

**Inhibition du biofilm formé par *Klebsiella pneumoniae* responsable d'infection urinaire par l'huile essentielle et les polyphénols de *Lavandula officinalis*.**Afif Chaouche Thinina<sup>1\*</sup>, Arab Karim<sup>1</sup>, Laoufi Razika<sup>2</sup>, Malek Malya<sup>3</sup><sup>1</sup> Laboratoire de Valorisation et de Conservation des Ressources Biologiques. UMBB, Algérie.<sup>2</sup> Laboratoire de Technologies, Valorisation, Physicochimie du matériel biologique et biodiversité, UMBB, Algérie.<sup>3</sup> Aix-Marseille Université, AMU, faculté de médecine, Marseille, France.\*Correspondance avec : [afifchaouchethanina@yahoo.fr](mailto:afifchaouchethanina@yahoo.fr)**Résumé**

L'échec de l'antibiothérapie n'est pas rare dans les infections urinaires à *Klebsiella pneumoniae*, la formation de biofilm peut compromettre la réussite de l'antibiothérapie. Cette étude propose des molécules bioactives comme alternative.

L'huile essentielle et les polyphénols de *Lavandula officinalis* ont été extraits. Des souches bactériennes de *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées à partir d'infections urinaires. La capacité de ces souches à former des biofilms est testée. Après, l'activité antimicrobienne et l'évaluation du pouvoir inhibiteur de formation de biofilms des extraits ont été testées.

Certaines souches isolées peuvent former des biofilms, les huiles essentielles inhibent la formation de biofilms à une concentration de 1/4, les polyphénols sont actifs à partir de 7.5 mg/ml.

**Mots clés :** *Lavandula officinalis*, *Klebsiella pneumoniae*, huiles essentielles, polyphénols, biofilms.

**Abstract**

Failure of chemotherapy is not uncommon in urinary tract infections with *Klebsiella pneumoniae* biofilm synthesis can cause this compromise this medical procedure. This study proposes bioactive molecules as alternatives.

Essential oils and polyphenols from *Lavandula officinalis* were extracted. Bacterial strains of *Klebsiella pneumoniae* were isolated from urinary tract infections. Their ability to form biofilm was assessed. After, we used antimicrobial acidity to assess its ability to prevent biofilms genesis.

Isolated strains were able to synthesize biofilms, essential oils showed a clear activity from 1/4 And polyphenols show it from 7.5 mg/ml.

**Key words:** *Lavandula officinalis*, biofilm, essential oils, polyphenols, biofilms.

**Introduction**

Chaque année, plus de 150 millions cas d'infections urinaires sont enregistrés dans le monde.

Dans les infections urinaires sévères l'origine est parfois nosocomiale ou est souvent associée à l'installation d'un cathéter et dans ce cas la présence de biofilms n'est pas rare. Ces biofilms sont constitués d'un mélange des protéines Tom Harsfall, de cristaux de nature minérale, de lipopolysaccharides bactériens et de bactéries vivantes (Walter *et al.*, 2001).

Pour les infections urinaires les moins compliquées on utilise des antibiotiques de première intention : des molécules comme la Nitrofurantoïne, la fosfomycine, la cotrimoxazole ou une pénicilline (Barber *et al.*, 2013). Cependant, en plus de la résistance accrue des germes aux antibiotiques, la formation de biofilms constitue un réservoir de bactéries difficilement accessible pour les antibiotiques de la thérapie classique.

Des options basées sur la biochimie structurale du biofilm ont été essayées, principalement des molécules agissant sur la biosynthèse des pilis responsables de l'attachement et de l'ancrage des bactéries dans diverses parties du système urinaire (Pinkner *et al.*, 2006), mais l'efficacité de telles molécules n'a pas été démontrée sur des modèles animaux (Barber *et al.*, 2013).

L'usage des plantes et de leurs extraits en antibiothérapie n'est plus restreinte à la médecine traditionnelle. Des essais cliniques *in vitro* sont réalisées et des méta-analyses de bases de données sont effectuées et donnent parfois des résultats très encourageants (Martin, 2003).

*Lavandula officinalis* est une espèce de la famille des Lamiacées prépondérante dans le bassin méditerranéen. Cette plante a des usages variables dans la médecine traditionnelle allant de la cosmétologie (Hossam *et al.*, 2015), aux troubles comportementaux (Scuterri *et al.*, 2017). La richesse de cette plante en molécules bioactives nous a suggérer d'explorer son potentiel en matière d'antibiothérapie et plus précisément à scruter son pouvoir inhibiteur de formation de biofilms.

