

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



**UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID TLEMEN**  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
ET SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à  
L'Environnement « LAMAABE »

## THÈSE

Présentée par

**Mme. BENBRAHIM Chahla**

**Ep Ghidaoui**

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

Option : Maîtrise du Développement Microbien

**Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits des  
plantes aromatiques sur *Klebsiella pneumoniae* productrice de  
 $\beta$ -lactamase à spectre élargi**

Soutenue le : 15/07/2021

Devant le jury :

Président	BENDAHOU M.	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	REBIAHI S.A	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	BENMAHDI L.	Maitre de conférences (A)	U. d'Oran 1
Examineur	KHADIR A.	Maitre de conférences (A)	U. d'Oran 1
Examineur	SEDDIKI S.M.L.	Maitre de conférences (A)	U. de Naâma
Directeur de thèse	BARKA M.S.	Maitre de conférences (A)	U. de Tlemcen

Année Universitaire : 2020-2021

## Remerciements

*Au terme de mon modeste travail, je remercie tout d'abord le Bon DIEU Tout Puissant de la santé, de la volonté, de la force et de la patience qu'il m'a donné pour accomplir le présent travail.*

*Je tiens à remercier mon directeur de thèse Mr. **BARKA Mohammed Salih** pour son encadrement et ses encouragements à travers son attention, sa patience, sa grande disponibilité, ses conseils judicieux et son suivi tout au long de ce travail. Je le remercie également de m'avoir fait confiance pour la réalisation de ce travail. Ma profonde gratitude va à Monsieur le Dr. **BENMAHDI Lahcene** Directeur du laboratoire de Microbiologie à l'Hôpital Militaire Régionale Universitaire d'Oran, pour son aide précieuse, pour sa gentillesse, pour son accueil chaleureux, pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour le bon déroulement de mon travail au sein de son laboratoire, ainsi que toute l'équipe du laboratoire.*

*Je remercie infiniment Pr. **KIJHAL Mabrouk** Directeur du laboratoire de Microbiologie Appliqué **LMA**. J'adresse mes vifs remerciements à monsieur **BENDAJHOU Mourad**, professeur à l'université ABB de Tlemcen, pour sa grande disponibilité, son écoute, ses conseils judicieux et son suivi tout au long de ce travail. Je remercie profondément Mme **Hassaine Hafida**, professeur à l'université ABB de Tlemcen et responsable de la formation doctorale «Maitrise du développement microbien».*

*Je tiens à remercier Mr. **KHADIR Abdelmounaim** Maître de conférences A à l'université de Senia Oran 1, Mr. **SEDDIKI Sidi Mhammed Lahbib** Maître de conférences A à l'université de Naâma et Mr. **REBLAHI Sid Ahmed** Professeur à l'université de Tlemcen d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Je suis très reconnaissante à Mme **ADRJANA Basile**, professeur et responsable du laboratoire de Biologie végétale de l'Université de Frédéric II, Naples, Italie, de m'avoir accueilli au sein du Laboratoire. Je lui témoigne toute ma reconnaissance pour son agréable assistance durant mon stage.*

*Je tiens à remercier aussi Pr. **FLAMINI Guido** au Département de Pharmacie, Université de Pisa, Italie pour son aide à faire la CG-SM.*

*Je suis sincèrement reconnaissante envers Dr. **MARJA Triassi** professeur et chef de Département de la santé publique à Naples, Italie, pour m'avoir donné l'accès au laboratoire de biologie moléculaire.*

*Je remercie tous les enseignants et les doctorants du laboratoire **LAMAABE**, en particulier Dr. **KHADIR Abdelmounaim**, qui m'ont soutenu et encourager tout au long de ma thèse.*

*Merci aux membres de l'équipe des substances naturelles antimicrobiennes (SNA) de **LAMAABE**, qui m'ont aidé et soutenu dans mes travaux au laboratoire.*

*Je tiens à remercier mes collègues **ZATOUT Asma**, **MECHALA Sara** et **ZATOUT Nawel** pour l'aide et le soutien qu'elles m'ont apporté*

*Enfin, merci à tous ceux qui, de loin ou de près ont contribué à la réalisation de ce travail*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes parents :*

*Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices.*

*Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et  
mes profonds sentiments envers eux.*

*Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est  
toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi Nouro*

*A ma joie et ma vie Mes petites anges Mohamed Iyad et Ayla*

*A ma belle-mère et mon beau-père et toute ma belle famille*

*A mes sœurs : Chahra, Sara, Abir, Moufida et mon cher frère Bilal*

*A mes nièces Assinat, Oumnia et mon neveu Sadjid*

*Je vous remercie pour le soutien moral et l'encouragement que vous m'avez accordés. Je vous souhaite tout le  
bonheur que vous méritez.*

*A mes tantes et à mes oncles*

*A mes cousins et cousines*

*A mes adorables amies avec lesquelles j'ai partagé mes moments de  
joie et de bonheur*

*Que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.*

*Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection la plus sincère...*

*Chahla*



اللَّهُمَّ إِنِّي أَسْأَلُكَ عِلْمًا  
نَافِعًا، وَرِزْقًا طَيِّبًا،  
وَعَمَلًا مُتَقَبَّلًا

## المخلص

أصبحت العدوى التي تسببها البكتيريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية مشكلة صحية عامة عالمية كبرى ، لا سيما من خلال إكتساب ال  $\beta$ -lactamases à spectre élargi والقدرة على تكوين البيوفيلم. لذلك من الضروري توفير جزيئات طبيعية جديدة لها تأثيرات مضادة للبكتيريا ويمكن أن تعمل ضد هذه السلالات متعددة المقاومة كمصادر طبيعية واعدة وبدائل للأدوية.

تهدف الدراسة المقترحة إلى تقييم التأثير المثبط لثلاثة زيوت أساسية (*Lavandula* , *Origanum glandulosum*) ضد سلالات *Klebsiella pneumoniae* التي تنتج  $\beta$ -lactamase à spectre élargi المعزولة من المستشفى العسكري الجهوي الجامعي بوهان الجزائر.

من خلال تحديد آلية عملها عن طريق قياس إطلاق المكونات الخلوية الماصة عند 260 نانومتر ، قياس السمية الخلوية في الخلايا الليمفاوية البشرية ، وتوليد أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) ومراقبة تأثير الزيوت الأساسية على مستوى جدار الخلية بالمجهر الإلكتروني، و تحليل تركيبات الزيوت الأساسية للنباتات بواسطة GC-MS

كانت نسبة BLSE *Klebsiella pneumoniae* 37.5 % ، كشف تحليل ال PCR عن وجود جين *bla CTX-M* من المجموعة 1 بنسبة عالية (86.7%) ، و 46.7% من بينهم كانوا منتجين معتدلين للبيوفيلم

أظهرت سلالات BLSE *Klebsiella pneumoniae* حساسية كبيرة من *Mentha* و *Origanum glanduloum* و *pulegium*. أعطوا في المتوسط ، على التوالي ، منطقة تثبيط: 43.45 / 13.06 مم ، أقل تركيز مثبط CMI: 5.14 / 7.22 مجم / مل و CMB : 10.64 / 7.35 مجم / مل. من ناحية أخرى، فإن الزيت العطري من *Lavandula dentata* أقل نشاطاً.

لم تظهر هذه المكونات أي تأثير سام ضد الخلايا الليمفاوية بعد 24 ساعة من الحضانه، وجود مواد ماصة عند مستوى 260 نانومتر في العينة المفلترة التي تمت معالجتها مقارنة بالخلايا الغير معالجة. أظهر اختبار ROS تأثيرات مثبطة على إنتاج كريات الدم البيضاء ROS مقارنة بالخلايا الشاهدة ،بالإضافة إلى ذلك ، هناك تغييرات في جدار الخلية وكذلك فقدان محتوى السيتوبلازم الذي أظهره الميكروسكوب الإلكتروني، وتشير نتائج هذه الدراسة إلى أن زيوتنا الأساسية يمكن استخدامها كمصدر للعقاقير الطبيعية المضادة للبكتيريا التي لها تطبيقات دوائية محتملة

**الكلمات المفتاحية:** *Klebsiella pneumoniae* ، PCR ،  $\beta$ -lactamase ، زيت أساسي ، نشاط مضاد للجراثيم ، سمية خلوية.

## Résumé

Les infections causées par les bactéries multirésistantes sont devenues un problème majeur de santé publique mondiale, en particulier par l'acquisition de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi et la capacité de formation de biofilm. Il est donc urgent de mettre à disposition de nouvelles molécules naturelles qui ont des effets antibactériens et qui peuvent agir contre ces souches multirésistantes en tant que sources prometteuses d'alternatives naturelles aux médicaments. L'étude proposée est d'évaluer l'effet inhibiteur de trois huiles essentielles (*Origanum glandulosum*, *Lavandula dentata* et *Mentha pulegium*) sur des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrice de  $\beta$ -lactamase à spectre élargi d'origine hospitalière. En déterminant leur mécanisme d'action par la mesure de la libération des composants cellulaires absorbant à 260 nm, la cytotoxicité dans les lymphocytes humains, la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et l'observation des effets des huiles essentielles au niveau de la paroi cellulaire par microscopie électronique. Les compositions des huiles essentielles des plantes ont également été analysées par GC-MS.

L'incidence de *K. pneumoniae* BLSE a été de 37,5%. L'analyse par PCR de ces dernières, a révélé la présence de gène bla CTX-M du groupe 1 avec un pourcentage élevé (86,7%), dont 46,7% d'eux étaient des productrices modérés de biofilm.

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE ont montré une grande sensibilité aux HES d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium*. Elles ont donné en moyenne respectivement, une zone d'inhibition 43,45 / 13.06 mm, une CMI= 5,14 / 7.22 mg/mL et une CMB= 7,35 / 10.64 mg/mL. Par contre l'huile essentielle de *Lavandula dentata* était moins active.

Les composés présentaient un bon profil de sécurité contre les lymphocytes après 24 heures d'incubation et la présence de matériaux absorbants à 260 nm dans les filtrats de *K. pneumoniae* traités. Le test de génération des ERO a montré des effets inhibiteurs sur la production des leucocytes polymorphonucléaires ERO par rapport aux cellules témoins. De plus, il y a des altérations dans la paroi cellulaire ainsi que la perte de contenu cytoplasmique visualisé par MET. Les résultats de cette étude suggèrent que nos huiles essentielles peuvent être utilisées comme source d'agents antibactériens naturels avec des applications pharmacologiques potentielles.

Mots clé : *Klebsiella pneumoniae*, PCR,  $\beta$ -lactamase, huile essentielle, activité antibactérienne, cytotoxicité.

## Abstract

Infections caused by multidrug-resistant bacteria have become a major global public health problem, in particular through the acquisition of extended spectrum  $\beta$ -lactamases and the ability to form biofilm. It is therefore urgent to make available new natural molecules which have antibacterial effects and which can act against these multiresistant strains as promising natural sources of alternatives to drugs.

The proposed study is to evaluate the inhibitory effect of three essential oils (*Origanum glandulosum*, *Lavandula dentata*, *Mentha pulegium*) on strains of *Klebsiella pneumoniae* extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing from hospital. Determining their mechanism of action by measuring the release of cellular components absorbing at 260 nm, cytotoxicity in human lymphocytes, generation of reactive oxygen species (ROS) and observing the effects of essential oils on the cellular wall by electron microscopy. The compositions of essential oils of plants were also analyzed by GC-MS.

The incidence of *K. pneumoniae* ESBL was 37.5%. PCR analysis of these revealed the presence of *bla* CTX-M group 1 gene with a high percentage (86.7%), and 46.7% of them were moderate biofilm producers.

The ESBL *K. pneumoniae* strains showed great sensitivity to *Origanum glandulosum* and *Mentha pulegium* EOs. They gave on average, respectively, a zone of inhibition 43.45 / 13.06 mm, a MIC = 5.14 / 7.22 mg / mL and a CMB = 7.35 / 10.64 mg / mL. On the other hand, the essential oil of *Lavandula dentata* is less active.

The compounds exhibited a good safety profile against lymphocytes after 24 hours of incubation and the presence of absorbent material at 260 nm in the treated *K. pneumoniae* filtrates. ROS production in polymorphonuclear leukocytes decreases when treated with *O. glandulosum* and *L. dentata* extracts compared to the control. In particular, the extract of *O. glandulosum* is more active than that of *L. dentate*. In addition, there are alterations in the cell membrane. Thus, the loss of cytoplasmic content visualized by TEM. The results of this study suggest that our essential oils can be used as a source of natural antibacterial agents with potential pharmacological applications.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, PCR,  $\beta$ -lactamase, essential oil, antibacterial activity, cytotoxicity.

## Table des matières

المخلص

**Abstract**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

**Introduction ..... 1**

### Synthèse bibliographique

**Chapitre 1 : Généralités sur *Klebsiella pneumoniae* ..... 5**

1. Historique et définition ..... 5

2. Classification et taxonomie ..... 5

3. Habitat et transmission ..... 5

4. Epidémiologie ..... 6

5. Caractéristiques bactériologique ..... 7

5.1. Caractéristiques cliniques ..... 7

5.2. Aspect des colonies ..... 7

5.3. Diagnostic d'espèce ..... 8

5.4. Diagnostic différentiel ..... 9

6. Pouvoir pathogène ..... 9

7. Marqueurs épidémiologiques ..... 9

8. Facteurs de pathogénicité ..... 10

8.1. La capsule ..... 11

8.2. Les adhésines ..... 12

8.2.1. Pili de type 1 ..... 12

8.2.2. Pili de type 3 ..... 13

8.2.3. CF29K ..... 13

8.2.4. KPF-28 ..... 14

8.3. Lipopolysaccharide ..... 14

8.4. Récupération du fer (sidérophores) ..... 15

8.5. Autres toxines ..... 15

**Chapitre 2 : Sensibilité aux antibiotiques ..... 16**

1. Introduction ..... 16

2. Origine de la résistance ..... 16

2.1. Résistance naturelle ..... 16

2.2. Résistance acquise ..... 16

3. Mécanisme de résistance ..... 17

4. Les  $\beta$ -lactamases ..... 18



5.Méthode de détection de BLSE.....	20
6.Formation de biofilm.....	20
6.1. Définition de biofilm .....	20
6.2. Etapes de la formation du biofilm .....	21
6.2.1. Adhésion initial ou réversible .....	22
6.2.2. Adhésion irréversible (Formation de micro-colonies) .....	22
6.2.3. Maturation et architecture .....	23
6.2.4. Détachement / dispersion du biofilm.....	23
6.3. Biofilm et sensibilité aux antibiotiques .....	23
<b>Chapitre 3 : Les huiles essentielles .....</b>	<b>25</b>
1.Introduction .....	25
2.Définition des huiles essentielles .....	25
3.Utilisation historique des huiles essentielles.....	25
4.Répartition des huiles essentielle .....	26
5.Méthodes d'obtention des huiles essentielles.....	26
5.1. Hydrodistillation simple .....	26
5.2. Distillation sèche .....	27
5.3. Hydrodiffusion.....	27
5.4. Expression à froid.....	27
5.5. Extraction par solvant.....	27
5.6. Extraction par un fluide en phase super critique .....	27
5.7. Extraction assistée par micro-ondes .....	27
6.Mécanismes de l'action antibactérienne des huiles essentielles .....	28
6.1. Action sur la membrane cellulaire.....	28
6.2. Action sur les acides gras membranaires.....	28
6.3. Action sur les protéines .....	28
6.4. Mode d'action contre l'ATP .....	29
7.Cytotoxicité des huiles essentielles .....	29
<b>Chapitre 4 : Les plantes étudiées .....</b>	<b>33</b>
1. <i>Lavandula dentata</i> .....	33
1.1. Définition.....	33
1.2. Utilisation traditionnelle .....	33
2. <i>Origanum glandulosum</i> Desf .....	34
2.1. Définition.....	34
2.2. Utilisation traditionnelle .....	34
3. <i>Mentha pulegium</i> .....	35
3.1. Définition.....	35

3.2. Utilisation traditionnelle .....	35
4. <i>Juniperus phoenicea</i> .....	<b>36</b>
4.1. Définition.....	36
4.2. Utilisation traditionnelle .....	36

### **Partie pratique**

<b>Chapitre 1 : Matériel et méthodes .....</b>	<b>37</b>
<b>1. Les isolats bactériens.....</b>	<b>37</b>
1.1. Isolement et purification des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	37
1.1.1. Tests de dépistage pour la production de BLSE .....	37
1.1.2. Test de confirmation pour la production de BLSE (double disque) .....	38
1.2. Détection des gènes de résistance de BLSE par PCR .....	38
1.2.1. Extraction d'ADN bactérien.....	38
1.2.2. PCR standard :.....	39
1.2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	39
1.3. Test d'adhésion sur des microplaques de titration à 96 puits (Méthode de TCP).....	41
<b>2. Matériel végétal.....</b>	<b>42</b>
2.1. Le choix des plantes .....	42
2.2. Extraction des huiles essentielles .....	42
2.3. Calcul du rendement.....	43
2.4. Analyse chimique des huiles essentielles par GC-MS .....	43
2.5. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	44
2.5.1. Technique en milieu solide : La méthode de Vincent (Aromatogramme).....	44
2.5.2. Détermination de CMI et CMB.....	45
2.6. Mécanisme d'action des huiles essentielles.....	46
2.6.1. Test de la cytotoxicité des huiles essentielles sur les lymphocytes humains .....	46
2.6.1.1. Séparation des lymphocytes humains .....	<b>46</b>
2.6.1.2. Test de la viabilité cellulaire .....	<b>46</b>
2.6.2. Mesure des fuites des acides nucléiques .....	47
2.6.3. Dosage de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	47
2.6.3.1. Collecte de sang et isolement des leucocytes polymorphonucléaires (PMN).....	<b>47</b>
2.6.3.2. Dosage de la dichlorofluorescéine (DCF).....	<b>47</b>
2.6.4. Microscopie Electronique à Transmission de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (MET) :	48
<b>3. Étude statistique .....</b>	<b>49</b>
<b>Chapitre 2: Résultats et discussion .....</b>	<b>50</b>
1. Profil de sensibilité aux antibiotiques des <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	<b>50</b>
1.1. Confirmation de production de BLSE .....	52
2. Fréquence de <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE en fonction de type de prélèvement.....	<b>53</b>

3.Fréquence de <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE en fonction de l'âge .....	54
4.Répartition des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE en fonction du sexe .....	55
5.Répartition des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE en fonction du service .....	55
6.Caractérisation moléculaire des gènes codant pour les $\beta$ -lactamases .....	56
7.Détection de la formation de biofilm par la méthode TCP .....	58
8.Effet des HEs des plantes aromatiques retenues sur les souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE .....	59
8.1. Résultats des extractions.....	59
8.2. Analyse chimique des huiles essentielles .....	60
8.3. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles.....	65
8.3.1. Résultats de la méthode de diffusion sur gélose .....	65
8.3.2. Résultats des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides .....	67
8.4. Résultats du test de la cytotoxicité des huiles essentielles sur les lymphocytes humains.....	70
8.5. Résultat de la mesure des fuites des acides nucléiques .....	72
8.6. Dosage de la production des espèces réactive de l'oxygène (ERO).....	74
8.7. Microscopie Electronique à Transmission de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (MET).....	75
<b>Conclusion.....</b>	<b>81</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>83</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>100</b>
<b>Publicatios et communications.....</b>	<b>107</b>

## Liste des abréviations

ADH : Alcool déshydrogénase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AMC : Acide clavulanique

ATB : Antibiotique

ATM : Aztréonam

ATP : Adénosine-Triphosphate

BHIB : Bouillon Coeur-Cerveille

C3G : Céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération

CAZ : Ceftazidime

CLED : Gélose Cystéine Lactose Electrolytes Déficiant

CLSI : Clinical Laboratory Standards Institut

CMB : concentration minimale bactéricide

CMI : concentrations minimales inhibitrices

CRO : Ceftriaxone

CTX : Céfotaxime

E-BLSE : Entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi

ECBU: examen cytobactériologique des urines

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

FOX: céfoxitine

FQ: Fluoroquinolone

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

He : Hélium

HE : Huiles essentielles

ISB : Infections de la circulation sanguine

KP : *Klebsiella pneumoniae*

Kp-BLSE: *Klebsiella pneumoniae* productrice de  $\beta$ -lactamase à spectre élargie

LCR: liquide céphalo-rachidien

LDC : Lysine décarboxylase

MET : Microscope électronique à transmission

MH: Mueller Hinton

MHB : Bouillon Mueller Hinton

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-di phényltetrazoliumbromide

NIST : Institut national des normes et de la technologie

OD : Densité optique

ODC : Ornithine décarboxylase

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PLP : protéine liant la pénicilline

TCP : Culture de Tissue en Plaque

TDA : Tryptophane-désaminase

TTR : Tetrathionate reductase

UFC : Unité Formant Colonie

UFC : unité formant colonie

UTP : Uridine-Triphosphate

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VP : Voges-Proskauer

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Colonies muqueuses (capsule) de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . .....	7
<b>Figure 2.</b> Présentation des facteurs de pathogénicité de <i>Klebsiella</i> ssp .....	11
<b>Figure 3.</b> Micrographie électronique en coupe mince de <i>Klebsiella pneumoniae</i> colorée au rouge de ruthénium pour montrer la capsule.....	12
<b>Figure 4.</b> Micrographie électronique à transmission de cellules de <i>K. pneumoniae</i> entourées d'épaisses couches de matière capsulaire fibrilleuse .....	14
<b>Figure 5.</b> Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques. ....	17
<b>Figure 6 .</b> Formation de biofilms bactériens de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	21
<b>Figure 7.</b> Formation et structure du biofilm .....	22
<b>Figure 8.</b> Extraction de l'ADN bactérien par la méthode de l'ébullition. ....	38
<b>Figure 9.</b> Photo de l'appareil utilisée pour l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation. ....	43
<b>Figure 10.</b> Profils de sensibilité aux antibiotiques des isolats de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . ....	52
<b>Figure 11.</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> productrice de BLSE .....	53
<b>Figure 12.</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> non productrice de BLSE .....	53
<b>Figure 13.</b> Répartition des souches de <i>K. pneumoniae</i> BLSE en fonction des prélèvements. ....	54
<b>Figure 14.</b> Répartition des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE en fonction de l'âge. ..	55
<b>Figure 15.</b> Répartition des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE en fonction du service. ....	56
<b>Figure 16 .</b> Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR du gène <i>bla</i> CTX-M.....	57
<b>Figure 17 .</b> Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR du gène <i>bla</i> TEM .....	58
<b>Figure 18.</b> Détection de la formation de biofilm par la méthode TCP. ....	59
<b>Figure 19.</b> Effet des huiles essentielles étudiées sur des souches Kp-BLSE.....	66
<b>Figure 20.</b> Effet des huiles essentielles de <i>L.dentata</i> , <i>O. glandulosum</i> et <i>M. pulegium</i> sur la viabilité cellulaire des lymphocytes humains (test MTT) .....	72
<b>Figure 21.</b> Effet des huiles essentielles de <i>L.dentata</i> , <i>O.glandulosum</i> et <i>M.pulegium</i> sur la libération des matériaux absorbant à 260 nm des <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE.....	74
<b>Figure 22.</b> Effet des huiles essentielles sur la production d'ERO dans les neutrophiles polymorphonucléaires (NPM).....	75
<b>Figure 23.</b> Microscopie Electronique à Transmission de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	77

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Caractères biochimiques de <i>K. pneumoniae</i> . .....	8
<b>Tableau 2.</b> Caractères différentielles de <i>K. pneumoniae</i> et <i>E. aerogenes</i> . .....	9
<b>Tableau 3.</b> Mécanismes de résistance aux antibiotiques .....	17
<b>Tableau 4.</b> Méthode de la préparation de la mixture pour la PCR standard .....	39
<b>Tableau 5.</b> Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes de résistance aux $\beta$ -lactamines.....	40
<b>Tableau 6.</b> Rendements en huiles essentielles des plantes étudiées.....	60
<b>Tableau 7.</b> Composition chimique des huiles essentielles des plantes retenues. ....	62
<b>Tableau 8.</b> Diamètres des zones d'inhibitions (mm) des huiles essentielles : <i>Origanum glandulosum</i> , <i>Lavandula dentata</i> et <i>Mentha plulegium</i> sur <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE.....	65
<b>Tableau 9.</b> Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (mg/ml) des huiles essentielles des plantes utilisées.....	67

---

# Introduction



### Introduction

La résistance bactérienne aux antibiotiques (ATB) est en perpétuelle évolution. Depuis plus de 30 ans, et la résistance des entérobactéries aux céphalosporines de 3ème génération (C3G) ne cesse de se renforcer notamment par l'acquisition de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE). Il a été démontré dans des études européennes précédentes que *K. pneumoniae* et *E. coli* étaient les espèces les plus fréquemment responsables de la sécrétion de BLSE (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2012).

Ces enzymes (TEM, SHV, CTX-M et dérivés) confèrent aux entérobactéries la résistance à l'ensemble des  $\beta$ -lactamines à l'exception des céphamycines et des carbapénèmes (El Bouamri et al., 2014 ; Pirzaman et al., 2018). Alors que les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (E-BLSE) étaient observées essentiellement en milieu hospitalier avec des fréquences d'isolement variables d'un hôpital à l'autre et même d'un service à l'autre au sein de la même institution hospitalière, la diffusion de ces germes multirésistants en milieu communautaire est de plus en plus importante. La transmission, principalement plasmidique, des gènes codants pour les BLSE est responsable de leur dissémination rapide et ainsi de l'augmentation de la prévalence des bactéries productrices de BLSE partout dans le monde, Cela laisse augurer un problème majeur de santé publique (Belmonte et al., 2010 ; El Bouamri et al., 2014).

*Klebsiella pneumoniae* est un agent pathogène bactérien opportuniste important causant des infections nosocomiales et communautaire (Markovska et al., 2017). Il fait partie de la microflore naturelle intestinale et couramment connu comme responsable d'infections sévères acquises hospitalière et communautaire (Akturk et al., 2016 et Cescutti et al., 2016 ; Seifi et al., 2016 ; Delatour et al., 2018 ; Huang et al., 2018).

L'apparition des premières souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE était rapportée en Europe en 1982 où une nouvelle résistance à la ceftazidime et à l'aztréonam a permis de retrouver une nouvelle bêta-lactamase à transmission plasmidique, cet enzyme est transmis rapidement et facilement aux autres bacilles à Gram négatif dont *E. coli*, et depuis cette date la découverte de nouvelles enzymes BLSE n'a pas cessé de croître. On compte aujourd'hui un peu plus de 200 enzymes différents (Ben Haj Khalifa et al., 2012). La surveillance active des agents pathogènes producteurs de BLSE dans les populations à haut risque devrait être réalisée à l'aide des techniques antimicrobiennes appropriées car cet agent pathogène est généralement multirésistant, il est surtout impliqué dans les épidémies, particulièrement en réanimation (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2012 ; Panda et al., 2016).

