



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département de biologie

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à
l'environnement
« LAMAABE »

Mémoire du master Présenté par

Melle BOUSSAFI Amina

Melle YEBDRI Loubna

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

Filière : Biologie Fondamentale
Option : Microbiologie Fondamentale

Intitulé du thème

**L'effet des huiles essentielles sur les bactéries formatrices de biofilm
isolées de sondes endotrachéales de CHU de TLEMCEN**

Soutenue le 08 juillet 2020, devant le jury composé de

Présidente	BOUBLENZA Lamia	Maître de conférences A	Université de Tlemcen
Examineur	BELYAGOUBI Larbi	Maître de conférences A	Université de Tlemcen
Encadreur	BELLIFA Samia	Maître de conférences B	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2019-2020

Remerciements

Ce mémoire a été effectué dans le laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et l'Environnement (LAMAABE), Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, sous la direction du **Professeur HASSAINE Hafida**, à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.

Nous tenons tout d'abord à remercier « **DIEU** » le tout puissant, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à adresser toutes nos gratitude et nos profonds remerciements à **Mme BELLIFA Samia**, Maître de conférences B à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, qui a accepté avec sa bienveillance de nous prendre en charge pour réaliser cette étude dont le mérite lui revient grâce à son aide, sa gratitude, sa disponibilité, son orientation, son écoute constante et attentive et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter nos réflexions. Merci beaucoup pour votre patience, votre soutien et vos encouragements et pour tout ce que tu nous as appris tout au long de ce travail.

Nos vifs remerciements à **Mme BOUBLENZA Lamia**, Maitre de conférences A à l'université Abou-bekr Belkaid Tlemcen, qui a honorée ce travail en acceptant de présider le jury. On lui remercie profondément aussi bien en tant que membre du jury et pour ses conseils et sa contribution à l'amélioration portée dans nos études durant tous ces années d'enseignement.

Nos profonds remerciements à **Mr BELYAGOUBI Larbi**, Maitre de conférences A à l'université Abou-bekr Belkaid Tlemcen, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce travail. On vous remercie énormément de nous avoir montré la clé du succès, pour votre soutien, vos conseils et votre enseignement.

Nos remerciements les plus fortes à nos très chers **parents** qui ont toujours été là pour nous « Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous nous avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. On est redevable d'une éducation dont on est fier ».

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes chers parents

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Ce travail est le fruit de vos efforts, de votre amour et de vos prières. Je vous remercie pour votre soutien, vos multiples encouragements et votre patience. J'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

A Ma chère Grand-mère

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A ma chère sœur Nesrine et son mari

A mon cher frère Zaki

A mes chères cousines Asma et Ahlem

A toutes ma famille

A mon binôme loubna

A mes chères amies

A toute la promotion « Microbiologie fondamentale 2019-2020 ».

Amina

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes chers parents,

Toute l'encre du monde ne pourrait suffire pour exprimer mes sentiments envers vous. Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin. Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont vous avez fait preuve, de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits de votre semence et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir comme parents.

*A mes chères sœurs **Selsabil et kawther,***

Merci, adorables sœurs, d'avoir montré tant de complaisance et de serviabilité à mon égard. Puisse Allah, le Très-Haut, vous accorder une vie heureuse et un avenir prospère, je vous aime mes sœurs chéries que notre fraternité se prolonge à l'éternité...

*A ma sœur **Amina,***

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude et l'amour, je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, santé et de réussite.

*A mes chère cousines, **Marwa et Amel,***

Je vous dédie ce travail en témoignage de ma profonde affection et du grand amour que je vous porte.

*A ma tante **Amaria** et sa belle famille*

*A ma **famille***

*A mes amies **Esma, Sarra, Amina***

Loubna

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	01
Première partie : Synthèse bibliographique	03
Chapitre 1 : Les biofilms bactériens	03
1. Historique et découverte de biofilm.....	03
2. Définition de biofilm.....	04
3. Les principaux constituants du biofilm.....	05
4. Le cycle de développement d'un biofilm.....	05
5. Les facteurs influençant la formation de biofilm.....	09
6. Le Quorum Sensing : régulation de la formation des biofilms.....	11
7. Biofilm dans le domaine médical.....	12
Chapitre 2: Biofilms et infections sur les dispositifs médicaux	13
1. Généralités	13
2. Définition d'un dispositif médical.....	13
2.1. Définition de la sonde endotrachéale.....	14
2.2. Types de sondes.....	15
3. Biofilm et pneumopathies sous ventilation mécanique.....	16
3.1. Physiopathologie des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique.....	17
Chapitre 3 : Lutte contre les biofilms	18
1. L'hygiène.....	18
2. L'antibiothérapie.....	18
3. Elimination mécanique du biofilm	19
4. La désinfection.....	19
5. Ultrasons et potentialisation de l'action des antibiotiques.....	19
6. Utilisation d'enzymes dégradant les exopolysaccharides de la matrice.....	19
7. Les vaccins.....	20
8. Les huiles essentielles.....	21
Deuxième partie : Matériel et méthodes	23
1. Lieu d'étude.....	23
2. Prélèvements.....	23

3. Ensemencement et isolement.....	23
4. Identification.....	24
5. Conservation des souches.....	25
6. Evaluation de la formation du biofilm <i>in vitro</i>	25
7. Activité anti biofilm d' <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
8. L'effet de quelque huile essentielle sur un biofilm préformé.....	27
Troisième partie : Résultats et discussion.....	28
1. Prélèvements et analyse microbiologique.....	28
2. Evaluation de la formation de biofilm chez les souches isolées de sondes endotrachéales.....	33
3. Etude de l'effet de <i>Lavandula officinalis</i> et <i>Eucalyptus globulus</i> sur la forme biofilm des souches isolées de sondes endotrachéales.....	36
Conclusion générale.....	38
Références bibliographique.....	39

Annexes

Liste des Abréviations :

AHL :	Acyl homosérines lactones
ATB :	Antibiotiques
ATS :	Antiseptiques
DO :	Densité optique
Doi :	Densité optique initiale
Dot :	Densité optique témoin
EPS :	Exopolysaccharides
HE :	Huiles essentielles
IAS :	Infections associées aux soins
IgA :	Immunoglobuline de classe A
LPS :	lipopolysaccharides
OMS :	Organisation mondiale de la santé
PAM :	plantes aromatiques et médicinales
PAVM :	Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique
PVC :	Chlorure de polyvinyle
QS :	Quorum sensing
RCA :	Rouge Congo Agar
<i>S.aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
TCP :	technique de plaque de culture de tissus

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique montrant le développement d'un Biofilm en cinq étapes.....	06
Figure 2 : Représentation schématique des différents types d'intubation.....	14
Figure 3 : Représentation schématique d'une sonde endotrachéale standard.....	16
Figure 4 : Aspect macroscopique des colonies de <i>S. aureus</i> sur milieu Chapman.....	29
Figure 5 : Aspect macroscopique des colonies de <i>K.pneumoniae</i> sur milieu Mac-Conkey.....	29
Figure 6 : Aspect macroscopique des colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur un milieu ceftrimide.....	30
Figure 7 : Aspect macroscopique des colonies d' <i>Acinetobacter baumannii</i> sur milieu conkey.....	30
Figure 8 : Résultat de l'identification de <i>K. pneumoniae</i> par la galerie API 20 ^E	31
Figure 9 : Résultat de l'identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la galerie API 20 ^E	31
Figure 10 : Résultat de l'identification d' <i>Acinetobacter baumannii</i> par la galerie API 20 ^E	31
Figure 11 : Résultat de l'identification de <i>Staphylococcus aureus</i> par la galerie API staph.....	32
Figure 12 : Résultat de l'identification de <i>S. aureus</i> par le test d coagulation.....	32
Figure 13 : Aspect des colonies de <i>S.aureus</i> sur milieu RC (Rouge Congo).....	35

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition typique d'un Biofilm bactérien.....	05
Tableau 2 : Les différentes parties de la sonde endotrachéale avec le matériel utilisé.....	15
Tableau 3 : Les différents types de sonde endotrachéale.....	15
Tableau 4 : Prélèvements des sondes endotrachéales	23
Tableau 5: Résultats des souches sur les différents milieux de culture.....	28

المخلص

الأغشية الحيوية هي مجتمعات منظمة من الكائنات الحية الدقيقة المرتبطة بسطح حيوي أو غير حيوي من خلال إفراز مادة عديد السكاريد الخارجية. يبدو أن هذه هي المفتاح للعديد من الإصابات. على الرغم من تنفيذ التدابير الوقائية ، يصعب القضاء على الأغشية الحيوية بسبب تحملها المميز لجرعات عالية من المضادات الحيوية.

يهدف عملنا إلى دراسة الطرق النوعية والكمية المختلفة لتقييم تكوين الأغشية الحيوية للبكتيريا المعزولة من الأنابيب الرغامية على مستوى خدمة الإنعاش ، CHU Tlemcen ، وثانيًا ، سنهتم باختبار التأثير المضاد للبيوفيلم للزيوت الأساسية لبعض النباتات الطبية: *lavandula officinalis* و *Ecalyptus globulus* على السلالات المعزولة التي تشكل الأغشية الحيوية.

بالنظر إلى الظروف الحالية (COVID-19) ، لم يتم تنفيذ الجزء الثاني ، وبالتالي تظهر نتائج العمل السابق من ناحية أن قدرة السلالات على تكوين الأغشية الحيوية متنوعة وفقًا للطرق المستخدمة (التقنية صفيحة ميكروية جيدة 96 (TCP) ، طريقة أجار الكونغو الأحمر (CRA)). من ناحية أخرى ، أظهر العمل الذي تم إجراؤه على إمكانات المضادات الحيوية للزيوت الأساسية (HE) من *lavandula officinalis* و *Ecalyptus globulus* على سلالات تشكيل الأغشية الحيوية نشاطًا أفضل مضادًا للبكتيريا لزيوت *E. globulus* الأساسي كروية تليها *Lavandula officinalis*. تظهر أحدث التطورات أن له مصلحة لا لبس فيها في المعركة المستقبلية ضد الأغشية الحيوية.

الكلمات المفتاحية

الشريط الحيوي،الأجهزة الطبية،الأنابيب الرغامية ، الزيوت الاساسية.

Résumé

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

L'objectif de notre travail vise à étudier par différentes méthodes qualitatives et quantitatives l'évaluation de la formation de biofilm des bactéries isolées de sondes endotrachéales au niveau de service de réanimation, CHU Tlemcen, et en deuxième lieu on va s'intéresser à tester l'effet anti biofilm des huiles essentielles de quelques plantes médicinales : *lavandula officinalis* et *d'Ecalyptusglobulus* sur les souches isolées formatrices du biofilm.

Compte tenu aux conditions actuelles (COVID-19), la deuxième partie n'a pas été réalisé, donc les résultats des travaux antécédents montrent d'une part que la capacité de souches à former des biofilms est diversifiée en fonction des méthodes utilisés (Technique de microplaque 96 puits (TCP), méthode de rouge Congo agar (CRA). D'une autre part les travaux réalisés sur le potentiel antibiofilm des huiles essentielles (HE) de *lavandula officinalis* et *d'Ecalyptusglobulus* sur les souches formatrices de biofilms ont montré une meilleure activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*E. globulus* suivie de *Lavandula officinalis*. Les dernières avancées montrent que les HE possèdent un intérêt sans équivoque dans la lutte future contre les biofilms.

Mots clés

Biofilm, dispositifs médicaux, sondes endotrachéales, huiles essentielles.

Abstract

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

The objective of our work aims to study by different qualitative and quantitative methods the evaluation of the biofilm formation of bacteria isolated from endotracheal tubes at the level of resuscitation service, CHU Tlemcen, and secondly we will be interested in testing the anti biofilm effect of the essential oils of some medicinal plants: *lavandula officinalis* and *Ecalyptusglobulus* on the isolated strains that form the biofilm.

Given the current conditions (COVID-19), the second part has not been carried out, therefore the results of previous work show on the one hand that the capacity of strains to form biofilms is diversified according to the methods used (Technique well microplate (TCP), Congo red agar (CRA) method. On the other hand, work carried out on the antibiofilm potential of essential oils (HE) of *lavandula officinalis* and *Ecalyptusglobulus* on biofilm-forming strains has shown better antibacterial activity of essential oil of *E. globulus* followed by *Lavandula officinalis*. The latest advances show that HE has an unequivocal interest in the future fight against biofilms.

Keywords

Biofilm, medical devices, endotracheal tubes, essential oils.

Depuis le début de son existence, l'homme se bat pour sa survie dans un environnement où la compétition est rude et doit affronter des menaces, bien souvent invisibles à l'œil nu, conférées par de multiples agents infectieux. Pour cela, il est doté d'un système immunitaire dont l'efficacité est redoutable, mais il arrive parfois que ce dernier soit affaibli. Il a été pendant de nombreuses années admis, à tort, que les microorganismes responsables de ces infections se présentaient exclusivement sous forme libre et isolés dite planctonique, or, ce mode de vie ne serait que transitoire et ne correspondrait qu'à 1 % seulement du monde bactérien en milieu naturel, et que 99% des espèces bactériennes ne vivent individuellement, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces, autrement dit le mode de vie dominant des bactéries est probablement en biofilm [(Garrett *et al.*, 2008) ; (Medeiros, 2016) ; (Dupin, 2017)].

Les biofilms sont ubiquitaires, ont un impact dans des secteurs très variés, tel que le domaine médical (Lagrafeuille, 2016). En effet 60% des infections bactériennes chez l'homme impliquent des biofilms.

Les épidémies de ces infections bactériennes sont presque toujours associées à la contamination des dispositifs médicaux (sonde urinaire, sonde endotrachéale, cathéter...) [(Olivares, 2017) ; (Hajoubi, 2019)]. Parmi les infections les plus courantes à l'hôpital les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) associées aux sondages endotrachéaux. Ces infections représentent aujourd'hui un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale, étant responsable d'une lourde morbidité (Hamza, 2010) de mortalité et de surcoût important, elles restent une préoccupation croissante au niveau de l'hôpital par leur impact humain.

La thérapeutique des pathologies infectieuses se base principalement sur l'usage des traitements nettoyants, désinfectants et des médicaments de synthèse (antibiotiques, antifongiques). Si l'élimination des cellules à l'état planctonique semble satisfaisante, elle est moindre et non normalisée dans le cas des cellules sous forme de biofilm. La prescription, à grande échelle et parfois inappropriée, de ces agents a entraîné l'émergence de souches résistantes ou encore l'apparition de certains effets indésirables et de contre-indications limitant l'usage de ces médicaments, d'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles voies et surtout vers des végétaux qui ont toujours constitué une source d'inspiration de nouvelles thérapeutiques [(kaloustian et hadji Minaglou, 2012) ; (Marwan, 2019)].

Connue et appliquée bien avant d'avoir été étudiée, la thérapeutique par les plantes, est sans doute, aussi ancienne que l'est la maladie, transmise en tous lieux de génération en autre **(Debuige, 1984)**. Jusqu'à nos jours, en dépit des progrès considérables de la chimie, de L'industrie pharmaceutique et de la médecine, ces plantes n'ont rien perdu de leur importance. La pharmacie moderne continue à les utiliser comme matière première pour les préparations de certains médicaments **(Bekhechi, 2002)**.

