvet De Rochemonteix A. (2009). "Les biofilms et la peau."

Dorman H. J. D. et Deans S. G.(2000). "Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils." *J Appl Microbiol* 88(2), 308-16.

Donlan, R. M. (2011). "Biofilm elimination on intervascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner." *Clinic Infect Dis.* 52: 1038-1045.

Donlan, R.M.et Costerton, J.W. (2002). "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms." *clinic microbial rev* 15: 167-193.

Donlan, R.M.(2008). "Biofilms on Central Venous Catheters : Is Eradication Possible?" *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 133-161.

Dupin, Danièle Festy et catherine (2012). "Les huiles essentielles c'est malin?" 50: 240.

E. Hamouche, D.K. Sarkis. (2005-2009). "Évolution De La Sensibilité Aux Antibiotiques De *Escherichia Coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Pseudomonas Aeruginosa* Et *Acinetobacter Baumannii* Dans Un Chu De Beyrouth." *Pathologie Biologie*, Issue 3, Volume 60: e15-e20.

El Fertas-Aissani R., M. Y., Alouache S., Bakour R. (2012). "Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different ".

Fauchère, J.-L. (2002). "Bactériologie générale et médicale." 365.

Filloux A, Vallet I. (2003). "Biofilm: Set-up and Organization of a Bacterial Community." *Medecine sciences: M/S.* 19(1). 77-83.

Fränkel Alan, D.Barbara J. Calnan, Sara Biancalana and Derek Hudson. (1991). Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *5(2):201-10.*

Goller C.C, Romeo T. (2008). "Environmental Influences on Biofilm Development". *Current Topics in Microbiology and Immunology 322: 37- 66.*

Hall-Stoodley, L., Costerton.J.W. et Stoodley. (2004). "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases." *Nat Rev Microbial 2, 95-108.*

Henerici A.T. (1932)."Studies of Fresh Water Bacteria : I.A Direct Microscopic Technique." *Journal of bacteriology 25(3), 277.*

Jacobsen, S.M. Stickler, D-J.Mobley, H-L & Shirtliff,M.E. (2008). "Complicated catheter-associated urinary tract infectious due to *Escherichia coli* and proteus mirabilis". *Clin.Microbiol.Rev.*

Jean-Jaques Macheix, Annie Fleuriet et Christian Jay-Allemand. (2005). " Les Composés Phénoliques Des Végétaux " Un Exemple De Metabolites Secondaires D'importance Économique." *192, 6-14.*

Jones, G. W., and R. E. Isaacson. (1983)."Proteinaceous Bacterial Adhesins and Their Receptors." *Crit. Rev. Microbiol., (10) 229–260.*

Kaplan, J. B. (2010). "Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications and potential therapeutic uses." *J Dent Res 89(205-218).*

Kassis-Chikhani, N., D. Decre, V. Gautier, B. Burghoffer, F. Saliba, D. Mathieu, D. Samuel, D. Castaing, J. C. Petit, E. Dussaix, and G. Arlet. (2006). "First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1 and blaSHV-5 in a French university hospital. *J.Antimicrob.Chemother.*" *57: 142-145.*

Lambert R. J. W., Skandamis P. N., et al. (2013). "A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol." *J App Microbiol91(3): 453-462.*

Lardry J-M, Haberkorn V.(2007). "L'aromathérapie et les huiles essentielles." *Kinesither Rev61:14-7.*

Larousse (2001). "Encyclopédie des plantes Médicinales deuxième édition ".

Lewis K, Rossi PG, Ferrari B, Berti L, Casanova J, Tomi F.(2008). "Composition, irregular terpenoids, chemical variability and antibacterial activity of the essential oil from *Santolinaorsica* Jordan et Fourr." *Phytochemistry*. 68: 1698-1705.

Macheix JJ,Christien JA, and Allemand J.(2005)"Les composés phénoliquesdes végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique." collection biologie,presses polytechniques et universitaires,Romands.1-192.

Marzoukia H., Elaissib A., Khaldic A., Bouzidd S., Falconerie D., Marongiu B., Pirasa A. and Porcedda S. (2009). Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *The Open Natural Products Journal*, Vol. 2, p. 86-91.