Ajouté à cela le problème de réfraction dû à l'utilisation abusive des antibiotiques qui ne donnent plus de réponse satisfaisante à son utilisateur à cause de l'usages multiples et incontrôlés, ce qui ne rassure pas un traitement efficace des infections (Akturk et al., 2016).

Les inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase doivent être utilisés avec prudence lors du traitement d'une infection grave causée par *K. pneumoniae* productrice de BLSE, car la sensibilité *in vitro* ne permet pas nécessairement de prédire l'efficacité *in vivo* (Panda et al., 2016).

Des enquêtes effectuées dans différents pays au cours des périodes spécifiques ont révélé qu'une fois une  $\beta$ -lactamase de type CTX-M pénètre dans une zone géographique spécifique, elle devient prédominante avec déplacement ou superposition sur les variantes TEM et SHV BLSE (Barrios et al., 2017).

Les principaux facteurs de virulence contribuant à la pathogénèse de *K. pneumoniae* sont les polysaccharides capsulaires, pili de type 1 et de type 3, qui peuvent contribuer à la formation de biofilm (Cescutti et al., 2016 ; Seifi et al., 2016), qui sont des populations bactériennes reliées par des matrices d'exopolysaccharides à la surface (Khodadadian et al., 2018).

La première souche de *K. pneumoniae* productrice de biofilms a été décrite à la fin de l'année 1988 (Seifi et al., 2016). Les bactéries formatrices des biofilms sont souvent observées sur le cathéter urinaire et à la surface des tissus et des biomatériaux sur les sites d'infection persistante dont la formation de biofilms est une cause principale d'échec des implants et limite souvent la durée de vie de nombreux dispositifs médicaux à demeure (Seifi et al., 2016; Khodadadian et al., 2018), donc, la capacité de *K. pneumoniae* à former un biofilm fournit une protection contre les réponses immunitaires de l'hôte ainsi que des antibiotiques de sorte que les biofilms sont une cause majeure de résistance aux substances antimicrobiennes entraînant des coûts de santé élevés (Vuotto et al., 2017).

Pour ces raisons, des connaissances approfondies sur les organismes producteurs de BLSE et de biofilms sont nécessaires pour la mise en œuvre de procédures préventives et l'application d'un contrôle des infections.

Il est urgent donc de mettre à disposition de nouvelles molécules naturelles qui ont des effets antibactériens et qui peuvent agir contre ces souches multirésistantes comme alternatives aux médicaments, et faire de nouvelles formulations avec de nouveaux agents antimicrobiens naturels (Boniface et al., 2010). Les huiles essentielles (HE) et les composés non volatils des plantes aromatiques contiennent différents composés aux nombreuses activités biologiques confirmées par des études *in vitro* et *in vivo* (Tepe et al., 2004 ; De Oliveira et al., 2013). Parmi ces biomolécules, les composés phénoliques qui sont utilisés

dans diverses applications. En particulier confèrent aux huiles essentielles des propriétés antibactériennes, insecticides, acaricides, antifongique, et cytotoxiques (Faleiro et al., 1999 ; Alitonou et al., 2006), antivirales, antiprotozoaires, anthelminthiques, antiseptiques, anti-inflammatoires, antitumorales, antioxydantes, antiallergiques, anticonvulsivantes, antidépressives, contraceptives, antimutagènes, analgésiques et diurétiques (De Oliveira et al., 2013), anticancéreuses, ainsi que la prévention des maladies cardiovasculaires et dégénératives (Bettaieb Rebey et al., 2017). Plusieurs secteurs industriels (cosmétique, pharmaceutique, agroalimentaire) se tournent de nouveau vers l'incorporation de ces molécules d'origine naturelle (Turgis et al., 2009).

La principale raison d'utiliser ces extraits d'herbes est leur efficacité et disponibilité. En Algérie, beaucoup d'herbes en particulier de la famille des *Lamiaceae* sont largement utilisées dans le traitement de nombreuses maladies. Présent principalement à l'état sauvage et sont encore appliqué par la population locale.

Dans le même axe de recherche de molécules bioactives issues des plantes aromatiques et médicinales, nous nous sommes intéressé à l'étude de l'effet inhibiteur des huiles essentielles de quatre plantes : *Origanum glandulosum*; *Lavandula dentata* ; *Mentha pulegium* et *Juniperus phoenicea* sur *Klebsiella pneumoniae* (BLSE) d'origine hospitalière.

Les objectifs de ce travail sont la mise en évidence de prévalence de *K. pneumoniae* productrice de BLSE, de détecter leur profil de résistance aux antibiotiques, de rechercher les gènes *bla* TEM et *bla* CTX-M et d'évaluer le développement de biofilms des isolats cliniques de *K. pneumoniae* l'un des principaux agents pathogènes tant dans le plancton que dans le biofilm, surtout l'évaluation de l'effet inhibiteur des huiles essentielles retenues sur ces souches résistantes aux antibiotiques en utilisant des méthodes de diffusion sur disque d'agar et de microdilution en bouillon pour l'activité antibactérienne, mesurant la libération des composants cellulaires absorbant à 260 nm, et évalué leur cytotoxicité sur les lymphocytes humains, testé la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO), observé la morphologie des membranes cellulaires pour évaluer l'effet des échantillons testés sur la paroi bactérienne en utilisant un microscope électronique à transmission. Les compositions des huiles essentielles des plantes sont également été analysées par GC-MS.

Pour cela le présent travail est divisé en trois parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique sur les aspects cliniques de *Klebsiella pneumoniae* BLSE et sur les huiles essentielles.
- La deuxième partie consiste à la présentation du matériel et des méthodes utilisés dans ce travail.

- Et enfin, la troisième partie, sera consacrée à la présentation des résultats et à leurs discussions.

---

# Synthèse Bibliographique

---

# **Chapitre 1 : Généralités sur** *Klebsiella pneumoniae*

### Synthèse bibliographique

#### Chapitre 1 : Généralités sur *Klebsiella pneumoniae*

##### 1. Historique et définition

Le genre bactérien *Klebsiella* a été créé en l'honneur du microbiologiste allemand Edwin Klebs en 1885, qui a également décrit l'espèce *Klebsiella pneumoniae* en 1887 (Martinez et al., 2004).

Les bactéries du genre *Klebsiella* sont des bâtonnets à Gram négatif pathogène opportuniste, aérobie-anaérobie facultatif, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* toujours immobiles et responsable de nombreuses infections nosocomiales (Pirzaman et al., 2018), possédant généralement une capsule et fermentant de nombreux glucides (Freney et al., 2007). Ce microbe est considéré comme un biocatalyseur exceptionnel qui transforme le glycérol en une variété de produits à valeur ajoutée. (Avril et al., 1992 ; Doorduyn et al., 2016 ; Benaïcha et al., 2017 ; Kumar et al., 2018).

##### 2. Classification et taxonomie

À l'origine, l'importance médicale du genre *Klebsiella* a conduit à sa subdivision en trois espèces correspondant aux maladies qu'elles provoquaient : *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis*. Au fur et à mesure que la taxonomie devenait de plus en plus raffinée en raison du développement de nouvelles méthodes telles que la taxonomie numérique, la classification des espèces de ce genre était continuellement révisée. Avec le temps, trois classifications principales ont émergé, celles de Carson, Bascomb et Ørskov (Podschun et Ullmann, 1998).

La classification des différentes espèces de *Klebsiella* est discutée. Néanmoins 6 espèces sont usuellement reconnues :

- Quatre espèces ont un pouvoir pathogène pour l'homme : *K. pneumoniae* (espèce-type), *K. oxytoca*, *K. ozaenae* et *K. rhinoscleromatis*.
- Deux espèces sont trouvées dans l'environnement et sont rarement pathogènes, ce sont *K. terrigena* et *K. planticola* (Avril et al., 1992).

##### 3. Habitat et transmission

Les *K. pneumoniae* sont fréquemment isolées des eaux, du sol et des végétaux. Elles sont présentes dans la flore fécale de l'homme et sont souvent commensales de la peau, des muqueuses et des voies respiratoires. Chez l'homme, *K. pneumoniae* est présente sous forme de saprophyte dans le nasopharynx et dans le tractus intestinal (Podschun et Ullmann, 1998).

Les malades s'infectent soit avec leurs propres souches, soit avec des souches responsables de petites épidémies hospitalières. Elles sont alors manuportées de malade à malade. (Avril et *al.*, 1992).

Bien que *Klebsiella* spp. fait partie de la flore entérique chez les individus sains ; s'ils sont présents, ce n'est qu'en petit nombre ( $<10^2$  UFC / g de matières fécales). Les bébés prématurés et en particulier ceux des unités des soins intensifs néonataux, patients hospitalisés même lorsqu'ils sont modérément ou gravement malades, ceux qui souffrent de maladies chroniques et les personnes âgées sont relativement facilement colonisés par *Klebsiella* spp. Cette colonisation peut également s'étendre à l'oropharynx. Dans une étude, il a été constaté que la demi-vie de portage de *K. pneumoniae* résistante aux aminosides, mais pas à *K. oxytoca* chez les patients âgés, était de 100 jours et certains sujets ont excrété des bactéries pendant plus de 200 jours, *Klebsiella* spp. peuvent faire partie de la flore normale d'une variété d'autres animaux et sont largement distribués dans l'environnement inanimé (Gillespie et Hawkey, 2006).

#### 4. Épidémiologie

D'un point de vue épidémiologique, il est souvent nécessaire de déterminer la clonalité des souches. Ceci est particulièrement important dans les flambées nosocomiales endémiques et épidémiques d'infections à *Klebsiella* pour améliorer la gestion de ces flambées (Podschun et Ullman, 1998).

Les infections nosocomiales à *Klebsiella* sont principalement causées par *Klebsiella pneumoniae*, l'espèce médicalement la plus importante du genre. Dans une bien moindre mesure, *K. oxytoca* a été isolé à partir d'échantillons cliniques humains (Podschun et Ullman, 1998). Il a été estimé que *Klebsiella* spp. causent 8% de toutes les infections bactériennes nosocomiales aux États-Unis et en Europe. Dans les unités de soins intensifs néonataux, *Klebsiella* spp. apparaissent dans les trois ou quatre principaux agents pathogènes à la fois dans les pays développés et en développement (Gillespie et Hawkey, 2006).

Aucune grande variation géographique de fréquence n'a été notée, les plaçant parmi les huit agents pathogènes infectieux les plus importants dans les hôpitaux et les données collectées au Royaume-Uni et en Allemagne sont remarquablement similaires à celles rapportées par le Centres de Contrôle et de la Prévention des maladies (Podschun et Ullman, 1998).

Les flambées explosives de septicémie potentiellement mortelles dues à *Klebsiella* spp. se produisent avec une régularité monotone. Dans ce contexte, la septicémie fait généralement suite à une colonisation intestinale par *Klebsiella* spp. qui, semble-t-il, peut résulter de



l'utilisation d'ampicilline plutôt que de céphalosporines. Les flambées d'infection sont une caractéristique chez les patients fragilisés, souvent porteurs d'organismes multirésistants *Klebsiella* spp. a été signalés comme étant responsables de 14% des cas de bactériémie associés aux dispositifs intravasculaires (Avril et *al.*, 1992).

La pneumonie due à *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* est une occurrence rare et survient généralement comme une infection acquise dans la communauté chez les hommes âgés affaiblis (Gillespie et Hawkey, 2006).

### 5. Caractéristiques bactériologique

#### 5.1. Caractéristiques cliniques

Les infections nosocomiales à *Klebsiella* peuvent survenir presque sur tous les sites, et les caractéristiques cliniques ne diffèrent pas de celles causées par l'une des entérobactéries. Bien que *K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* est historiquement associée à la pneumonie, une étude mondiale sur la pneumonie bactériémique a révélé que le bacille de Friedlander représentait moins de 1% des cas. En outre, un syndrome distinctif de bactériémie à *K. pneumoniae* en association avec des abcès hépatiques communautaires, une méningite ou une endophtalmie, a été trouvé, le premier se trouvant presque exclusivement à Taiwan. Les facteurs de risque de bactériémie à *K. pneumoniae* acquise dans la communauté comprennent la maladie alcoolique du foie et le diabète (Gillespie et Hawkey, 2006).

#### 5.2. Aspect des colonies

Sur milieux usuels, les *Klebsiella* donnent après une incubation de 24 heures à 37°C des colonies généralement lactose (+), rondes, de 3 à 4 mm de diamètre, bombées, muqueuses et ayant une tendance à la confluence. Cet aspect muqueux, en relation avec la présence habituelle d'une capsule plus ou moins volumineuse, est parfois observée avec d'autres *Enterobacteriaceae* notamment certaines souches d'*E. coli* (Figure 1) (Avril et *al.*, 1992).



**Figure 1. Colonies muqueuses (capsule) de *Klebsiella pneumoniae* (Denis et *al.*, 2007).**

### 5.3. Diagnostic d'espèce

Les caractères biochimiques utiles au diagnostic de *K. pneumoniae* sont présentés dans le tableau 1 : (Minor et al., 1989 ; Avril et al., 1992 ; Podschun et Ullmann 1998 ; Denis et al., 2007).

**Tableau 1: Caractères biochimiques de *K. pneumoniae*.**

<i>K. pneumoniae</i>	Caractères biochimiques
ONGP	+
Lysine décarboxylase (LDC)	+
Malonate	+
Uréase	+
Oxydase	-
Catalase	+
Ornithine décarboxylase (ODC)	-
ADH	-
tryptophane-désaminase (TDA)	-
Lipase	-
H <sub>2</sub> S	-
Production d'indole	-
Dégradation du pectate	-
β-Galactosidase	+
Croissance à 10° C	-
Croissance à 41° C	+
Utilisation Gentsiate	-
Rouge de méthyle	+
Voges-Proskauer	+
Gaz de glucose	+
Croissance de KCN	-
Croissance dans citrate de Simmon	+
Acide de dulcitol	+
Acide de lactose	+
Lysine decarboxylase	+
Assimilation d'histamine	-
Assimilation du mélézitose	-
gaz de :	
D-melezitose	-
L-Sorbose	v
Utilisation de :	
m-hydroxybenzoate	-
hydroxy L-proline	v
Malonate	+
Tetrathionate reductase TTR	-
Gélatinase	-
saccharose	+
Arabinose	+
Rhamnose	+
Melibiose	+
Adonitol	+
Inositol	+
Sorbitol	+
Galacturonate	+
DNase	-

V : Réaction variable + : Présence - : Absence

### 5.4. Diagnostic différentiel

Au sein du genre *Klebsiella*, les espèces individuelles peuvent être différenciées sur la base des caractéristiques énumérées (Podschun et Ullmann 1998).

La majorité des souches de *K. pneumoniae* est uréase (+) en milieu «urée-indole». Les souches uréase (-) de *K. pneumoniae* sont parfois confondues avec *Enterobacter aerogenes* qui se distingue par la mobilité et l'ODC (Tableau 2) (Avril et al., 1992).

**Tableau 2. Caractères différentielles de *K. pneumoniae* et *E. aerogenes*.**

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>
<b>Mobilité</b>	-	+
<b>ODC</b>	-	+
<b>Carbénicilline</b>	R	S
<b>Uréase</b>	(+)	

R : résistant ; S : sensible

### 6. Pouvoir pathogène

Les bactéries appartenant au genre *Klebsiella* sont des agents pathogènes importants acquis à l'hôpital, susceptibles de provoquer une morbidité et une mortalité sévères chez les patients hospitalisés (Martinez et al. 2004).

Les *K. pneumoniae* provoquent fréquemment des infections nosocomiales et communautaires, sont isolées principalement de broncho-pneumopathies aiguës ou subaiguës, mais aussi d'infections urinaires, hépato-biliaires, bactériémie, méningite, les infections des plaies ou des tissus mous et les abcès hépatiques ou de pus divers. En raison du terrain débilisé sur lequel elles se développent, les septicémies à *Klebsiella* ont un pronostic très sévère (Avril et al., 1992 ; Benaïcha et al., 2017 ; Pirzaman et al., 2018).

Des études publiées suggèrent que KPN est responsable des proportions plus élevées des infections nosocomiales (Musicha et al., 2019). *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* sont deux des causes les plus courantes d'infections de la circulation sanguine dans le monde (Sawatwong et al., 2019). Curieusement, les BLSE sont le plus souvent détectées chez *K. pneumoniae*. Les infections de la circulation sanguine à *K. pneumoniae* peuvent provenir des poumons (pneumonie acquise en communauté et sous ventilation assistée), des voies urinaires, des pathologies intra-abdominales et des infections liées à la ligne veineuse centrale (Paterson et al., 2003).

### 7. Marqueurs épidémiologiques

Leur recherche est faite par des laboratoires spécialisés pour écarter ou affirmer l'existence d'infections nosocomiales épidémiques en milieu hospitalier.

**-Le typage capsulaire :** C'est la méthode la plus discriminante. Il existe 77 antigènes capsulaires K et la détermination de ces antigènes se fait essentiellement par la réaction de gonflement de la capsule ou réaction de Neufeld, en présence de l'immum-sérum correspondant (Avril et *al.*, 1992).

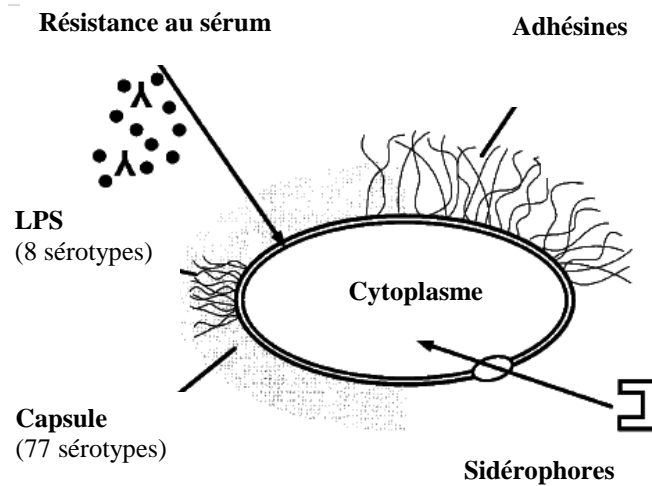
**-La biotypie :** Elle est moins performante, huit biotypes peuvent être distingués par l'étude de 3 caractères : sorbose, dulcitol et d-tartrate (Avril et *al.*, 1992).

### **8. Facteurs de pathogénicité**

Les termes «facteur de pathogénicité» et «facteur de virulence» sont utilisés comme synonymes par certains auteurs, tandis que d'autres mettent l'accent sur une distinction nette entre eux. Le terme «pathogénicité» définit la capacité d'une bactérie à provoquer une maladie tandis que la «virulence» est la mesure ou le degré de pathogénicité de toute espèce bactérienne (Gillespie et Hawkey, 2006).

La recherche des mécanismes de pathogénicité des infections à *Klebsiella* a permis d'identifier un certain nombre de facteurs bactériens qui contribuent à la pathogenèse de ces bactéries. Des modèles *in vitro* et *in vivo* ont été établis pour étudier l'interaction des cellules bactériennes et de l'hôte (Gillespie et Hawkey, 2006).

La recherche actuelle sur la pathogénicité de *Klebsiella* se concentre sur le groupe de cinq facteurs présentés dans la figure 2.



**Figure 2. Présentation des facteurs de pathogénicité de *Klebsiella* spp. (Podschun et Ullmann 1998).**

### 8.1. La capsule

Une caractéristique clé de *Klebsiella* spp. est la production des colonies mucoïdes lorsqu'elles sont cultivées sur des milieux solides. Ceci est amélioré lorsque le milieu contient un excès de glucides. Le caractère mucoïde est dû à l'épaisse capsule de polysaccharide (Figure 3) qui absorbe une grande quantité d'eau. Le matériau capsulaire peut également diffuser librement dans le milieu environnant sous forme de polysaccharide extracapsulaire impliqué dans la colonisation, l'adhésion, le maintien et la prolifération de cette espèce sur son hôte (Juan et al., 1986, Gillespie et Hawkey, 2006). Il existe au moins 82 sérotypes et sous-types capsulaires (K) différents, avec une antigénicité similaire, mais différents squelettes polysaccharidiques ont été décrits. *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* est majoritairement de sérotype 3 (Gillespie et Hawkey, 2006). Les capsules sont essentielles à la virulence de *Klebsiella*. Le matériel capsulaire forme des faisceaux épais de structures fibrilleuses recouvrant la surface bactérienne en couches massives, cela protège la bactérie de la phagocytose par les granulocytes polymorphonucléaires, d'une part, et empêche la destruction des bactéries par des facteurs sériques bactéricides, d'autre part (Struve et Krogfelt, 2003).



**Figure 3 : Micrographie électronique en coupe mince de *Klebsiella pneumoniae* colorée au rouge de ruthénium pour montrer la capsule. Bar = 1 µm. (Gillespie et Hawkey, 2006).**

## **8.2. Les adhésines**

*Klebsiella* spp. possèdent à la fois des adhésines fimbriales et non fimbriales. Les fimbriae peuvent être de type 1 ou 3 (hémagglutination résistante au mannose des érythrocytes bronzés uniquement), et occasionnellement P. fimbriae.

Une adhésine non fimbriale inhibitrice du mannose a été trouvée sur *Klebsiella* spp., qui facilite l'adhésion de *Klebsiella* aux cellules épithéliales. La situation est inversée pour certains sérotypes capsulaires de *K. pneumoniae* qui ont des unités de disaccharide de mannose dans leur polysaccharide. Ici, le disaccharide agit comme le récepteur (plutôt que l'adhésine) pour une lectine spécifique du mannose / N-acétylglucosamine à la surface des macrophages (Gillespie et Hawkey, 2006)

Les pili (également connus sous le nom de fimbriae) sont des projections filamenteuses non flagellaires sur la surface bactérienne. Ces structures mesurent jusqu'à 10 µm de long et ont un diamètre de 1 à 11 nm ; ils sont constitués de sous-unités protéiques globulaires polymériques (piline) d'une masse moléculaire de 15 à 26 kDa (Podschn et Ullmann 1998).

### **8.2.1. Pili de type 1**

Sont les mieux étudiés des adhésines bactériennes. La protéine d'adhésion dans ce type de pilus est située sur la tige fimbriale et est capable de se lier aux trisaccharides contenant du mannose des glycoprotéines hôtes. Les structures de sucre consistent vraisemblablement en de courtes chaînes d'oligomannose liées via des liaisons N-glycosidiques aux glycoprotéines (Podschn et Ullmann, 1998).

Cependant, dans l'évaluation du rôle pathogène des pili de type 1, le phénomène de «variation de phase» doit être pris en compte. Comme mentionné ci-dessus, ce type d'adhésine médie la colonisation bactérienne des surfaces muqueuses de l'hôte via une liaison plutôt non spécifique. Dans les microorganismes pathogènes, la colonisation de la membrane muqueuse est suivie d'une invasion de tissu sous-jacent, avec tous les événements ultérieurs de la pathogénèse infectieuse. Une fois dans le tissu hôte, les pili de type 1 ne sont plus utiles pour les bactéries, car ils déclenchent une activité leucocytaire indépendante de l'opsonine connue sous le nom de lectinophagocytose. Les forces de répulsion séparant la bactérie et le leucocyte sont affaiblies par le caractère hydrophile de ces pili, permettant ainsi aux adhésines de se lier à des récepteurs spécifiques contenant du mannose à la surface des leucocytes.

Les fimbriae de type 1 de *K. pneumoniae* sont étroitement apparentées aux fimbriae de type 1 exprimées par d'autres espèces membres de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ils confèrent une hémagglutination sensible au mannose (MSHA) et un phénotype d'adhésion spécifique au mannose aux cellules trachéales de hamster cilié et aux cellules épithéliales de la vessie de rat *in vitro* (Podschun et Ullmann, 1998 ; Martino et al., 2003 ; Murphy et al., 2013).

### 8.2.2. Pili de type 3

Les fimbriae de type 3 sont caractérisés par leur capacité à agglutiner les érythrocytes traités avec de l'acide tannique *in vitro*, et ce phénotype a été appelé réaction d'hémagglutination de *Klebsiella* comme la résistante au mannose (RM/ K-HA), implique que ce type fimbrial est synthétisé uniquement par *Klebsiella*, des études ultérieures ont démontré que les pili de type 3 se produisent dans de nombreux genres entériques (Murphy et al., 2013).

De plus, les pili de type 3 ne sont apparemment pas identiques dans tous les genres d'entérobactéries, car les études sérologiques ont montré une diversité antigénique considérable. Décrit à l'origine comme les organites d'adhésion de *Klebsiella* habitant les racines des plantes, ces pili se sont par la suite révélés capables de se lier à divers cellules humaines. Les souches de *K. pneumoniae* exprimant les pili de type 3 adhèrent aux cellules endothéliales, aux épithéliums des voies respiratoires et aux cellules uroépithéliales (Podschun et Ullmann, 1998).

### 8.2.3. CF29K

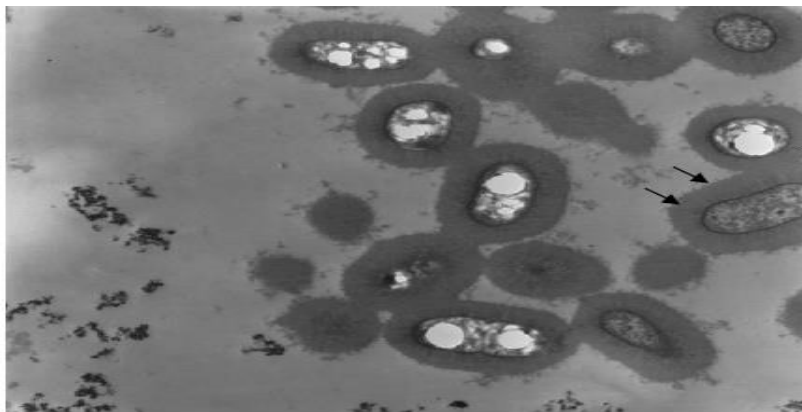
Les CF29K ont un rôle de la protéine de surface bactérienne majeure en tant que facteur adhésif. Il a été démontré que l'adhésine CF29K codée par le plasmide R de *K. pneumoniae* médie l'adhérence aux lignées cellulaires intestinales humaines Intestin-407 et CaCo-2. Ce

type d'adhésine semble être identique à la protéine adhésive CS31-A des souches d'*E. Coli* diarrhéiques humaines et appartient à la famille des adhésines K88 (Darfeuille-Michaud et al., 1992 ; Podschun et Ullmann, 1998).

Elle s'est avérée médiatrice de l'adhésion diffuse des souches de *K. pneumoniae* produisant la  $\beta$ -lactamase à large spectre CAZ-1 (Di Martino et al., 1995).