La pharmacologie utilise ces molécules car elles ont un effet spécifique sur d'autres organismes, parmi ces substances les huiles essentielles qui caractérisent les plantes aromatiques et qui ont un champ d'action très large et une efficacité extraordinaire sur le plan de la santé **(Remmal et al., 1993)**.

Afin de mieux connaître les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles des plantes médicinales, notre travail va s'intéresser principalement à tester l'effet des huiles essentielles de *lavandula officinalis* et d'*Eucalyptus globulus* sur l'inhibition de la formation de biofilms sur les sondes endotrachéales.

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 et perspectives.

Chapitre 1 : Les Biofilms bactériens

En conditions naturelles, les microorganismes peuvent vivre sous forme libre ou planctonique, mais le plus souvent sont retrouvés en communautés pluricellulaires, plus ou moins complexes, à un ou plusieurs types d'organismes. De telles communautés microbiennes peuvent éventuellement adhérer à une surface. La coexistence de ces microorganismes et leurs comportements coopératifs entre eux, ont pour effet l'apparition de nouvelles fonctions au sein de la communauté microbienne. On appelle ces organisations ; des biofilms [(Moons *et al.*, 2009) ; (Klein, 2011) ; (Bezoui, 2016) ; (Tasse 2017)].

Le biofilm, une stratégie de survie, permet aux microorganismes de s'installer et de coloniser un environnement, plutôt que libres et isolés dans le milieu environnemental. En effet, les transitions entre ces modes de vie mettent en jeu des processus dynamiques et complexes [(Filloux et Vallet, 2003) ; (Roux et Ghigo, 2006) ; (Klein, 2011)].

Ce mode de vie, dit sessile (à l'opposé de mode de vie planctonique), est retrouvé dans tout type d'environnement. Il est la principale forme de vie microbienne et la capacité à former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique microbienne universelle, et par conséquent il est de plus en plus étudié en tant qu'un système d'organisation communautaire pour ces microorganismes [(Tremblay *et al.*, 2014) ; (Medeiros, 2016) ; (Tasse, 2017)].

1. Historique et découverte de biofilm

D'après les recherches les plus récentes, les bactéries seraient apparues sur Terre il y a environ 3,6 milliards d'années, soit bien avant l'apparition de l'homme lui-même, il y a environ 100 000 années. L'homme ne se doutait pas de l'existence même des microorganismes jusqu'au 17^{ème} siècle que le biologiste néerlandais Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) a développé le premier microscope. Il a visualisé et illustré graphiquement des «animalcules» (bactéries) trouvées dans sa propre plaque dentaire [(Stickler, 2008) ; (Bezoui, 2016) ; (Hajoubi, 2019)]. Ces données corrélées à nos connaissances actuelles montrent qu'il s'agissait d'un biofilm bactérien (Bjarnsholt *et al.*, 2013).

La théorie du mode de vie des bactéries non pas libres mais adhérentes sur une surface fut avancée par Henrici en 1932 (Henrici, 1936). Il observa sur des lames de verre plongées dans un aquarium, le développement de bactéries sur la surface des lames. Le lavage sous un robinet était insuffisant pour décrocher les bactéries. Il constata aussi, que les bactéries étaient abondantes et diverses. Ses observations des micro-organismes dans l'eau lui permirent d'établir une évidence acceptée seulement depuis quelques décennies : les bactéries sont

majoritairement adhérees sur une surface pour croître et non libres dans leur environnement **(Henrici, 1933)**.

Le concept de « biofilm » est né, mais le terme en lui même n'est pas encore utilisé. En 1943, Claude Zobell, considéré comme le père de la microbiologie marine, a examiné les populations marines par microscopie directe et démontra que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension. ZoBell et Anderson en 1936 ont noté que les bactéries sont généralement plus actives dans les petits que dans les grands récipients de forme similaire. Étant donné que les petits récipients présentent une surface relativement plus solide par unité de volume d'eau stockée que les grands récipients, ils ont conclu que les surfaces solides sont bénéfiques pour les bactéries dans les solutions nutritives diluées **[(Zobell, 1943) ; (Bezoui 2016) ; (Lagrafeuille, 2016)]**.

Ce résultat ne sera expliqué qu'en 1978 lorsque le microbiologiste John W. Costerton démontra pour la première fois l'existence des biofilms, en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des micro-organismes **[(Costerton *et al.*, 1978) ; (Lappin-Scott *et al.*, 2014)]**.

Enfin, dans les années 1980, les travaux de William Costerton mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixée sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines, présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales (surfaces des feuilles) ou animales (surfaces des muqueuses, surfaces dentaires etc.), elles sont appelées biofilms **(Roux et Ghigo, 2006)**.

2. Définition de biofilm

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

Le biofilm est communément défini comme des populations de microorganismes adhérees à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire d'une matrice extracellulaire autoproduite. Cette matrice extracellulaire prend la forme d'un réseau de structure tridimensionnelle complexe, composé d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire, de protéines et est susceptible de piéger des éléments provenant de l'environnement tel que des particules inorganiques **(Pessereau, 2015)**.

Les biofilms sont des communautés hétérogènes dynamiques en constant changement **(Hall-Stoodley et Stoodley, 2009)**. Ils peuvent se composer d'une seule espèce de bactéries,

de champignons ou, plus fréquemment, ils peuvent être polymicrobiens, c'est-à-dire qu'ils contiennent de multiples espèces variées. Au niveau le plus élémentaire, un biofilm peut être décrit comme des bactéries englobées dans une barrière fine et visqueuse composée de sucres et de protéines. La barrière du biofilm protège les micro-organismes contre les menaces externes [(Tregove *et al.*, 1996) ; (Dowd *et al.*, 2008)].

3. Les principaux constituants du biofilm

Les constituants essentiels d'un biofilm sont les micro-organismes agglomérés et la matrice qu'ils synthétisent. Les micro-organismes représentent 2 à 15 % du matériel du biofilm alors que la matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée d'un biofilm. La composition des EPS est très différente d'un biofilm à l'autre. Elle dépend de la nature des microorganismes présents dans le biofilm, de l'âge du biofilm et des différents facteurs environnementaux comme les forces hydrodynamiques, la température et la disponibilité de nutriments et leurs natures (Bezoui, 2016) (Tableau 1).

Tableau 1 : Composition typique d'un biofilm bactérien (Hajoubi, 2019).

Composés		Fraction	
Eau		87 à 99 %	
Bactéries		1 à 2 %	
EPS	Polysaccharides	2 à 5 %	40 à 95 %
	Protéines		< 1 à 60 %
	Acides nucléiques		< 1 à 10 %
	Lipides		< 1 à 40 %

4. Le cycle de développement d'un biofilm

La formation de biofilm a été proposée comme étant un processus de développement et de changement radical de mode de vie de microorganismes, dans lequel les bactéries planctoniques s'adaptent à la vie sur une surface (Kuchma *et al.*, 2005).

La transition des bactéries d'un état planctonique vers une forme sessile résulte de modifications profondes de l'expression génique [(Rumbo-Feal *et al.*, 2013) ; (Guilhen *et al.*, 2016)]. Bien que les mécanismes en jeu varient en fonction des espèces et des conditions environnementales, les biofilms partagent tous les mêmes étapes de développement.

Afin de lutter contre la formation de biofilms, il est nécessaire d'en connaître les étapes.

Celles-ci sont résumées en **figure 1**.

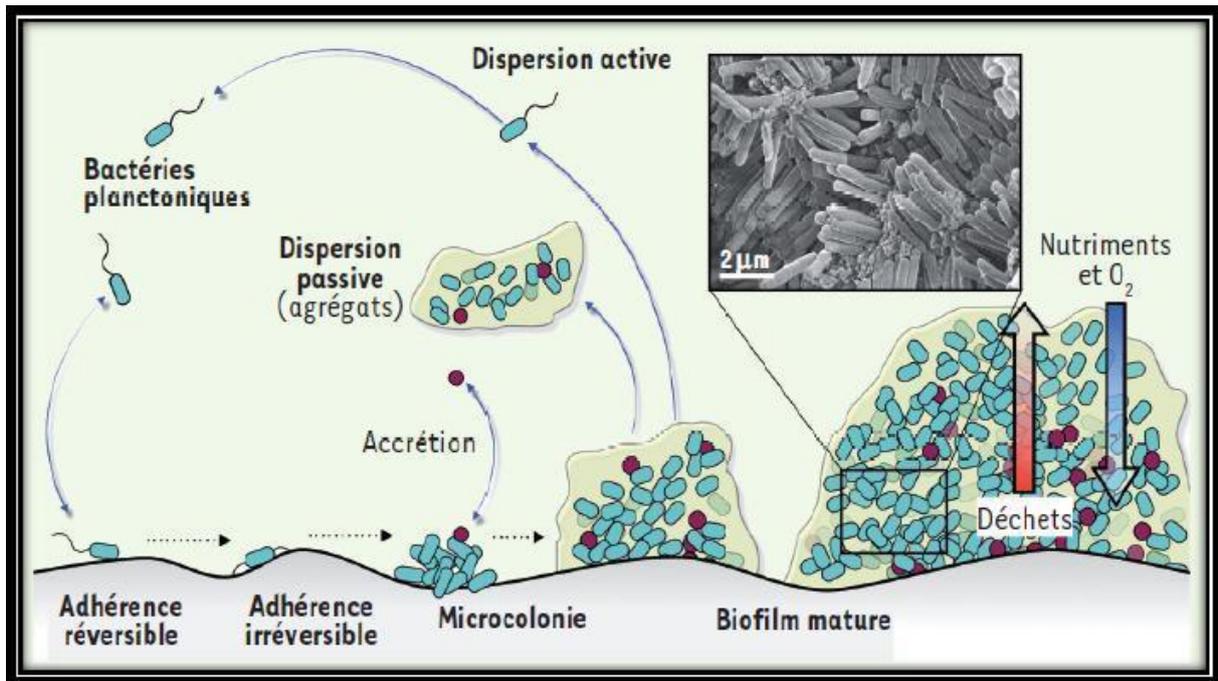


Figure 1 : représentation schématique montrant le développement d'un biofilm en cinq étapes (Lebeaux *et al.*, 2014).

On retrouve notamment :

1. Fixation initiale des cellules à la surface (attachement réversible des bactéries).
2. Adhésion irréversible et production d'EPS.
3. Développement précoce de l'architecture de biofilm (formation de micro colonies).
4. Maturation de biofilm (structure tridimensionnelle).
5. Détachement de biofilm.

a. Adhésion initiale aux surfaces « attachement réversible »

L'adhésion est une étape clé (Pantaleon, 2015). Les bactéries planctoniques sont confrontées à un choix dans l'environnement : nager ou adhérer (Belas, 2013). L'adhésion initiale est une étape primordiale pour la mise en place d'un biofilm.

La surface sur laquelle les bactéries vont adhérer peut être biotique (tissus, peaux, muqueuses, yeux, poumons, etc.) ou abiotique (implants médicaux, coques de bateau, rochers, etc.) ou, dans un premier temps, l'adhésion est dite réversible (Tasse, 2017).

L'adhésion réversible a lieu lors des premiers contacts entre la bactérie et surface, sa durée est de l'ordre de quelques secondes (Pessereau, 2015). Les bactéries planctoniques,

déclenchant leur passage d'un état unicellulaire nomadique à un état multicellulaire sédentaire grâce à plusieurs changements phénotypiques. En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles). Elles s'y attachent de manière réversible par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques. Les pili ou les flagelles, peuvent également contribuer à la fixation des cellules microbiennes à la surface. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le PH, l'osmolarité du milieu, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique du fluide et par la nature de la surface elle-même, sa rugosité et son hydrophobicité. Les bactéries adhèrent facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire [(Nudleman et Kaiser, 2004) ; (Beloin *et al.*, 2008) ; (Lopes, 2019)].

b. Adhésion irréversible aux surfaces

La fixation à la surface solide devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolysaccharides par les bactéries et conduisant à des fortes interactions avec des liaisons covalentes entre les bactéries et la surface, et surtout grâce à des structures d'adhérences variables selon les espèces bactériennes, par exemple pour les bactéries Gram négatives, il s'agit des pili des fimbriae et des curli, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface, et pour les bactéries Gram-positives, ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. Ces molécules d'adhésions permettent d'établir des contacts cellule- surface et des contacts cellule-cellule [(Vallet *et al.*, 2001) ; (Van Houdt et Michiels, 2005) ; (Beloin *et al.*, 2008) ; (Lemon *et al.*, 2008)].

c. Formation de microcolonies « maturation précoce »

Après avoir adhérees, les bactéries vont croître et se multiplier horizontalement et verticalement. Les bactéries forment des microcolonies qui vont continuer de se développer jusqu'à former des macrocolonies. En grossissant, les espaces entre les microcolonies se réduisent, formant ainsi des canaux aqueux qui permettent le transport des nutriments et de l'oxygène. Ces canaux contribuent aussi à l'évacuation des déchets bactériens qui peuvent être néfastes pour la communauté microbienne. Différents facteurs comme la disponibilité des nutriments, le pH interne du biofilm, la pression partielle en oxygène, l'osmolarité, la source de carbone vont contrôler la croissance du biofilm (Pantaleon, 2015).

d. Maturation de biofilm

La phase de maturation du biofilm se caractérise par une augmentation de la taille de la structure via la multiplication cellulaire et la synthèse d'exopolysaccharides (**Picard, 2011**). L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et des pores entre les microcolonies, permettant d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes dans les régions enfuies du biofilm et d'autre part d'évacuer les déchets (**Filloux et Vallet, 2003**).

Le développement des microcolonies traduit le stade de maturation du biofilm et la colonisation de nouvelle surface (**Roux et Ghigo, 2006**). Par la suite le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à formation d'un film hétérogène tridimensionnel. Dans cette structure tridimensionnelle les colonies se trouvent normalement séparées les unes des autres par des canaux ou circule le flux du milieu qui permet la diffusion des nutriments, d'oxygène et parfois d'agents antimicrobiens [(**Costerton et al., 1995**) ; (**Donlan, 2002**)].

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 des gènes. Toutes ces transformations sont coordonnées grâce à un système de communication entre les bactéries d'une même espèce au sein du biofilm, appelé le quorum sensing. Ce système est fondé sur la production des molécules diffusibles par les bactéries. Par exemple les acyl-homosérine lactones (AHL) chez les bactéries à gram négatif qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné [(**Filloux et Vallet, 2003**) ; (**Behlau, 2008**)].

e. Le détachement des bactéries

Le détachement d'un biofilm mature constitue une étape essentielle dans la dissémination bactérienne et la colonisation de nouvelles surfaces. Ce processus de détachement dépend de la mobilité des bactéries, de la taille des micro-colonies, mais également des conditions environnementales (disponibilité en nutriments, en acides aminés) et internes (limitation en oxygène, carences métaboliques) du biofilm (**Lagrafeuille, 2016**). Ce processus implique également des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries, notamment par le quorum sensing. Lorsque la densité bactérienne sur une surface devient très élevée (10^7 cellules/cm), des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique.