Martinez LR, Casadevall A. (2007). " Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light". *Applied and Environmental Microbiology*. 4592- 4601.

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(Mc Landsborough)*: 24: 25-29.

Maud Belmont (2013). " *Lavandula angustifolia*M., *Lavandula latifolia* M., *Lavandula x intermedia* E. : études botaniques, chimiques et thérapeutiques." Sciences pharmaceutiques.

Menaceur Fouad et Hazzit Mohammed. (2015). Composition chimique et activité antioxydante des huiles essentielles et extraits éthanoliques du romarin (*Rosmarinus eriocalyx*) et de la lavande (*Lavandula stoechas*). Article universitaire.

Miller, M. B. et B. L. Bassler (2001). "Quorum sensing in Bacteria." *Annu Rev Microbiol* 55: 165-199.

Myriam-Auger (2012). "Formation de biofilm in vitro par des souches chimiques d'*Escherichia coli*: impact de la modification des conditions expérimentales." 90: 90.

Mohammedi Zohra, Atik Fawzia.(2011). Pouvoir antifongique et antioxydant de l'huile essentielle de *lavandula stoechas* L. *Revue Nature et Technologie*.39(6).

Nabors, W.M. (2004). "Biologie Végétale : Structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies ": 614: 151-155.

N. Chahboun, A. Esmail, H. Abed, M. Barrahi, R. Amiyare, M. Berrabeh, H. Oudda, M. Ouhssine. (2015). "Evaluation de l'activité bactériostatique d'huile essentielle de la *Lavandula Officinalis* vis-à-vis des souches d'origine clinique résistantes aux antibiotiques." **6 (4):** 1186-1191.

Ofek, I., and N. Sharon. (1988). "Lectinophagocytosis: A molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria." Infect. Immun.: 56:539–547.

Ofek, I., J. Goldhar, D. Zafri, H. Lis, R. Adar, and N. Sharon. (1991). "Anti-*Escherichiacoli* adhesin activity of cranberry and blueberry juices." *N. Engl. J. Med.* **324:1599.**

Ofek, I., K. Kabha, A. Athamna, G. Frankel, D. J. Wozniak, D. L. Hasty, and D. E. Ohman. (1993). "Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a." *Infect. Immun.* **61:4208–4216.**

Ofek, I., and R. J. Doyle. (1994). "Bacterial adhesion to cells and tissues." Chapman & Hall, Ltd., London, United Kingdom.

Olle M. and Bender I. (2010). The content of oils in Umbelliferous crops and its formation, *Agronomy Research* 8 (3), p.687-696.

Paterson, D. L. and R. A. Bonomo. (2005). "Extended-spectrum bêta-lactamases: a clinical up date." *Clin. Microbiol. Rev* 18: 657-686.

Peter M. Hawkey, Stephen H. Gillespie. (2006). "Principale and practice of clinical Bacteriology second Edition ": 341.

Philips PL; Wolcott RD ; Feltcher J ; Schultz GS. (2010). "Biofilm Made Easy." Wonds International. 1-8.

Philips P, Sampson E, Yang Q, et al. (2008). "Bcterial biofilms in wonds". *Wonds Healthing Southern Africa* 1: 10-12.

Podschun R, Ullmann U. (1998). "*Klebsiella spp.* As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors." Journal of Clinical Microbiology **11(4):589-603.**

Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. et Roura S.I., (2003). "Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard, Lebensm." *Wiss.u.-Technol.*36: p.679-684.

Roulier Guy. (1990). " Les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. ." Editions Dangles.

Samia Bellifa, H. H., Damien Balestrino, Nicolas Charbonnel, Imane M'hamedi, Ibtissem Kara Terki, Merieme Lachachi, Wafae Didi, and Christiane Forestier. (2013). "Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria." *African Journal of Microbiology Research.* 7(49): 7.

Silano V. and Delbò M., 2008, Assessment report on *Foeniculum vulgare* Miller, EMEA, European Medicines Agency, London, p. 23.

Silverstein et Domatucci, C. F. (2003). "Les biofilms bactériens et prothèses implantables." *Journal international de recherche de l'impuissance* 15.

Simard S., M. Hachey J., Colin G.J. J. Mill. (1988). *Wood Techn.* (8) 561-573.