### 8.2.4. KPF-28

C'est un facteur de colonisation putatif de l'intestin humain. Fait intéressant, ce type fimbrial a été trouvé dans la majorité des souches de *K. pneumoniae* produisant des BLSE de type CAZ-5 / SHV4 (Podschun et Ullmann 1998).



**Figure 4. Micrographie électronique à transmission de cellules de *K. pneumoniae* entourées d'épaisse couches de matière capsulaire fibrilleuse (Podschun et Ullmann 1998).**

### 8.3. Lipopolysaccharide

Le répertoire des antigènes O sur le LPS de *K. pneumoniae* est limité à huit types (O : 1, 3–5, 7–9 et 12), O: 1 étant le plus courant. En raison de leurs propriétés endotoxiques, les LPS sont considérés comme un facteur important dans la pathologie de la septicémie (Gillespie et Hawkey, 2006).

Des études récentes ont toutefois démontré une exposition de surface aux antigènes O dans des souches exprimant des sérotypes capsulaires particuliers. Le petit nombre de types O de *Klebsiella* est un grand avantage en ce qui concerne leur applicabilité en tant que vaccins (Struve et Krogfelt, 2003).

Cependant, un grand inconvénient de l'immunisation active avec des vaccins contenant du LPS est des réactions toxiques indésirables, auxquelles il faut s'attendre en raison de la teneur en endotoxines. Ainsi, chaque vaccin *Klebsiella* composé d'antigènes O doit être rendu sûr par une désintoxication suffisante du LPS (Podschun et Ullmann 1998).



### 8.4. Récupération du fer (sidérophores)

L'apport de fer libre disponible aux bactéries dans le milieu hôte est extrêmement faible, car cet élément est lié intracellulairement à des protéines telles que l'hémoglobine, la ferritine, l'hémosidérine et la myoglobine et extracellulairement à des protéines de liaison au fer de haute affinité telles que la lactoferrine et la transferrine. Dans des conditions carencées en fer, par exemple, dans le milieu hôte, les entérobactéries synthétisent une variété de sidérophores, qui appartiennent à deux groupes chimiques différents, l'un constitué des sidérophores de type phénolate et l'autre constitué des sidérophores de type hydroxamate (Gillespie et Hawkey, 2006).

Dans le genre *Klebsiella*, la production d'entérobactine et d'aérobactine a été démontrée. Cependant, l'entérobactine (hydroxamate sidérophorique) est synthétisée par presque toutes les souches, des isolats de *Klebsiella* positifs pour l'aérobactine, indépendamment de l'espèce ou de la source d'isolement, ont été rarement observés. Les isolats de *Klebsiella* positifs à l'entérobactine (phénolate sidérophore) dans des modèles animaux n'étaient pas plus virulents que les souches négatives à l'entérobactine. En revanche, une association entre la synthèse de l'aérobactine et la virulence des souches de *Klebsiella* a été démontrée sans équivoque (Podschn et Ullmann, 1998 ; Gillespie et Hawkey, 2006).

### 8.5. Autres toxines

Comme pour de nombreuses entérobactéries, et comme cela a été particulièrement bien étudié chez *E. coli*, d'autres facteurs ont également été mis en évidence chez *Klebsiella* spp. Bien que la production de cytotoxines, d'entérotoxines et d'hémolysine a été sporadiquement décrite, ces caractéristiques jouent probablement un rôle plutôt mineur chez *Klebsiella* (Podschn et Ullmann, 1998).

Des souches de *K. pneumoniae* portant des gènes pour, ou exprimant des entérotoxines thermolabiles et thermostables ont été décrites. Leur importance clinique n'est pas claire. Une bactériocine formant un canal (microcine E492) de *K.pneumoniae* est capable d'induire l'apoptose dans les cellules humaines (Gillespie et Hawkey, 2006).

---

## **Chapitre 2 : Sensibilité aux antibiotiques**

### Chapitre 2 : Sensibilité aux antibiotiques

#### 1. Introduction

Les *Klebsiella* ont une résistance naturelle à l'ampicilline et la carbénicilline (Gillespie et Hawkey, 2006), et elles sont normalement sensibles aux céphalosporines. Des enzymes récemment caractérisées, CTX-1 (TEM 3, *K. pneumoniae*) et SHV-2, rendent les souches résistantes aux uréidopénicillines, à toutes les céphalosporines (excepté les céphamycines) et aux monobactames. Ces nouvelles bêta-lactamases plasmidiques sont fortement inhibées par l'acide clavulanique (Avril et *al.*, 1992).

*Klebsiella* spp. semblent avoir une propension particulière à acquérir, à constituer et à maintenir des plasmides de résistance aux antibiotiques, surtout s'ils sont acquis nosocomialement. L'acquisition d'une résistance codée par un plasmide a entraîné des flambées d'infection nosocomiale. Dans les années 1970 et 1980, des épidémies d'infection dues à *K. pneumoniae* résistante à la gentamicine et à la tobramycine (mais pas à l'amikacine) ont été signalées en nombre croissant (Gillespie et Hawkey, 2006).

#### 2. Origine de la résistance

La résistance bactérienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles, naturelles et acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique alors que la seconde est développée en fonction des conditions métaboliques (Bouyahya et *al.*, 2017).

##### 2.1. Résistance naturelle

C'est une résistance intrinsèque, commune à une population, due essentiellement à la présence de gènes spécifiques. Elle se caractérise par des modifications structurales, dans le cas de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, et métaboliques, dans le cas du bacille de la tuberculose insensible à un grand nombre d'antibiotiques en s'opposant à l'action des antibiotiques par le biais de son métabolisme original. Les gènes de résistance sont exprimés soit d'une manière constitutive ou bien induite en répondant à un signal enzymatique établi par la mise en œuvre d'un processus d'échappement vis-à-vis de l'antibiotique (Carle, 2009 ; Bouyahya et *al.*, 2017).

##### 2.2. Résistance acquise

Elle est due à des modifications dans le profil d'expression génique via des mutations ponctuelles ou acquises. Grâce à ce processus, les bactéries partagent entre elles des informations génétiques, ce qui leur confère un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent (Bouyahya et *al.*, 2017).

3. Mécanisme de résistance :

Il existe quatre mécanismes principaux présentés dans le tableau 3 et illustrés par la figure 5, par lesquels les micro-organismes développent de la résistance.

Tableau 3. Mécanismes de résistance aux antibiotiques (Carle, 2009).

Mécanismes de résistance	Conséquences
<b>Inhibition enzymatique</b>	Production d'une enzyme qui inactive ou détruit l'antibiotique; Mécanisme de résistance le plus répandu.
<b>Réduction de la perméabilité cellulaire</b>	Changements de perméabilité de la paroi ou de la membrane bactérienne empêchant le médicament d'atteindre sa cible
<b>Altération des sites de liaison ciblés par l'antibiotique</b>	Baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action.
<b>Pompes à efflux</b>	Antibiotique éjecté de la cellule par transport actif et site d'action devenant inaccessible

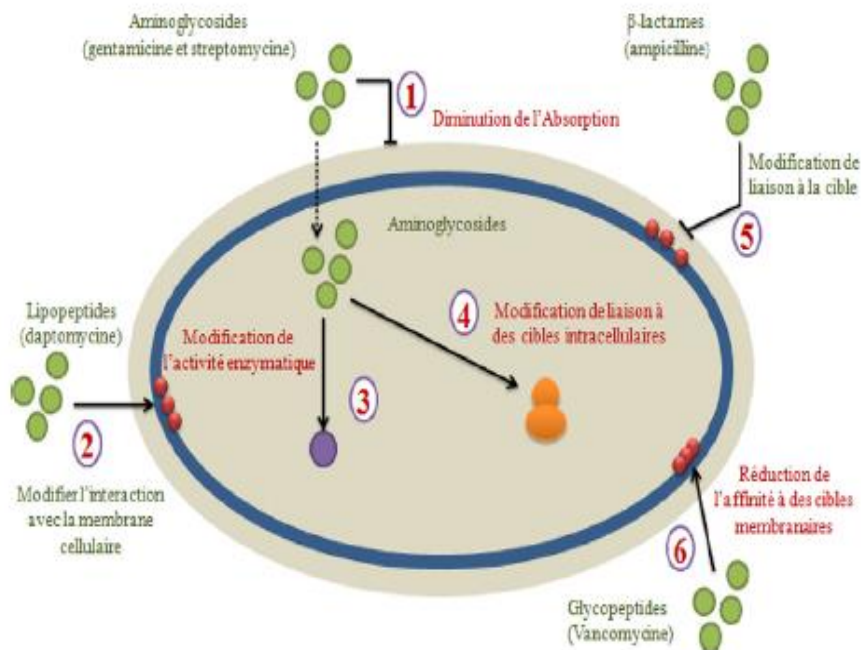


Figure 5. Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouyahya et al., 2017).

Les bactéries possèdent différents modes de résistance aux antibiotiques. 1) Diminution de l'adsorption des aminoglycosides. 2) Modification de l'interaction des lipopeptides avec la

membrane cellulaire. 3) Modification de l'activité enzymatique des aminoglycosides. 4) Modification de liaison des  $\beta$ -lactamines à des cibles intracellulaires. 5) Modification de liaison à des cibles membranaires. 6) Réduction de l'affinité des glycopeptides à des cibles membranaires.

### 4. Les $\beta$ -lactamases

Les  $\beta$ -lactamases sont la principale défense des bactéries à Gram négatif contre les antibiotiques  $\beta$ -lactame (Jacoby et Munoz-Price, 2005).

Les céphalosporines à spectre étendu ou de troisième génération, par exemple la céfotaxime, la ceftazidime et la ceftriaxone ont été introduits dans l'utilisation clinique au début des années 1980 pour fournir un traitement efficace en grande partie pour les infections nosocomiales causées par des *Enterobacteriaceae* multi-résistantes et particulièrement résistantes à la gentamycine, en particulier *Klebsiella* spp. *Enterobacter* spp. et *Pseudomonas aeruginosa* (Ahmed et al., 2013).

Les  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE) sont des enzymes acquises par les entérobactéries qui hydrolysent l'ensemble des pénicillines et les céphalosporines (leur permettant d'hydrolyser le noyau  $\beta$ -lactame). La transmission, surtout plasmidique, de ce mécanisme de résistance est responsable de sa dissémination (Doit et al., 2010 ; Fouquet et al., 2012). Les premières BLSE dérivait des pénicillinases de type TEM ou SHV-1 par mutation ponctuelle. Plus récemment, de nouvelles BLSE non dérivées des pénicillinases ont émergé : les céfotaximases de type CTX-M et les ceftazidimases de type PER, GES et VEB. La distribution des espèces bactériennes au sein de ces souches a également évolué : *K. pneumoniae* qui représentait environ 60 % de ces souches en 1995, n'en représente plus que 20 %. C'est chez *Escherichia coli* que la progression est la plus nette, passant de moins de 10 % en 1995 à 55 % en 2008 (Doit et al., 2010).

*K. pneumoniae* est naturellement résistante à l'ampicilline et à la carbénicilline par la production de  $\beta$ -lactamase SHV-1 codée sur le chromosome. Au début des années 80, le premier BLSE capable d'hydrolyser les oxyimino-céphalosporines a été identifié. Depuis lors, la résistance aux céphalosporines de troisième génération est principalement due à la production de BLSE. Ces enzymes sont principalement à médiation plasmidique et confèrent une résistance aux pénicillines, aux céphalosporines de première, deuxième et troisième générations et à l'aztréonam en hydrolysant ces antibiotiques. Ils sont inhibés par les inhibiteurs de la  $\beta$ -lactamase et restent inactifs contre la céfoxitine et les carbapénèmes. Leurs plasmides codent fréquemment pour d'autres mécanismes de résistance impliquant la résistance aux fluoroquinolones, au cotrimoxazole et aux aminosides. Pendant plus de deux

décennies, les variantes génétiques des SHV-1 et TEM-2 classiques étaient principalement des BLSE (Hennequin et Robin, 2015). Depuis 1983, lorsque *K. pneumoniae* productrice de BLSE a été isolée pour la première fois en Allemagne, de nombreuses épidémies de maladies infectieuses causées par des souches productrices de BLSE ont été signalées dans le monde. Il est donc important d'identifier, de suivre et de prévenir les infections causées par les souches productrices de BLSE (Deng et al., 2017). Au début des années 1990, une nouvelle famille BLSE, appelée groupe CTX-M, a vu le jour. Les enzymes CTX-M sont maintenant le type de BLSE le plus dominant, et la CTX-M-15 étant la principale enzyme actuellement observée chez *K. pneumoniae* (Hennequin et Robin, 2015).

Depuis que les  $\beta$ -lactamines sont utilisées pour un usage clinique, Les  $\beta$ -lactamases ont co-évolué avec elles. Les premiers événements étaient une augmentation de leur prévalence dans les organismes dans lesquels l'enzyme était connue mais peu fréquente (comme *Staphylococcus aureus*) et se sont propagés à des agents pathogènes qui manquaient auparavant de  $\beta$ -lactamase (à savoir, *Haemophilus influenzae* et *Neisseria gonorrhoeae*) (Heinz et al., 2018).

Les entérobactéries porteuses de bêta-lactamases (BLSE) résistantes aux carbapénèmes et à spectre étendu ont été récemment soulignées comme une priorité essentielle pour le développement de nouveaux traitements par l'OMS. *K. pneumoniae* fait partie des *Enterobacteriaceae* et a connu une augmentation spectaculaire de sa pertinence clinique en raison de sa capacité étrange à accumuler des plasmides de multi-résistance aux antibiotiques (Hennequin et Robin, 2015 ; Heinz et al., 2018).

Les BLSE sont généralement à médiation plasmidique. Étant donné que ces plasmides sont facilement transmis entre différents membres des entérobactéries, l'accumulation des gènes de résistance aboutit à des souches qui contiennent des plasmides multirésistants. Pour cette raison, les isolats producteurs de BLSE sont résistants à une variété de classes d'antibiotiques. De plus, l'émergence de ces souches de *Klebsiella* multi-résistantes s'accompagne malheureusement d'une stabilité relativement élevée des plasmides codant pour les BLSE. Même des années après l'arrêt de la ceftazidime et d'autres céphalosporines à spectre étendu, une colonisation continue des patients par des souches de *Klebsiella* productrices de BLSE a été observée. Les facteurs de risque d'acquisition de ces souches semblent être la durée du séjour à l'hôpital et la performance des procédures invasives (Podschun et Ullmann, 1998 ; Heinz et al., 2018).

### 5. Méthode de détection de BLSE

Au cours des dernières années, la question s'est posée de savoir s'il était nécessaire de déterminer si chaque souche isolée de *Klebsiella* était productrice de BLSE. La réponse dépend de la situation épidémiologique d'un pays ou d'un hôpital (Podschn et Ullmann, 1998).

La détection des BLSE est principalement basée sur des tests phénotypiques, tels que la mise en évidence d'une image de synergie (Ahmed et *al.*, 2013) et de test à double disque, dont un disque d'amoxicilline/acide clavulanique et un disque d'une céphalosporine à spectre étendu, placés rapprochés sur une surface de gélose inoculée avec l'organisme d'essai, le renforcement de la zone d'inhibition autour du disque de céphalosporine vers le disque contenant l'amoxicilline/ clavulanate indique la présence d'une souche productrice de BLSE. Un produit disponible dans le commerce est la bandelette de test E de dépistage BLSE. Cette méthode est basée sur l'évaluation de la différence entre l'activité antimicrobienne de la ceftazidime seule et celle de la ceftazidime plus acide clavulanique (Podschn et Ullmann, 1998). Ces tests ne sont pas toujours évident et prend généralement du temps car il nécessite un repiquage ou l'utilisation de plaques contenant du cloxacilline pour inhiber les céphalosporinases naturelles et à médiation plasmidique. Au cours des 20 dernières années, des stratégies alternatives visant à remplacer ou compléter les méthodes phénotypiques traditionnelles ont été proposées. La PCR standard et le séquençage génique restent la technique la plus largement utilisée (Ahmed et *al.*, 2013).

### 6. Formation de biofilm

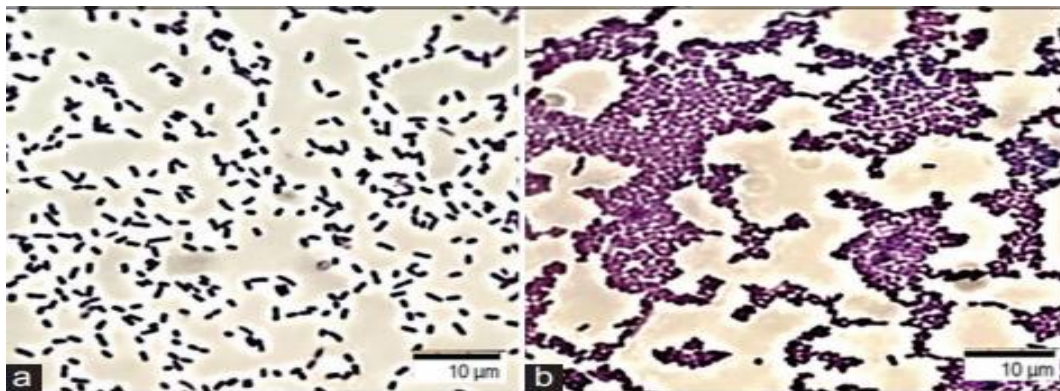
#### 6.1. Définition de biofilm

Les bactéries sont planctoniques ou existent sous forme d'agrégats de cellules, ce dernier étant appelé biofilm (Surgers et *al.*, 2018). La première souche de *K. pneumoniae* productrice de biofilm a été décrite à la fin de l'année 1988, ces bactéries peuvent produire une épaisse couche de matrice extracellulaire en tant que facteur de virulence, empêchant ainsi les effets des agents antimicrobiens (Seifi et *al.*, 2016). Sont actuellement définis comme des communautés bactériennes structurées enfermées dans une matrice d'exopolysaccharide autoproduite et adhérentes à des surfaces abiotiques ou biologiques (Martino et *al.*, 2003 ; Surgers et *al.*, 2018). La production de biofilm était largement présente dans la plupart des isolats de *K. pneumoniae* productrice de BLSE, dont les facteurs de virulence les plus importants contribuant à la pathogenèse de *K. pneumoniae* au regard de la gravité de ses



infections sont les polysaccharides capsulaires, pili de type 1 et de type 3, qui peuvent contribuer à la formation de biofilm (Vuotto et *al.*, 2017).

Les bactéries avec biofilms présentent certains avantages par rapport aux bactéries planctoniques: coopération métabolique interspécifique accrue, détection de quorum, protection de pathogène des réponses immunitaires de l'hôte ainsi que des antibiotiques améliorant sa persistance sur les tissus épithéliaux et les surfaces des dispositifs médicaux, nécessitant des concentrations plus élevées de l'agent antimicrobien et capacité accrue de conjugaison bactérienne (Vuotto et *al.*, 2017 ; Surgers et *al.*, 2018). Pour ces raisons, des connaissances détaillées sur la formation du biofilm et les bactéries productrices de biofilm sont nécessaires pour la gestion et le traitement des infections associées. En outre, la détermination de la diversité génétique pour l'identification des espèces dominantes peut être utile pour prévenir la propagation de l'infection dans les hôpitaux. Connaître le génotype dominant des isolats peut être utile pour l'identification de la source d'une infection, et pour mettre en œuvre des procédures préventives et appliquer le contrôle des infections (Figure 6) (Martino et *al.*, 2003 ; Seifi et *al.*, 2016).

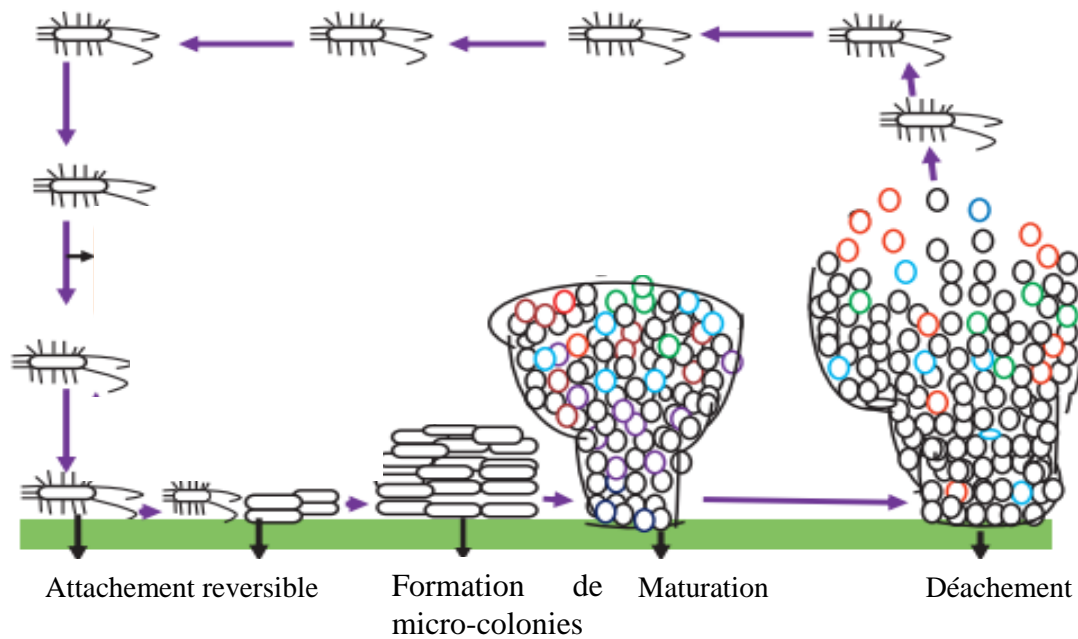


**Figure 6 . Formation de biofilms bactériens de *Klebsiella pneumoniae* : (a) Adhésion réversible des formes végétatives des bactéries ayant une forme et une taille typiques (0,3-0,6 × 0,6-1,0); (b) la formation d'une monocouche de bactéries - une couche diffuse de cellules bactériennes; coloration avec un violet de gentiane; microscopie optique, 100 × (Lenchenko et *al.*, 2020).**

### 6.2. Etapes de la formation du biofilm

Les études génétiques nous disent que la formation du biofilm se produit en plusieurs étapes (Figure 8). Il nécessite un type spécial de signalisation, connu sous le nom de détection de quorum, entre les cellules du micro-organisme, la formation du biofilm est complexe mais selon Jamal et *al.* (2018), elle se produit en quelques étapes courantes :





**Figure 7. Formation et structure du biofilm (Abebe, 2020).**

### 6.2.1. Adhésion initial ou réversible

Les cellules microbiennes se fixent à la surface par leurs appendices comme les pilli, les flagelles et les fimbriae qui renforcent l'interaction entre les bactéries et la surface de fixation et donnent de la force à l'interaction entre les bactéries et la surface d'attachement, ils peuvent également se fixer par d'autres forces physiques comme les forces de van der Waal, les interactions électrostatiques et interactions hydrophobes (Jamal et *al.*, 2018 ; Abebe, 2020).

Les bactéries à ce stade s'engagent dans le mode de vie du biofilm ou quittent la surface et reviennent au mode de vie planctonique (Abebe, 2020 ; Hinsa et *al.*, 2003).

### 6.2.2. Adhésion irréversible (Formation de micro-colonies)

Après qu'un attachement de micro-organismes à une surface biotique ou abiotique se produit et que cet attachement devient stable, les cellules commencent une adhésion irréversible et s'accumulent sous forme d'amas cellulaires multicouches (Agladze et *al.*, 2005 ; Jamal et *al.*, 2018). Les colonies bactériennes dans un biofilm sont généralement constituées de nombreux types de micro-communautés qui se coordonnent les unes avec les autres sous de multiples aspects. Cette coordination joue un rôle crucial dans l'échange de substrat, la distribution des produits métaboliques importants et l'excrétion des produits finaux métaboliques (Jamal et *al.*, 2018 ; Abebe 2020).

### 6.2.3. Maturation et architecture

Si les conditions sont propices à une croissance et une différenciation suffisantes, un biofilm peut se développer en structures de biofilm matures tridimensionnelles bien agencées dans l'espace (Abebe 2020).

À ce stade, les cellules microbiennes communiquent entre elles via des signaux auto-inducteurs. La communication de cellule à cellule est un processus important au cours duquel la densité cellulaire microbienne requise est atteinte. Cela conduit à la sécrétion de molécules de signalisation, appelées auto-inducteurs. Ces auto-inducteurs facilitent la détection du quorum (Caiazza et O'Toole, 2004 ; Jamal et *al.*, 2018). Certains produits géniques sont exprimés, qui sont considérés comme importants pour la formation d'EPS qui est le matériau principal de la structure tridimensionnelle du biofilm, des vides interstitiels sont alors produits dans la matrice. Ces canaux sont remplis d'eau et agissent comme un système circulatoire, utilisé pour distribuer des nutriments importants et éliminer les déchets des communautés de micro-colonies dans le biofilm et les éléments essentiels des substances peuvent être diffusées et circuler dans chaque microenvironnement. La détection du quorum active la maturation et le désassemblage du biofilm de manière coordonnée. Généralement, la signalisation de cellule à cellule joue un rôle énorme dans l'attachement et le détachement des cellules du biofilm (Jamal et *al.*, 2018 ; Abebe 2020 ; Hinsa et *al.*, 2003).

### 6.2.4. Détachement / dispersion du biofilm

Au cours du processus de détachement, les communautés microbiennes du biofilm produisent différentes enzymes saccharolytiques qui aident à libérer la surface des microbes dans une nouvelle zone pour la colonisation. Dans cette phase, les cellules microbiennes régulent à la hausse l'expression des protéines liées à la formation de flagelles, pour permettre aux bactéries de se déplacer vers un nouveau site, le détachement des cellules microbiennes et le transfert vers un nouveau site facilitent la propagation des infections (Caiazza et O'Toole, 2004 ; Jamal et *al.*, 2018).

## 6.3. Biofilm et sensibilité aux antibiotiques

La proximité des bactéries dans les biofilms crée un environnement favorable à l'échange de matériel génétique, notamment par transfert conjugatif. Couplée à la survie accrue des bactéries dans le biofilm, sa formation pourrait être un facteur important expliquant la distribution généralisée de plasmides multi-résistants, tels que CTX-M (Surgers et *al.*, 2018).

Le développement de mécanismes de résistance aux antibiotiques comme les  $\beta$ -lactamases à spectre étendu peut être favorisée par transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques à l'aide des éléments mobiles comme les transposons et les plasmides, qui contribuent à la survie de *K. pneumoniae* dans les environnements nosocomiaux. (Oliveira-Junior et Franco, 2020). Les biofilms sont associés à une résistance accrue aux agents antimicrobiens, contribuant à la persistance des infections microbiennes, l'inhibition de l'efficacité du traitement d'antibiotique, la protection contre les mécanismes de défense de l'hôte et facilite la communication bactérienne menant à l'expression de déterminants de la virulence favorisant l'échec du traitement (Brooun *et al.*, 2000; Cubero *et al.*, 2019).