Traditionnellement, le détachement des bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Le détachement des bactéries se fait selon trois étapes : **(Kaplan, 2010)**.

- Détachement des cellules de la colonie de biofilm.
- Translocation des cellules vers un nouvel emplacement.
- Fixation des cellules à un substrat dans le nouvel emplacement.

La dispersion est considérée comme duelle : dispersion active et dispersion passive. La dispersion active est initiée par les bactéries mêmes du biofilm afin de s'échapper de celui-ci. Il s'agit donc d'une dispersion relevant de mécanismes biologiques [(**Morgan et al., 2006**) ; (**Baudin et al., 2017**)]. La dispersion passive est quant à elle relayée par des forces externes appliquées au biofilm qui décrochent les bactéries du biofilm. Il s'agit donc d'une dispersion relevant de mécanismes physicochimiques [(**Flemming, 2011**) ; (**McDougald et al., 2012**)].

5. Les facteurs influençant la formation de biofilm

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs

- Propriétés des surfaces : Texture, rugosité, présence d'aspérités, hydrophobicité et la présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface.
- Propriétés du milieu : Vitesse du flux, pH, température, cations (Ca^{2+} , Na^{2+} , Fe^{3+} ...), le fer, les nutriments, sources de carbone disponibles, disponibilité du milieu en oxygène et la présence d'agents antimicrobiens.
- Propriétés des cellules : Hydrophobicité de la surface des cellules, présence de fimbriae, de flagelles et rôles des exopolysaccharides.

a. Propriétés de surfaces

N'importe quelle surface 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 sur une surface jouent une influence sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm (**Hajoubi, 2019**).

L'attachement a lieu préférentiellement sur des surfaces rugueuses (présence d'aspérités), hydrophobes et préalablement recouvertes d'un film protéique (**Donlan et Costerton, 2002**). Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante. Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence

d'aspérités. Néanmoins, certaines souches sauvages des bactéries colonisent aussi des surfaces lisses [(Martinez et Casadevall, 2007) ; (Hajoubi, 2019)].

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les microorganismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le téflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux. (Bendinger *et al.*, 1993).

La présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilm. La nature de ces films protéiques est différente selon les milieux (Mittelman, 1996).

b. Les caractéristiques du milieu

La formation d'un biofilm nécessite des facteurs environnementaux clefs. Ces facteurs sont les suivants [(Donlan, 2002) ; (Martinez et Casadevall, 2007) ; (Goller et Romeo, 2008)].

- La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (Dumas, 2007).
- Le pH conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité (Martinez et Casadevall, 2007).
- La concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques. Les sources de carbone disponibles : elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (Martinez et Casadevall, 2007).
- Les 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). L'augmentation de la concentration de plusieurs cations (calcium, magnésium) entraîné une augmentation de l'attachement bactérien.
- Hydrodynamique du fluide : selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (Donlan, 2002).

c. Propriétés 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, 2002).

6. Le Quorum Sensing : régulation de la formation des biofilms

La formation d'un biofilm est contrôlée par des mécanismes de quorum sensing. Il s'agit de mécanismes de contrôle ayant lieu au sein de cellules, optimisées par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception du quorum. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique [(Costerton, 1999) ; (Tomlin *et al.*, 2005)]. 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) ; (Clutterbuck *et al.*, 2007) ; (Irie et Parsek, 2008)]. Des mutations des gènes impliqués dans les mécanismes de quorum sensing entraînent des répercussions sur les stades tardifs de formation des biofilms. Ces gènes exercent un contrôle sur une grande partie de l'expression du transcriptome et du protéome, avec un contrôle de l'expression des facteurs de virulence comme les protéases par exemple (Tomlin *et al.*, 2005).

a. Les molécules impliquées dans le quorum sensing

Les molécules du quorum sensing sont différentes selon les types de bactéries. En général, on trouve des acylhomosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries Gram-négatives. La majorité des bactéries Gram-positives utilisent des peptides auto-inducteurs, dont la taille est très variable (de 5 à 87 acides aminés). Les molécules du quorum

sensing sont dégradées par des enzymes : AHL-lactonases et AHL-acylases. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du quorum sensing au sein d'un Biofilm **(Irie et Parsek, 2008)**.

b. Rôles du quorum sensing

Le quorum sensing régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm, et en prenant en compte les conditions environnementales. Il initie les phénomènes de dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm. Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm. Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases **[(Clutterbuck *et al.*, 2007) ; (Irie et Parsek, 2008)]**. Les molécules du quorum sensing jouent aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme les protozoaires (exemple de *Serratia marcescens*) **(Queck *et al.*, 2006)**.

Les synergies observées au sein des biofilms constitués de différentes espèces de micro-organismes sont permises grâce aux molécules intervenant dans le quorum sensing **(Bjarnsholt *et al.*, 2005)**. Les biofilms composés de plusieurs communautés de bactéries d'espèces différentes ont de fortes concentrations en molécules du quorum sensing, compte-tenu de la densité élevée de cellules présentes.

7. Biofilm dans le domaine médical

En santé humaine, il a été montré que les biofilms sont associés à des problèmes majeur de santé publique et sont impliqués dans un large éventail de maladies infectieuses qui touchent majoritairement les personnes légèrement ou fortement immunodéprimés ou porteurs de dispositifs médicaux **(Tasse, 2017)**. Les biofilms sont aussi impliqués dans 60 % des infections nosocomiales. Ces derniers peuvent se former à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux implantés dans l'organisme (lentilles de contact, cathéter veineux central, sonde endotrachéale...), cela sera détaillé dans le chapitre suivant **[(Olivares, 2017) ; (Hajoubi, 2019)]**.

Chapitre 2 : Biofilms et infections sur les dispositifs médicaux

1. Généralités

Les matériaux d'implantation sont de plus en plus utilisés dans de nombreux domaines de la médecine moderne, à des fins diagnostiques ou thérapeutiques (**Archibald et Gaynes, 1997**).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'entre 5 et 12% des patients hospitalisés dans le monde développent une infection associée aux soins (IAS) dont plus de 60% sont associées à l'implantation d'un dispositif médical ou chirurgical (**Espinasse *et al.*, 2010**).

Tout dispositif peut devenir le site d'une éventuelle infection : les sondes endotrachéales, urinaires, les valves cardiaques artificielles...etc. Ils contribuent de façon significative à des affections caractérisées par une infection bactérienne sous-jacente.

Un dispositif médical implantable est une surface lisse et stérile, souvent composée de divers polymères appelés biomatériaux. La physiologie de ces infections est généralement liée à la constitution d'un biofilm sur ces corps étrangers. Immédiatement après son insertion, le dispositif entre en contact avec divers fluides biologiques tels que le sang, l'urine ou les sécrétions oropharyngées en fonction de sa localisation. Des protéines présentes dans ces liquides biologiques (albumine, fibronectine, fibrinogène...) vont s'adsorber très rapidement sur la surface du dispositif et entraîner la formation d'un film muqueux : on parle de film de conditionnement. Ce film muqueux va favoriser l'attachement initial des bactéries et donc le développement de biofilm [(**Trautner et Darouiche, 2004**) ; (**Tenke *et al.*, 2006**) ; (**Phillips *et al.*, 2010**)].

On va traiter un exemple d'implants médicaux sur lequel se forme le biofilm, il s'agit de « sonde endotrachéale »

2. Définition d'un dispositif médical

On entend par dispositif médical tout instrument, appareil, équipement, matériel ou autre article utilisé seul ou en association, y compris les accessoires et logiciels nécessaires au bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des différentes fins de santé, notamment, de diagnostic, de prévention, de contrôle, de traitement et d'atténuation d'une maladie ou d'une blessure (**Marchal, 2018**).

Tout dispositif, implanté à titre provisoire ou permanent, peut devenir le site d'une éventuelle infection (**Espinasse *et al.*, 2010**).

2.1 Définition de la sonde endotrachéale

La sonde endotrachéale ou tube endotrachéal est une sonde destinée à être insérée par la bouche ou les narines dans la trachée pour assurer le maintien de la perméabilité des voies aériennes et permettre la ventilation mécanique (**Deprugney, 2011**) lors d'une intubation endotrachéale qui est la méthode de référence pour le contrôle des voies aériennes (**Goldstein et al., 1999**).

Selon le mode d'introduction de la sonde d'intubation, on distingue deux types

- Lorsque l'extrémité de la sonde d'intubation est accessible au niveau de la bouche, on parle d'intubation orotrachéale.
- Lorsqu'elle est accessible au niveau des narines, l'intubation est dite nasotrachéale (**Figure 2**) (**Traoré, 2013**).

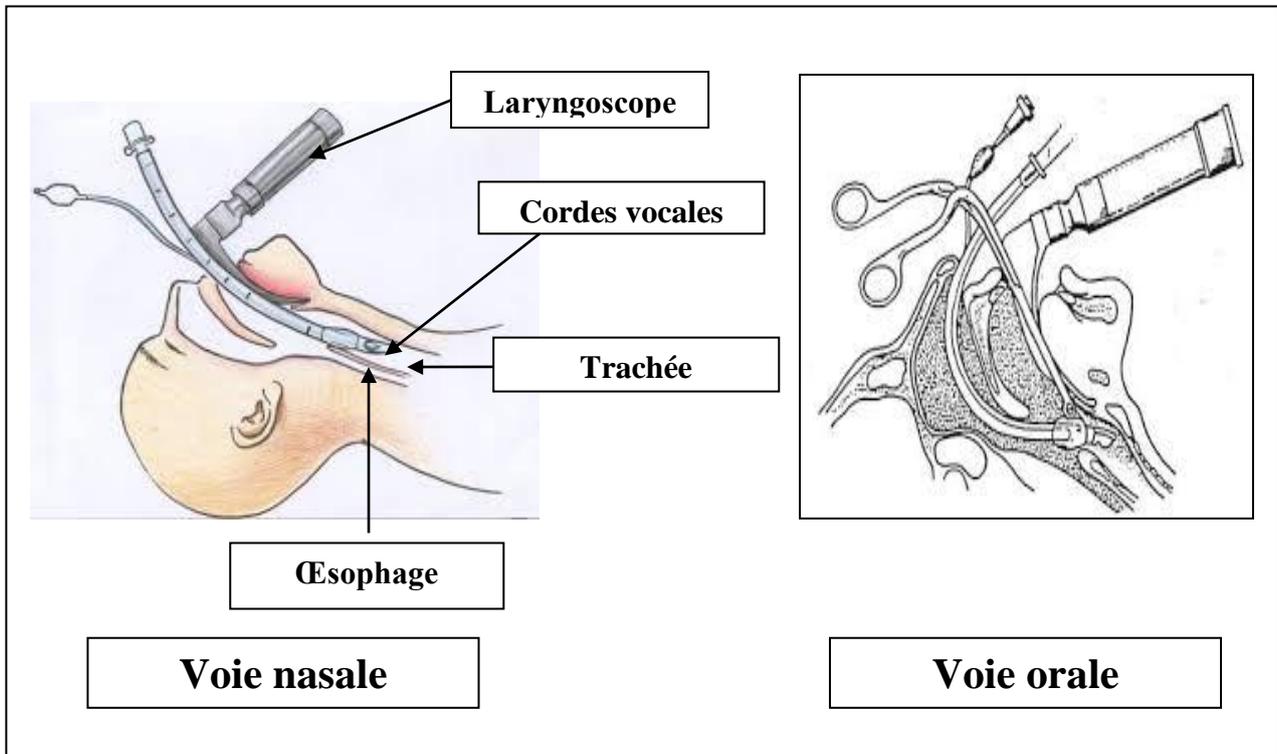


Figure 2 : Représentation schématique des différents types d'intubation (**Gresser, 2010**).

La sonde endotrachéale est composée de plusieurs parties (**Tableau 2**) :

Tableau 2 : les différentes parties de la sonde endotrachéale avec le matériel utilisé [(Vazel et al., 2004) ; (Deprugney, 2011)].

Matériels de la sonde endotrachéale	Un connecteur	diamètre standard
	Un tube	-Le plus souvent constitué de plastique transparent thermo-sensible de façon à favoriser la tolérance. -Il existe également des sondes armées composées d'un tube plastique équipé d'un ressort en métal ou nylon qui rigidifie la sonde.
	un ballonnet barrique ou conique	situé à l'extrémité distale de la sonde assure l'étanchéité.
	l'extrémité distale	droite ou biseautée, avec ou sans œil, avec ou sans ballonnet.

2.2. Types de sondes

Les différents types de la sonde endotrachéales sont regroupés dans le tableau suivant : (**Tableau 3, figure 3**)

Tableau 3 : les différents types de sonde endotrachéale [(Konate, 2006) ; (Félix, 2006)].

Sondes standard (avec ballonnet)	Sondes sans ballonnet
les plus utilisées à l'heure actuelle sont en chlorure de polyvinyle (PVC) ou plus rarement en silicone. Elles ont remplacé celles en caoutchouc Elles sont, pour la plupart d'entre elles, a usage unique.	Utilisées souvent en pédiatrie, recommandées spécialement chez les enfants qui présentent une région sous glottique plus étroite qui assure l'étanchéité.

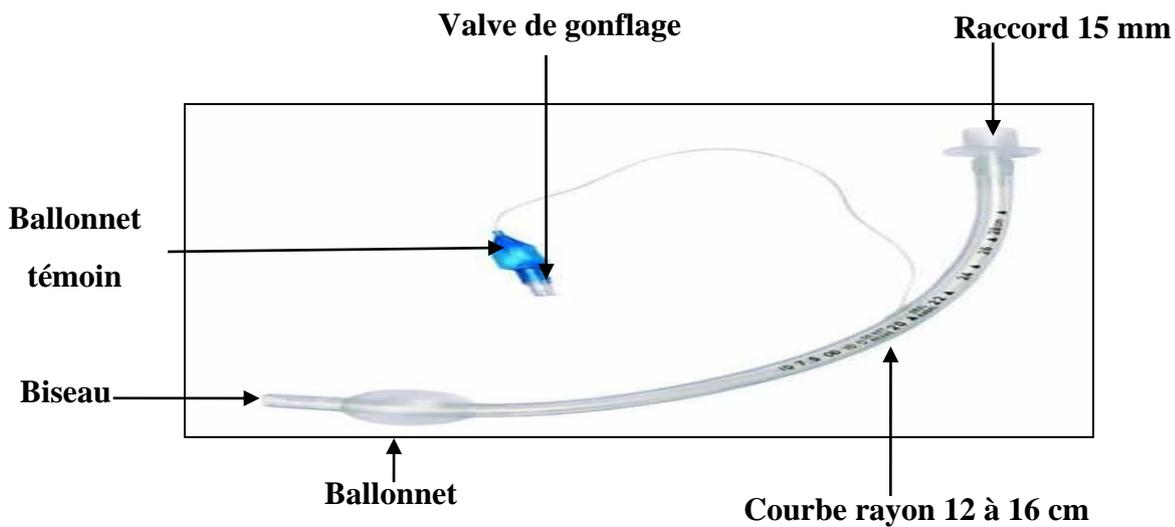


Figure 3 : Représentation schématique d'une sonde endotrachéale standard (Gresser, 2010).