## **1. Matériel et méthodes**

### **1. 1. Les extraits de la plante étudiée**

La plante utilisée pour extraire les huiles essentielles et les polyphénols est *Lavandula officinalis*, elle est récoltée de la région de Boumerdès (Algérie) dans les mois de Février-Mars 2016.

L'huile essentielle est obtenue par hydrodistillation pendant trois heures. Après séparation, l'huile est mise dans un flacon spécial et gardée à 4°C jusqu'à utilisation.

Les polyphénols ont été extraits par macération dans un mélange méthanol-acide formique (85%-15%) pendant 48 heures. L'évaporation des solvants se fait par Rotavapor à 45°C. après extraction, l'extrait est dosé par la méthode de Folin- Ciocalteu suivant le protocole de Hogan *et al.*, 2009.

### **1. 2. La souche bactérienne**

Des bactéries de *Klebsiella pneumoniae* sont isolées de patients atteints d'infections urinaires, hospitalisées à l'hôpital de Thénia dans la Wilaya de Boumerdes.

Dans la période du 15 février 2016 au 10 Mars 2016, six souches bactériennes de *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées, identifiées par des galeries biochimiques. Une souche de *Klebsiella pneumoniae* formatrice de biofilm a été identifiée par le Maldi-Tof et est retenue pour évaluer l'effet inhibiteur de biofilm des deux extraits.

### **1. 3. Antibiogramme**

Un antibiogramme est utilisé afin de tester la sensibilité des bactéries isolées vis-à-vis des antibiotiques utilisés en thérapeutique.

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 (CA-SFM, 2013).

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

### **1. 4. Activité antimicrobienne et CMI**

L'activité antimicrobienne se fait par le dépôt de 10µl de l'extrait sur un disque vierge, le disque est déposé au centre d'une boîte Pétri contenant le Mueller Hinton et la bactérie ensemencée suivant les recommandations de la Société Française de Microbiologie (2013).

Le même travail se refait pour chacune des dilutions préalablement préparées.

### **1. 5. Formation de biofilm**

L'évaluation de formation de biofilm se fait par la méthode des tubes. A partir d'une boîte de culture de 18-24 heures, ensemencer une colonie dans 10mL 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.

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 de biofilm. La formation de biofilm est notée comme suit: 0 pour absent, + pour modéré et +++ pour fort (Christensen GD *et al.*, 1982-1985).

### **1. 6. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des Biofilms (CMIB)**

Les CMIB des Huiles essentielles et des polyphénols ont été déterminées suivant le protocole de (SFM, 2010).

100 µl de la suspension bactérienne sont mis dans les puits d'une microplaque de 96 puits, la plaque est couverte puis incubée 24h à 37°C.

Une fois la plaque retirée, elle est lavée trois fois avec un tampon phosphate salin (PBS). Les mêmes puits sont ensuite remplis de 70µl de bouillon Mueller Hinton et de 30 µl de chaque concentration. Deux rangés sont remplies uniquement de bouillon de culture pour servir de témoin de contamination.

La microplaque est ensuite incubée une seconde fois à 37°C pendant 24h. La lecture du résultat se fait visuellement, la CMIB correspond au premiers puits où la croissance bactérienne n'a pas été observée.

## 2. Résultats et discussion

### 2. 1. Extractions

L'extraction des huiles essentielles a donné une huile de couleur jaune pâle avec une odeur âcre. Le rendement calculé est de  $1.02 \pm 0.01$  %.

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).

Les plantes de cette famille sont assez riches en huiles essentielles, d'après Bousmaha *et al.*, (2006), une extraction faite de la plante *Lavandula dentata* a donné un rendement de 1.68%.

L'extraction des polyphénols a fait ressortir un extrait marron légèrement gélatineux. Le rendement est de 45%. Un travail a montré une teneur de  $89 \pm 7$  mg/g de polyphénols chez la même plante récoltée de Bejaia (Touati, 2009).

Le dosage de l'extrait polyphénolique de *L. officinalis* a donné une concentration 30 mg d'équivalent en acide gallique.

### 2. 2. Les souches bactériennes

Les bactéries utilisées sont identifiées par leurs caractères biochimiques puis confirmées par la technique du Maldi-Tof-SM qui a donné un score de 2.17.