*Klebsiella* spp. génère des fimbriae, qui facilitent la liaison bactérienne aux surfaces muqueuses de l'hôte avec des capsules et peuvent présenter une activité anti-phagocytaire. Les pili de types 1 et de type 3 de *Klebsiella* spp. jouent un rôle dans la colonisation des infections des voies urinaires (Martino *et al.*, 2003).

---

# **Chapitre 3 : Les huiles essentielles**

### Chapitre 3 : Les huiles essentielles

#### 1. Introduction

La résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif a été détectée dans plusieurs genres, dont *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* et *Pseudomonas*. Il y a un besoin urgent donc, de nouveaux agents antimicrobiens qui seront utilisés contre les échecs de traitement observés dans les infections liées à la multirésistance (Lai and Roy, 2004).

En médecine traditionnelle, les plantes sont utilisées depuis l'antiquité pour la prévention et / ou la protection contre les maladies infectieuses. Ces dernières années, l'utilisation des plantes médicinales comme thérapie alternative pour les maladies infectieuses, s'est intensifiée en raison de leur forte teneur en agents antimicrobiens tels que les polyphénols, c'est-à-dire les flavonoïdes, les tanins et les alcaloïdes (Nabavi et al., 2015).

Les huiles essentielles des plantes ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (Amarti et al., 2010).

#### 2. Définition des huiles essentielles

Pour la 8<sup>ème</sup> édition de pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (essences ou huiles volatiles) étaient : des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. Pour extraire ces principes volatils, il existe divers procédés. Deux seulement sont utilisables pour la préparation des essences officinales : celui par hydrodistillation dans la vapeur d'eau de plantes à essence ou de certains de leurs organes, et celui par expression (Bruneton, 1993 ; Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012). L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition (Bruneton, 1993).

#### 3. Utilisation historique des huiles essentielles

Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine. On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, soulager ou guérir des maladies (El amri et al., 2014). La distillation comme méthode de production des HEs a été utilisée pour la première fois en Orient (Egypte, Inde et Perse), il y a plus de 2000 ans et a été améliorée au IX<sup>e</sup> siècle par les Arabes. Le premier récit écrit authentique de la distillation d'huile essentielle est attribué à Villanova (vers 1235–1311). Au 13<sup>ème</sup> siècle, les HEs étaient fabriqués par les pharmacies et leurs effets pharmacologiques étaient décrits dans les

pharmacopées, mais leur utilisation ne semble pas avoir été répandue en Europe jusqu'au XVI<sup>e</sup> siècle (Bouyahya, 2017). Au XVII<sup>e</sup> siècle, la préparation des HEs était bien connue et les pharmacies stockaient généralement 15 à 20 huiles différentes. La première mesure expérimentale des propriétés bactéricides des vapeurs d'HE aurait été réalisée par De la Croix en 1881. Cependant, au cours des XIX<sup>e</sup> et XX<sup>e</sup> siècles, l'utilisation des HEs en médecine est devenue progressivement secondaire par rapport à leur utilisation, pour la saveur et l'arôme. Les applications des huiles essentielles à des fins différentes sont variées et comprennent non seulement leur utilisation en cuisine pour améliorer le goût et les avantages pour la santé des aliments, mais également leur application en parfumerie, en pharmacie, en cosmétologie, en agroalimentaire et dans l'industrie chimique (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012 ; Ríos, 2016). De plus, ils sont devenus une source prometteuse et un moyen efficace pour l'éradication des germes résistants aux antibiotiques puisqu'elles possèdent un réservoir de molécules anti-infectieuses importantes ayant des propriétés contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Burt, 2004 ; Khadir et *al.*, 2013).

#### 4. Répartition des huiles essentielle

Les huiles essentielles sont des liquides aromatiques et volatils obtenus à partir des matières végétales, y compris les fleurs, les racines, l'écorce, les feuilles, les graines, la peau, les fruits, le bois et les plantes entières. Tout au long de l'histoire, ces huiles ont été considérées avec un grand intérêt, bien que beaucoup de leurs utilisations aient été perdues avec le temps, il est généralement admis que les êtres humains les extraient de plantes aromatiques depuis l'aube de l'humanité (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012 ; Ríos, 2016).

#### 5. Méthodes d'obtention des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont obtenues selon plusieurs techniques qui utilisent la chaleur (entraînement par la vapeur ou hydrodistillation) et la distillation sèche ou à la température ambiante et ne concerne que les agrumes (fruits du genre *Citrus*) à l'état frais (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

##### 5.1. Hydrodistillation simple

C'est le procédé le plus ancien. La plante aromatique (entière ou broyée) placée dans un alambic est émergée dans l'eau ; il est préférable d'utiliser une eau sans chlore contenant peu ou pas de calcium (eau distillée). Portée à ébullition, l'eau à l'état vapeur en passant à travers le matériel végétal entraîne l'huile essentielle ; elle est refroidie et condensée dans un serpent. L'huile essentielle est séparée de l'eau par une différence de densité (Bruneton, 1993).

### 5.2. Distillation sèche

Cette distillation est réalisée, de préférence, sur le bois ou les écorces. Elle n'utilise pas l'eau ou la vapeur d'eau, contrairement à l'entraînement par la vapeur ou l'hydrodistillation. La distillation sèche conduit à un distillat ayant souvent l'apparence d'un goudron (liquide visqueux noirâtre). Ce mode de distillation est très peu utilisé. (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

### 5.3. Hydrodiffusion

La vapeur d'eau est pulsée de haut vers le bas à travers la plante aromatique, pour une huile essentielle destinée à un usage médicale, il convient :

- d'opérer à basse pression, ce qui donne une huile essentielle de meilleure qualité ;
- de réaliser une distillation complète (donc plus longue) de façon à avoir tous les constituants aromatique contenant dans l'huile essentielle (Bruneton, 1993).

### 5.4. Expression à froid

Cette méthode n'est utilisée que pour les épicarpes des *Citrus* (*Citrus limonum*, *Citrus sinensis*...) Après avoir dilacéré les zestes, l'essence libérée et récupérée (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

### 5.5. Extraction par solvant

Cette technique utilisera des solvants comme l'hexane, le toluène, les dérivés chlorés. Le solvant est ensuite éliminé par distillation, et elle ne doit pas être employé s'il on veut préparer une huile essentielle à usage thérapeutique car il pourrait rester des traces de solvant. Elle est parfois utilisée dans l'industrie des parfums (Bruneton, 1993).

### 5.6. Extraction par un fluide en phase super critique

Cette méthode a été développée au départ dans l'industrie agroalimentaire (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012), elle est généralement réalisée à basse température, ce qui en fait une méthode très appropriée pour les composés thermosensibles, et il s'agit d'une méthode plus respectueuse de l'environnement car elle utilise des fluides non toxiques tels que le CO<sub>2</sub> ou, dans certains cas, utilise beaucoup moins de quantités de solvant organique (quelques millilitres seulement) (Stratakos et Koidis, 2016).

### 5.7. Extraction assistée par micro-ondes

Une technologie supplémentaire qui a attiré une attention particulière est l'extraction assistée par micro-ondes (EAM) en raison de son mécanisme de chauffage unique (basé sur le

frottement), de son coût raisonnable et de ses bonnes performances dans des conditions atmosphériques (Stratakos et Koidis, 2016).

### **6. Mécanismes de l'action antibactérienne des huiles essentielles**

Les effets antimicrobiens des HEs ont été examinés contre un large éventail de micro-organismes au fil des années, mais leur mécanisme d'action n'est pas encore complètement compris. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les actions des composés chimiques contenus dans les HEs (Calo et *al.*, 2015).

#### **6.1. Action sur la membrane cellulaire**

Le caractère lipophile des molécules constituant les HEs les rend capables de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane cellulaire et de s'accumuler entre les phospholipides, entraînant des changements de conformation et éventuellement un manque de régulation de la membrane cellulaire, ce qui perturbe ainsi le transport membranaire des substances nutritives, perturbant la force proton-motrice, le flux d'électrons, le transport actif et la coagulation du contenu cellulaire (Burt, 2004 ; Bouyahya et *al.*, 2017).

#### **6.2. Action sur les acides gras membranaires**

Une caractéristique importante des HEs et de leurs composants est leur hydrophobicité, qui leur permet de se répartir dans les lipides de la membrane cellulaire bactérienne et des mitochondries, perturbant les structures et les rendant plus perméables (Burt, 2004). En effet, la présence des HEs dans la cellule bactérienne, même à des concentrations inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI), diminue le taux des acides gras insaturés qui sont généralement responsables de la fluidité membranaire. Et peut également affecter des enzymes responsables de la biosynthèse de ces derniers. Une perte importante du contenu cellulaire ou la sortie de molécules et d'ions critiques entraînera la mort cellulaire (Burt, 2004).

#### **6.3. Action sur les protéines**

Les différents composants des HEs peuvent agir sur les protéines présentes dans les bactéries et peuvent affecter la division cellulaire. Ils semblent également agir aussi sur les protéines cellulaires intégrées dans la membrane cytoplasmique. Deux mécanismes possibles ont été suggérés par lesquels les hydrocarbures cycliques pourraient agir sur ceux-ci. Les molécules d'hydrocarbures lipophiles pourraient s'accumuler dans la bicouche lipidique et fausser l'interaction lipide-protéine; en variante, une interaction directe des composés



lipophiles avec des parties hydrophobes de la protéine est possible (Burt, 2004 ; Bouyahya et *al.*, 2017).

### 6.4. Mode d'action contre l'ATP

La production d'ATP dans les cellules procaryotes se produit à la fois dans la paroi cellulaire au niveau de la membrane, par la chaîne respiratoire, et dans le cytosol par la glycolyse. La modification dans la membrane cellulaire affecte légèrement le processus du couplage énergétique conduisant à une perturbation entre l'équilibre du pool d'ATP intra et extracellulaire (Bouyahya et *al.*, 2017).

## 7. Cytotoxicité des huiles essentielles

Afin d'assurer qu'une réduction de l'infectiosité observée est due à un effet direct de l'huile essentielle sur l'agent pathogène et non à un effet toxique sur les cellules hôtes, il est nécessaire de déterminer la cytotoxicité des huiles essentielles (Schnitzler et *al.*, 2011). Les composés des huiles essentielles peuvent montrer une activité cytotoxique, antitumorale et antibactérienne, tandis qu'une combinaison de l'activité antioxydante avec des effets cytotoxiques et antitumoraux s'est avérée essentielle pour expliquer l'intérêt des huiles essentielles pour les applications pharmaceutiques et nutraceutiques. En raison de leur composition chimique, les huiles essentielles d'autres espèces ont montré des activités cytotoxiques dans diverses lignées cellulaires, une procédure couramment utilisée pour évaluer la cytotoxicité dans les cultures cellulaires est le test MTT [3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium bromure] est basée sur la réduction du colorant tétrazolium par l'enzyme mitochondriale de cellules viables (Shakeri et *al.*, 2014 ; Souto et *al.*, 2020). Cela, est défini comme un indice de sélectivité et est une mesure de l'applicabilité thérapeutique potentielle de l'huile (Schnitzler et *al.*, 2011).

---

## **Chapitre 4 : Les plantes étudiées**

### Chapitre 4 : Les plantes étudiées

#### 1. *Lavandula dentata*

##### 1.1. Définition

La lavande dentée (*Lavandula dentata*), est un arbrisseau aromatique et médicinale spontanée appartenant au genre *Lavandula*, la famille des *Lamiacées*, affilié à la sous-famille des Népétoïdées (Bachiri et al., 2016 ; Bettaieb Rebey et al., 2017 ; Ouedrhiri et al., 2017), elle est composé d'environ 39 espèces, de nombreux hybrides, et près de 400 cultivars enregistrés. Elle est originaire des canaris et des régions montagneuses bordant la méditerranée, a climat tempéré et doux, dont les sols est pauvre et rocheux. Elle est considérablement cultivée pour ses fleurs aromatiques dans différentes régions de France Italie, Angleterre, et même à l'extrême nord de la Norvège (Bachiri et al., 2016 ; Bettaieb Rebey et al., 2017). Elle pousse à l'état indigène dans certaines îles de l'Atlantique et depuis le bassin méditerranéen jusqu'au nord de l'Afrique tropicale, au Moyen Orient, à l'Arabie et à l'Inde. Certaines se plaisent dans les collines incultes, d'autres préfèrent les bordures de forêts de chênes verts ou les lisiers de bois d'oliviers. Leurs stations naturelles s'étendent du bord de mer jusqu'à des altitudes de 2500 m, mais toutes aiment les terrains secs, légers, sablonneux et pierreux, bien drainés (Bachiri et al., 2016 ; Bettaieb Rebey et al., 2017).

##### 1.2. Utilisation traditionnelle

L'importance médicinale de *Lavandula dentata* est bien documentée ; en fait, Les pharmacopées comprennent les médicaments préparés à partir d'eux, principalement sous forme d'infusions (Algieri et al., 2016). Elle est utilisée dans l'industrie de la lessive et de la savonnerie, ainsi qu'en parfumerie, est également employée en herboristerie, en aromathérapie et est considérée comme une plante médicinale pour l'action de son huile. Des études pharmacologiques récentes se rapportant à *Lavandula dentata* ont révélé un large spectre d'activités biologiques principalement les propriétés sédatives, antibactériennes, antifongiques, antidépressives, antioxydantes, anti-carcinogènes, insecticides, désinfectants des plaies et comme expectorant (Bachiri et al., 2016 ; Bettaieb Rebey et al., 2017).

Elle est aussi, fréquemment utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement des troubles digestifs, tels que les affections inflammatoires hépatiques et intestinales, mais aussi pour d'autres troubles inflammatoires tels que l'arthrite (Algieri et al., 2016).

### 2. *Origanum glandulosum* Desf

#### 2.1. Définition

*Origanum glandulosum* Desf est une plante spontanée endémique d'Algérie, de Tunisie et du Maroc, appartenant au genre *Origanum* et à la famille des *Lamiaceae* qui comprend environ 38 espèces répandues dans les régions méditerranéennes, euro-sibériennes et irano-sibériennes qui ont été étudiées de manière approfondie pour leur importance potentielle, et des utilisations dans les aliments aromatisants et la médecine traditionnelle en raison de leurs caractéristiques pharmacologiques (Belhattab et al., 2005; Ali et al., 2020).

Dans la littérature, il existe de nombreux rapports concernant la composition chimique et les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de diverses espèces d'origan, et leur application dans diverses préparations commerciales, comme antimicrobiens et antioxydants (Kačániová et al., 2012). Plusieurs études ont rapporté la composition chimique des HES d'*Origanum glandulosum* algériens et tunisiens et ont montré que le thymol, le carvacrol, le  $\alpha$ -terpinène et le p-cymène étaient les principaux composants qui ont une importance biologique particulière (Mechergui et al., 2015 ; Nabti et al., 2020).

#### 2.2. Utilisation traditionnelle

L'*Origanum glandulosum* a été continuellement étudié pour leur composition en huiles essentielles qui sont importantes sur le plan médical en tant que sources naturelles potentielles d'agent antimicrobien et antioxydant, antifongique, antithrombine, antimutagène, angiogénique, antiparasétique et antihyperglycémique, insecticide et anti-cancérigène (Bendahou et al., 2008 ; Harfi et al., 2019).

Il est principalement utilisé comme plante médicinale contre la coqueluche, la toux, la fièvre et la bronchite (Bendahou et al., 2008 ; Nabti et al., 2020), utilisé aussi en médecine traditionnelle pour soigner plusieurs maladies telles que les rhumatismes, et également couramment utilisé sous forme de poudre à pulvériser sur la peau dans les salles de bain traditionnelles (Bains turcs) (Belhattab et al., 2005). Aussi largement utilisé comme herbe culinaire, pour aromatiser les produits alimentaires et les boissons alcoolisées (Bendahou et al., 2008), est connu pour ses effets antispasmodiques, l'inhibition de l'acétylcholine estérase, l'inhibition de la lipide peroxydase, son effet de piégeage des radicaux et son activité dépressive cardiaque (Mechergui et al., 2015).

### 3. *Mentha pulegium*

#### 3.1. Définition

*Mentha pulegium*, communément appelé pennyroyal, ou pennyrile, est une herbe culinaire traditionnelle, un remède populaire et un abortif, vivace, aromatique et herbacée, appartenant à la famille des *Lamiaceae* qui peut atteindre jusqu'à un demi-mètre de hauteur (Tutar et al., 2016 ; Hadi et al., 2017 ; Aitboulahsen et al., 2018 ; Gülçin et al., 2019), elle est originaire d'Europe, d'Afrique du Nord, d'Asie mineure et du Proche-Orient (Mahboubi et Haghi., 2008 ; Pirmohammadi et al., 2016), qui comprend 20 espèces réparties dans le monde entier (Mahboubi et Haghi. ; 2008), au Maroc et en Algérie, elle est connue sous le nom arabe "Fliou" (Zekri et al., 2013 ; Brahmi et al., 2016). Elle est traditionnellement utilisée pour le traitement de nombreuses maladies (Tutar et al., 2016). Les huiles essentielles du genre *Mentha* sont généralement riches en pulegone, pipériténone, pipéritone et isomenthone et sont utilisées en aromathérapie (Pirmohammadi et al., 2016 ; Hadi et al., 2017).

#### 3.2. Utilisation traditionnelle

Les Grecs de l'Antiquité aromatisaient souvent leur vin avec du pennyroyal, bien qu'il fût couramment utilisé pour la cuisine au Moyen Âge, il est progressivement tombé en désuétude comme herbe culinaire et est rarement utilisé comme tel aujourd'hui. Les feuilles de la plante servaient à parfumer le pudding (Zekri et al. 2013 ; Hadi et al., 2017). Dans la médecine traditionnelle, elle a été utilisée sous forme d'infusion, de tisane ou de poudre pour le traitement de certaines maladies telles que la bronchite, la coqueluche, le rhume, les maux de gorge et les troubles digestifs (Aitboulahsen et al., 2018 ; Gülçin et al., 2019). Les parties aériennes fleuries de *M. pulegium* étaient traditionnellement utilisées pour leurs propriétés antimicrobiennes dans le traitement de certaines maladies dégénératives telles que le diabète, le cancer, l'artériosclérose, l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires, du rhume, de la sinusite, du choléra, des intoxications alimentaires, de la bronchite et de la tuberculose, aussi comme antifatulent, carminatif, expectorant, diurétique, antitussif (Mahboubi et Haghi., 2008 ; Gülçin et al., 2019).

L'huile essentielle de *M. pulegium* avait un effet inhibiteur ou germicide selon le type d'organismes et a révélé un effet antimicrobien significatif contre les bactéries à Gram positif (Mahboubi et Haghi. ; 2008), cette plante et ses préparations ont été utilisées traditionnellement pour leur effet anti-hépatique, antibactérien, acaricide, antioxydant, anticorrosion anti-acier, relaxant, antispasmodique, diaphorétique, sédatif, stimulant, diurétique, antitussif, tonique, cholagogue, expectorant, antiseptique (Zekri et al. 2013 ; Hadi et al., 2017) et un effet abortif sur le myomètre de rat (Mahboubi et Haghi., 2008).

### 4. *Juniperus phoenicea*

#### 4.1. Définition

*Juniperus phoenicea* (Genévrier de phénicie, "Araar") est une plante appartenant à la famille des *Cupressaceae*, d'origine Américaine, Asiatique, Africaine et Européenne. C'est un arbre branchu pouvant atteindre 8 mètres de hauteur, possédant un tronc court qui peut atteindre 2 mètres de circonférence (Akrouf, 2004). Le genre *Juniperus* comprend un grand nombre d'espèces (environ 75) avec des variétés rigides aux aiguilles piquantes et des variétés souples aux feuillages en écailles. Cette espèce est monoïque, la floraison a lieu pendant l'hiver et la fructification à la fin de l'été de l'année suivante. A maturité, les fruits sont brunsrouges et luisants. Elle devient de plus en plus rare sous l'effet de son exploitation abusive (son bois est très recherché comme combustible et fournit un charbon très apprécié) (Akrouf, 2004 ; Mansouri et al., 2011 ; Adams et al., 2013).

L'aire de répartition du genévrier de phénicie s'intercale entre les formations steppiques de basse altitude et les formations forestières et préforestières à chêne vert. Cette position confère au *J. phoenicea* un rôle écologique considérable du fait qu'il se comporte comme un élément de forte résistance à l'érosion éolienne et à la pression anthropique (Mansouri et al., 2011).

#### 4.2. Utilisation traditionnelle

L'espèce *J. phoenicea* L. est considérée comme une plante médicinale importante largement utilisée en médecine traditionnelle. Les feuilles sont utilisées sous forme de décoction pour soigner le diabète, diarrhée et rhumatisme alors que les fruits séchés et réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès (Akrouf, 2004 ; Amalich et al., 2015). Ou sous forme de poudre contre les maladies bronchopulmonaires ou comme diurétique. Le goudron de cette espèce est utilisé de la même manière que celui de Cèdre de Barbarie, c'est un substitut; cette espèce végétale est considérée comme emménagogue, elle est également utilisée contre les infections intestinale chez les enfants, et la poudre de fruits secs peut guérir les ulcères cutanés et les abcès, et un mélange de feuilles et de fruits est utilisé comme agent hypoglycémiant oral (Amalich et al., 2015).

*J. phoenicea* L. mérite d'être appréciée à travers ses huiles essentielles qui contiennent une diversité de substances; ils leur donnent une grande variété de rôles et de propriétés biologiques. Dans la littérature, certains travaux ont été réalisés sur les activités biologiques de *J. phoenicea*, et ils ont montré que cette espèce est antibactérienne, antifongique et antioxydante (Bouzouita et al., 2008 ; Amalich et al., 2015).

---

# Partie pratique

---

# Chapitre 1 : Matériel et Méthodes



### Partie pratique

#### Chapitre I : Matériel et méthodes

##### 1. Les isolats bactériens

Cette partie a été réalisée au laboratoire de microbiologie à l'Hôpital Militaire Régional Universitaire à Oran, en Algérie, pendant 5 mois (du 29 octobre 2017 au 29 mars 2018) sur 630 échantillons: urine (333), pus (173), hémoculture (98), liquide céphalo-rachidien (12), cathéter (8), abcès péritonéal (4), plaie chirurgicale (2), dans différents services : pédiatrie, infectieux, chirurgie générale, oncologie, pneumologie, unité des soins intensifs, hématologie, urologie, rééducation, néphrologie, chirurgie infantile et psychiatrie, de l'hôpital et des patients externes. Pour chaque patient, une fiche des données sociodémographiques a été réalisée contenant : l'âge, le sexe, le type d'échantillon, le service et la date d'échantillonnage.

##### 1.1. Isolement et purification des souches de *Klebsiella pneumoniae*

Les échantillons ont été cultivées sur gélose au sang et gélose MacConkey (Fluka), à l'exception des échantillons d'urine qui ont été étalés sur gélose Cystéine Lactose Electrolytes Déficiant (CLED), puis incubés pendant 24 h à 37 °C, identifiés par des méthodes de microbiologiques conventionnelles (morphologie des colonies, coloration de Gram) et purifiée par repiquages successifs sur gélose MacConkey (Fluka).

L'identification précise des souches de *Klebsiella pneumoniae*, l'antibiogramme, les concentrations minimales inhibitrices et la détection des phénotypes de résistance ont été réalisés par méthode automatisée sur VITEK 2 (Biomérieux) en utilisant des Catres GN et AST-N233. La production de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi (BLSE), détectée par l'automate, a été confirmée par un test de synergie et technique de double disque sur gélose. Les critères de lecture et d'interprétation selon les recommandations du CLSI 2014.

##### 1.1.1. Tests de dépistage pour la production de BLSE

Le test de synergie a été réalisé dans les mêmes conditions de l'antibiogramme après détection des phénotypes de résistance par VITEK 2 (Biomérieux), en mettant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) à 30 mm centre à centre des disques de ceftazidime (CAZ), de céfotaxime (CTX), de ceftriaxone (CRO) et d'aztréonam (ATM). La production d'enzymes se traduit par l'apparition d'une image de synergie ou de bouchon de

champagne. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 a été utilisée comme témoin (Philippon, 2013).

### 1.1.2. Test de confirmation pour la production de BLSE (double disque)

Ce test se fait en déposant un disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC) et un disque de céphalosporine de troisième génération (CTX) à une distance de 30 mm, le test est positif lorsque le diamètre d'inhibition au tour de disque de C<sub>3</sub>G appliqué après diffusion du disque de l'AMC est > 5 mm par rapport au diamètre d'inhibition au tour du disque de C<sub>3</sub>G (Abrar *et al.*, 2017).

## 1.2. Détection des gènes de résistance de BLSE par PCR

La PCR a été effectuée dans le laboratoire de Département de Santé Publique à Naples, Italie, pour la détection des gènes *bla* CTX-M, *bla* TEM avec des amorces spécifiques à partir de l'ADN total (tableau 5).

### 1.2.1. Extraction d'ADN bactérien

L'ADN bactérien a été extrait par la méthode de l'ébullition selon Dashti *et al.* (2009). Pour cela, les isolats ont été cultivés sur gélose nutritive pendant 18 à 24 heures à 37 ° C. Une colonie de chaque souche a été inoculée dans 100 µl d'eau distillée stérile, et bouillies à 95° C pendant 5 minutes, puis centrifugées pendant cinq minutes à 1000 tr / min. Cinq microlitres du surnageant ont été utilisés pour la PCR (Figure 8).



**Figure 8.**Extraction de l'ADN bactérien par la méthode de l'ébullition.

### 1.2.2. PCR standard :

La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Applied Biosystems 2720 California, USA) et les conditions d'amplification étaient: la dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes suivi de 30 cycles à 94°C pendant 25 secondes, un annelage à 52° pendant 40 secondes, un allongement à 72° pendant 50 secondes et un allongement final à 72° pendant 6 minutes.