Le matériau doit répondre à plusieurs critères, parmi lesquels :

- être transparent, afin de faciliter la surveillance de l'accumulation des sécrétions bronchiques et de la condensation des gaz expirés.
- avoir une surface interne et externe lisse et glissante, douce, non mouillante, pour faciliter l'insertion de la sonde et limiter les frottements et l'adhésivité des sécrétions.
- posséder une rigidité, une solidité et thermolabilité suffisantes pour empêcher plicature et compression et favoriser l'adaptation de la sonde à l'anatomie du patient (Konate, 2006).

3. Biofilm et pneumopathies sous ventilation mécanique

Une pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) correspond à toute pneumonie associée aux soins, survenant chez un malade dont la respiration est assistée par une machine, par l'intermédiaire d'une sonde endotrachéale, dans les 48 heures précédant la survenue de l'infection (Benmahdi, 2017). On distingue parmi les PAVM les pneumonies précoces (apparition dans un délai inférieur à 5 jours après l'initiation de la ventilation mécanique) et tardives (supérieur ou égal à 5 jours). Les pneumopathies associées aux soins représentent environ 15 % des infections nosocomiales et occupent, avec les infections du site opératoire, le deuxième rang des sites infectés. Leur incidence varie entre 0,5 à 1 cas pour 100 admissions, et augmente de 6 à 20 fois chez les patients, adultes ou enfants, sous ventilation mécanique. Ce qui place les pneumopathies acquises sous ventilation au 1er rang des

infections nosocomiales en réanimation avec une incidence variant entre 1 et 4 épisodes pour 1 000 jours de ventilation [(Nyunga, 2011) ; (Hajoubi, 2019)].

Les patients atteints de ces pneumopathies nécessitent une ventilation mécanique et un séjour prolongés ainsi que des antibiothérapies souvent lourdes, responsables d'un surcoût non négligeable. La mortalité attribuable aux PAVM pourrait excéder 10 % [(Chastre et Fagon, 2002) ; (Coffin *et al.*, 2008)].

3.1. Physiopathologie des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique

La pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) pourrait aussi bien être nommée pneumopathie liée à la sonde d'intubation. Le biofilm bactérien qui se dépose dans la sonde d'intubation est un des mécanismes de développement des pneumonies acquises sous ventilation mécanique. Ce biofilm peut se détacher spontanément sous l'effet de la ventilation par un effet d'aérosolisation ou détachement induit par le passage de la sonde d'aspiration endotrachéale de trachée vers le poumon qui mobilise alors un agrégat de biofilm (Espinasse *et al.*, 2010).

Le principal facteur de risque d'acquisition d'une infection pulmonaire au cours de la ventilation mécanique est la présence de la sonde d'intubation favorisant la colonisation des voies aériennes à partir des microorganismes présents dans l'oropharynx (Bertholet *et al.*, 2010) la sonde d'intubation est placée à travers la cavité oro-pharyngée jusqu'au dans la trachée où se trouvent de nombreuses bactéries résidentes. D'autres bactéries peuvent les rejoindre en migrant de la sphère oropharyngée en suivant soit la surface externe de la sonde, via le ballonnet, soit la surface interne lors des aspirations (Bezoui, 2016).

Sur le plan physio-pathogénique, les pneumopathies résultent généralement de la pénétration et du développement des micro-organismes dans les voies aériennes inférieures qui, après une phase de colonisation, vont conduire à une infection du parenchyme pulmonaire par dépassement des capacités de défenses mécaniques, cellulaires (macrophages, lymphocytes, cytokines) ou humorales (anticorps et complément) de l'hôte.

Les pneumopathies peuvent être causées par un large spectre de pathogènes bactériens, les germes responsables d'une pneumonie nosocomiale sont plus difficiles à prédire. Cependant, les bactéries sont les plus fréquemment incriminées. Près de 80,16% de PN sont dues à des bactéries aérobies à Gram négatif (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et les Entérobactéries). Plus récemment, les auteurs rapportent que les PN à bactéries à Gram positif sont de plus en plus fréquentes, le staphylocoque doré

(*Staphylococcus aureus*), étant alors le plus prédominant [(Guidelines for the Management of Adults with HAP and VAP, 2005) ; (Chènfir, 2016)].

Chapitre 3: Lutte contre les biofilms

Par les dommages qu'ils causent dans les milieux médicaux, les biofilms ont un impact très important. Il est nécessaire de développer des moyens de lutte efficaces et pérennes contre leur formation.

La prévention et la lutte contre la formation des biofilms dans le secteur médical est la source de nombreux travaux, notamment ceux qui concernent la prévention des infections associées aux implants médicaux. En effet les infections nosocomiales associées au développement d'un biofilm sur un dispositif médical sont plus difficiles à traiter (Ghellai, 2016).

Il existe des mesures préventives à fin d'empêcher la formation de biofilms et des mesures curatives à l'encontre des biofilms déjà formés (Dupin, 2017).

1. L'hygiène

La formation de biofilms sur des implants médicaux est liée à la durée de présence de l'implant dans l'organisme. Plus l'implant est là depuis longtemps, et plus il y a un risque de formation de biofilms. La pose de l'implant doit se faire dans des conditions d'hygiène strictes, afin d'éviter au maximum toute contamination bactérienne. (Maki, 1994).

2. L'antibiothérapie

Quelques soient les mécanismes de résistances, lorsqu'on traite une infection bactérienne chez l'Homme ou chez l'animal, il est important de sélectionner l'antibiotique (ATB) adéquat, non seulement au début du traitement mais de façon continue, afin d'éviter la sélection de mutants résistants à l'antibiotique utilisé (De Chalvet De Rochemonteix, 2009).

La tolérance intrinsèque des biofilms aux antibiotiques et au système immunitaire est devenue un problème majeur. Même si certains antibiotiques comme la rifampicine conservent une activité raisonnable à l'encontre des biofilms, la majorité des antibiotiques conventionnels sont inefficaces aux doses habituelles (Römling *et al.*, 2014).

La résistance des biofilms aux antibiotiques est responsable d'une grande partie des difficultés rencontrées au cours du traitement des infections associées aux biofilms, car

l'antibiothérapie active habituellement sur les bactéries à l'état planctoniques se révèle bien souvent moins efficace sur des structures organisées en biofilm (Bellifa, 2014).

3. Elimination mécanique du biofilm

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

4. La désinfection

Le but de cette dernière est de détruire les bactéries du biofilm, qui n'auraient pas été éliminées préalablement par le nettoyage. Toutes les molécules n'ont pas la même efficacité.

L'usage de chlorexidine comme antiseptique n'est pas efficace pour réduire le nombre d'infections dues à des bactéries Gram-négatives et sélectionne des individus résistants à de nombreux agents anti-microbiens. L'utilisation de triclosan peut se révéler efficace (Stickler, 2002). La plupart des antiseptiques et désinfectants ont du mal à pénétrer au sein de biofilm, et les bactéries des biofilms sont résistantes à leur action. Cette méthode se révèle peu efficace.

5. Ultrasons et potentialisation de l'action des antibiotiques

Il existe une synergie entre antibiotiques comme la gentamicine et ultrasons qui permettent d'éliminer des bactéries Gram-négatives planctoniques ou sous forme de biofilms. On parle d'effet bio-acoustique ou d'effet bio-électrique. Le mécanisme de cette synergie est mal connu, on peut penser qu'il résulte d'une perturbation de l'organisation membranaire de bactéries permettant ainsi une meilleure diffusion de l'antibiotique au sein du biofilm (Donlan, 2008).

L'action synergique des ultrasons et de la gentamicine dans la réduction des biofilms d'*Escherichia coli* a été mise en évidence sur des modèles animaux. Les résultats de l'étude montrent de façon très significative que l'association d'ultrasons et de gentamicine est plus efficace que l'administration de gentamicine seule dans le traitement contre les biofilms (Carmen *et al*, 2005).

6. Utilisation d'enzymes dégradant les exopolysaccharides de la matrice

L'inhibition ou la perturbation de la formation du biofilm peut s'effectuer par certaines molécules et enzymes.

L'utilisation d'enzymes dégradant des polysaccharides de la matrice et désorganisant totalement l'architecture du biofilm, pour enfin aboutir à sa destruction, peut fournir des pistes de recherche pour l'éradication des biofilms. Prenons l'exemple des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces derniers produisent un exopolysaccharide, l'alginate, aux propriétés intéressantes : il retarde la diffusion des aminosides au sein du biofilm et inhibe leur activité anti-microbienne. Si on ajoute au milieu une enzyme dégradant l'alginate, l'alginate lyase, on augmente le pouvoir de pénétration et l'activité anti-microbienne de l'antibiotique (gentamicine, tobramicine) dans le biofilm (**Donlan, 2008**).

7. Les vaccins

Pour inhiber l'adhésion des micro-organismes, on peut utiliser la vaccinologie. Des vaccins sont actuellement en cours de développement, comme par exemple les vaccins contre les caries, dirigés contre *Streptococcus mutans* (**De Chalvet De Rochemonteix, 2009**). Le but de la vaccinologie est de former des immunoglobulines A qui vont inhiber les phénomènes responsables de l'adhésion des micro-organismes (**Donlan, 2008**). Certains vaccins ont été efficaces sur des modèles animaux, mais beaucoup reste encore à prouver (**Otto, 2008**).

Lutter contre ces biofilms est par conséquent un objectif majeur. Malheureusement, les désinfectants, les antiseptiques et les antibiotiques classiques, s'ils s'avèrent actifs à l'encontre des formes planctoniques, deviennent bien souvent inefficaces aux doses usuelles contre les biofilms, obligeant l'utilisation de concentration des ATB 100 à 1000 fois plus élevée, ce qui les rend toxiques et donc pratiquement inutilisables pour l'Homme (**Dupin, 2017**). En effet La résistance des bactéries aux ATB est devenu une véritable préoccupation, ce phénomène de résistance est général et concerne toutes les espèces bactériennes et ne cesse d'augmenter (**Toure, 2015**).

Face à la menace récurrente de l'antibiorésistance, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont aujourd'hui indispensables pour lutter contre les infections microbiennes. C'est principalement dans ce contexte d'impasse thérapeutique que les huiles essentielles (HE) pourraient avoir toute leur importance et pourraient ainsi être une piste intéressante dans la lutte contre les biofilms (**Dupin, 2017**).

Actuellement, une augmentation de l'utilisation de composés d'origine naturelle est observée, justifiant l'accroissement de la production de certaines plantes aromatiques et médicinales (PAM). Parmi ces plantes de nombreuses, sont utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes de leurs huiles essentielles (HE) (**Benabdelkader, 2012**).

8. Les huiles essentielles

a. Définition

Chaque fois que, après avoir écrasé un pétale de fleur, une feuille, une branchette, ou une quelconque partie d'une plante, un parfum se dégage, cela signifie qu'une huile essentielle s'est libérée (**Bekhechi, 2002**).

Le terme «huile essentielle» a été inventé au 16^{ième} siècle par le médecin Suisse Parascelsus Von Hohenheim pour désigner le composé actif d'un remède naturel (**Bouchaala, 2019**).

Les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, les branches. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal : elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air (**Bekhechi, 2002**).

Les huiles essentielles sont des produits complexes, contenant pour la plupart plus d'une centaine de constituants (phénols, alcools, aldéhydes, esters, terpènes, cétones). Elles sont issues de plantes dites aromatiques et médicinales (PAM). Ces plantes (PAM) sont employées, soit sous leur forme naturelle comme aromate et en pharmacopée traditionnelle, soit pour en extraire les principes actifs recherchés par les industries pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires [(**Chahboun et al., 2015**) ; (**Fahed, 2016**)].

b. Pouvoir anti microbien des huiles essentielles de « *Lavandula officinalis* » et « *d'Eucalyptus globulus* »

Depuis des millénaires, les huiles essentielles sont exploitées pour leurs propriétés antiseptiques et antimicrobiennes car elles s'opposent au développement des germes et les tuent. Leur pouvoir antiseptique est général bien qu'elles aient des compositions chimiques très différentes. L'huile essentielle de Lavande officinale (*Lavandula officinalis*) ou de Lavande vraie est incontournable en aromathérapie, tant son spectre d'action est large et son innocuité reconnue. De nombreuses études cliniques ont en effet validé à la fois son efficacité et sa sécurité d'emploi. Dans certaines indications, elle s'est avérée très efficace (**Couic-Marinier et al., 2014**). Elle était utilisée par les médecins qui la considéraient comme tonique, résolvente et carminative. Ils la prescrivent pour lutter contre des infections pulmonaires et les infections urinaires. *Lavandula officinalis* a une activité antibactérienne sur *Esherichia coli*, *Acinetobacter sp.*, *klebsiella pneumoniae.*, *staphylococcus aureus* (**Audrey, 2016**).

En phytothérapie, l'essence d'*Eucalyptus globulus* pourra trouver une place comme désinfectant atmosphérique en milieu hospitalier afin de lutter contre les infections nosocomiales (Boukhatem *et al.*, 2017). Traditionnellement, l'Eucalyptus est un anti infectieux et antiseptique des voies respiratoires, il est utilisé dans le traitement de l'infection aigue et chronique des voies respiratoires supérieures ou inférieures.

Eucalyptus globulus est particulièrement active contre les bactéries suivantes : *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis* (Lobstein *et al.*, 2018). En revanche, elle n'est pas active sur *Escherichia Coli* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Koziol, 2015).

Des études ont également testés le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *Lavandula officinalis* et d'*Eucalyptus globulus* à fin de déterminer leur action antibactérienne sur des souches formatrices de biofilm.

1. Lieu d'étude

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de l'Université Abou- Bekr Bel kaid-Tlemcen.

2. Prélèvements

Les sondes endotrachéales ont été collectées au niveau de service de réanimation du CHU de Tlemcen, sur une période allant du 23/02/2020 au 01/03/2020.

Les sondes ont été soigneusement prélevées dans des conditions d'asepsie, placées individuellement dans des tubes en verre stériles. Les échantillons sont transportés au laboratoire en glacière et leurs analyse a été aussi rapide que possible (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Prélèvements des sondes endotrachéales

Date de prélèvements	Service	Patients	Codes
23/02/2020	Réanimation	Femme diabétique, choc septique, résistance aux antibiotiques (19 ans). Homme (20 ans)	P1 : E2BR4. P2 : E2BR1
27/02/2020	Réanimation	Femme Femme (24 ans) Homme Homme	P3 : E2BLA P4 : E2BR5 P5 : E2BL.A.1 P6 : E2BL.A.2
01/03/2020	Réanimation	Homme (21 ans). Homme (23ans). Femme diabétique, choc septique, résistance aux antibiotiques (19ans).	P7: E2BR2 P8: E2BR3 P9 :E2BR2.V.C P10 : E2B.L.A.3

3. Ensemencement et isolement

Durant une période de 3semaines, 10 sondes endotrachéales ont été soigneusement prélevés de patients hospitalisés plus de 48heures au service de réanimation du CHU de Tlemcen, dans des conditions d'asepsies.