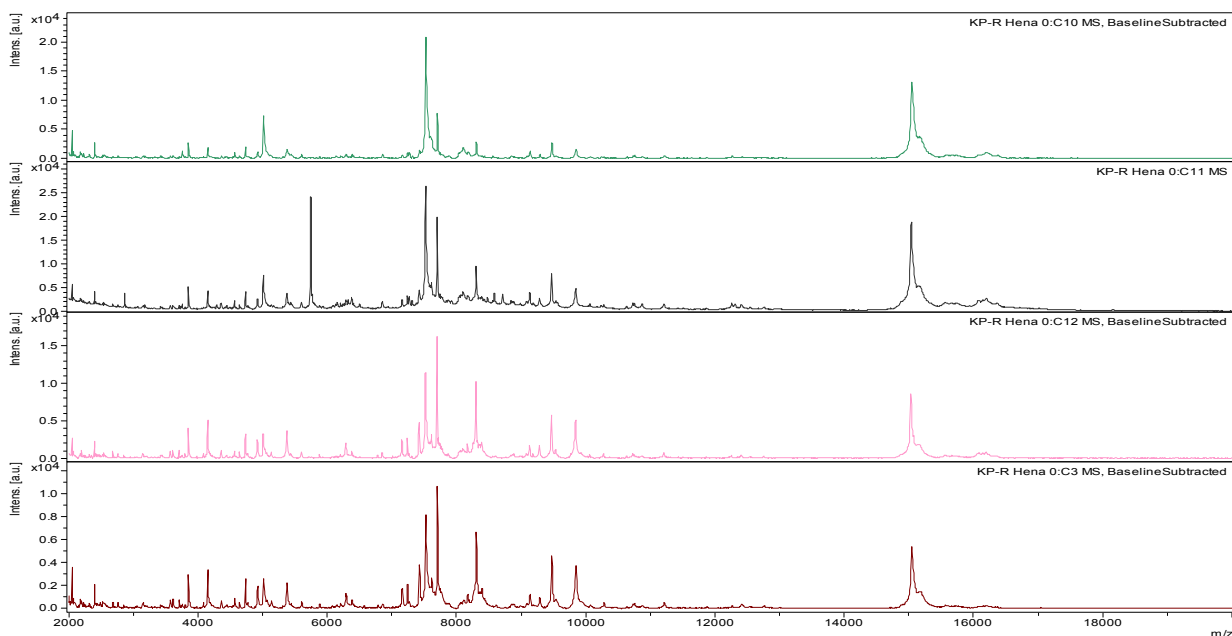


Figure 1 : Maldi-Tof de *Klebsiella pneumoniae*

### 2. 3. Antibiogramme

La résistance des bactéries gram négatif dont *K. pneumoniae* aux antibiotiques 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-tazobactame (TZP), cefotaxime (CTX) et à l'azythromycine entre 2006 et 2009, et une augmentation sensible du taux de BLSE entre 2008 et 2009 (Hamouche *et al.*, 2012).

Les six souches isolées dans le présent travail se sont avérées résistantes aux antibiotiques, la figure 2 montre le profil de résistance vis-à-vis les antibiotiques utilisés.

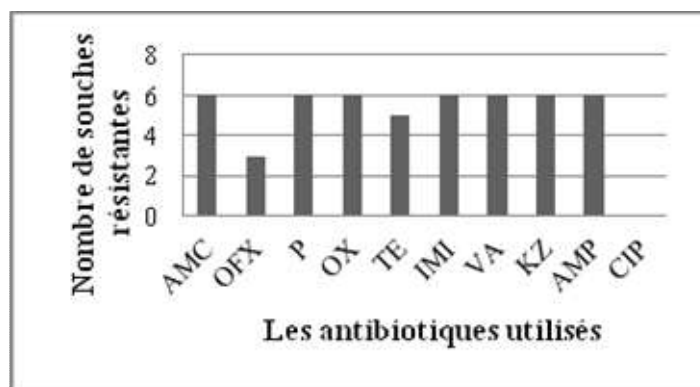


Figure 2 : Profil de résistance aux antibiotiques

### 2. 3. Activité antimicrobienne et CMI

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 moyennement sensibles à l'huile essentielle de *Lavandula officinalis*.

Les résultats de l'activité antimicrobienne et des concentrations minimales inhibitrices des huiles essentielles et des polyphénols de la plante étudiée sont présentés dans les tableaux ci dessous :

**Tableau 1 : zones d'inhibitions obtenues par l'extrait brut**

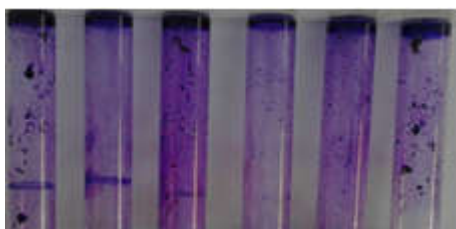
	H.E. (Diamètre mm)	Polyphénols (Diamètre mm)
KP1	9	12
KP2	7	8
KP3	11	11
KP4	9	10
KP5	8	9
KP6	12	11

Tableau 2 : CMI obtenues.