### 1.2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de PCR (6µL) ont été soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% (une migration à 120 Volts), visualisés dans un transilluminateur UV après coloration avec du bromure d'éthidium (0,5 L/ mL) dans un tampon 0,5 x TBE, et photographiés. Un marqueur de poids moléculaire (100 pb) a été utilisé pour déterminer les tailles des bandes présentées est déposé en même temps que les échantillons. Les conditions de préparation du mixte sont indiqués dans le tableau 4 et les amorces utilisées sont décrites dans le tableau 5 (Woodford et *al.*, 2005 ; Alibi et *al.*, 2015)

**Tableau 4. Méthode de la préparation de la mixture pour la PCR standard**

Réactifs	Concentrations finale	Volume finale	Volume finale pour une souche
H <sub>2</sub> O cl		181.8 µL	10.1 µL
Tampon	1.5 mM	45 µL	2.5 µL
dNTP	0.2mM	36 µL	2 µL
Amorce F	0.4µM	90 µL	5 µL
Amorce R	0.4µM	72 µL	4 µL
Taq polymerase		7.2 µL	0.4 µL
ADN bactérien			1µL
Volume final		432 µL	25 µL

**Tableau 5. Les amorces utilisées pour l'amplification des gènes de résistance aux β-lactamines (Alibi et *al.*, 2015 ; Woodford et *al.*, 2005 ; Lytsy et *al.*, 2008).**

Gene	Sequence	Sequences (5'--3')	Size of the fragments(pb)
CTX-M group 1	CTX-M + Forward	5'-AAA AAT CAC TGC GCC AGTTC	415 bp
	CTX-M - Reverse	5'-AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	
CTX-M group 2	CTX-M + F	5'-CGACGCTAC CCCTGC TAT T	552 bp
	CTX-M - R	5'- CCAGCGTCAGAT  TTT TCA GG	
CTX-M group 9	CTX-M + F	5'-CAA AGA GAG TGC AACGGA TG	205 bp
	CTX-M - R	5'-ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC	
CTX-M group 8	CTX-M + F	5'-TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC	666 bp
CTX-M group 25	CTX-M + F	5'-GCA CGA TGA CAT TCG GG	327 bp
CTX-M group 8/25	CTX-M - R	5'-AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	
TEM	TEM + F	5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT G	861 pb
	TEM - R	5'-TTA CCA ATG CTT CAG TGA G AAT	

### 1.3. Test d'adhésion sur des microplaques de titration à 96 puits (Méthode de TCP)

Le test de formation de biofilm par les isolats de *K. pneumoniae* a été réalisé selon (Extremina *et al.*, 2010 ; Christensen *et al.*, 1985) avec quelques modifications. Pour cela, des microplaques en polystyrène à 96 puits ont été utilisées. Les isolats ont été cultivés sur gélose nutritive pendant 18 à 24 heures à 37 ° C. Une colonie de chaque souche a été inoculée dans 5 ml de bouillon Coeur-Cervelle (BHIB) et incubée à 37 ° C pendant 24 heures, puis diluée à 1:100 dans le BHIB + (2% de saccharose). Chaque puit de la microplaque a été rempli avec 200 µL de cette dilution (trois cultures indépendantes pour chaque espèce). Un bouillon stérile de BHIB + 2% de saccharose a été utilisé comme témoin négatif.

Les microplaques ont été ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures, le contenu des puits a été doucement éliminé et rincer quatre fois avec le PBS (pH 7,2), et laisser sécher à 60° C pendant 30 min. Ensuite, les cellules adhérant au support en polystyrène dans les puits sont colorées avec 200 µl de cristal violet à 1% (p : v) pendant 30 min d'incubation à la température ambiante, puis verser le surplus du cristal violet et rincer quatre fois avec l'EPS.

Le colorant incorporé par le produit adhérent a été solubilisé avec l'acétate de sodium (2%) et laisser sécher pendant une nuit à l'air libre. Ensuite, 200 µl d'éthanol à 95% (v / v) ont été ajoutés dans chaque puits et laisser pendant 15 minutes avant de lire les Densité Optique à 550 nm en utilisant un lecteur de microplaques Bio-Rad ELISA (PR 5100) et l'interprétation des résultats a été réalisée selon Vuotto *et al.* (2017).

La densité optique des souches a été obtenue par la moyenne des trois puits et comparé par l'absorbance moyenne du contrôle négatif (ODc) : ( $OD \leq ODc$ ) non formatrice du biofilm, ( $ODc < OD \leq 2xODc$ ) faiblement formatrice du biofilm, ( $2ODc < OD \leq 4xODc$ ) modérément formatrice du biofilm, ( $4xODc < OD$ ) fortement formatrice du biofilm.

### 2. Matériel végétal

Les parties aériennes des plantes : *Lavandula dentata* et *Juniperus phoenicea* ont été récolté au mois de mars 2016 en pleine floraison, provenant de forêt madegh d'Oran, dans le Nord- Ouest algérien et les deux plantes *Origanum glandulosum*, *Mentha pulegium* ont été achetées chez une herboristerie ; Les espèces ont été identifiées au niveau de département de biologie végétal de l'université de Abou bekr Belkaid, Tlemcen et d'après Quezel et Santa, (1963).

#### 2.1. Le choix des plantes

Ces quatre espèces ont été choisies pour les raisons suivantes :

- La disponibilité du matériel végétal sur terrain.
- Le criblage préliminaire de l'activité antibactérienne des huiles essentielles.
- Reconnus pour leur activité antibactérienne (Mahboubi et Haggi., 2008 ; Mechergui et *al.*, 2015 ; Bettaieb Rebey et *al.*, 2017).
- A notre connaissance il n'y pas de travaux antérieurs sur l'utilisation des huiles essentielles de ces plantes contre les *Klebsiella pneumoniae* BLSE en Algérie.

Les spécimens ont été séchés à l'ombre, à l'abri de l'humidité et à la température ambiante pendant 7 jours.

#### 2.2. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles ont été obtenues par hydrodistillation à la vapeur dans un appareil de type Clevenger (figure 9) sur 200 g de matériel végétal pendant trois heures. Les huiles obtenues ont été déshydratées à l'aide du sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>) et conservées à 4°C à l'abri de la lumière (Clevenger, 1928).



**Figure 9. Photo de l'appareil utilisée pour l'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation.**

### 2.3. Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante sèche, exprimé en pourcentage, est calculé par la formule suivante :

$$R = PB/PA \times 100$$

R : rendement de l'huile en pourcentage.

PB : poids de l'huile en gramme.

PA : poids de la plante en gramme (Cheurfa et *al.*, 2013).

### 2.4. Analyse chimique des huiles essentielles par GC-MS

Les analyses de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC - MS) ont été réalisées avec un un appareil Varian CP-3800 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) en utilisant un DB-5 non polaire (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) colonne capillaire (longueur: 30 m; diamètre interne 0,25 mm; épaisseur du film 0,25  $\mu\text{m}$ ) et un détecteur de masse à piège à ions Varian Saturn 2000 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) avec le programme de température suivant: de 60 à 240 ° C à 3 ° C / min, température de l'injecteur et de la ligne de transfert, respectivement 220 et 240 ° C. Le gaz vecteur était He, à 1 ml / min. Le volume d'injection 1  $\mu\text{L}$ . L'acquisition a été effectuée avec les paramètres suivants : balayage complet, avec une plage de balayage de 35 à 300 m / z ; temps de balayage : 1,0 s ; seuil : 1 comptage.

L'identification des constituants a été basée sur la comparaison de leurs temps de rétention (tR) avec ceux des échantillons de référence purs et de leurs indices de rétention linéaires (LRI), déterminés à l'aide du tR d'une série de n-alcane. Les spectres de masse détectés ont été comparés à ceux répertoriés dans les bibliothèques commerciales NIST 14 et ADAMS, ainsi que dans une bibliothèque de spectres de masse maison, constituée de substances pures et de composants d'huiles connues, et dans les données de la littérature de spectroscopie de masse (Adams, 1995 ; Hudaib et *al.*, 2002 ; Coutinho et *al.*, 2009).

### 2.5. Evaluation de l'activité antibactérienne

L'évaluation de l'effet antibactérien des huiles essentielles des plantes se fait en deux étapes : une première étape correspondant à un test initial de sensibilité (méthode des disques) suivie d'une deuxième étape en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB).

**-La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)** est définie comme étant la plus petite dilution dans laquelle aucune croissance macroscopique n'est observée.

**-La Concentration Minimale Bactéricide (CMB)** correspond à la plus faible concentration en huile essentielle ou en extrait brut capable de tuer plus de 99,9 % de l'inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01 % de survivants) (Bachiri et *al.*, 2016).

#### 2.5.1. Technique en milieu solide : La méthode de Vincent (Aromatogramme)

L'activité des huiles essentielles a été évaluée par la technique de diffusion en gélose. En bref, une culture de 18 à 24 heures de la souche à tester (*K. pneumoniae* BLSE) sur bouillon Müller-Hinton a été préparée à une concentration de  $10^8$  UFC/mL, ensuite ensemencée sur gélose Müller-Hinton (Fluka Bio Chemika, Espagne) par écouvillonnage selon les recommandations de CLSI. Un disque stérile de 6 mm de diamètre imprégné de 10  $\mu$ L de l'huile à tester a été déposé au centre de la boîte ensemencée (Bauer et *al.*, 1966 ; Khadir et *al.*, 2013). Ensuite, les boîtes ont été conservées pendant 1 heure à température ambiante.

Après 24 h d'incubation à 37 ° C, les zones d'inhibition ont été mesurées en mm. Toutes les expériences ont été effectuées en triplé. La sensibilité des souches bactériennes à l'huile essentielle a été classée comme suit :

- non sensible pour un diamètre inférieur à 8 mm
- modérément sensible (+) pour un diamètre allant de 8 à 14 mm



- sensible (++) pour un diamètre de 14 à 20 mm
- très sensible (+++) pour un diamètre supérieur à 20 mm (Bertella et *al.*, 2018).

### 2.5.2. Détermination de CMI et CMB

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée en utilisant la méthode décrite par (Khadir et *al.*, 2013 ; Bazargani et *al.*, 2016 ) avec quelques modifications : L'huile essentielle a subi des dilutions successives à 1/2 dans le bouillon Müller-Hinton (Fluka Bio Chemika, Espagne) en ajoutant le Tween 80 avec une concentration de 1 % (v/v) dont le but d'avoir une miscibilité totale de l'huile dans le bouillon. La concentration finale de tween 80 dans le test n'a pas dépassé 1%.

Après incubation dans la gélose, chaque souche a été inoculée dans des tubes individuels contenant du bouillon Mueller Hinton stérile (10 mL) et incubées à 37° C pendant 8 à 12 h pour s'assurer que les bactéries étaient dans la phase exponentielle. Les inocula à 10<sup>8</sup> UFC/mL ont été dilués à 1/100 pour avoir une concentration de 10<sup>6</sup> UFC/mL.

Une culture de 8 à 12 heures de chaque souche a été ajustée pour donner une densité finale de 0,5 McFarland et 100 µL a été ajoutée dans chaque puits de microplaque, par la suite, 100 µl de MHB avec tween 80 ont été ajoutés, ensuite, 100 µl de chaque solution mère de plante (100 mg / mL pour *Lavandula dentata* et 50 mg / mL pour *Origanum glandulosum* et *Mentha pulegium*) ont été placés dans le premier puits et procédé à des dilutions 1/2 dans le MHB stérile pour obtenir des concentrations finales allant de 50 à 0.098 mg/ml pour *Origanum glandulosum* et *Mentha pulegium* et de 100 à 0.19 mg/ml pour *Lavandula dentata*. Un contrôle positif constitué de 100 µl de suspension bactérienne et un contrôle négatif constitué de MHB avec l'huile à tester et tween 80 à 1% ont été utilisées. Les microplaques ont été incubées à 37 ° C pendant 24 h, chaque essai a été répété trois fois.

La CMI a été déterminée comme la concentration la plus faible de l'huile essentielle inhibant la croissance bactérienne visible.

Pour déterminer la concentration bactéricide minimale (CMB), une aliquote de 10 µL de chaque puit ne présentant aucune croissance visible a été répartie sur des boîtes de MHA. La CMB était la concentration la plus faible qui ne donne pas de culture sur les plaques d'agar après 24 h à 37° C.

### 2.6. Mécanisme d'action des huiles essentielles

#### 2.6.1. Test de la cytotoxicité des huiles essentielles sur les lymphocytes humains

Afin d'étudier l'innocuité de nos huiles essentielles, nous avons évalué la cytotoxicité par le test MTT sur les lymphocytes humains.

##### 2.6.1.1. Séparation des lymphocytes humains

- La séparation des lymphocytes humains a été déterminée en prenant 2 mL de sang humain dans un tube EDTA plus 2 mL de PBS (pH 7,2) (v/v), ensuite 7 mL de Ficol (Ficoll-Paque) a été ajouté et centrifugé avec une Rcf 800×g 18°C pendant 20 min, puis éliminer le plasma et récupérer l'anneau des lymphocytes (reste quelque trace de plasma).
- l'anneau des lymphocytes a été met dans un tube et laver avec 4 mL de PBS puis centrifuger a 550×g 18°C pendant 10 min ensuite éliminer le PBS et subi un lavage avec 4 mL de PBS puis centrifuger a 550×g 18°C pendant 10 min, éliminer le PBS et récupérer les lymphocytes dans un tube ependorf (Boyle and Chow, 1969 ; Kol et *al.*, 1983).
- le Comptage des lymphocytes a été fait par un microscope optique dans une cellule de bu'rker, 10 µL de lymphocyte ont été dilué dans 100 µL de milieu de culture RPMI1640.
- Le comptage des 4 cadrons se fait comme suit :

$$\text{Nombre de lymphocyte} = \frac{\sum \text{nombre de lymphocyte dans 4 cadron}}{4} \times \text{fd} \times 10\mu\text{L}$$

Fd : facteur de dilution

##### 2.6.1.2. Test de la viabilité cellulaire

Une dilution avec 28 mL de milieu RPMI1640 a été faite, puis, des volumes de 432,9 µL de milieu RPMI1640 (contiennent 1000000 lymphocytes) ont étéensemencés dans une plaques de microtitrage de 24 puits et traitées avec 10, 17.5 et 20 mg /432.9 µL pour *Lavandula dantata*, 2, 2.2 et 5 mg /432.9 µL pour *Mentha pulegium*, 2, 3.1 et 5 mg /432.9 µL pour *Origanum glandulosum*. Après 24 heures d'incubation à 37°C et à 5% CO<sub>2</sub>, le 3-(4,5-diméthyllthiazol-2yl)-2,5-di phényltetrazoliumbromide (MTT) a été mesuré en accord avec les instructions du fabricant (MTT Cell Viability assay Kit; Biotum, Inc) 40 µL de 5 mg /mL de MTT a été ajoutés dans chaque puit et incubés pendant 2 h à 37 °C, puis les cristaux de formazan bleu insolubles dans l'eau produits ont été dissous dans 500 µL de sulfoxyde de diméthyle (DMSO; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) en pipétant vers le haut

et vers le bas plusieurs fois et en secouant pendant 15 minutes sur un agitateur orbital à 20° C (Liu et Schubert 1997).

L'absorbance a été mesurée à 570 nm et à 630 nm en utilisant un spectrophotomètre (Thermo Helios Omega UV-Vis) pour obtenir le pourcentage de viabilité cellulaire (la densité optique, OD570–OD630) et calculé à l'aide de la formule suivante :

$$[\text{DO (570 nm)} - \text{DO (630 nm) traité} / \text{DO (570 nm)} - \text{DO (630 nm) non traité}] 100\%.$$

Toutes les expériences ont été réalisées en trois fois, et la viabilité cellulaire relative a été exprimée en pourcentage par rapport aux cellules témoins non traitées (les cellules traitées avec le milieu RPMI 1640 seulement). La prolifération cellulaire du témoin a été indiquée en pourcentage (De Oliveira et *al.*, 2013 ; Notariale et *al.*, 2018).

### 2.6.2. Mesure des fuites des acides nucléiques

La mesure de la libération des matériaux absorbants à 260 nm des cellules de *K. pneumoniae* BLSE a été réalisée dans des aliquotes de 2 mL des inoculats bactériens qui ont été diluées dans du MHB pour obtenir  $10^6$  UFC. mL<sup>-1</sup>. Ensuite 1 mL de chaque suspension a été incubé avec nos huiles essentielles avec des volumes correspondant à la CMI à 37° pendant 60 minutes, puis filtrées par des membranes filtrantes (0,22µm) et l'absorbance des filtrats a été mesuré à 260 nm en utilisant un spectrophotomètre (Thermo Helios Omega UV-Vis). Des suspensions bactériennes sans huiles essentielles ont été utilisées comme contrôle et testés de manière similaire (Bajpai et *al.*, 2013).

### 2.6.3. Dosage de la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

#### 2.6.3.1. Collecte de sang et isolement des leucocytes polymorphonucléaires (PMN)

Le sang a été collecté par trois donneurs sains à jeun et soumis à un prélèvement du sang périphérique avec des tubes vacutainers K3EDTA (Becton Dickinson, Plymouth, Royaume-Uni). L'isolement des PMN a été réalisé selon le protocole rapporté par Di Napoli et *al.*, (2020) et Russi et *al.*, (2020).

#### 2.6.3.2. Dosage de la dichlorofluorescéine (DCF)

Le dosage de la dichlorofluorescéine (DCF) a été effectué pour quantifier la génération des EROs selon Manna et *al.* (2012). Les leucocytes ont été traités avec des huiles essentielles (valeurs MIC et doubles MIC : *Origanum* 5,2 et 10,4 mg/mL et *Lavandula* 40,6 et 81,2 mg/mL) pendant 6 h puis incubés avec le 2',7'-dichlorodihydrofluorescine diacétate (DCFH-

DA) non polaire et non fluorescent, à une concentration finale de 10 µM, pendant 15 min à 37 C°. La quantité d'ERO a été contrôlée par fluorescence (longueur d'onde d'excitation de 350 nm et longueur d'onde d'émission de 600 nm) sur un lecteur de microplaque. Les résultats ont été exprimés en intensité de fluorescence.

### **2.6.4. Microscopie Electronique à Transmission de *Klebsiella pneumoniae* (MET) :**

Cette technique est utilisée pour observer les effets d'une huile essentielle au niveau de la paroi cellulaire. Elle est particulièrement adaptée pour visualiser les altérations de la paroi ainsi que la perte du contenu cytoplasmique. La méthode employée pour la préparation des cellules bactériennes en MET a été faite selon un protocole défini par Rasooli et *al.*, (2006) et Heydari et *al.*, (2018).

5mL des suspensions bactériennes à 10<sup>7</sup> UFC/ml sont incubés en absence (contrôle négatif) et en présence des huiles essentielles des deux plantes (*Lavandula dentata* et *Origanum glandulosum*) à des concentrations correspondants à la valeur moyenne de CMI.

Après incubation, les suspensions bactériennes sont centrifugées à 1 300g pendant 10 minutes à température ambiante et les culots ont été fixés dans une solution tamponnée de cacodylate de sodium glutaraldéhyde 2,5% pendant 2 heures à température ambiante.

Après fixation dans une solution tamponnée de cacodylate de sodium tétroxyde d'osmium à 1% pour 1,5 heure à température ambiante, les échantillons ont subi une déshydratation avec de l'alcool éthylique et incorporé dans de la résine Spurr. Des coupes de 50 nm d'épaisseur ont été colorées avec du colorant de remplacement d'acétate d'uranyle UAR (Electron Microscopy Sciences) et du citrate de plomb. Les observations ont été effectuées sous un TEM Philips EM 208S à 80 KV (Rasooli et *al.*, 2006 et Heydari et *al.*, 2018).

### 3. Étude statistique

Les données ont été analysées et interprétées à l'aide du logiciel de surveillance de la sensibilité aux antibiotiques WHONet 5.6.

Le logiciel SPSS version 22 a été utilisé pour l'étude statistique :

Le test de Kruskal wallis a été réalisé pour étudier l'effet de l'activité antibactérienne par la méthode de disque, les CMI, les CMB des HEs des plantes sur les Kp-BLSE,  $p \leq 0.05$  est considéré significatif.

Test t été réalisé pour étudier l'effet des huiles essentielles sur la production de ERO dans les leucocytes.

Le test Anova été réalisé pour étudier la cytotoxicité des huiles essentielles sur les lymphocytes humains et pour la mesure des fuites des acides nucléiques.

## **Chapitre 2 : Résultats et Discussion**

### Résultats et discussion

#### 1. Profil de sensibilité aux antibiotiques des *Klebsiella pneumoniae*

Au cours de la période d'étude, 630 cas ont été recensés, *K. pneumoniae* a été impliquée dans 6.34% de l'ensemble des cas (40 sur 630), ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Ben Haj Khalifa et Khedher en 2012.

Les profils de sensibilité aux antibiotiques des isolats de *K. pneumoniae* ont été présentés dans la figure 10.

- On note un faible taux de résistance pour l'amoxicilline / acide clavulanique et la piperacilline / tazobactame, pour l'AMC, nos résultats étaient en accord avec Rasamiravaka et al., (2015), alors que Muggeo et al., (2017) et Ben Haj Khalifa et Khedher (2017) ont trouvé que toutes les souches étaient intermédiaires.

Différentes études ont signalé des taux plus élevés que nos résultats par Lagha et al. (2014) (100%), Benaïcha et al. (2017) (61%) et par Ben Haj Khalifa et Khedher (2012).

Cependant, pour la piperacilline/tazobactame nos résultats étaient inférieurs à ceux de Lagha et al., (2014) et de Muggeo et al., (2017).

La diminution du profil de résistance est un indicateur de présence de  $\beta$ -lactamase de type CTX-M et l'association des pénicillinases avec les inhibiteurs a permis de récupérer l'activité des molécules.

Les composés inhibiteurs de la  $\beta$ -lactamase partagent une similarité structurelle avec la pénicilline, sont efficaces contre de nombreux organismes sensibles exprimant des lactamases de classe A (Abrar et al., 2017), en plus l'association de pénicilline-inhibiteur de  $\beta$ -lactamases a été active dans le traitement des infections causées par des bactéries productrices de BLSE et pourrait être proposée pour le traitement en ambulatoire des infections urinaires causées par *E. coli* productrice de BLSE (Rodriguez-Bano et al., 2012 ; El Bouamri et al., 2014).

- Pour la cefoxitine, l'imipénème et l'ertapénème une sensibilité totale a été signalée, nos résultats étaient également en accord avec certaines autres études (Lagha et al., 2014 ; Alibi et al., 2015), des différents résultats ont été trouvés par Rasamiravaka et al. (2015) (6 /35 souches sensibles à l'imipénème), Muggeo et al., 2017 (31% sensibles à la céfoxitine, 89% sensibles à l'imipénème), et par Singh et al. (2017), Khodadadian et al. (2018) (7%, 25,6% respectivement résistantes à l'imipénème), Vuotto et al. (2017) ont trouvé (32,5%) des souches résistantes à au moins un carbapénème.

- Actuellement, les carbapénèmes, c'est-à-dire l'imipénème et le méropénem, sont la seule classe des antibiotiques à avoir toujours été efficace contre *K. pneumoniae* productrice de BLSE (Panda et al., 2016). Cependant, il est essentiel d'insister sur l'usage rationnel des carbapénèmes car il n'y a pas de nouveaux antibiotiques disponibles dans l'avenir proche pour le traitement des infections à E-BLSE (El Bouamri et al., 2014).

- Par contre, une sensibilité prédominante a été notée pour la céfalotine (60%), la céfotaxime (62.5%), la ceftazidime (61.5%), l'amikacine (97.5%), la gentamicine (67.5%), la tobramycine (65%), l'acide nalidixique (67.5%), la ciprofloxacine (82.5%) et l'ofloxacine (87.5%).

Des résultats trouvés par Muggeo et al. (2017) étaient inférieurs à nos résultats : 6% sensible à la ceftazidime, 11% à la céfotaxime, 6% à tobramycine, 25% à gentamicine, alors que pour l'amikacine, ils ont trouvé des résultats similaires (83%). Nos résultats étaient également en accord avec certaines autres études de Benaïcha et al. (2017) pour la ceftazidime, Singh et al. (2017) pour la ciprofloxacine et la gentamicine.

Différents résultats pour la ciprofloxacine, ont été rapportés à Madagascar en 2015 par Rasamiravaka et al. (30/35 souches résistantes).

Abrar et al., (2017), Lagha et al. (2014) ont trouvé que 100% des souches de *K. pneumoniae* étaient résistantes aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération, Singh et al. (2017) ont trouvé que 100% des souches étaient résistantes à la ceftazidime. Des taux de résistances élevés aux aminosides ont été signalés par Lagah et al. (2014). Benaïcha et al. (2017) ont trouvé un taux de résistance à l'amikacine très bas (02.54%), alors que pour la tobramycine et la gentamycine ils ont trouvé 36.44%, 30.5% respectivement.

- Un taux de résistance de 100% au Fluoroquinolones a été trouvé au North-Eastern de France en 2017 par Muggeo et al., alors que Benaïcha et al. (2017) ont trouvé un taux de résistance très bas. Vuotto et al. (2017) et Lagha et al. (2014) ont trouvé des résultats proches à notre résultat (80%, 89%) respectivement.

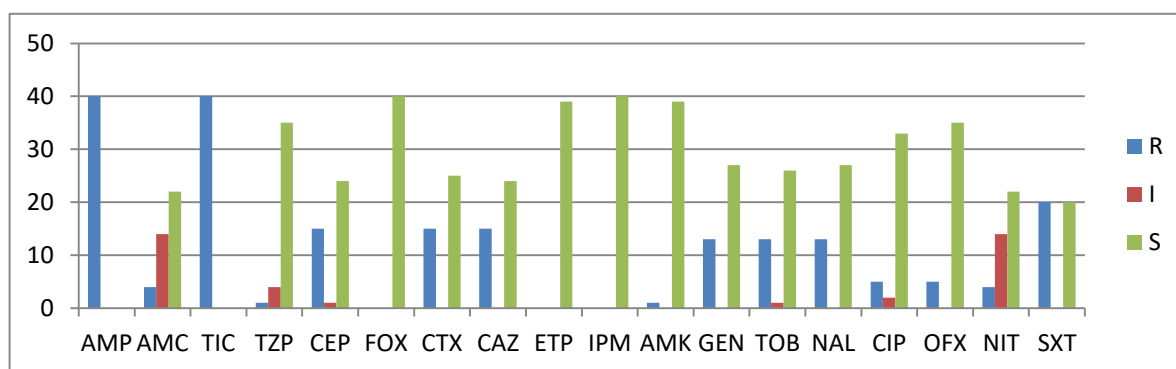
- 50% des souches étaient sensible à la triméthoprime/sulfaméthoxazole et 55% à la nitrofurantoïne dans notre étude, pour le SXT Rasamiravaka et al. (2015) ont trouvé différents résultats (32/35 souches résistantes), Vuotto et al. (2017) ont trouvé 0.3%.

Les fluoroquinolones sont des traitements potentiels pour les infections causées par des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi sensibles aux FQ (Muggeo et al., 2017). *Klebsiella* spp. est naturellement sensible aux FQ et l'utilisation abusive de ces



molécules en médecine humaine et vétérinaire entretient l'évolution de la résistance des bactéries à cette famille d'antibiotiques au cours de la dernière décennie et a réduit leur efficacité et a compromis l'utilisation future de cette classe importante de médicaments antibactériens (Ben Haj Khalifa et Khedher, 2012).