Selon la technique quantitative de **Brun Buisson, (1987)**. L'extrémité distale est coupée puis mise dans un tube contenant 5ml de sérum physiologique. Après un traitement avec l'ultrason et un passage au vortex pendant 1minute, un volume de 0,1ml est ensemencé par étalement en surface sur les milieux sélectifs suivants :

- **Mac Conkey** : est un milieu d'isolement ordinaire, lactosé et sélectif des bacilles à Gram négatif non exigeants. Le désoxycholate de sodium et le cristal violet inhibe la croissance des bactéries à Gram positif.
- **Chapman** : La gélose Chapman est le milieu sélectif des bactéries halophiles et plus particulièrement fermentant le mannitol. C'est un milieu semi-synthétique. Il est utilisé pour l'isolement des *Staphylococcus*
- **Cetrimide** : La gélose au cetrimide est utilisée pour l'isolement et l'identification de *Pseudomonas aeruginosa*. Le cétrimide est un ammonium quaternaire qui inhibe la croissance de la plupart des autres espèces bactériennes. *Pseudomonas aeruginosa* colore ce milieu en bleu-vert par production de pyocyanine.

4. Identification

L'identification des souches est contrôlée après vérification de leurs pureté par :

- L'étude des caractères macroscopiques** (aspects des colonies sur milieux gélosés).
- L'étude des caractères microscopiques** (forme des colonies, mobilité, coloration de Gram).
- Identification par galerie API 20 E et API Staph:**

La galerie API est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif et les staphylocoques, elle comporte 20 micro tubes contenant des substrats déshydratés. Les micro tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (**Biomérieux, 2010**).

- Test d'oxydase : Test d'oxydase**

Ce test permet la mise en évidence de la production de la bactérie étudié de l'enzyme « oxydase ». Les bactéries possédant une chaîne respiratoire complète sont dotées d'une

enzyme cytochrome oxydase. L'oxydation de Tétraméthyl-p-phénylènediamine indique la présence d'une oxydase chez la bactérie oxydase (El Bouamri, 2017).

Sur une lame de verre propre, déposer un disque imprégné de solution d'oxydase fixée par l'eau distillée à l'aide d'une pipette pasteur stérile flambée, et déposer la colonie à étudier et observer immédiatement. Le résultat positif se traduit par une coloration rose violette.

□ **Test de coagulase :** La **coagulase** ou **staphylocoagulase** est une enzyme capable de faire coaguler le plasma sanguin. La mise en évidence d'une activité coagulase libre chez une souche de *Staphylococcus* est un des critères d'identification de *Staphylococcus aureus* en médecine humaine.

Dans un tube à hémolyse stérile verser 0,5 ml de bouillon cœur-cerveille et 0,5 ml de plasma oxalaté, homogénéiser et incuber à 35 - 37 °C.

5. Conservation des souches

Toutes les souches identifiées sont conservées en double réplique :

□ **Gélose nutritive inclinée :** c'est une technique de conservation à court terme. Une fois que les tubes sontensemencés et placés dans l'étuve à 37°C pendant 24h, ils sont conservés dans le réfrigérateur à 4°C. La vitalité de la souche se maintient pendant des durées variables, selon la température et l'espèce microbienne.

□ **Le glycérol :** c'est une technique de conservation à long terme (-80°C). Elle consiste à l'ajout du glycérol aux suspensions bactériennes. Le glycérol est un cryoprotecteur permettant d'éviter au maximum les altérations cellulaires dues au refroidissement.

6. Evaluation de la formation du biofilm *in vitro*

a. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

Le test TCP décrit par O'Toole *et al.*, (2000) permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm. A partir d'une culture de 24 heures dans le milieu TSB, les puits d'une microplaque de 96 puits (polystyrène) sont inoculés avec 150 µL de la suspension bactérienne ajustée à une DO de 0,1. Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Les puits sont lavés trois fois avec l'eau distillée stérile afin d'éliminer les bactéries libres (planctoniques). Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet (0,1%) pendant 15 min. L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques sont laissées pour le séchage pendant quelque minute. Les microplaques sont ensuite remplies avec 150 µL d'une solution

d'éthanol (95%) afin d'évaluer l'importance de la coloration du biofilm (Stepanovic *et al.*, 2000).

b. Détection de la production de slime sur milieu Rouge Congo Agar (RCA)

Cette technique qualitative consiste à l'ensemencement des souches testées pour leurs capacité à produire un biofilm sur milieu Rouge Congo (Chaieb *et al.*, 2005). C'est une méthode indirecte qui permet de distinguer entre les souches productrices de slime de celles qui n'en produisent pas, en se basant sur la composition de la couleur de leurs colonies.

Les souches sont ensemencées par stries en surface du milieu Rouge Congo coulé en boîtes pétri et incubé à 37° pendant 24h à 48h (Mathur *et al.*, 2006).

Evaluation de couleur des colonies, selon Satorres et Alcaraz en 2007, les colonies des souches non productrices sont de couleur rose rouges tandis que celle qui ont la capacité à produire un slime sont de couleur noires à surface ou presque noire (Nasr *et al.*, 2012).

Les colonies des souches de phénotype variable donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge à centre rouge et à contour noir (Touati *et al.*, 2007).

c. Lecture

La classification des résultats obtenus présente sur la base du DO témoin. Les souches ont été classées comme suit : $DO \leq DO_t$ (Témoin) : non formatrice du biofilm. $DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$: Modérément formatrice du biofilm. $DO > DO_t \times 4$: Fortement formatrice du biofilm (Christensen *et al.*, 1985).

7. Activité anti biofilm de quelques huiles essentielles sur les souches isolées de sondes endotrachéales

Des morceaux de 1 cm² de sonde endotrachéale préparés et stérilisés sont mis dans des tubes contenant 1ml de la suspension bactérien à une DO de 0.1 et 1ml des substances de huile de Lavande et d'Eucalyptus à des concentrations de 50%, 40%, 30% et 10% dilué dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Ugur *et al.*, 2016) puis incubés à 37°C pendant 24H. Les morceaux sont récupérés, lavés abondamment à l'eau distillée stérile puis placés dans 1ml de l'eau physiologique. La sonication est effectuée 3 fois à l'aide de l'ultrason model WiseClean WUC-D06H pendant 5min intercalée par un passage de 20sec au vortex. Une série de dilutions est effectuée pour chaque échantillon, puis ensemencée sur gélose de Mac Conkey. Le dénombrement des colonies est réalisé après 24h d'incubation à 37°C.

8. L'effet de quelques huiles essentielles sur un biofilm préformé

Après la formation du biofilm sur des morceaux de sonde endotrachéale (Des coupes de 1cm² sont introduites dans des tubes contenant 1mL d'une suspension bactérienne de chaque souche ajustée à une DO=600 de 0,1 puis incubés à 37°C pendant 24H). Les supports sont récupérés, lavés abondamment à l'eau distillée stérile et placés dans des tubes contenant de substance d'huiles de la Lavande et d'Eucalyptus des concentrations de 50% 30% 20% et 10% dilué dans le DMSO, puis incubés à 37°C pendant 24h. Après l'incubation, les morceaux sont rincés, traités par passage successif sur l'ultrason et vortex pour détacher les bactéries adhérees sur le morceau de la sonde. Une série de dilutions est effectuée pour chaque échantillon, puis un ensemencement sur gélose de cétrimide. Le dénombrement des colonies est réalisé après 24h d'incubation. Le dénombrement des colonies est réalisé après 24h d'incubation à 37°.

1. Prélèvements et analyse microbiologique

Sur une période de trois semaines, dix sondes endotrachéales ont été recueillies chez des patients hospitalisés plus de 48h dans le service de réanimation, CHU de Tlemcen. Ces patients présentent les signes d'infection (Fièvre, douleurs,...), dont l'âge des patients varie de 19 ans à 24 ans.

Sur la totalité des sondes endotrachéales analysées 15 souches bactériennes étaient identifiées soit : 7 *Staphylococcus aureus*, 4 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Acinetobacter baumannii*, et 1 *Pseudomonas aeruginosa* (Tableau 5).

Tableau 5 : Résultats des souches obtenues sur les différents milieux de culture

Codes	Résultats			Souches identifiées
	Chapman	Mac conkey	Cetrimide	
E2BR4	+	+	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
E2BR1	+	+	-	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
E2BR2	-	+	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
E2BR3	+	+	-	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
E2BR2.V.C	+	+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
E2BL.A	+	-	-	<i>staphylococcus aureus</i>
E2BR5	+	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
E2BL.A.1	-	+	-	<i>Staphylococcus aureus</i>
E2BL.A.2	-	-	-	
E2B.LA3	+	-	-	<i>Staphylococcus aureus</i>

a. Aspect macroscopique de souches obtenues sur les milieux sélectifs :

- ***Staphylococcus aureus*** : Sur milieu Chapman et après 24 à 48 heures à 37°C en aérobiose les colonies de *Staphylococcus* apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté. Les colonies sont arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm de diamètre, semi-bombé et avec un aspect de la surface lisse et brillante (**Figure 4**).



Figure 4 : Aspect macroscopique des colonies de *S. aureus* sur milieu chapman
(Photo personnelle).

- ***K. pneumoniae*** : présente tous les caractères généraux des entérobactéries. C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, qui cultive sur milieux usuels non-enrichis. Après 18-24 heures à 37°C, elle forme des colonies arrondies, muqueuses, généralement bombées et brillantes sur gélose Mac Conkey (**Figure 5**).

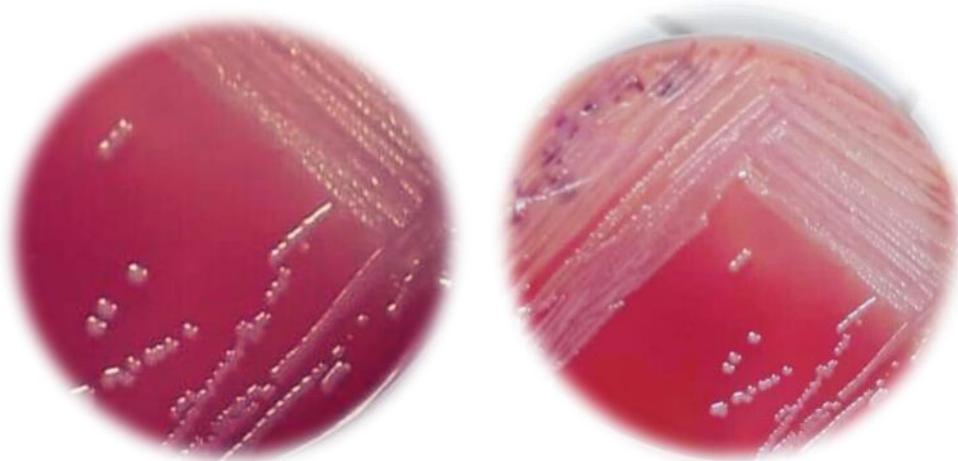


Figure 5 : Aspect macroscopique des colonies de *K.pneumoniae* sur milieu Mac conkey
(Photos personnelle)

- *Pseudomonas aeruginosa* : sur le milieu cétrimide on a observé de grandes colonies isolées, bombées à contour irrégulier, à aspect métallique (**Figure 6**).

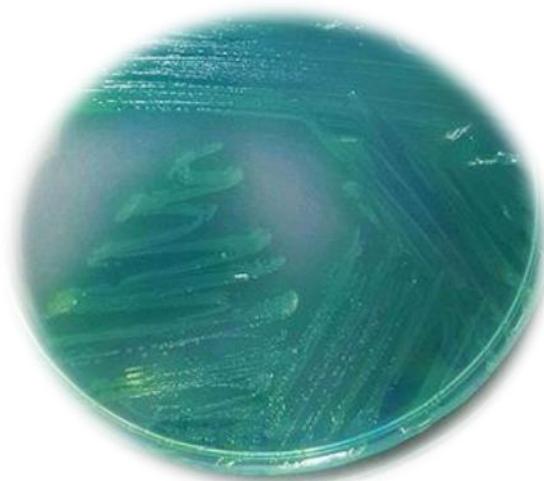


Figure 6 : Aspect macroscopique des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu cétrimide.

- *Acinetobacter baumannii* : sur milieu mac conkey on a observé des colonies convexes, luisantes, blanchâtres translucides ou légèrement opaques, muqueuses (**Figure 7**).



Figure 7 : Aspect macroscopique des colonies d'*Acinetobacter baumannii* sur milieu Mac conkey.

b. Caractères biochimiques :

L'identification bactérienne réalisée par galerie API 20^E nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques des souches obtenues caractérisant et confirmant ainsi un profil numérique:

- *K. pneumoniae* : avec le biotype : 5215773 (Figure 8)



Figure 8 : Résultat de l'identification de *K. pneumoniae* par la galerie API 20^E (Photo personnelle).

- *Pseudomonas aeruginosa*: avec le biotype 2216006 (Figure 9)



Figure 9 : Résultat de l'identification de *Pseudomonas aeruginosa* par la galerie API 20^E

- *Acinetobacter baumannii* : avec le biotype : 0204042 (Figure 10)



Figure 10 : Résultat de l'identification d'*Acinetobacter baumannii* par la galerie API 20^E

- *Staphylococcus aureus*

L'identification par la galerie API Staph nous a permis de mettre en évidence les principaux caractères biochimiques de *Staphylococcus aureus* avec le biotype : 673611 (Figure 11)



Figure 11 : Résultat de l'identification de *Staphylococcus aureus* par la galerie API Staph

- **Test coagulase**

Le test de confirmation de *staphylococcus aureus* (test de coagulation) a permis d'identifier 5 souches. Le plasma est converti en un gel rigide qui reste en place lorsque le tube est incliné ou inversé, cela veut dire que les souches possèdent une coagulase positive (**Figure 12**).

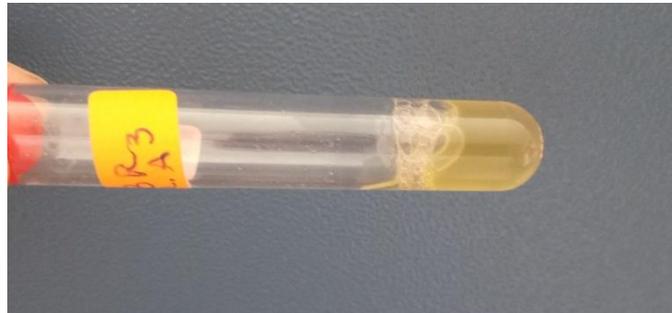


Figure 12: Résultat de l'identification de *S.aureus* par le test de coagulation
(**Photo personnelle**).

Klebsiella pneumoniae est un pathogène opportuniste fréquemment impliqué dans des infections sévères (**Berrazeg, 2013**). Il est responsable de plus de 10% des infections nosocomiales. Il résiste à la majorité des antibiotiques utilisés et rend ainsi difficile le traitement. Ceci pose un problème de santé publique.