	CMI (H.E.)	CMI (polyphénol mg/ml)
KP1	½	3.75
KP2	E.B	30
KP3	¼	7.5
KP4	E.B.	15
KP5	E.B.	15
KP6	1/8	15

## 2.4. Evaluation de la formation du biofilm et CMIB

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). La technique utilisée a montré les résultats observés dans la figure 3. Cependant, trois souches sont fortement formatrices de biofilm, les trois autres n'ont pas le pouvoir de former un biofilm (figure 3).



**Figure 3 :** Evaluation de la formation de biofilm par ma méthode des tubes

Les activités antibiofilm des deux extraits de la plante *Lavandula officinalis* sont représentées dans le tableau 3.

**Tableau 3:** CMIB des H.E. et des polyphénols.

	H.E.	Polyphénols (mg/ml)
<i>KPI</i>	1/4	7.5

H.E. : huile essentielle

De façon générale, nos résultats montrent que la concentration minimale inhibitrice de la forme biofilm (âgé de 24 heures) d'une souche est plus importante que sa CMI en 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 CMIB étaient identiques ou huit fois plus élevée que leurs correspondants CMIs. 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 (SFM, 2010).

## Conclusion

Le monde végétal regorge de molécules bioactives aux propriétés thérapeutiques aussi variées que puissantes. La démonstration de l'activité de *Lavandula officinalis* contre la formation de biofilms dans les infections urinaires ouvre une piste de recherche qui nécessite plus d'explorations à effectuer *in vitro* ainsi que des essais de biopharmacie pour évaluer à côté de leur efficacité leur innocuité pour l'usage humain.

## Références bibliographiques

Barber J., Paul Norton Adam, Spivak M., Matthew A., Mulvey (2013). Urinary Tract Infections: Current and Emerging Management Strategies .Clinical infectious diseases. Volume 57 issue 5. Pages 719-724.

- Besombes Colette (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques : applications généralisées. Thèse de Doctorat, Université de la Rochelle. P289.
- Bousmaha, L., Boti, J.B. Intraspecific chemical variability of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria. *Flavour Fragr. J.* 21, 368-372, 2006.
- Christensen GD., Simpson WA., Bisno AL., Beachy EH. (1982). Adherence of biofilm producing strains of *Staphylococci epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity* 37: 318-326.
- Christensen GD., Simpson WA., Younger JA., Baddour LM., Barrett FF., Melton DM. (1985). Adherence of coagulase negative *Staphylococci* to plastic tissue cultures: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology.* 22:996-1006.
- Hammouche, Sarkis (2012). Évolution de la sensibilité aux antibiotiques de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans un CHU de Beyrouth entre 2005 et 2009. *Pathologie et biologie.* 60 (3): 15-20.
- Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Zoecklein, B., Zhou, K. (2009). Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes, *LWT. Food Science and Technology*, 42: 1269-1274.
- Hosam O. Elansar, Eman A. Mahmoud, Shadi Shokralla, Kowiyou Yessoufou (2015). Diversity of Plants, Traditional Knowledge, and Practices in Local Cosmetics: A Case Study from Alexandria, Egypt. *Economic botany.* 69 (2): 114-126.
- Karen Martin Edzard Ernst (2003). Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *Journal of antimicrobial chemotherapy.* Volume 51 issue 2: 241-246.
- Pinkner S., Han Remaut, Floris Buelens, Eric Miller, Veronica Åberg, Nils Pemberton, Mattias Hedenström, Andreas Larsson, Patrick Seed, Gabriel Waksman, Scott J. Hultgren, and Fredrik Almqvist (2006). Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America.* Issue 130(47): 17897-17902.
- 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.
- Scuteri, Luigi Antonio Morrone, Laura Rombolà, Pina Rosa Avato, Anna Rita Bilia, Maria Tiziana Corasaniti, Shinobu Sakurada, Tsukasa Sakurada, and Giacinto Bagetta (2017). Aromatherapy and Aromatic Plants for the Treatment of Behavioural and Psychological Symptoms of Dementia in Patients with Alzheimer's Disease: Clinical Evidence and Possible Mechanisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* ID 9416305, 8.
- Société Française de Microbiologie, 2010-2013.
- Singla, D.; Kumar, TR.; Gupt, VK.; Chaturvedi, P. (2012). "Antimicrobial activity of some promising plant oils, molecules and formulations." *Indian J Exp Biol.* 50(10):714-7.
- Touati N. (2009). l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Lavandula stoechas* et *Rosmarinus officinalis* dans la région de Bejaia.
- Walter E., Stamm et Ragnar Norrby S. (2001). Urinary Tract Infections: Disease Panorama and Challenges. *The journal of infectious diseases.* Volume 183 issue supplement 1. Pages S1-S4.