Les souches de notre échantillonnage présentaient un comportement similaire, La concentration minimale inhibitrice (CMI) de CTX était  $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ , la CMI de CAZ variait de  $1 \mu\text{g/ml}$  à  $\geq 64 \mu\text{g/ml}$ , la CMI de FOX était de l'ordre de  $\leq 4$  et  $8 \mu\text{g/ml}$  et la CMI de AMC était de l'ordre de  $16$  et  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ . Daoud et *al.* (2017) ont trouvé que tous les isolats ont donné des ratios de CMI de ceftazidime par rapport à la CMI ceftazidime plus l'acide clavulanique est  $\geq 8$ .



AMP : Ampicilline, AMC : Amoxicilline/Acide clavulaniqu, TIC : Ticarcilline, TZP : Piperacilline/Tazobactam, CEP : Céfalothine, FOX : Céfoxitine, CTX : Céfotaxime, CAZ : Ceftazidime, ETP : Ertapenem, IPM : Imipénème, AMK : Amikacine, GEN : Gentamicine, TOB : Tobramycine, NAL : Acide nalidixique, CIP : Ciprofloxacine, OFX : Ofloxacine, NIT : Nitrofurantoïne, SXT : Trimethoprim/Sulfamethoxazole.

**Figure 10 . Profils de sensibilité aux antibiotiques des isolats de *Klebsiella pneumoniae*.**

### 1.1. Confirmation de production de BLSE

La présence d'une BLSE a été confirmée par l'antibiogramme, par visualisation d'une image de synergie (bouchon de champagne) entre les disques de céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et le disque contenant l'amoxicilline + acide clavulanique.

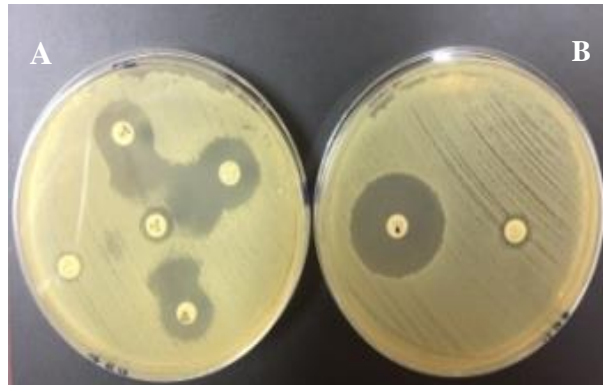
Nous avons relevés la présence de 15 sur 40 (37.5%) souches de *Klebsiella pneumoniae* productrice de  $\beta$ -laclamase à spectre élargie (figures 11, 12). Aucune souche carbapenemase n'est détectée.

Nos résultats étaient proches à ceux de Pirzaman et *al.* en 2018 (41,1%) et différentes à celles qui ont été trouvés en Tunisie (39/198) par Ben Haj Khalifa et Khedher (2017) et par

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

Lagha et *al.* en Algérie (2014), Par contre, un taux élevé de Kp- BLSE (60,8%) a été détecté en Russie par Edelstein et *al.* (2003).

Le phénomène de production de BLSE a été observés chez diverses bactéries pathogènes, mais il est plus fréquents chez *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, et plus élevée dans les pays asiatiques, où ils ont signalé jusqu'à 75% de production de BLSE (Abrar et *al.*, 2017).



**Figure 11. *Klebsiella pneumoniae* productrice de BLSE : A: test Espagnol positif ; B: test double disque positif**



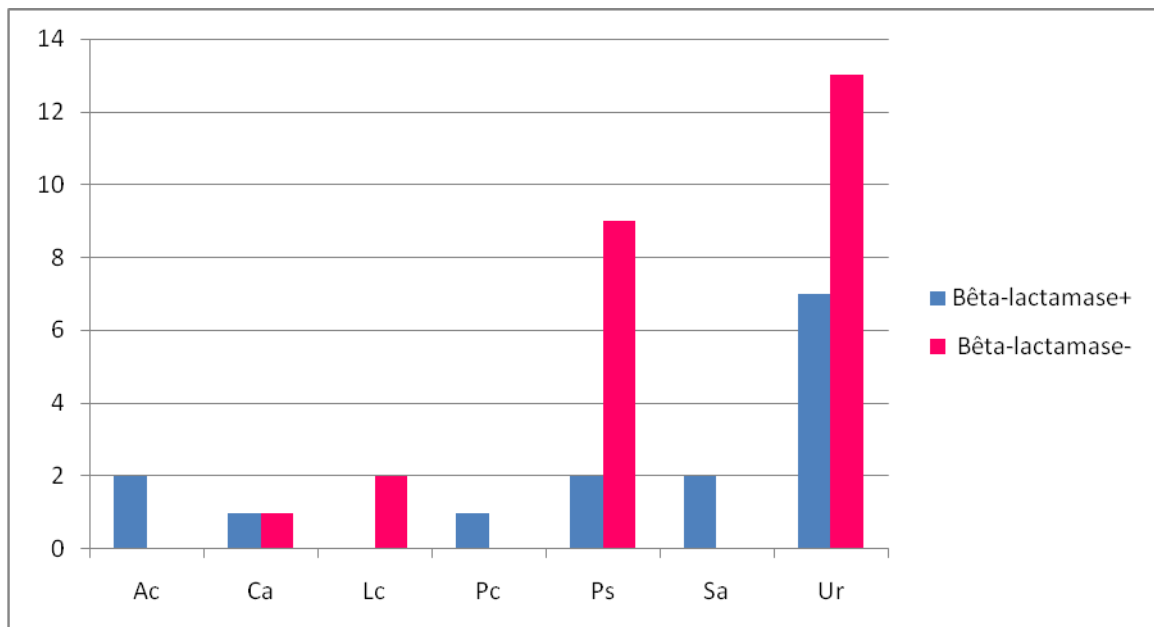
**Figure 12. *Klebsiella pneumoniae* non productrice de BLSE : A: test Espagnol négatif ; B: test double disque négatif**

### **2. Fréquence de *Klebsiella pneumoniae* BLSE en fonction de type de prélèvement**

Les Kp-BLSE étaient plus fréquemment retrouvées dans les urines (46,66%), puis dans les pus, les hémocultures et les abcès péri-rectale (13,33%) pour chacun, ensuite dans les plaies chirurgicales et les cathéters (6,66%) pour chacun, aucune souche dans le liquide

céphalorachidien n'a été détectée (Figure 13). Peut être les services de consultations adresse un grand nombre des ECBU.

Nos résultats étaient en accord avec certaines autres études pour les urines (Guessennd et *al.*, 2008 ; Benaicha et *al.*, 2017; Jung et *al.*, 2018 ; Pirzaman et *al.*, 2018 et Kathryn R. Bush et *al.*, 2019). Différents résultats ont été rapportés par Rasamiravaka et *al.* (2015) : 50/170 souches dans les urines et 32/170 dans les hémocultures, alors que Muggeo et *al.* (2017) ont trouvé des résultats similaires à nos résultats dans les pus. Pour les autres prélèvements ils ont trouvé : (17%) provenaient des urines, (2%) de sang, (23%) d'autres sites infectieux et (58%) d'échantillons de dépistage (selles ou écouvillons rectaux).



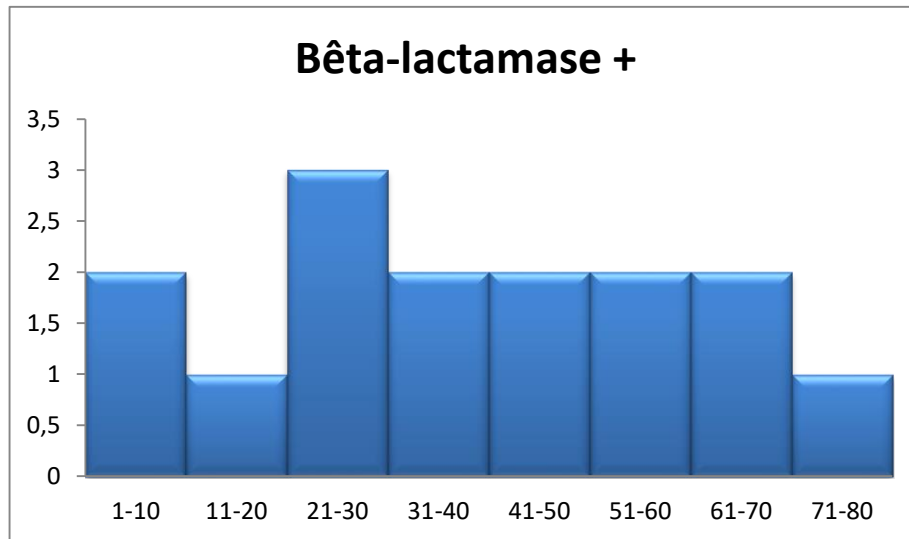
Ac : Abscès péri rectale, Ca : Cathéter, Lc : Liquide céphalorachidien, Pc : Plaies chirurgicales, Ps : Pus, Sa : hémoculture, Ur : Urine

**Figure 13. Répartition des souches de *K. pneumoniae* BLSE en fonction des prélèvements.**

### 3. Fréquence de *Klebsiella pneumoniae* BLSE en fonction de l'âge

Les infections causées par une bactérie productrice de BLSE peuvent survenir chez les personnes de tout âge. Néanmoins, dans notre étude, une similarité de dispersion des isolats de Kp-BLSE : 13.33% dans chacune des tranches d'âge (1-10), (31-40), (41-50), (51-60), (61-70) ans et 20% ont été isolées chez des patients âgés entre 21-30 ans (Figure 14), Cela

pourrait être dû à leur statut immunologique et à l'utilisation excessive et systématique des  $\beta$ -lactamines, Lagha et *al.* (2014) ont trouvé que la plupart des Kp-BLSE étaient isolées dans les tranches d'âge entre 27 et 85 ans. Gravey et *al.* (2017) ont isolé 4,1% des Kp-BLSE dans la tranche d'âge 18-64 ans et 4,2% dans la tranche d'âge > 65 ans.



**Figure 14. Répartition des souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE en fonction de l'âge.**

#### 4. Répartition des souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE en fonction du sexe

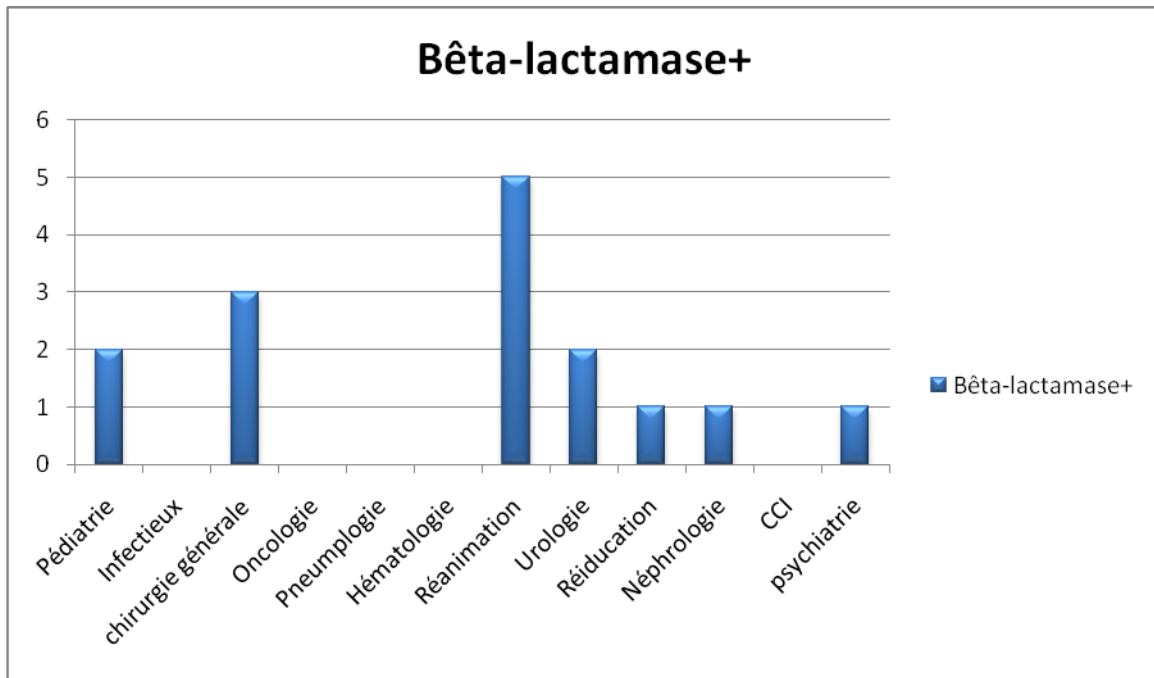
86.67% des isolats ont été retrouvés chez des patients de sexe masculin et 13.33% chez des patients de sexe féminin, nos résultats étaient proches à ceux de Deng et *al.* (2017) et Kathryn R. Bush et *al.* (2019) : 75,0% et 67% respectivement étaient des hommes. Lagha et *al.* (2014) ont trouvé que la majorité des patients étaient des femmes (78%), les hommes étaient infectés 6.5 fois plus que les femmes (H/F). Cela peut être due à la spécificité de l'hôpital (la plupart des patients de l'hôpital militaire sont de sexe masculin).

#### 5. Répartition des souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE en fonction du service

La plupart des souches de Kp-BLSE ont été isolées dans le service de réanimation (33.33%) puis dans la chirurgie générale (20%), pédiatrie (13.33%), Urologie (13.33%), ensuite dans les services de Néphrologie, Rééducation et Psychiatrie avec (6.67%) pour chacun, Nos résultats étaient également en accord avec Lagha et *al.*(2014) (33% dans le service de la réanimation). Cependant, Ben Haj Khalifa et Khedher (2017) ont signalé des taux plus bas: Pédiatrie (5%) Réanimation médicale (2,5%) Chirurgie (00%).

La plupart des souches de Kp-BLSE ont été isolées chez des patients hospitalisés, comme le signalaient de nombreuses études : Des épidémies nosocomiales causées par Kp-BLSE ont été signalées principalement dans les unités de soins intensifs (Alibi *et al.*, 2015).

Cependant, nous n'avons isolé aucune souche de Kp-BLSE dans les services d'Infectieux, Oncologie, Pneumologie, Hématologie et CCI. Cela suggérait une bonne hygiène dans ces services (Figure 15).



**Figure 15. Répartition des souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE en fonction du service.**

### 6. Caractérisation moléculaire des gènes codant pour les $\beta$ -lactamases

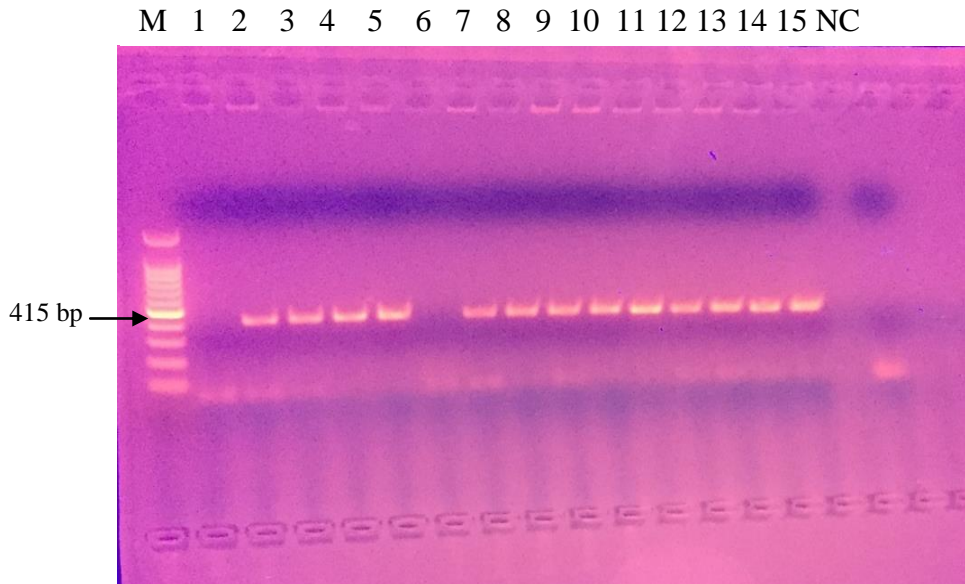
Les résultats de PCR étaient positifs pour le CTX-M du groupe 1 qui a été produit par 13 isolats (86.7%) et aucun des producteurs d'enzymes CTX-M du groupe 2, 8,9, 25 et d'enzyme TEM n'ont été détecté (Figures 16, 17).

Alibi *et al.* (2015) ont trouvés des résultats similaires pour le *bla* CTX-M total (89%), alors que pour le *bla* TEM ils ont trouvés 56.78% des souches productrices. Paterson *et al.* (2003) ont trouvé que 87,7% des isolats étaient proctrices d'une  $\beta$ -lactamase de type TEM et dans 23,3% des isolats étaient proctrices d'une  $\beta$ -lactamase de type CTX-M.

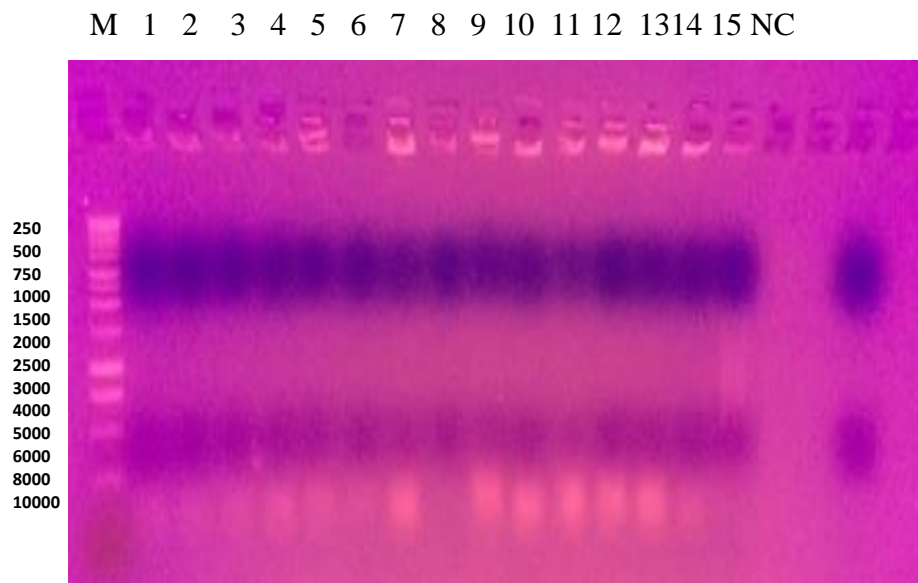
Dans une étude à Abidjan en Côte d'Ivoire, Guessennd et *al.* (2008) ont trouvé que 63,4% des souches exprimaient une  $\beta$ -lactamase de type TEM et la majorité des souches étaient associées à une  $\beta$ -lactamase de type CTX-M du groupe 1 (58,5 %), aucune n'était de type CTX-M groupes 2 et 9, une souche avait le type CTX-M du groupe 8 et trois étaient à la fois TEM, SHV et CTX-M du groupe 1. Dans une autre étude en Corée rapporté par Jung et *al.* (2018), ils ont trouvé uniquement les types de BLSE du groupe CTX-M-1 (75.9%) et / ou du groupe CTX-M-9 (20.5%). Dans une étude Egyptienne, le *bla* CTX-M a été signalé dans trois cas et le *bla* TEM n'a été détecté que dans un cas (Ahmed et *al.*, 2013).

Paterson et *al.* (2003) ont constaté que la céfotaxime et le ceftriaxone sont utilisés dans le monde entier. Il n'est donc pas surprenant que les  $\beta$ -lactamases de type CTX-M se trouvent maintenant dans de nombreux pays et à des taux élevés (Alibi et *al.*, 2015).

Les souches renferment les gènes *bla* CTX-M et ou *bla* TEM sont résistantes aux céphalosporines de troisième génération à savoir le ceftriaxone, la céfotaxime, la ceftazidime. Plusieurs travaux avaient montré que la présence de ces gènes pouvait conférer la résistance aux céphalosporines de troisième génération (Ahoyo et *al.*, 2007).



**Figure 16 . Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR du gène *bla* CTX-M:** Premier puit : marqueur moléculaire (Échelle 100 pb), les puits numérotés 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 montrent des bandes de 415 pb, tandis que les puits numérotés 1 et 6 montrent un résultat négatif. NC: contrôle négatif.



**Figure 17 . Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR du gène *bla* TEM : Premier puit, marqueur de poids moléculaire; les puits numérotés 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 montrent un résultat négatif. NC: contrôle négatif.**

### **7. Détection de la formation de biofilm par la méthode TCP**

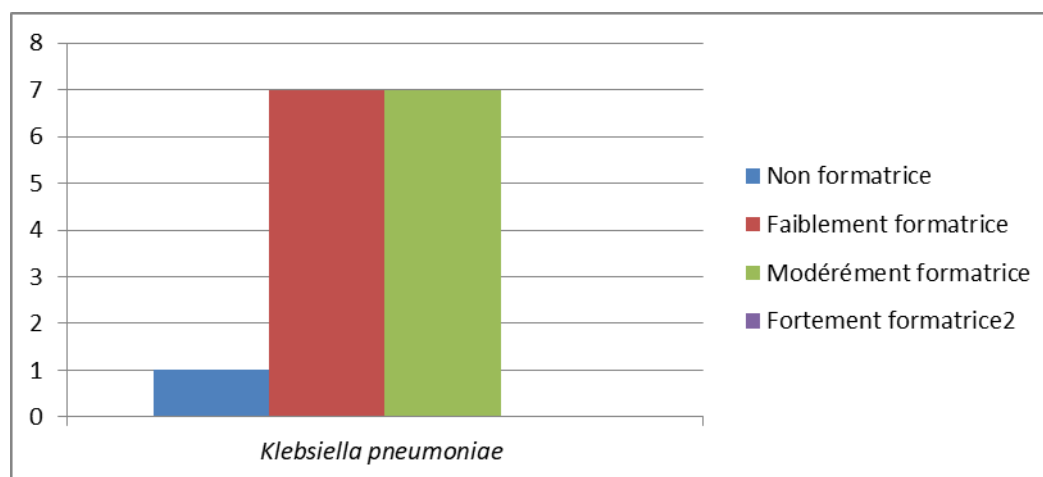
Les résultats de la formation de biofilm étudiés par la méthode de TCP ont montré que (46.67%) des isolats étaient des producteurs modérés de biofilm, (46.67%) étaient faibles, (6.66%) étaient non producteurs de biofilm (Figure 18).

Martino et *al.* (2003) ont trouvé que 48,5% des souches de *K. pneumoniae* étaient fortement formatrices de biofilm, alors que Vuotto et *al.* (2017) ont trouvé que 67,5% des souches étaient productrices puissantes de biofilm, 25% productrices modérées de biofilm et 7,5% productrices faibles de biofilm. 91,2% étaient formatrices des biofilms trouvé par Khodadadian et *al.* (2018), Seifi et *al.* (2016) ont trouvé que 52,1% des isolats testés étaient classés comme souches productrices modérées du biofilm, 33% ont formée des biofilms bien établis, 8,5% produits des biofilms négligeables, et 6,4% des souches étaient non productrices de biofilm.

La production du biofilms procure un avantage pathogène important permettant une protection contre les réponses immunitaires de l'hôte et une sensibilité réduite à l'antibiothérapie. Surgers et *al.* (2018) ont trouvé une relation étroite avec plusieurs facteurs de virulences différentes et la capacité de production du biofilm. La capacité des souches de



*K. pneumoniae* à adhérer et à coloniser des surfaces inertes peut être une caractéristique générale de cette espèce. En effet, nous avons observé des incidences élevées d'adhérence effective sur les surfaces en verre et en polypropylène chez des souches de *K. pneumoniae* d'origines cliniques et des système de distribution d'eau (Martino *et al.*, 2003).



**Figure 18. Détection de la formation de biofilm par la méthode TCP.**

## 8. Effet des HEs des plantes aromatiques retenues sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE

### 8.1. Résultats des extractions

Les rendements moyens en huiles essentielles ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne des plantes. Les échantillons de *Lavandula dentata*, *Origanum glandulosum*, *Mentha pulegium* et *Juniperus phoenicea* ont fourni des bons rendements en HE comparés à ceux obtenus par d'autres chercheurs (Tableau 6).

Pour *Lavandula dentata*, nos résultats étaient en accord avec ceux rapportés dans la littérature obtenus par Senouci et Abdelouahid (2010) 1.44 %, Bettaieb Rebey *et al.* (2017) 0.89 % et par Ouedrhiri *et al.* (2017) 1.1%, des rendements plus élevé que notre, ont été trouvé par Bachiri *et al.* (2016, 2017), Dammak *et al.* (2019) soit 2.9 %, 2.6%, 1.76% respectivement. Alors que Dob *et al.* (2005), Silva-Flores *et al.* (2019) ont rapporté des résultats plus bas que nos rendements : 0,79%, 0,53% respectivement.



Pour *Origanum glandulosum* : nos résultats sont proches de ceux obtenus avec cette même espèce par Belhattab et al. (2005), alors que Bendahou et al. (2007) et Bekhechi et al. (2008) ont trouvé des taux supérieurs dans différentes régions.

Ait-Ouazzou et al. (2012), Zantar et al., (2015) ont trouvé un rendement de l'HE de *M. pulegium* similaire à notre résultat 2.7%.

Pour *Juniperus phoenicea*, Bouzouita et al. (2008) ont trouvé un rendement similaire à notre rendement (0,5%).

Cette différence du rendement en huiles essentielles est normale, elle peut être due à diverses conditions et facteurs à savoir l'espèce, le génotype, en plus de l'environnement, la période de récolte, le lieu de séchage et l'origine géographique de la plante (Bachiri et al., 2016, 2017).

**Tableau 6. Rendements en huiles essentielles des plantes étudiées.**

Composés	Teneurs %
<i>Lavandula dentata</i>	1,2%
<i>Origanum glandulosum</i>	3,15%
<i>Mentha pulegium</i>	3,07%
<i>Juniperus phoenicea</i>	0,55%

### 8.2. Analyse chimique des huiles essentielles

Dans l'huile essentielle de *L. dentata*, 43 composants ont été identifiés par GC / MS ; les principaux constituants étaient: la  $\beta$ -pinène (17.3%) suivi par le myrtenal (10.2%), *trans*-pinocarveol (8.7%),  $\alpha$ -thujène (7.2%), linalool (6.8%) et le 1,8-cinéole (6.1%) ; (Tableau 8).