En Europe, environ 8 % des infections nosocomiales sont dues à l'espèce de *K.pneumoniae*. En France le rapport de l'ONERBA (observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques) indique que cette espèce est responsable respectivement de 4.8 % et 4.5 % des infections nosocomiales, ce qui la place au 3^{ème} rang des bacilles à gram négatif après *Echerichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Kassis-Chikhani, 2012**).

Les bacilles à Gram négatif sont en cause dans 60 à 70% des cas et les cocci à Gram positif dans 25%. Des résultats montrent que *Staphylococcus aureus* est un leader de l'infection

hospitalière derrière *Escherichia coli*, mais devant *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella* ; il est le genre le plus souvent impliqué dans les infections nosocomiales (**Zeroual, 2012**).

Staphylococcus aureus est l'une des causes majeures des infections nosocomiales. Ce germe est responsable d'infections aiguës et chroniques dont la plupart sont dues à sa capacité à adhérer sur les implants médicaux et à former des biofilms. D'après le Centre de coordination de lutte contre les infections nosocomiales, 65% des infections bactériennes sont dues à la présence des biofilms (**CCLIN, 2014**).

Lors d'une étude menée par (**Shehata et al., 2012**) sur la formation de biofilm à la surface de sondes endotrachéales, ces auteurs ont trouvé qu'il existe une corrélation entre la durée d'intubation et l'âge du biofilm en montrant que la formation de biofilm est de stade III au bout de 3 à 9 jours d'intubation, de stade II au bout de 3 à 6 jours et de stade I au bout de 2 à 3 jours.

2. Evaluation de la formation de biofilm chez les souches isolées de sondes endotrachéales

Les circonstances actuelles (COVID-19) ont empêché la réalisation de cette deuxième partie expérimentale qui porte sur l'évaluation de la formation du biofilm *in vitro* par différentes techniques, et l'étude de l'effet de quelques huiles essentielles sur l'installation du biofilm et un biofilm préformé. Ce travail reste préliminaire et mérite d'être reconduit. Pour cela dans cette partie on va essayer de justifier notre choix de cette étude, en discutant les résultats de quelques travaux antérieurs.

a. Technique de TCP

Plusieurs chercheurs ont étudié les stratégies employées par les micro-organismes pour produire des biofilms, Ils ont montré que les bactéries productrices de biofilm sécrètent certaines substances chimiques qui les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et des systèmes immunitaires de l'hôte (**Saitou et al., 2009**). Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm *in vitro* ont été établies, telles que la méthode quantitative de la microplaque 96 puits et la méthode qualitative du Rouge Congo (**Mathur et al., 2006**).

Des souches de *Staphylococcus* ont été incubées en atmosphère humide à 35°C dans les puits d'une microplaque à 96 puits. La formation du biofilm a été mesurée après 1, 2, 3 ou 4 h en utilisant la méthode de coloration au cristal violet. Les résultats ont été exprimés en absorbance mesurée à 540 nm du colorant incorporé par les cellules formant un biofilm et par les composants de la matrice. D'après des différentes valeurs moyennes de la densité optique

(DO) obtenus, Une augmentation significative de l'absorbance a été observée après 3 h d'incubation pour toutes les souches (**Liesse Iyamba, 2012**).

Une autre étude montre que sur un nombre total de 50 souches de *S. aureus*, il s'est avéré que 34 (68%), étaient biofilm positif dont 20(40%), 10 (20%) et 4(8%) étaient faiblement adhérentes, modérément et fortement adhérentes, respectivement. Les autres souches 16 (32%) étaient non adhérentes (**Namvar et al., 2013**).

Bellifa et al., (2013) ont montré que sur 115 souches de *K. pneumoniae*, 30 sont fortement formatrices du biofilm, 65 modérément formatrices de biofilm et 25 souches sont non formatrices de biofilm

Ces résultats concordent avec ceux retrouvés par **Nirwati et al., (2019)** où ils ont montré que parmi les 167 isolats de *K. pneumoniae*, 143 (85,63%) étaient formatrices du biofilm et 24 (14,37%) ne forment pas du biofilm. Parmi les producteurs de biofilm, 45 souches (26,95%) étaient de très bonnes formatrices du biofilm, 48 (28,74%) étaient modérément formatrices de biofilm et 50 (29,94%) étaient faiblement productrices du biofilm.

Une étude similaire a indiqué que 37.6 % des souches de *K.pneumoniae* étaient productrices du biofilm (**Nirwati et al., 2019**).

La capacité des souches cliniques étudiées de *K.pneumoniae* à former des biofilms favorise certainement des infections associées aux dispositifs médicaux implantables.

Coban et al., (2009) et **Oncel et al., (2010)** ont utilisé technique TCP pour étudier la capacité des *P. aeruginosa* isolées de fibrose kystique à produire un biofilm dont la majorité de souches étaient de bonnes formatrices du biofilm.

La capacité à former un biofilm étaient différentes de chaque isolats car, en général, plusieurs facteurs influencent cette capacité tels que les caractéristiques physico-chimiques de souches, l'interaction physique entre les constituants, type de surface, le pH, la température etc (**Nirwati et al., 2019**).

b. Technique du rouge Congo agar (RCA)

Cette méthode qualitative se base sur le caractère phénotypique des souchesensemencées sur milieu rouge Congo, afin de mettre en évidence d'éventuelle production de slime par les staphylocoques.

Dans une étude réalisée par **Ghellai, (2016)**, sur 50 souches de *S. aureus* seules 10 (20%) étaient susceptibles de produire du slime (**Figure 13**).

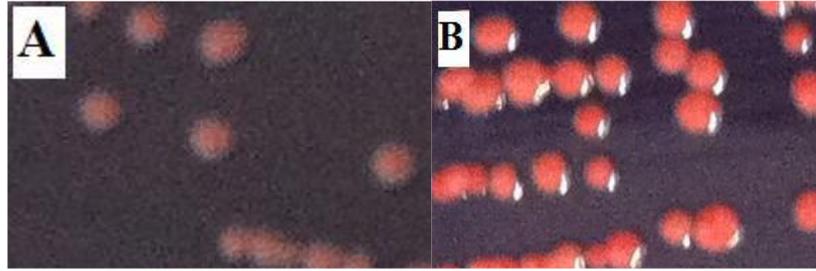


Figure 13 : Aspect des colonies de *S. aureus* sur milieu RC (Rouge Congo).
A : souche slime (+), **B** : souche slime (-) (Ghellai, 2016).

Selon certains auteurs, la classification des staphylocoques ensemencés sur milieu rouge Congo est rendue possible, en comparant la couleur des colonies : une couleur rose indique l'absence de biofilm et une couleur noire avec une consistance sèche indique la présence de biofilm ; tandis qu'une couleur rose avec un noircissement au centre de la colonie correspond aux souches faiblement productrices de biofilm alors que les colonies d'une couleur noire et lisses indiquent que les souches sont intermédiairement productrices de biofilm [(Freeman *et al.*, 1989)] ; (Mathur *et al.*, 2006)].

La formation d'un biofilm de *S. aureus* est un processus qui se déroule en deux phases. La première phase consiste en l'attachement initial des cellules sur une surface, et la seconde à la multiplication et à la formation d'une communauté structurée, mature et multicouche des cellules bactériennes. Ces deux phases sont physiologiquement différentes l'une de l'autre et requièrent chacune des facteurs spécifiques. Le détachement de cellules du biofilm mature permet la dissémination des bactéries et la colonisation de nouveaux sites d'infection chez l'homme (Otto, 2008).

Les biofilms à *S. aureus* sont à l'origine d'infections nosocomiales, le plus souvent en rapport avec l'utilisation des implants médicaux. Ces infections sont plus difficiles à traiter et nécessitent un remplacement plus fréquent des implants médicaux (Von Eiff *et al.*, 2005).

La technique de microplaque 96 puits semble être la méthode de criblage la plus fiable, sensible, précise et reproductible, pour la détection de la formation de biofilm [(Hassan *et al.*, 2011)] ; (Mathur *et al.*, 2006)].

De même Bellifa en 2013 et Kara-Terki en 2014 montrent que la technique TCP en comparaison avec d'autres méthodes de détection du biofilm présente plus de fiabilité.

Cette technique, bien qu'elle est très utile pour montrer que les souches sont biofilm-positif ou biofilm-négatif et distinguer entre celles qui sont faiblement, modérément ou fortement

adhérentes, il est important de reconnaître que les niveaux absolus de biofilm produit par une souche peuvent varier considérablement entre les expériences ce qui signifie que le protocole utilisé devrait être strictement respecté (**Waters et al., 2014**).

3. Etude de l'effet de *Lavandula officinalis* et *Eucalyptus globulus* sur la forme biofilm des souches isolées de sondes endotrachéales

On rencontre plusieurs problèmes associés au développement des biofilms dans le milieu médical, surtout la résistance élevée aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants).

Au cours des vingt dernières années, les études sur le terrain ont porté sur l'élaboration de stratégies préventives plutôt que sur des approches qui tuent les micro-organismes après leur colonisation en surface ; Cependant, de tels traitements ne sont pas totalement efficaces car les microorganismes à biofilm ont des caractéristiques qui offrent des conditions de vie microbienne réussies, y compris une résistance accrue aux traitements antibiotiques et biocides (**Cattò et Cappitelli, 2019**).

Pendant les dernières années, les chercheurs utilisent des extraits des plantes pour inhiber les mécanismes de virulences et lutter contre les agents pathogènes

Aujourd'hui où la résistance des germes aux antibiotiques devient de plus en plus préoccupante, les huiles essentielles (HE) montrent leur efficacité (**Chahboun et al., 2013**).

(**Chahboun et al., 2015**) ont montré que l'huile essentielle de *lavandula officinalis* a une activité antibiofilm sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* comme elle a un effet important contre *Acinetobacter baumannii* et le *Staphylococcus aureus*. L'activité antimicrobienne observée est due essentiellement à la richesse de l'huile en constituants suivants : L' α -pinène, le camphre, le bornéol et les esters. Ces composés sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. Il est clair alors que l'huile essentielle de la lavande peut être très efficace contre des germes résistants aux antibiotiques de synthèse.

Parmi toutes les HE, celle de la Lavande est certainement la plus universellement connue. Elle a fait l'objet d'une centaine d'études scientifiques validant ses nombreuses propriétés liées à sa richesse en linalol et en acétate de linalyle. Contenant très peu de camphre, sa toxicité est quasiment nulle, d'où l'usage sécuritaire de cette HE, devenue incontournable dans le conseil pharmaceutique (**Lobstein et Couic-Marinier, 2017**).

Ghellai en 2016 a déterminé l'effet d'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* sur la forme planctonique et sessile des souches de *S. aureus* hautement adhérentes. Les résultats des valeurs de CMI et CMB obtenus de cette huile qui ont été déterminées par la méthode de

micro dilutions sur plaque 96 puits, ont permis d'attribuer une meilleure activité antibactérienne à l'huile essentielle d'*E. globulus* (CMI : 0,06 à 1 g/L)) contre la croissance planctonique des souches de *S. aureus*. Les valeurs des concentrations minimales inhibitrices du biofilm (CMIB) étaient significativement supérieures (0,25 à 1 g/L) que les CMIB obtenues contre les mêmes souches lorsqu'elles étaient cultivées sous forme planctonique.

Dans la même étude (**Ghellai, 2016**) a combiné entre la povidone iodée qui apparaît souvent parmi les composés antiseptiques les plus employés dans le milieu hospitalier en raison de son efficacité antibactérienne approuvée vis-à-vis un bon nombre de microorganismes et l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. Les résultats permettent d'attribuer une meilleure efficacité antibactérienne. Ceci indique un effet synergique contre le biofilm à *S. aureus*.

Samoussa et al en **2018**, indique que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est efficace sur les *S. aureus*.

Les propriétés de l'eucalyptus sont dues principalement à un éther-oxyde terpénique contenu dans l'HE produite par les feuilles. Anciennement nommée eucalyptol, cette substance porte désormais le nom de 1,8-cinéole. Le composé, qui représente 55 à 70 % de la composition de l'essence, est un fluidifiant des sécrétions ORL et bronchiques.

Il est reconnu que les huiles essentielles sont, généralement, plus efficaces contre les bactéries de type Gram positif dont fait partie *S. aureus* (**Delaquis et al., 2002**).

Ait-Ouazzou et al en **2011** ont mis en évidence une bonne activité bactériostatique et bactéricide, contre sept bactéries pathogènes et d'altération dont *S. aureus* formatrice du biofilm.

Par ailleurs, l'effet inhibiteur des huiles essentielles contre les bactéries selon leur type de Gram est controversé (**Ehivet et al., 2011**). Généralement et selon certains auteurs, les bactéries Gram positif sont plus susceptibles à l'action des huiles essentielles que les bactéries Gram négatif (**Delaquis, 2002**).

Les huiles essentielles, à l'image des antiseptiques, sont susceptibles d'agir sur les microorganismes pendant toutes les phases de la multiplication microbienne (**Thormar, 2011**).

À la fin de ce travail nous pouvons dire, que la mise en place des sondes endotrachéales chez les patients hospitalisés perturbe les défenses de l'hôte et constitue très souvent une porte d'entrée pour les microorganismes pathogènes, responsables de la formation de biofilm.

Lors de l'implantation de dispositif médical, le développement de biofilm est rapide sur l'implant utilisé, par ailleurs la technique d'évaluation TCP, reste la méthode la plus fiable pour la détection de la formation de biofilm.

Klebsiella pneumoniae et *staphylococcus aureus*, sont de très bonnes souches formatrices de biofilm, qui favorisent leur pathogénicité et leur adhésion sur les surfaces des sondes endotrachéales et par conséquent une infection associées aux soins. Elles résistent à la majorité des ATB utilisés et rendent ainsi le traitement difficile. Ce qui pose un grand problème de santé publique.

Les traitements des infections à biofilms sont complexes car ils sont responsables de la tolérance aux antibiotiques. Si l'effet antibactérien de nombreuses huiles essentielles est depuis quelque décennies largement étudié, ce n'est que récemment qu'un certain nombre d'étude s'intéressent aux propriétés anti-biofilm, dont sont doté des HE, là où un bon nombre d'ATB demeurent inefficaces. C'est précisément l'objet de la seconde partie de ce travail à propos de l'activité des HE de la Lavande et d'Eucalyptus sur les biofilms.

A la lumière des résultats obtenus par l'étude de pouvoir antimicrobien des huiles essentielles de *Lavandula officinalis* et d'*Eucalyptus globulus*, on constate qu'elles sont plus actives sur les souches de *Klebsiella pneumoniae*, d'*Acinetobacter baumannii* et le *Staphylococcus aureus* car ces plantes renferment une teneur en huile essentielles très élevées.