Simoës M. (2011). Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. *Current medicinal chemistry.* 18(14): 2129-2145. **Singla S., Harjai K., Chhibber S. (2012).** Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. *The Journal of antibiotics.*

Singh, D.; Kumar, TR.; Gupta, VK.; Chaturvedi, P. (2012). "Antimicrobial activity of some promising plant oils, molecules and formulations." *Indian J Exp Biol.*50(10):714-7.

Sirot, D. (1995). "Extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases." *J.Antimicrob.Chemother* Suppl A.36: 19-34.

Spormann, AM. (2008). "Physiology of Microbes in Biofilms Stability of Burkholderia Cenocepacia Biofilms." *Applied and Environmental Microbiology,* 5208- 5218.

Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B.S., Vabic-Vlahovic M (2000). "A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation" *Journal of Microbiological Methods.* 40: 175–179.

S. Ram Verma, U. Iaiq Rahman, S. Chandan Chanotiya, K. Rajesh Verma, S. Amit Chauhan, Anju Yadav, Anand Singh. And K. Ajai Yadav. (2010). Essential oil

composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India., Journal of the serbian chemical society. 75 (3): 343-348.

Teuscher Eberhard, Robert Anton et Annelise Lobstein (2005). "Plante aromatiques: Epices, aromates, condiments et huiles essentielles". 544.

Thénard Louis Jaques baron (1836). "Traité de chimie élémentaire, théorique et pratique." 520.

Touati, Naima. (2009). Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des substances végétales actives (polyphénols et huiles essentielles) et de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Rosmarinus officinalis*. 104.

Trautner.B.W et Darouiche .R.O.(2004). "Role of biofilm in Catheter Associated Urinary tract infection." Am J Infect Control32: 177-183.

Trautner B.W, Darouiche R.O.(2009). "Role of biofilm in Catheter-associated Urinary Tract infection,A." Am J Infect Control32 (3): 177-183.

Van Houdt, R et Michiels .C.W.(2005). "Role of bacterial Cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation." Res Microbiol156: 626-633.

Waterhouse, A.L. (2001). Determination of Total Phenolics, in Current Protocols in Food Analytical Chemistry, II.1.1-11.1.8.

Woodford, N., P. M. Tierno, Jr., K. Young, L. Tysall, M. F. Palepou, E. Ward, R. E. Painter, D. F. Suber, D. Shungu, L. L. Silver, K. Inglima, J. Kornblum, and D. M. Livermore.(2004). "Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. Antimicrob. Agents Chemother 48: 4793-4799.

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 Bakteriologie274(2): 239-245.

Yang, J., L.Ye,W.Wang,Y.Luo,Y.Zhang and L.Han. (2011). "Diverse prevalence of 16S rRNA methylase genes *ermaA* et *erm B*".173.

ANNEXE

Préparation du tampon

Le tampon PBS (tampon Phosphate Salin) à 0,1M, pH= 7,2± 2

KH₂PO₄	4 0, 29 g
K₂HPO₄	4 1, 19 g
NaCl	4, 93 g

Dans un litre d'eau distillée. Eau distillée (qsp) 1 L

Préparation des milieux de culture

Gélose nutritive :

Extrait de viande	1g
Extrait de levure.....	2g
Peptone tryptique.....	5g
NaCl ou KCl.....	5g
Agar-Agar	15à 20g
Eau	1 dm ³

pH= 7.4

Pour la préparation de 1L on prend 23g de gélose nutritive en poudre

Muller Hinton

Infusion de viande de bœuf.....	300ml
Peptone de caséine	17.5g
Amidon de maïs	1.5g
Agar	17g

pH= 7.4

Pour la préparation de 1L on prend 38g de Muller Hinton en poudre

Une fois les géloses préparées, elles sont versées dans des flacons puis stérilisées à 121°C pendant 15 minutes ; avant d'être coulées dans des boîtes de pétri.

Milieu de culture liquide

Bouillon cœur-cerveille (BHIB)

Protéose-peptone	10g
Infusion de cerveau de veau	12.5g
Infusion de cœur de bœuf	5g
Glucose	2g
Chlorure de sodium.....	5g
Hydrogénophosphate de sodium.....	2.5g

pH=7.4