Le pourcentage de 1,8-cinéole (6.1%) dans notre huile de *L. dentata* d'Algérie a révélé une dissimilitude avec ceux décrits dans la littérature ; Dob et al. (2005) ont rapporté que les principaux constituants de l'huile de *L. dentata* étaient le 1,8-cinéole (38,4%), le *cis*-verbénol (4,3%), le *p*-cymen-8-ol (3,8%) et la fenchone (2,3%) ; Ouedrhiri et al. (2017) ont trouvé que les deux monoterpènes : le  $\beta$ -pinène (25.82%) et le 1,8-cinéole (10.82%), étaient les principaux composants d'HE de *L. dentata*. Dammak et al. (2019) ont montré que le principal composant était: le 1,8-cinéole. Silva-Flores et al. (2019) ont identifiés 16 composants dont les principaux constituants étaient les monoterpènes oxygénés (80,71%) et les monoterpènes hydrogénés (16,19%); les principaux constituants étaient le 1,8-cinéole (68,59%) et le  $\beta$ -pinène (11,53%).

Parmi les 23 composant identifiés, l'analyse de l'huile essentielle d'*Origanum glandulosum* a révélé que les principaux composants étaient : le thymol (33.2%), le  $\gamma$ -terpinene (25.4%), le *p*-cymene (16.1%), le carvacrol (13.0%). Nos résultats sont proches de ceux qui ont été obtenus avec cette même espèce par Bendahou et *al.* (2007): thymol (41.6%) puis le  $\gamma$ -terpinene (27%), *p*-cymene (17.1%), Harfi et *al.* (2019) : thymol (25.4%), le  $\gamma$ -terpinene (20.4 %), le *p*-cymene (20.3 %) et Khadir et *al.* (2013) : thymol (42.3 %) puis le  $\gamma$ -terpinene (25.9%), *p*-cymene (17.6%).

D'autres différents résultats ont été obtenus par : Belhattab et *al.* (2005) qui ont trouvé que les composés majoritaires des huiles de l'*O. glandulosum* sont : le carvacrol (47%), le  $\gamma$ -terpinene (13.4%), le *p*-cymene (11.2%) puis le thymol (6.6%). Nabet et *al.* (2017) ont trouvé que les principaux composés de HEO étaient le  $\gamma$ -terpinène (29,4%) et le carvacrol (12,9%). Mechergui et *al.* (2015) et Ali et *al.* (2020) ont trouvé que le carvacrol été le composant majoritaire suivie par  $\gamma$ - terpinene, *p*-cymene et le thymol. Nabti et *al.* (2020) ont trouvé que les quatre principaux composants détectés dans différentes régions en Algérie étaient : le thymol (15.1–56.3%), le carvacrol (2.8–59.6%), le  $\gamma$ -terpinene (9.8–21.8%) et le *p*-cymene (8.5–13.9%).

L'analyse par GC-MS de l'HE de *Mentha pulegium* à révélé aussi la piperitone (74,6%) comme principal composant, accompagnée d'autres composants à des niveaux relativement faibles: limonene (4,8%),  $\beta$ -pinene (4,7%), pulegone (3,3%),  $\alpha$ -pinene et (2.8%), sabinene (2.0%) et piperitenone (1.5%) ; (Tableau 7).

Tutar et *al.* (2016) ont trouvé que les principaux composants de l'HEMP étaient la pégégone (51,32%), le D-isomenthone (33,19%), l'isopulégone (9,20%), le menthol (2,98%) et la pipériténone (0,86%), Lorenzo et *al.* (2002) ; Mahboubi et Haggi. (2008) ; Nikolic et *al.* (2014) ; Zantar et *al.* (2015) et Aitboulahsen et *al.* (2018) ont trouvé que le pulegone été le principale composant : 38,0%, 73.4%, 68,7%, 77.16% et 86,3% respectivement.

Pour *Juniperus phoenicea*,  $\alpha$ -pinene (34.2%),  $\alpha$ -terpinyl acetate (21.4%),  $\beta$ -phellandrene (8.4%) étaient les composants majoritaires, ce qui en accord avec les résultats de Mansouri et *al.*, (2011) ( $\alpha$ -pinène : 34,23 %) ; Bouzouita et *al.*, (2008) ( $\alpha$ -pinène : 59,11%).

Nous avons observé des différences dans la composition chimique, en particulier dans la quantité des principaux composants des huiles essentielles. Cela peut être dû à des variations de nombreux facteurs qui affectent les accès étudiés, tels que le climat, l'amplitude thermique

le relief, la durée d'ensoleillement, la période de collecte et la partie de la plante (par exemple, les feuilles, les tiges et les fleurs) (Bachiri et *al.*, 2017 ; Bettaieb Rebey et *al.*, 2017; Nabti et *al.*, 2020), le sol autant de facteurs d'ordre environnemental susceptibles d'induire des modifications génotypiques peut de son côté, être responsable d'une telle différence. Par conséquent, cette différence chimique peut se répercuter sur leurs activités biologiques. (Goncalves et *al.*, 2010; Bachiri et *al.*, 2017).

**Tableau 7. Composition chimique des huiles essentielles des plantes retenues.**

Constituants	LRI	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Lavandula dentata</i>	<i>Mentha pulegium</i>
tricyclene	928			
$\alpha$ -thujene	933	0,9	7,2	0,1
$\alpha$ -pinene	941	0,6		2,8
camphene	955		1,0	
thuja-2,4(10)-diene	959		0,4	
sabinene	977			2,0
1-octen-3-ol	981	0,3		
$\beta$ -pinene	982	0,2	17,3	4,7
3-octanone	987	0,2		0,4
myrcene	992	1,4		0,2
3-octanol	994			0,9
$\delta$ -2-carene	1002			
$\alpha$ -phellandrene	1006	0,2		
$\delta$ -3-carene	1013			
$\alpha$ -terpinene	1020	2,9		0,2
<i>p</i> -cymene	1028	16,1	1,1	0,2
limonene	1032	0,5	5,1	4,8
$\beta$ -phellandrene	1033			
1,8-cineole	1034		6,1	0,4
$\gamma$ -terpinene	1063	25,4		0,5
<i>cis</i> -linalool oxide (furanoid)	1076		0,3	
terpinolene	1090		0,8	
<i>p</i> -cymenene	1091			
linalool	1101	0,6	6,8	
hotrienol	1103		0,2	
<i>endo</i> -fenchol	1112		0,2	
<i>cis-p</i> -menth-2-en-1-ol	1123		0,6	

<b><math>\alpha</math>-campholenal</b>	1125		1,2	
<b><i>trans</i>-pinocarveol</b>	1141		8,7	
<b><i>cis</i>-verbenol</b>	1142		0,4	
<b><i>trans</i>-verbenol</b>	1143		2,2	
<b>camphor</b>	1145			
<b>menthone</b>	1155			0,9
<b><i>trans</i>-pinocamphone</b>	1165			
<b>pinocarvone</b>	1164		4,1	
<b>isomenthone</b>	1165			0,4
<b>borneol</b>	1167	0,1	1,7	
<b><i>p</i>-mentha-1,5-dien-8-ol</b>	1168		0,5	
<b><i>cis</i>-pinocamphone (syn. isopinocamphone)</b>	1175			
<b>4-terpineol</b>	1179	0,6	0,9	0,6
<b>cryptone</b>	1185		3,6	
<b><math>\alpha</math>-terpineol</b>	1191	0,4	1,0	0,2
<b>myrtenol</b>	1193			
<b>myrtenal</b>	1194		10,2	
<b>verbenone</b>	1207		0,3	
<b><i>trans</i>-carveol</b>	1220		1,1	
<b>citronellol</b>	1229			
<b>methyl thymol</b>	1234	0,1		
<b>pulegone</b>	1240			3,3
<b>cumin aldehyde</b>	1241		3,9	
<b>carvone</b>	1244		1,6	
<b>methyl carvacrol</b>	1245	0,2		
<b>piperitone</b>	1254		0,6	74,6
<b>(<i>Z</i>)-4-decen-1-ol</b>	1258			
<b>isopiperitenone</b>	1271			0,1
<b>phellandral</b>	1272		0,8	
<b>bornyl acetate</b>	1287			
<b><i>p</i>-cymen-7-ol (syn. cuminalcohol)</b>	1290		0,7	
<b>thymol</b>	1291	33,1		0,4
<b><i>p</i>-mentha-1,8-dien-7-ol (syn. perilla alcohol)</b>	1297		0,5	
<b>carvacrol</b>	1299	13,0		
<b>(<i>E</i>)-3-hexenyl (<i>E</i>)-2-methylbut-2-enoate</b>	1325		0,4	
<b>piperitenone</b>	1342			1,5
<b><math>\alpha</math>-cubebene</b>	1352			
<b><math>\alpha</math>-terpinyl acetate</b>	1353			
<b><math>\alpha</math>-ylangene</b>	1373			
<b><math>\alpha</math>-copaene</b>	1377			

<b><math>\beta</math>-bourbonene</b>	1385			0,1
<b><math>\beta</math>-caryophyllene</b>	1419	1,5	0,2	0,1
<b><math>\alpha</math>-humulene</b>	1455			0,4
<b><math>\gamma</math>-muurolene</b>	1478			
<b>germacrene D</b>	1482			
<b><math>\beta</math>-selinene</b>	1487		1,1	
<b><math>\alpha</math>-selinene</b>	1495			
<b><math>\alpha</math>-muurolene</b>	1499			
<b><math>\beta</math>-bisabolene</b>	1508	0,2		
<b><i>trans</i>-<math>\gamma</math>-cadinene</b>	1514		0,2	
<b><i>trans</i>-calamenene</b>	1523		0,5	
<b><math>\delta</math>-cadinene</b>	1524			
<b><math>\beta</math>-sesquiphellandrene</b>	1525	1,2		
<b><math>\alpha</math>-calacorene</b>	1543			
<b>elemol</b>	1550			
<b>germacrene B</b>	1557			
<b>caryophyllene oxide</b>	1582	0,2	0,4	
<b>salvial-4(14)-en-1-one</b>	1594			
<b>humulene epoxide II</b>	1607			
<b>junenol</b>	1618			
<b>1-<i>epi</i>-cubenol</b>	1629			
<b>caryophylla-4(14),8(15)-dien-5-ol</b>	1636			
<b>T-cadinol</b>	1641			
<b><math>\beta</math>-eudesmol</b>	1650		1,6	
<b><math>\alpha</math>-cadinol</b>	1652			
<b><math>\alpha</math>-bisabolol oxide B</b>	1654		0,5	
<b>cadalene</b>	1673		0,4	
<b><math>\alpha</math>-bisabolol</b>	1686		0,2	
<b><i>cis</i>-14-<i>nor</i>-muurol-5-en-4-one</b>	1687		1,5	
<b>manoyl oxide</b>	1845			
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>		48,2	32,9	15,5
<b>Monoterpènes oxygénés</b>		48,1	54,6	82,4
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>		2,9	2,4	0,6
<b>Sesquiterpènes oxygénés</b>		0,2	4,2	0,0
<b>Diterpenes</b>		0,0	0,0	0,0
<b>Dérivés non terpéniques</b>		0,5	4,0	1,3
<b>Total identifiés</b>		<b>99,9</b>	<b>98,1</b>	<b>99,8</b>

LRI : Indices de rétention linéaires.

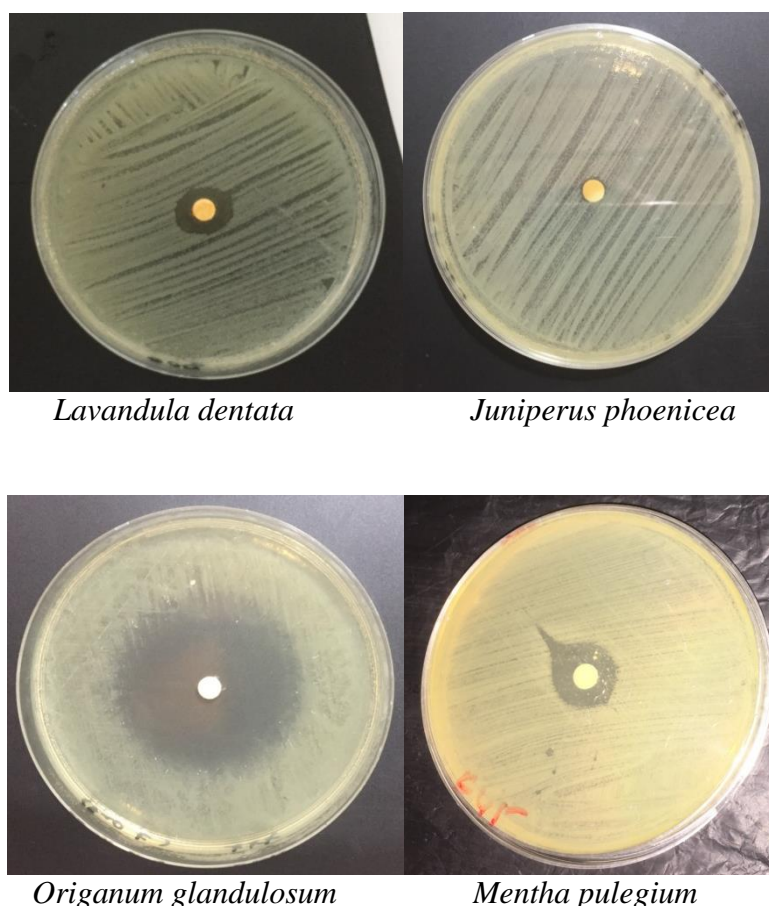
### 8.3. Etude du pouvoir antibactérien des huiles essentielles

#### 8.3.1. Résultats de la méthode de diffusion sur gélose

Les résultats des diamètres des zones d'inhibitions des huiles essentielles des quatres plantes sont sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE sont présentés dans le tableau 8 et illustrés par la figure 19.

**Tableau 8 . Diamètres des zones d'inhibitions (mm) des huiles essentielles : *Origanum glandulosum*, *Lavandula dentata* et *Mentha plulegium* et sur *Klebsiella pneumoniae* BLSE**

Souches	<i>Origanum glandulosum</i>	<i>Lavandula dentata</i>	<i>Mentha plulegium</i>
Souche 1	45.3333±0.57	10.3333 ±0.57	13.6667 ±0.57
Souche 2	35.3333 ±0.57	10.3333 ±0.57	14.6667 ±0.57
Souche 3	51 ±1	9.3333 ± 0.57	13.3333 ± 0.57
Souche 4	30.3333 ±0.57	9.3333 ± 0.57	13.3333 ±0.57
Souche 5	41 ±1	9.3333 ±0.57	12.6667 ±0.57
Souche 6	40.3333 ±0.57	8.3333 ±0.57	12±0
Souche 7	44.6667 ±0.57	9.3333 ±0.57	11.6667 ±0.57
Souche 8	43.6667 ±0.57	9.6667 ±0.57	13.3333 ±0.57
Souche 9	59.6667 ±6.35	8.3333 ±0.57	12.3333 ±0.57
Souche 10	41.3333 ±1.15	9.3333 ±0.57	12.3333 ±0.57
Souche 11	39.6667 ±0.57	9.3333 ±0.57	13.3333 ±0.57
Souche 12	43.6667 ±0.57	9 ± 0	14 ± 0
Souche 13	39.6667 ±0.57	7.6667 ±0.57	11 ± 0
Souche 14	45.6667 ±0.57	8 ± 0	12.3333 ± 0.57
Souche 15	44.3333 ±0.57	11 ± 0	15 ± 0
Souche 16	49.6667 ±0.57	10.3333 ±0.57	14 ± 0
La moyenne	43,4583±6,62670	9,3125±0,99266	13,0625±1,13749
<i>p-value</i>	$p \leq 0.01$	$p = 0.001$	$p \leq 0.01$



**Figure 19. Effet des huiles essentielles étudiées sur des souches Kp-BLSE.**

Les huiles essentielles extraites de la partie aérienne de *Lavandula dentata* exercent une activité inhibitrice moyenne de la croissance vis-à-vis nos souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE avec une moyenne de  $9,31 \pm 1$  mm (Tableau 8). Ces résultats corroborent ceux mentionnés par d'autres chercheurs : (Bachiri et al., 2016, 2017 ; Ramdan et al., 2018), par contre, Senouci et Abdelouahid (2010) ont trouvé que les huiles essentielles de *L. dentata* présentaient une très faible activité antibactérienne contre des souches de *K. pneumoniae* résistante aux antibiotiques (06.7 mm) (Figure 19).

Les diamètres des zones d'inhibition d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium*, montrent une activité remarquable contre les mêmes souches avec une moyenne de  $43,45 \pm 6,62$  mm et  $13,06 \pm 1,13$  mm respectivement, *Juniperus phoenicea* n'a exercé aucune activité antibactérienne. Nos résultats étaient en accord avec ceux rapportés par Boukhebti et al. (2011) qui ont trouvé que la zone d'inhibitions de l'HE de *M. pulegium* contre des souches de *K. pneumoniae* était 10 mm, et ceux trouvés par Bendahou et al. (2008) qui ont remarqué dans leur étude que l'huile d'*O. glandulosum* extraite par la méthode d'hydrodistillation présentait une activité antimicrobienne contre dix souches à Gram négatif avec des zones



d'inhibition variant de 8 à 34 mm, et par Bekhechi et *al.* (2008) qui ont remarqué que l'huile essentielle d'*O. glandulosum* agit de façon très active sur l'ensemble des souches testées à Gram négatif et à Gram positif, sauf deux souches de *Pseudomonas* qui se révèlent très résistantes. Aussi par Nabti et *al.* (2020) qui ont rapporté que les huiles essentielles d'*O. glandulosum* présentaient une bonne activité antibactérienne contre des souches d'*E. coli* uropathogènes multirésistantes.

### 8.3.2. Résultats des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

Les huiles essentielle d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium* sont révélées les plus actives avec des valeurs moyennes de CMI / CMB égales à 5,1443 / 7,3573 mg/mL et 7,227 / 10,645 mg/mL respectivement suivis par *Lavandula dentata* avec des valeurs moyennes de CMI / CMB égales à 40,625 / 48,046 mg/mL respectivement (Tableau 09).

**Tableau 9. Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (mg/ml) des huiles essentielles des plantes utilisées.**

souches	<i>Origanum glandulosum</i>		<i>Lavandula dentata</i>		<i>Mentha plulegium</i>	
	CMI (m/v)	CMB (m/v)	CMI (m/v)	CMB (m/v)	CMI (m/v)	CMB (m/v)
<b>Souche 1</b>	5,2083 ±1,80422	8,3333± 3,60844	41,6667± 14,43376	58,3333± 38,18813	5,2100 ± 1,80133	10,4167± 3,60844
<b>Souche 2</b>	5,2083 ±1,80422	8,3333± 3,60844	8,3333± 3,60844	10,4167 3,60844	2,0833 ±0,90644	5,2100 ±1,80133
<b>Souche 3</b>	7,2917 ±4,77352	8,3333 ±3,60844	66,6667± 28,86751	66,6667 ± 28,86751	10,4167± 3,60844	10,4167± 3,60844
<b>Souche 4</b>	1,5607±0,0 0115	2,6033± 0,90355	33,3333 ±14,43376	33,3333 ± 14,43376	8,3333± 3,60844	10,4167 ± 3,60844
<b>Souche 5</b>	3,6467±2,3 8731	3,6467±2,3 8731	16,6667± 7,21688	33,3333± 14,43376	20,8333± 7,21688	20,8333± 7,21688
<b>Souche 6</b>	4,1700 ±1,80133	8,3333± 3,60844	16,6667 ±7,21688	25,0000 ± 21,65064	4,1700 ±1,80133	5,2100 ±1,80133
<b>Souche 7</b>	3,6467± 2,38731	3,6467 ± 2,38731	66,6667 ±28,86751	66,6667 ±28,86751	3,1233 ± 2,70777	16,6667± 7,21688
<b>Souche 8</b>	5,2100 ± 1,80133	8,3333 ±3,60844	33,3333 ±14,43376	41,6667± 14,43376	4,1700 ± 1,80133	5,2100 ± 1,80133
<b>Souche 9</b>	4,1700 ±1,80133	5,2100± 1,80133	66,6667 ± 28,86751	66,6667± 28,86751	4,1700 ±1,80133	4,1700± 1,80133
<b>Souche 10</b>	2,6067± 0,90644	2,6067 ±0,90644	66,6667± 28,86751	66,6667 ± 28,86751	2,0833 ± 0,90644	2,6067± 0,90644
<b>Souche 11</b>	8,3333 ± 3,60844	10,4167± 3,60844	41,6667 ±14,43376	66,6667 ±28,86751	10,4167 ±3,60844	20,8333± 7,21688
<b>Souche 12</b>	10,4167 ±	10,4167±	41,6667±	41,6667 ±	3,1233 ±	5,2100±



## Chapitre 2 : Résultats et discussion

	3,60844	3,60844	14,43376	14,43376	2,70777	1,80133
<b>Souche 13</b>	4,1700± 1,80133	5,2100 ±1,80133	41,6667 ±14,43376	41,6667± 14,43376	16,6667± 7,21688	33,3333± 14,43376
<b>Souche 14</b>	2,0833 ±0,90644	5,2100 ±1,80133	33,3333 ±14,43376	41,6667 ±14,43376	5,2100 ±1,80133	10,4167± 3,60844
<b>Souche 15</b>	10,4167 ± 3,60844	20,8333± 7,21688	41,6667 ±14,43376	66,6667 ± 28,86751	2,0833 ±0,90644	5,2100 ±1,80133
<b>Souche ATCC</b>	4,1700± 1,80133	6,2500±0	33,3333 ±14,43376	41,6667± 14,43376	4,1733 ± 1,80711	4,1700 ±1,80133
<b>La moyenne</b>	5,1443± 3,31733	7,3573±5, 07508	40,625± 23,52709	48,046±25, 72603	7,227±6,086 27	10,645±9,2 7751

Selon le test de Kruskal wallis, les CMI des HEs d'*Origanum glandulosum*, de *Lavandula dentata* et de *Mentha pulegium* ont des effets significatifs sur les Kp-BLSE ( $p < 0.05$ ).

En se référant à Canillac et Mourey (2001), si le rapport CMB / CMI est inférieur ou égal à 4, la souche est considérée comme sensible ; si ce rapport est supérieur à 4, la souche est considérée comme tolérante, donc nous pouvons conclure que nos huiles essentielles des trois espèces ont un pouvoir bactéricide vis-à-vis les souches utilisées.

En comparant nos résultats des CMI et des CMB avec des travaux antérieurs, Bendahou et al. (2008) ont trouvé que les *K. pneumoniae* ont été inhibé par l'huile essentielle de l'*O. glandulosum* avec une CMI de 5900 µg/mL. Bekhechi et al. (2008) ont rapporté que les souches de klebsielle et de *Listeria* sont inhibées à partir d'un même seuil de concentrations d'huile essentielle, soit entre 2180 et 2350 µg/mL.

La nature antimicrobienne des huiles essentielles d'*O. glandulosum* était peut être liée à ses composants phénoliques, tels que le thymol, le carvacrol, le *p*-cymène et  $\gamma$ -terpinène. Il a été suggéré que les dérivés phénoliques peuvent provoquer des activités perturbant la membrane cellulaire (Bendahou et al., 2008). En effet Nabet et al., (2017) ont rapporté que les composants phénoliques (thymol et carvacrol) et leurs précurseurs présents dans les huiles essentielles sont responsables de la forte activité antifongique. Nabti et al. (2020) ont trouvé que le carvacrol et le thymol étaient les composants les plus actifs et présentaient une bonne activité antibactérienne, le *p*-cymène était moins actif, tandis que le  $\gamma$ -terpinène était totalement inactif contre toutes les souches testées.

Il a été mentionné dans la littérature que les huiles essentielles d'origan ont la capacité de sensibiliser la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire, provoquant une augmentation de la perméabilité et des fuites des constituants intracellulaires vitaux ou une altération des systèmes enzymatiques des bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Nabet et al., 2017 ; Dutra et al., 2019).

Vu la disponibilité de ces espèces en Algérie, et leur richesse en huiles essentielles ainsi que l'homogénéité et la stabilité de la composition chimique de leur huiles essentielles, *Origanum glandulosum* susceptible d'avoir un intérêt industriel et peut être également recommandée comme une source potentielle de thymol (Bekhechi et al., 2008).

En revanche, l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Lavandula dentata* Marocaine sont assez différentes de l'huile Algérienne, des différents résultats ont été trouvés dans d'autres études, Bachiri et al. (2016) ont trouvé que les *K. pneumoniae* ont été inhibé par cette même huile avec des CMI / CMB égale à 0.14 / 0.16 mg/mL respectivement. Dans une autre étude, Dammak et al. (2019) ont montré que l'addition de 1,8-cinéole de *Lavandula dentata* a inhibé de manière significative l'extension mycélienne d'*Aspergillus carbonarius* avec un taux d'inhibition de 37,92%.

Plusieurs résultats des CMI et CMB de HEMP ont été discutés dans différentes études : Tutar et al. (2016) ont trouvé dans leur étude des valeurs des CMI /CMB de l'HEMP sur 15 souches d'*Acinetobacter baumannii* étaient de : 0,6 à 2.5 / 2.5 à 5 µl /mL respectivement, Mahboubi et Haghi. (2008) ont trouvé des valeurs des CMI/CMB sur des bactéries à Gram négative de : 2 à 4 / 4 µl/mL. Certaines études antérieures ont rapporté que la pulegone, l'isomenthone, la pipériténone présentaient des activités antibactériennes et antifongiques élevées (Tutar et al., 2016).

La composition de cet HE a fait l'objet de plusieurs études dont on peut conclure que les plantes présentent une variabilité chimique. En effet, l'activité biologique des huiles essentielles dépend de la composition chimique qui, elle, est déterminée par plusieurs facteurs, intrinsèques : le génotype, et extrinsèques : le biotope, les conditions de récolte des plantes, les méthodes d'extraction (Bachiri et al., 2017 ; Dammak et al., 2019).

Sur le plan mode d'action des HEs sur les cellules bactériennes, il paraît plus probable que l'activité antimicrobienne résulte de l'association conjointe de plusieurs mécanismes sur différentes cibles cellulaires, dont les composés phénoliques auraient pour cible la membrane plasmique et la paroi, d'autres agents compromettent plutôt l'intégrité structurale de la

membrane plasmique en induisant une perte du matériel cytoplasmique, au moment où la cible pour d'autres est probablement l'ADN bactérien suite à la diffusion à travers les membranes bactériennes (Bachiri et *al.*, 2017).

### 8.4. Résultats du test de la cytotoxicité des huiles essentielles sur les lymphocytes humains

La cytotoxicité des huiles sur les lymphocytes humains est indiquée dans la figure 20. Les huiles de *Lavandula*, *Origanum* et *Mentha* n'ont pas montré des effets cytotoxiques et aucune réduction significative de la viabilité cellulaire n'a été observée pour toutes les concentrations testées.