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

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

- Ait-Ouazzou A., Cherrat L., Espina L., Lorán S., Rota C., Pagán R. (2011).**The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 12(3), 320–329.
- Ango P. D., Konan K. D., Kouamé K. A., Sai S. S., Tchimou A. Y., Adingra S. C., Boua N. (2019).**Écologie Microbienne des Surfaces et Dispositifs Médicaux au Service de Réanimation du Centre Hospitalier et Universitaire (CHU) de Treichville. *HEALTH SCIENCES AND DISEASES*, 21(1).
- Archibald L.K, Gaynes R.P. (1997).** HOSPITAL-ACQUIRED INFECTIONS IN THE UNITED STATES. *Infectious Disease Clinics of North America* 11, 245–255.
- Audrey G. (2016).** Lavandes et lavandin, utilisation en aromathérapie : enquête auprès des pharmaciens d’officine.
- Baudin M., Cinquin B., Sclavi B., Pareau D., Lopes F. (2017).**Understanding the fundamental mechanisms of biofilms development and dispersal: BIAM (Biofilm Intensity and Architecture Measurement), a new tool for studying biofilms as a function of their architecture and fluorescence intensity. *Journal of Microbiological Methods* 140, 47–57.
- Behlau I. (2008).** Microbial Biofilms in Ophthalmology and Infectious Disease. *Arch Ophthalmol* 126(11), 1572.
- Bekhechi C. (2002).** Analyse de l’huile essentielle d’*Ammoides verticillata* de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. (Thèse de doctorat) Département de Biologie, Université de Tlemcen.
- Belas R. (2013).**When the swimming gets tough, the tough form a biofilm. *Molecular microbiology*, 90(1), 1-5.
- Bellifa, S. (2014).**Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen (Thèse de doctorat).
- Bellifa S., Hafida H., Damien B., Nicolas C., Imane M. hamed Ibtissem K.T., Merieme L., Wafae D., Christiane F. (2013).**Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen, Algeria. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7, 5558–5564.
- Beloin C., Roux A., Ghigo J.-M. (2008).***Escherichia coli* Biofilms. In *Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 249–289.

- Benabdelkader T. (2012).** Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des lavandes ailées, *Lavandula stoechas* sensu lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique (Thèse de doctorat).
- Bendinger B., Rijnaarts H.H.M., Altendorf K., Zehnder A.J.B. (1993).** Physicochemical Cell Surface and Adhesive Properties of Coryneform Bacteria Related to the Presence and Chain Length of Mycolic Acids. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3973–3977.
- Benmahdi L. (2017).** Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique: Bactériologie et biofilm (Thèse de doctorat).
- Berrazeg M S., M. Diene M., Drissi M., Kempf H., Richet L., Landraud., Rolain J. M. (2013).** Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS.One.* 8:e61428.
- Bertholet E., Bloch L., Camilatto I., Clabault K., Delabranche X., Dray S., Fourier L., Hauchard I., Ledroit C., Lelias I. (2010).** Prévention des pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) : résultats de l'enquête de la SRLF 2008. *Réanimation* 19, 366–373.
- Bezoui M. (2016).** Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine (Thèse de doctorat).
- Biomérieux S. A. (2010).** API 20 C AUX.
- Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Burmølle M., Hentzer M., Haagensen J.A.J., Hougen H.P., Calum H., Madsen K.G., Moser C., Molin S., et al. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology* 151, 373–383.
- Bjarnsholt T., Alhede M., Alhede M., Eickhardt-Sørensen S.R., Moser C., Kühl M., Jensen P.Ø, Høiby N. (2013).** The in vivo biofilm. *Trends in Microbiology* 21, 466–474.
- Bouchaala M. (2019).** Etude phytochimique, caryologique et activités biologiques des huiles essentielles du genre *Helichrysum* Auct. Plur. de l'est Algérien (Thèse de doctorat).
- Boukhatem M.N., Ferhat M.A., Kameli A., Mekarnia M. (2017).** *Eucalyptus globulus* (Labill.) : un arbre à essence aux mille vertus. *Phytothérapie*.
- Brun-Buisson C., Abrouk F., Legrand P., Huet Y., Larabi S., Rapin M (1987).** Diagnosis of central venous catheter-related sepsis. Critical level of quantitative tip cultures. *Archives of Internal Medicine.* 147:873–877.

- Carmen J. C., Roeder B. L., Nelson J. L., Ogilvie R. L. R., Robison R. A., Schaalje G. B., Pitt W. G. (2005).** Treatment of biofilm infections on implants with low-frequency ultrasound and antibiotics. *American journal of infection control*, 33(2), 78-82.
- Cattò C, Cappitelli, F. (2019).** Testing anti-biofilm polymeric surfaces: Where to start?. *International journal of molecular sciences*, 20(15), 3794.
- CCLIN (Centre de coordination de lutte contre les infections nosocomiales de l'interrégion Nord).(2014).** Les infections nosocomiales. (<http://www.cclinparisnord.org/>).
- Chahboun N., Esmail A., Abed H., Barrahi M., Amiyare R., Berrabeh M., Ouhssine M. (2015).** Evaluation de l'activité bactériostatique d'huile essentielle de la *Lavandula Officinalis* vis-à-vis des souches d'origine clinique résistantes aux antibiotiques. *J Mater Environ Sci*, 6(4), 1186-1191.
- Chaieb K., Mahdouani K., Bakhrouf A. (2005).** Detection of *icaA* and *icaD* loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *Journal of Hospital Infection*, 61(3), 225-230.
- Chastre J, Fagon J.-Y. (2002).** Ventilator-associated Pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 867–903.
- Chénfir A. (2016).** Les pneumopathies nosocomiales en milieu de réanimation À l'hôpital militaire Avicenne Marrakech. Thèse Doctorat en Médecine, Faculté de Marrakech.
- Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. (1985).** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J. Clin. Microbiol.* 22, 996–1006.
- Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L. (2007).** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 121, 1–17.
- Coban A.Y., Ciftci A., Onuk E.E., Erturan Z., Tanriverdi Cayci Y., Durupinar B. (2009).** Investigation of biofilm formation and relationship with genotype and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *Mikrobiyol Bul* 43, 563–573.
- Coffin S.E., Klompas M., Classen D., Arias K.M., Podgorny K., Anderson D.J., Burstin H., Calfee D.P., Dubberke E.R., Fraser V., et al. (2008).** Strategies to Prevent Ventilator-Associated Pneumonia in Acute Care Hospitals. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29, S31–S40.

- Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.-J. (1978).** How Bacteria Stick. *Sci Am* 238, 86–95.
- Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. (1995).** Microbial Biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.
- Costerton J. W. (1999).** Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents*, 11(3-4), 217-221.
- Couic-Marinier F., Harnist F., Lobstein A. (2014).** En savoir plus sur l’huile essentielle de Lavande officinale. *Actualités Pharmaceutiques* 53, 37–40.
- Debuige G. (1984).** Larousse des plantes qui gérissent. Librairie Larousse.
- De Chalvet De Rochemonteix A. (2009).** Les biofilms et la peau. (Thèse de doctorat. *École vétérinaire de Maisons-Alfort*).
- Delaquis P. (2002).** Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74, 101–109.
- Deprugney G. (2011).** Soins infirmiers aux patients intubés ventilés. *Ecole d’IAD*.
- Donlan R. M. (2008).** Biofilms on central venous catheters: is eradication possible?. In *Bacterial biofilms* (pp. 133-161). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Donlan R.M. (2002).** Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881–890.
- Donlan R.M, Costerton J.W. (2002).** Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *CMR* 15, 167–193.
- Dowd S.E., Sun Y., Secor P.R., Rhoads D.D., Wolcott B.M., James G.A., Wolcott R.D. (2008).** Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol* 8, 43.
- Dumas C. (2007).** Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible (thèse de doctorat).
- Dupin A. (2017).** Intérêts des huiles essentielles dans la lutte contre l’antibio-résistance induite par les biofilms (thèse de doctorat).
- Ehivet F.E., Min B., Park M.-K., Oh J.-H. (2011).** Characterization and Antimicrobial Activity of Sweetpotato Starch-Based Edible Film Containing Origanum (Thymus capitatus) Oil. *Journal of Food Science* 76, C178–C184.
- Espinasse F., Page B., Cottard-Boulle B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010, 51–63.
- Fahed L. (2016).** Diversité chimique et potentiel antimicrobien d’huiles essentielles de plantes libanaises (thèse de doctorat).

- Filloux A, Vallet, I. (2003).** Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Med Sci (Paris)* 19, 77–83.
- Flemming H. C. (2011).** Microbial biofouling: unsolved problems, insufficient approaches, and possible solutions. In *Biofilm highlights* (pp. 81-109). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T. (1989).** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* 42, 872–874.
- Garrett T. R., Bhakoo M., Zhang Z. (2008).** Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049-1056.
- Ghellai L. (2016).** Étude de l'effet de trois huiles essentielles sur la formation de biofilm à *Staphylococcus aureus* responsable d'infections nosocomiales au C.H.U de Tlemcen. (thèse de doctorat).
- Ghellai L., Hassaine H., Klouche N., Khadir A., Aissaoui N., Nas F., Zingg, W. (2014).** Detection of biofilm formation of a collection of fifty strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Algeria at the University Hospital of Tlemcen. *Journal of Bacteriology Research*, 6(1), 1-6.
- Goller C.C, Romeo T. (2008).** Environmental Influences on Biofilm Development. In *Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 37–66.
- Goldstein P, H., Menu C., Adriansen R., Garrigue V., Van Laer., A Facon. (1999).** De L'INTUBATION PARTICULARITÉ et PRÉHOSPITALIÈRE, EN MÉDECINE. Quels accès de voies aériennes en cas d'intubation difficile du patient dans le cadre de la réanimation préhospitalière. *Médecine d'urgence*, p. 49-62.
- Gresser A. (2010).** Intubation trachéale. REVUE DES DISPOSITIFS MEDICAUX, CHU Bordeaux.
- Guilhen C., Charbonnel N., Parisot N., Gueguen N., Iltis A., Forestier C., Balestrino D. (2016).** Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics* 17, 237.
- Guidelines for the Management of Adults with HAP and VAP (2005).** *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171(4), 388–416.
- Hajoubi W. (2019).** Les infections associées aux biofilms.

- Hall-Stoodley L, Stoodley P. (2009).** Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology* 11, 1034–1043.
- Hamza R. (2010).** EPIDEMIOLOGIE DES INFECTIONS ASSOCIEES AUX SOINS HEALTHCARE ASSOCIATED INFECTIONS EPIDEMIOLOGY. *Revue Tunisienne d'Infectiologie-Janvier*, 4, 1-4.
- Hassan A., Usman J., Kaleem F., Omair M., Khalid A., Iqbal M. (2011).** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Braz J Infect Dis* 15, 305–311.
- Henrici A.T. (1933).** Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *J. Bacteriol.* 25, 277–287.
- Henrici A.T. (1936).** Studies of Freshwater Bacteria: III. Quantitative Aspects of the Direct Microscopic Method. *J. Bacteriol.* 32, 265–280.
- Irie Y, Parsek M.R. (2008).** Quorum Sensing and Microbial Biofilms. *In Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 67–84.
- Jouenne T. (2008).** Biofilms bactériens. 14.
- Kaloustian J., Hadji-Minaglou F. (2012).** La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie; Entre science et tradition pour une application médicale raisonnée. Springer.
- Kaplan J.B. (2010).** Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *J Dent Res* 89, 205–218.
- Kara Terki I. (2014).** Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen (thèse de doctorat).
- Kassis-Chikhani N. (2012).** Klebsielle Pneumoniae pathogène nosocomial, résistance et virulence (Doctoral dissertation).
- Klein G. (2011).** Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines (thèse de doctorat, UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE).
- Konate M. (2006).** INTUBATION TRACHÉALE DIFFICILE EN CHIRURGIE THYROÏDIENNE DANS LE SERVICE D'ANESTHÉSIE RÉANIMATION DE L'HOPITAL DU POINT G.

- Koziol N. (2015).** Huiles essentielles d'Eucalyptus globulus, d'Eucalyptus radiata et de Corymbia citriodora: qualité, efficacité et toxicité (thèse de doctorat, Université de Lorraine).
- Kuchma S.L., Connolly J.P., O'Toole G.A. (2005).** A Three-Component Regulatory System Regulates Biofilm Maturation and Type III Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *JB* 187, 1441–1454.
- Lagrafeuille R. (2016).** Activités anti-biofilm de *Lactobacillus* vis-à-vis de *Klebsiella Pneumoniae* (thèse de doctorat).
- Lappin-Scott H., Burton S., Stoodley P. (2014).** Revealing a world of biofilms — the pioneering research of Bill Costerton. *Nat Rev Microbiol* 12, 781–787.
- Lebeaux D., Ghigo J.-M., Beloin C. (2014).** Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78, 510–543.
- Lemon K.P., Earl A.M., Vlamakis H.C., Aguilar C., Kolter R. (2008).** Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*. In *Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–16.
- Liesse Iyamba J. M. (2012).** Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique.
- Lobstein A., Couic-Marinier F., Koziol N. (2018).** Huile essentielle d' Eucalyptus globulus. *Actualités Pharmaceutiques* 57, 59–61.
- Lobstein A, Couic-Marinier, F. (2017).** Huile essentielle de Lavande officinale. *Actualités Pharmaceutiques* 56, 57–60.
- Lopes J. (2019).** Développement de nouvelles stratégies de lutte contre les biofilms de *Providencia stuartii*, un pathogène humain multi-résistant (Doctoral dissertation, Université Grenoble Alpes).
- Maki D. G. (1994).** Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention, and management. *Infections associated with indwelling medical devices*, 2, 155-212.
- Marchal O. (2018).** L'expertise en ingénierie biomédicale ou du bon usage des dispositifs médicaux. *Médecine & Droit* 2018, 129–139.
- Martinez L.R, Casadevall A. (2007).** *Cryptococcus neoformans* Biofilm Formation Depends on Surface Support and Carbon Source and Reduces Fungal Cell Susceptibility to Heat, Cold, and UV Light. *AEM* 73, 4592–4601.

- Marwan A., Corinne B., Pascal D., Nour-Eddine, C. (2019).** Les biofilms et l'hygiène des surfaces en milieu hospitalier et alimentaire.
- Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D., Fatma T., Rattan A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol* 24, 25.
- McDougald D., Rice S.A., Barraud N., Steinberg P.D., Kjelleberg S. (2012).** Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 10, 39–50.
- Medeiros A. C. D. A. P. (2016).** Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées (thèse de doctorat).
- Mittelman M. W. (1996).** Adhesion to biomaterials. Bacterial adhesion: molecular and ecological diversity. *New York: Wiley-Liss, Inc*, 89-127.
- Moons P., Michiels C.W., Aertsen A. (2009).** Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology* 35, 157–168.
- Morgan R., Kohn S., Hwang S.-H., Hassett D.J., Sauer K. (2006).** BdlA, a Chemotaxis Regulator Essential for Biofilm Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *JB188*, 7335–7343.
- Namvar A.E., Asghari B., Ezzatifar F., Azizi G., and Lari A.R. (2013).** Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hygiene and Infection Control*; 8(1):Doc03; ISSN 2196-5226.
- Nasr S.A., Abushady H.M., Hussein H.S. (2012).** Biofilm formation and presence of ica AD gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, pp. 1110-8630.
- Nirwati H., Sinanjung K., Fahrnunissa F., Wijaya F., Napitupulu S., Hati V.P., Hakim M.S., Meliala A., Aman A.T., Nuryastuti T. (2019).** Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proc* 13, 20.
- Nudleman E, Kaiser D. (2004).** Pulling Together with Type IV Pili. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7, 52–62.
- Nyunga, M. (2011).** Les techniques d'intubation. Service de réanimation, CH
- Oli A. K., Raju S., Rajeshwari N. S., & Kelmani C. (2012).** Biofilm formation by multidrug resistant *Enterococcus faecalis* (MDEF) originated from clinical samples. *J Microbiol Biotechnol Res*, 2, 284-8.

- Olivares E. (2017).** Évaluation de l'impact des antibiotiques sur la formation de biofilms par *P. aeruginosa*: place de l'Antibiofilmogramme (thèse de doctorat).
- Oncel S., Pinar E., Sener G., Calli C., Karagoz U. (2010).** Evaluation of bacterial biofilms in chronic rhinosinusitis. *Journal of Otolaryngology--Head & Neck Surgery*, 39(1).
- O'Toole G. A., Kaplan HB., Kolter R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *The Annual Review of Microbiology*. 54: 49- 79
- Otto M. (2008).** Staphylococcal Biofilms. *In Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 207–228.
- Pantaleon V. (2015).** Le biofilm de *C. difficile*: rôle des protéines de surface (thèse de doctorat).
- Pessereau C. (2015).** Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermale (thèse de doctorat, Nantes, Ecole des Mines).
- Phillips P. L., Wolcott R. D., Fletcher J., Schultz G. S. (2010).** Biofilms made easy. *Wounds International* 1, 1-6.
- Picard C. (2011).** Transfert de matière dans un biofilm aéré sur membrane (thèse de doctorat).
- Queck S.-Y., Weitere M., Moreno A.M., Rice S.A., Kjelleberg S. (2006).** The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environ Microbiol* 8, 1017–1025.
- Remmal A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayebi M., Tantaoui-Elaraki A. (1993).** Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *Journal of Essential Oil Research*, 5(2), 179-184.
- Römling U., Kjelleberg S., Normark S., Nyman L., Uhlin B. E., Åkerlund B. (2014).** Microbial biofilm formation: a need to act. *Journal of internal medicine*, 276(2), 98-110.
- Roux A, Ghigo J.-M. (2006).** Les biofilms bactériens. *Bul. de l'Ac. Vét. de France* 261.
- Rumbo-Feal S., Gómez M.J., Gayoso C., Álvarez-Fraga L., Cabral M.P., Aransay A.M., Rodríguez-Ezpeleta N., Fullaondo A., Valle J., Tomás M., et al. (2013).** Whole Transcriptome Analysis of *Acinetobacter baumannii* Assessed by RNA-Sequencing Reveals Different mRNA Expression Profiles in Biofilm Compared to Planktonic Cells. *PLoS ONE* 8, e72968.
- Saitou K., Furuhashi K., Kawakami Y., Fukuyama M. (2009).** Biofilm formation abilities and disinfectant-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals. *Biocontrol science*, 14(2), 65-68.

- Samoussa M.O., Abdellaoui A., Kettani A., Saile R., Bennani H. (2018).** Étude de la Sensibilité Aux Huiles Essentielles de Cinnamomum Verum, Eucalyptus Globulus, et Glycyrrhiza Glabra L Ainsi qu'aux Antibiotiques de Certains Germes Issus de la Restauration Collective. *ESJ 14*, 584.
- Satorres S, Alcaraz A. (2007).** Prevalence of icaA and icaD genes in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strains isolated from patients and hospital staff, Cent Eur J Public Health, pp. 87–90
- Shehata I., Shabban M., Ibrahim R., Shoukry Y. (2012).** Endotracheal Tube Biofilm and its Relationship to Ventilator Associated Pneumonia in a Neonatal ICU. *Nature and Science. 10*: 133-141.
- Spormann A.M. (2008).** Physiology of Microbes in Biofilms. In *Bacterial Biofilms*, T. Romeo, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 17–36.
- Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M. (2000).** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods 40*, 175–179.
- Stickler D.J. (2008).** Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat Clin Pract Urol 5*, 598–608.
- Stickler D. J. (2002).** Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *Journal of applied microbiology, 92*, 163S-70S.
- Tasse J. (2017).** Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilm dans la prise en charge des infections ostéo-articulaires à staphylocoques (thèse de doctorat, Lyon).
- Tenke P., Kovacs B., Jäckel M., Nagy E. (2006).** The role of biofilm infection in urology. *World J Urol 24*, 13–20.
- Thormar H. (2011).** Lipids and essential oils as antimicrobial agents (Chichester, West Sussex: J. Wiley).
- Tomlin K.L., Malott R.J., Ramage G., Storey D.G., Sokol P.A., Ceri H. (2005).** Quorum-Sensing Mutations Affect Attachment and Stability of Burkholderia cenocepacia Biofilms. *AEM71*, 5208–5218.
- Touati A., Achour W., Abbassi et al., (2007),** Détection des gènes ica et de la production de slime parmi des souches de Staphylococcus epidermidis isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques, *Pathologie Biologie, 55* : 277–282

- Toure D. (2015).** Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire (thèse de doctorat).
- Trautner B.W, Darouiche R.O. (2004).** Catheter-Associated Infections: Pathogenesis Affects Prevention. *Arch Intern Med* 164, 842.
- Trengove N.J., Stacey M.C., McGechie D.F., Stingemore N.F., Mata S. (1996).** Qualitative bacteriology and leg ulcer healing. *Journal of Wound Care* 5, 277–280.
- Tremblay Y. D., Hathroubi S., Jacques M. (2014).** Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.
- Ugur A. R., Dagi H. T., Ozturk B., Tekin G., Findik D. (2016).** Assessment of in vitro antibacterial activity and cytotoxicity effect of *Nigella sativa* oil. *Pharmacognosy magazine*, 12(Suppl 4), S471.
- Vallet I., Olson J.W., Lory S., Lazdunski A., Filloux A. (2001).** The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 6911–6916.
- Van Houdt R, Michiels C.W. (2005).** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology* 156, 626–633.
- Vazel L., Potard G., Martins-Carvalho C., LeGuyader M., Marchadour N., Marianowski R. (2004).** Intubation : technique, indication, surveillance, complications. *EMC - Oto-rhino-laryngologie* 1, 22–34.
- von Eiff C., Jansen B., Kohnen W., Becker K. (2005).** Infections Associated with Medical Devices: Pathogenesis, Management and Prophylaxis. *Drugs* 65, 179–214.
- Waters EM., McCarthy H., Hogan S., Zapotoczna M., O'Neill E., O'Gara JP (2014).** Rapid quantitative and qualitative analysis of biofilm production by *Staphylococcus epidermidis* under static growth conditions. *Methods Mol. Biol.* 1106:157-66.
- Zeroual Z. (2012).** Profil épidémiologique et bactériologique des infections nosocomiales (À propos d'une Enquête de prévalence des infections nosocomiales du CHU Ibn Sina de Rabat Janvier-2010) (thèse de doctorat).
- Zobell C.E. (1943).** The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J. Bacteriol.* 46, 39–56.

Annexel

Préparation des milieux

Préparation des Géloses

Gélose Mac Conkey

Peptone de caséine.	(17g/l)
Peptone de viande.	(3 g/l)
Sels biliaires.	(1.5 g/l)
Cristal violet.	(0.001g/l)
Lactose.	(10 g/l)
Rouge neuter.	(0.03g/l)
NaCl.	(5g/l)
Agar.	(13.5g/l)

pH final =7.1

Pour la préparation de 1L on prend 52g de Mac conkey en poudre

Gélose Nutritive

Extrait de viande.	(1 g)
Extrait de levure.	(2g)
Peptone tryptique.	(5g/l)
NaCl (ou KCl).	(5g/l)
Agar-agar.	(15à20g/l)
Eau.	(1dm ³)

pH = 7.4

Pour la préparation de 1 L on prend 23 g de Gélose Nutritive en poudre

Cetrimide

Peptone de gélatine.	(16 g)
Peptone de caséine.	(10 g)
Bromure de tétradonium.	(0.2 g)
Acide nalidixique.	(15mg)
Sulfate de potassium.	(10g)
Chlorure de magnésium.	(1.4 g)
Agar.	(10g)

pH = 7.1

Pour la préparation de 1 L on prend 51.1g de gélose de Cetrimide en poudre

	Chapman	(1 g)
Extrait de viande de bœuf.		(10 g)
Peptones.		(10 g)
Mannitol.		(75g)
Chlorure de sodium.		(0.025 g)
Rouge de phénol.		(15g)
Agar.		

pH=7.4

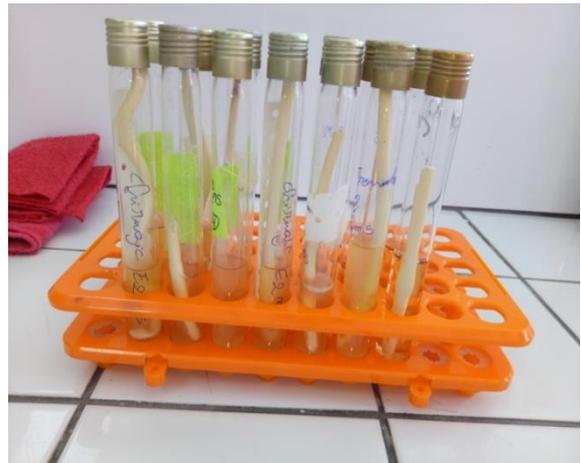
Pour la préparation de 1 L on prend 111 g de Chapman en poudre

Milieu de culture liquide

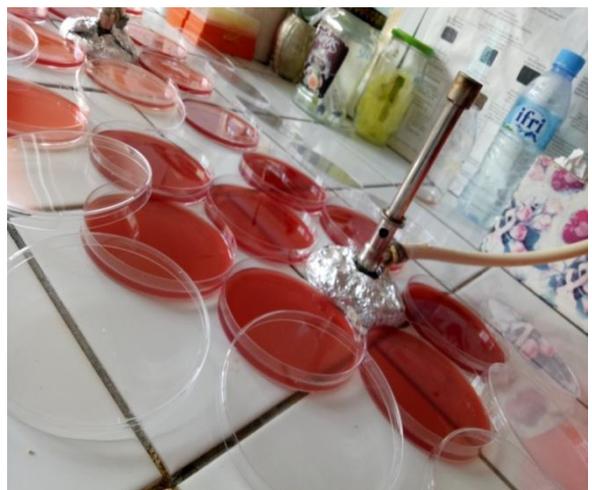
	Bouillon Cœur –Cervelle	(10 g)
Protéose- peptone.		(12.5 g)
Infusion de cervelle de veau.		(5 g)
Infusion de cœur de bœuf.		(2 g)
Glucose.		(5g)
Chlorure de Sodium.		(2.5 g)
Hydrogénophosphate de Sodium.		

pH=7.4

Annexe2



Enrichissement de sondes





Aspect macroscopique des colonies de *S. aureus* sur milieu chapman



Test de coagulase



Conservation des souches dans la gélose nutritive

الملخص

الأغشية الحيوية هي مجتمعات منظمة من الكائنات الحية الدقيقة المرتبطة بسطح حيوي أو غير حيوي من خلال إفراز مادة عديد السكاريد الخارجية. يبدو أن هذه هي المفتاح للعديد من الإصابات. على الرغم من تنفيذ التدابير الوقائية ، يصعب القضاء على الأغشية الحيوية بسبب تحملها المميز لجرعات عالية من المضادات الحيوية.

يهدف عملنا إلى دراسة الطرق النوعية والكمية المختلفة لتقييم تكوين الأغشية الحيوية للبكتيريا المعزولة من الأنابيب الرغامية على مستوى خدمة الإنعاش ، CHU Tlemcen ، وثانيًا ، سنهتم باختبار التأثير المضاد للبيوفيلم للزيوت الأساسية لبعض النباتات الطبية: *lavandula officinalis* و *Ecalyptus globulus* على السلالات المعزولة التي تشكل الأغشية الحيوية.

بالنظر إلى الظروف الحالية (COVID-19) ، لم يتم تنفيذ الجزء الثاني ، وبالتالي تظهر نتائج العمل السابق من ناحية أن قدرة السلالات على تكوين الأغشية الحيوية متنوعة وفقًا للطرق المستخدمة (التقنية صفيحة ميكروية جيدة 96 (TCP) ، طريقة أجار الكونغو الأحمر (CRA)). من ناحية أخرى ، أظهر العمل الذي تم إجراؤه على إمكانات المضادات الحيوية للزيوت الأساسية (HE) من *lavandula officinalis* و *Ecalyptus globulus* على سلالات تشكيل الأغشية الحيوية نشطاء أفضل مضافًا للبكتيريا لزيوت *E. globulus* . الأساس كروية تليها *Lavandula officinalis*. تظهر أحدث التطورات أن له مصلحة لا ليس فيها في المعركة المستقبلية ضد الأغشية الحيوية.

الكلمات المفتاحية

الشريط الحيوي،الأجهزة الطبية،الأنابيب الرغامية ، الزيوت الاساسية.

Résumé

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

L'objectif de notre travail vise à étudier par différentes méthodes qualitatives et quantitatives l'évaluation de la formation de biofilm des bactéries isolées de sondes endotrachéales au niveau de service de réanimation, CHU Tlemcen, et en deuxième lieu on va s'intéresser à tester l'effet anti biofilm des huiles essentielles de quelques plantes médicinales : *lavandula officinalis* et *d'Ecalyptusglobulus* sur les souches isolées formatrices du biofilm.

Compte tenu aux conditions actuelles (COVID-19), la deuxième partie n'a pas été réalisé, donc les résultats des travaux antécédents montrent d'une part que la capacité de souches à former des biofilms est diversifiée en fonction des méthodes utilisés (Technique de microplaque 96 puits (TCP), méthode de rouge Congo agar (CRA). D'une autre part les travaux réalisés sur le potentiel antibiofilm des huiles essentielles (HE) de *lavandula*

officinalis et d'*Ecalyptusglobulus* sur les souches formatrices de biofilms ont montré une meilleure activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*E. globulus* suivie de *Lavandula officinalis*. Les dernières avancées montrent que les HE possèdent un intérêt sans équivoque dans la lutte future contre les biofilms.

Mots clés

Biofilm, dispositifs médicaux, sondes endotrachéales, huiles essentielles.

Abstract

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

The objective of our work aims to study by different qualitative and quantitative methods the evaluation of the biofilm formation of bacteria isolated from endotracheal tubes at the level of resuscitation service, CHU Tlemcen, and secondly we will be interested in testing the anti biofilm effect of the essential oils of some medicinal plants: *lavandula officinalis* and *Ecalyptus globulus* on the isolated strains that form the biofilm.

Given the current conditions (COVID-19), the second part has not been carried out, therefore the results of previous work show on the one hand that the capacity of strains to form biofilms is diversified according to the methods used (Technique well microplate (TCP), Congo red agar (CRA) method. On the other hand, work carried out on the antibiofilm potential of essential oils (HE) of *lavandula officinalis* and *Ecalyptus globulus* on biofilm-forming strains has shown better antibacterial activity of essential oil of *E. globulus* followed by *Lavandula officinalis*. The latest advances show that HE has an unequivocal interest in the future fight against biofilms.

Keywords

Biofilm, medical devices, endotracheal tubes, essential oils.