La chaîne respiratoire et d'autres systèmes de transport des électrons réduisent le MTT et d'autres sels de tétrazolium et forment ainsi des cristaux de formazan violets non hydrosolubles à l'intérieur de la cellule. La quantité de ces cristaux peut être déterminée par spectrophotométrie et sert d'estimation du nombre des mitochondries et donc du nombre des cellules vivantes dans l'échantillon. Ces caractéristiques peuvent être mises à profit dans des tests de cytotoxicité ou de prolifération cellulaire. Donc les enzymes cellulaires clivent les sels de tétrazolium en formazan, dont la concentration est directement proportionnelle au nombre des cellules métaboliquement actives dans la culture, qui sont largement utilisés en immunologie, en toxicologie et en biologie cellulaire. Cette propriété a déjà été discutée dans la littérature, où il a été souligné que différents profils chimiques ont été liés à différentes activités biologiques (Nikolić et *al.*, 2014).

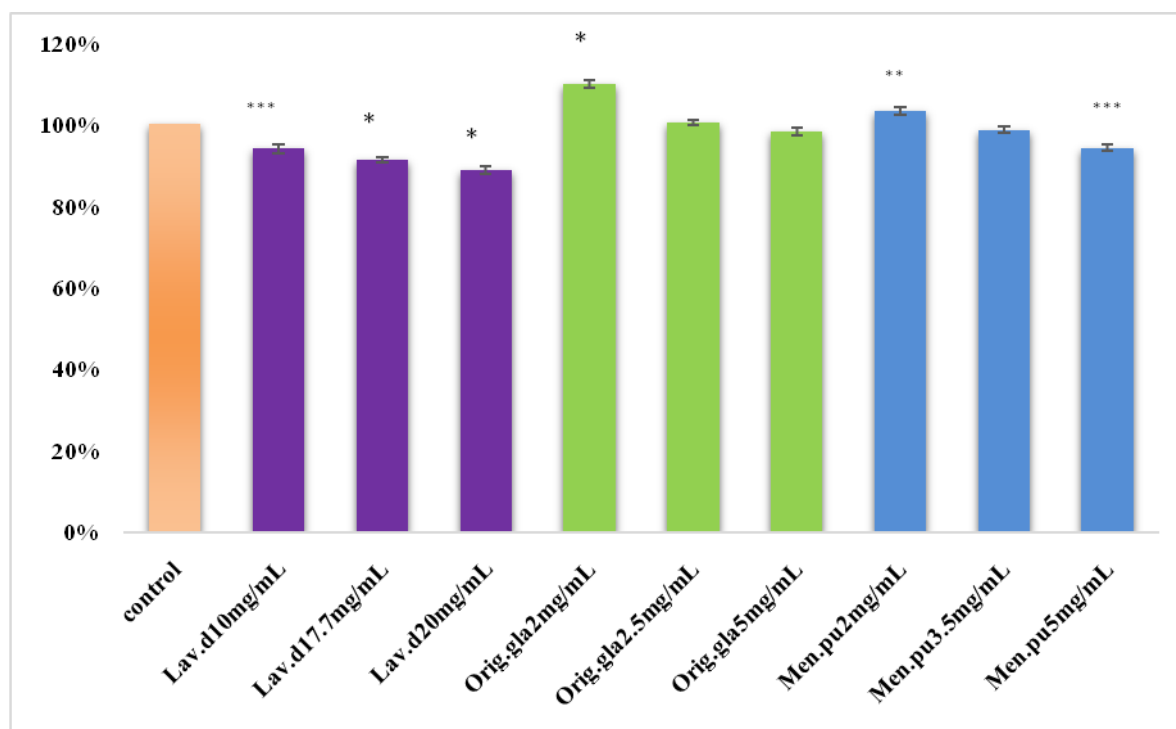
Nos résultats étaient proches à ceux trouvés dans la littérature par plusieurs auteurs : Gonçalves et *al.*, (2010) ont rapporté dans leur étude que l'incubation de FSDC (La lignée cellulaire dendritique de peau de souris foetale) avec l'huile essentielle de *Thymus zygis* ssp. *sylvestris* à 0,08 et 0,16  $\mu\text{l} / \text{mL}$  pendant aussi longtemps que 24 h, n'a montré aucun effet cytotoxique. Giongo et *al.*, (2017) ont trouvé que l'huile essentielle de *Canelilla* n'a pas montré un effet cytotoxique sur les lymphocytes humains pour toutes les concentrations et les temps testés. Abu-Darwish et *al.*, (2013) ont évalué l'activité cytotoxique possible de l'huile essentielle de *Salvia officinalis* dans les macrophages et les kératinocytes, ils ont prouvé qu'après 24h d'exposition au LPS n'ont eu aucun effet significatif sur la viabilité cellulaire (pour des concentrations de 0,64, 0,32 et 0,16  $\mu\text{L} / \text{mL}$ , l'huile n'a pas montré une cytotoxicité significative).

Il est indispensable de tester la cytotoxicité surtout des substances qui ont des bons profils des activités biologiques, par exemple, il a été démontré que l'huile de myrte au citron possède une activité antimicrobienne importante contre différents micro-organismes. Cependant, des tests de cytotoxicité *in vitro* ont indiqué que cette huile avait un effet très toxique contre les cultures cellulaires primaires de fibroblastes de la peau humaine (Gonçalves *et al.*, 2010).

Dans une autre étude, ils ont montré que l'huile de lavande est cytotoxique *in vitro* sur les cellules de la peau humaine (cellules endothéliales et fibroblastes) à une concentration de 0,25% (v / v) (Prashar *et al.*, 2004).

Sinha *et al.*, (2014) ont détecté dans leur étude une réduction de la viabilité des lymphocytes humains traités avec les huiles essentielles de palmarosa, citronella et lemongrass, conduit a une perte de l'intégrité de la membrane plasmique associée à la nécrose.

De plus, le carvacrol est connu pour être toxique pour les cellules des mammifères à des concentrations élevées. Il peut induire la mort cellulaire des cellules CaCo-2 et réduire la prolifération et la viabilité des cellules Hep-2. Par contre, des effets protecteurs de l'ADN ont été observés avec le carvacrol sur des cellules de mammifères cultivées *in vitro* (Gonçalves *et al.*, 2010). Le traitement des cellules épithéliales intestinales porcines avec > 5 mM de carvacrol a perturbé leur barrière épithéliale et inhibé la prolifération *in vitro* des lymphocytes porcines et des cellules épithéliales intestinales (Gonçalves *et al.*, 2010). Les tests MTT effectués sur des lymphocytes traités pendant 24 h avec les mêmes quantités d'extrait brut contenant des protéines PL (Potamine-like) ont indiqué que la viabilité cellulaire était au moins 80–90% prouvé par Notariale *et al.*, (2018).



**Figure 20.** Effet des huiles essentielles de *L.dentata*, *O. glandulosum* et *M. pulegium* sur la viabilité cellulaire des lymphocytes humains (test MTT) : Viabilité (%) des lymphocytes humains ( $1 \times 10^6$  cellules / mL) incubées avec du milieu seul (contrôle), et avec *Lavandula* (10 mg / mL, 17.7 mg / mL, 20 mg / mL) *Origanum* ( 2 mg / mL , 2.5 mg / mL, 5 mg / mL), *Mentha* (2 mg / mL, 3.5 mg / mL, 5 mg / mL) pendant 24h. L'analyse statistique a été réalisée par le test ANOVA à un facteur suivie de test de Tukey (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  \*\*; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 8.5. Résultat de la mesure des fuites des acides nucléiques

La mesure de marqueurs de fuite cellulaire spécifiques tels que les matériaux absorbants à 260 nm est un indicateur de la sensibilité de la membrane à un agent antimicrobien spécifique par rapport aux cellules non traitées.

L'absorption à 260 nm des filtrats de traitement et de contrôle était significativement différente. La figure 21 montre la présence de matériaux absorbant à 260 nm dans les filtrats de *K. pneumoniae* traitées. Des augmentations significatives de l'absorption à 260 nm se sont produites après le traitement avec les CMI des huiles essentielles de *Lavandula dentata*, *Origanum glandulosum* et *Mentha pulegium* ( $P < 0,05$ ). Les filtrats témoins ont montré des absorbances de :  $0,003A^\circ$ ,  $0,002A^\circ$  et  $0,003A^\circ$  respectivement, alors que les filtrats traités ont donné des absorbances de  $1,417A^\circ$  pour *Origanum glandulosum*,  $1,342A^\circ$  pour *Lavandula dentata* et  $1,380A^\circ$  pour *Mentha pulegium*.

Cela indique directement la confirmation d'une fuite de matériaux absorbants à 260 nm provenant des cellules bactériennes traitées avec nos huiles essentielles et suggère qu'ils ont provoqué des dommages importants et irréversibles de la membrane cytoplasmique et une perturbation de la perméabilité.

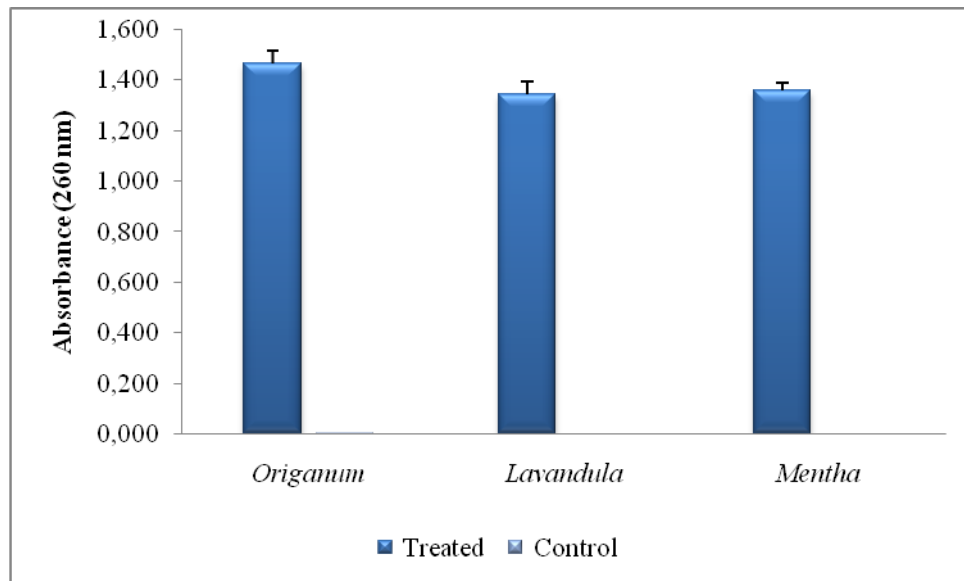
Ceci est cohérent avec plusieurs résultats précédents : Bajpai et *al.* (2013) ont rapporté que les cellules de *B. cereus* ATCC 13061 et *E. coli* O157: H7 ATCC 43889 exposées au HE de *Cudrania tricuspidata* à la concentration de CMI a révélé une libération croissante de matériaux absorbants à 260 nm en fonction du temps d'exposition, cependant, après 60 minutes de traitement, une augmentation d'environ plus de 2 fois a été observée dans la densité optique des filtrats de culture cellulaire bactérienne.

Paul et *al.*, (2011) ont montré que l'exposition des cellules ATCC 6633 de *B. subtilis* à l'huile essentielle de *Trachyspermum ammi* a causé une perte rapide de matériau absorbant à 260 nm avec une libération des ions de potassium.

Chez *E. coli* O157: H7 et *Salmonella typhi*, l'absorbance à 260 nm était de 0,111 et 0,047 avec l'huile essentielle de la moutarde, alors qu'elle était mesurée à 0,017, 0,101 pour les témoins (Turgis et *al.*, 2009).

L'HE d'origan espagnol, HE de sarriette d'hiver, HE de cannelle chinoise, la vanilline et  $\alpha$ -pinene induit une perte de matériaux absorbant à 260 nm, où des acides nucléiques ayant fui à travers la membrane cytoplasmique endommagée ont été observés parmi les matériaux absorbant 260 nm (Turgis et *al.*, 2009).

L'hydrophobicité est une caractéristique importante des huiles essentielles et de leurs principaux composants (le carvacrol, les terpènes, les phénols, les aldéhydes et les cétones) qui leur permet de s'accumuler dans les membranes cellulaires bactériennes et fongique provoquant leur perturbation et pourraient être responsables de l'activité antibactérienne (Turgis et *al.*, 2009 ; Paul et *al.*, 2011 ; Diao et *al.*, 2014).



**Figure 21. Effet des huiles essentielles de *L.dentata*, *O.glandulosum* et *M.pulegium* sur la libération des matériaux absorbant à 260 nm des *Klebsiella pneumoniae* BLSE.**

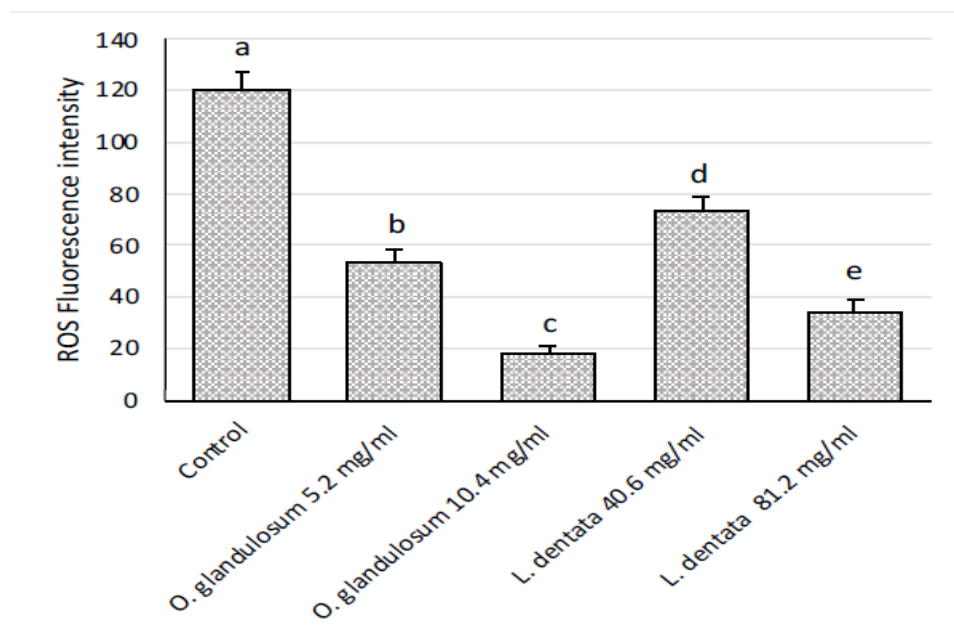
### 8.6. Dosage de la production des espèces réactive de l'oxygène (ERO)

Comme on peut le voir dans la figure 22, la production d'ERO dans les leucocytes PMN diminue lorsqu'ils sont traités avec les huiles d'*O. glandulosum* et de *L. dentata* par rapport au témoin. En particulier, l'huile d'*O. glandulosum* est plus actif que celui de *L. dentata* déjà à la concentration la plus faible (4 mg / ml).

La production excessive des ERO est délétère pour les cellules et les tissus, car ils modifient la structure et la fonction des biomolécules.

Les huiles essentielles d'*O. glandulosum* et *L. dentata* ont montré des effets inhibiteurs sur la production des leucocytes ERO par rapport aux cellules témoins non traitées. Ainsi, ces extraits peuvent agir en tant qu'agents anti-inflammatoires qui peuvent être efficaces pour protéger l'organisme d'une production excessive des ERO via une activité de piégeage des radicaux.

Le test de génération des espèces réactive de l'oxygène confirme l'activation des lymphocytes sous les traitements aux huiles essentielles qui est très intéressante car ces cellules jouent un rôle crucial dans le système immunitaire. Ainsi, les huiles essentielles, en plus de lutter contre les infections bactériennes, pourraient également être capables d'activer le système immunitaire.



**Figure 22. Effet des huiles essentielles (*O. glandulosum* 5,2 et 10,4 mg/mL et *L. dentata* 40,6 et 81,2 mg/mL) sur la production d'ERO dans les neutrophiles polymorphonucléaires (NPM). Les données ont été présentées sous forme d'erreur moyenne et standard et ont été analysées avec un test t apparié. Les barres non accompagnées de la même lettre étaient significativement différentes à  $p < 0,05$ .**

### 8.7. Microscopie Electronique à Transmission de *Klebsiella pneumoniae* (MET)

Pour rendre ces résultats plus adéquats et complets, et afin d'analyser la forme des cellules bactériennes après traitement avec les huiles essentielles de l'*Origanum glandulosum* et de *Lavandula dentata* nous avons effectué des observations avec TEM.

Les micrographies électroniques ont montré des altérations de l'apparence typique des cellules traitées aux huiles essentielles par rapport à celles non traitées. En fait, ces dernières ont perdu la forme typique de bâtonnet et apparaissent globulaires, suggérant un changement de la paroi cellulaire, qui maintient la forme correcte de la cellule.

La souche *K.pneumoniae* traitée par l'origan semblait différente de la souche non traitée, ces derniers sont apparus sous forme de bâtonnet, délimitées par une paroi cellulaire multicouche bien visible. Les échantillons traités par l'origan ont développé une capsule externe constituée d'un réseau de filaments bouclés et de renflements de la paroi cellulaire.

Comparées à celles non traitées, les bactéries traitées par la lavande ont développé des changements ultrastructuraux similaires à ceux induits par l'origan. La surface des cellules



présentait un réseau de fibrilles, suggérant une capsule externe et des vésicules bourgeonnantes (Figure 23).

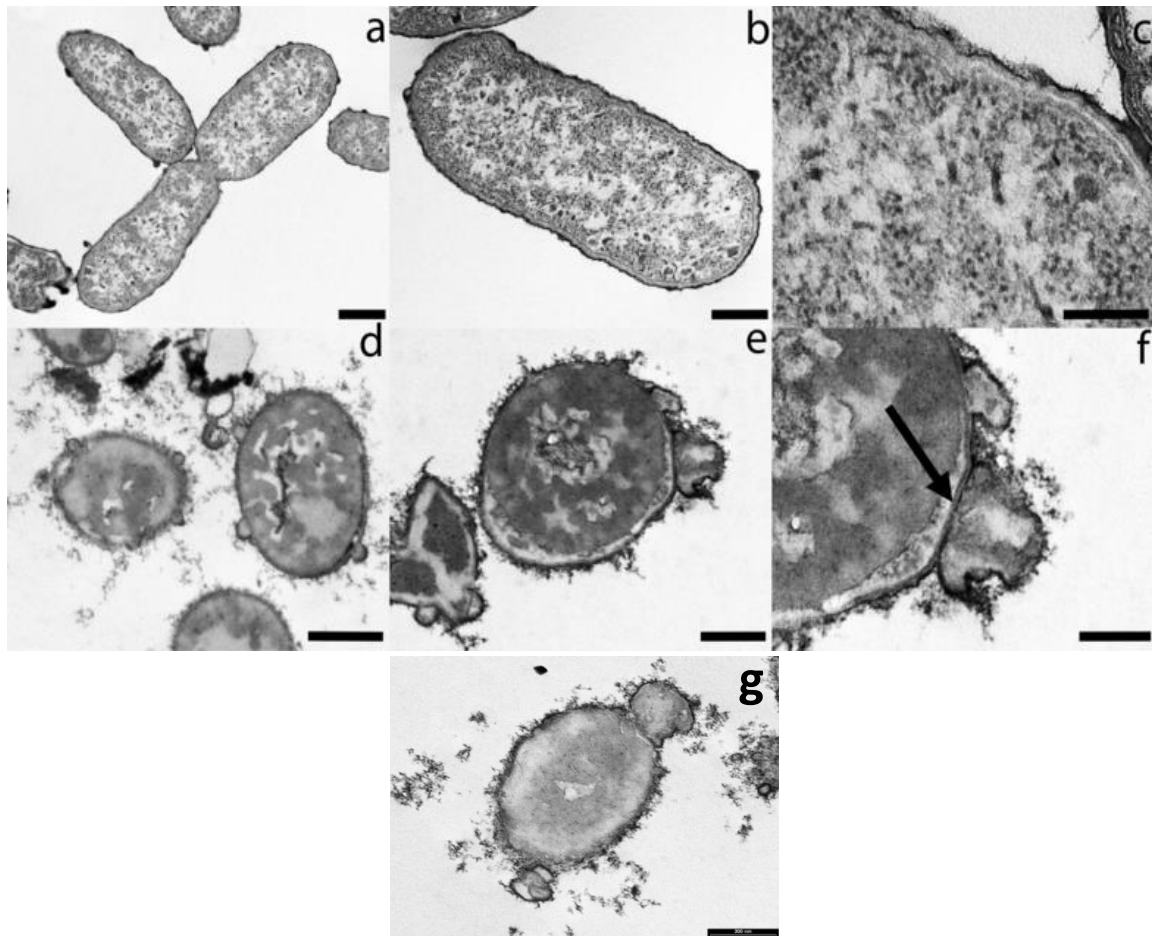
Les données de la littérature montrent des dommages à la paroi cellulaire bactérienne sous les traitements aux huiles essentielles. Rasooli et *al.*, (2006) ont observé des effets sévères des huiles essentielles de thym sur la paroi cellulaire de *Listeria*, conduisant à une rupture de la paroi qui a perdu sa douceur et son uniformité. Dutra et coll. (2019) ont montré une perturbation de la paroi cellulaire et une déformation de l'intégrité d'*Alicyclobacillus* spp. après traitement avec l'huile essentielle d'*Origanum vulgare*.

Il a déjà été signalé que les monoterpènes, agissent à la fois sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif endommageant leur biomembranes, et perturbant en particulier la fraction lipidique de la membrane plasmique, entraînant à la perméabilité membranaire et la fuite des matériaux intracellulaires (Heydari et *al.*, 2018).

L'aspect bombé de nos cellules traitées est en accord avec Yang et *al.*, (2020), qui ont conclu que *K. pneumoniae* multi-résistante aux antibiotiques lors d'une exposition à l'huile essentielle de lavande a développé une enveloppe ondulée avec des irrégularités, bien évidentes sous un microscope électronique à balayage SEM. Yang et *al.*, (2020) ont également démontré une perturbation des membranes bactériennes sous traitement aux huiles essentielles via le stress oxydatif, ce qui est cohérent avec nos observations de surfaces bombées sous TEM. Notre image montrant la saillie de la membrane externe, qui est endommagée en premier, alors que la continuité de la paroi cellulaire et de la membrane interne est encore préservée, pourrait représenter une première étape dans l'endommagement de la surface bactérienne. En fait, il a été constaté que l'huile essentielle de lavande modifiait la perméabilité de la membrane bactérienne des souches de *K. pneumoniae* multi-résistantes aux antibiotiques (Yang et *al.*, 2020).

Un changement de perméabilité de la membrane pourrait facilement conduire à des phénomènes de gonflement, donnant des images de bombement de surface comme celles que nous avons observées sur nos échantillons traités aux huiles essentielles. Et lorsque la perturbation concerne à la fois les membranes et la paroi cellulaire, une fuite de matériel cytoplasmique se produit (Yang et *al.*, 2020). La perte de matière cellulaire est démontrée par nos découvertes sur la libération accrue de matériau absorbant à 260 nm par les cellules bactériennes après exposition aux huiles essentielles. Cela suggère également que les huiles

essentielles ont causé des dommages importants et irréversibles à la membrane cytoplasmique et une perturbation de la perméabilité. Ceci est également cohérent avec les résultats précédents montrant des données similaires relatives aux huiles essentielles végétales testées contre les souches bactériennes (Turgis et *al.*, 2009 ; Paul et *al.*, 2011 ; Bajpai et *al.*, 2013; Hernández-González et *al.*, 2017).



**Figure 23. Microscopie Electronique à Transmission de *Klebsiella pneumoniae*: La figure montre des micrographies TEM des échantillons de *K. pneumoniae* non traité (a-c) et *K. pneumoniae* traité avec de l'huile essentielle d'*O. glandulosum* et *Lavandula dentata* à la valeur moyenne de la CMI (d-f). (a) Trois cellules typiques en forme de bâtonnet. Ceux alignés se divisent toujours. (b) Une cellule bactérienne prise à un grossissement plus élevé montre le protoplasme granuleux délimité par une paroi cellulaire externe lisse. (c) Le détail d'une cellule bactérienne montre le protoplasme granuleux et la surface multicouche, pris à un grossissement plus élevé. (d) Les cellules bactériennes traitées avec des huiles essentielles perdent leur apparence en forme de**

bâtonnet. Le protoplaste, sans aspect granuleux, apparaît moyennement dense sur de grandes surfaces. (e- g) Une cellule bactérienne globulaire avec une apparence modifiée.

Le protoplaste, non granuleux, est dense en électrons sur de grandes surfaces. La surface a développé de gros renflements et une matière velue externe. (f) Détails d'une cellule modifiée prise à un grossissement plus élevé. La flèche montre la continuité de la membrane interne et de la paroi cellulaire. Barres d'échelle : 500 nm (a, d); 300 nm (b, e); 200 nm (c, f).

---

# Conclusion

### Conclusion

L'objectif assigné à cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur de certaines huiles essentielles des plantes aromatiques sur des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrice de  $\beta$ -lactamase à spectre élargie.

Les infections causées par les bacilles à Gram négatif productrices de BLSE sont en augmentation, en particulier chez les patients immunodéprimés qui ont été hospitalisées pour des maladies sous-jacentes graves ou en unité des soins intensifs. En revanche, ces infections étaient associées à un coût de santé plus important en Algérie et à travers le monde suite à la prolongation de la durée d'hospitalisation et au recours à des médicaments onéreux pour le traitement de ce genre d'infections.

La fréquence de *K.pneumoniae* productrices de BLSE que nous avons mise en évidence est le reflet du niveau de l'hygiène dans l'hôpital.

La détection moléculaire et l'identification des bêta-lactamases et une meilleure connaissance sur la formation de biofilm seraient essentielles pour une enquête épidémiologique fiable sur la résistance aux antimicrobiens, et les organismes producteurs de BLSE doivent être identifiés rapidement afin de mettre en œuvre l'utilisation appropriée d'antibiotiques et les mesures de contrôle des infections.

Nos hôpitaux devrait mettre en place des moyens préventifs du risque de transmission de ces agents par le dépistage de portage de bactéries multirésistantes, lavage des mains, port des gants et des blouses, ainsi l'isolement des patients ayant un germe producteur de BLSE. Les établissements de santé doivent également suivre des procédures de nettoyage strictes pour empêcher la propagation des *Klebsiella pneumoniae* productrices de BLSE et un meilleur contrôle de la consommation des antibiotiques seraient toutefois des facteurs favorisant une meilleure maîtrise des risques.

Les huiles essentielles extraites de la partie aérienne d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium*, montrent une activité remarquable contre nos souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE. *Lavandula dentata* exercent une activité inhibitrice moyenne contre les mêmes souches. *Juniperus phoenicea* n'a exercé aucune activité antibactérienne.

## Conclusion

---

Les huiles essentielles de *Lavandula*, *Origanum* et *Mentha* n'ont pas montré des effets cytotoxiques et aucune réduction significative de la viabilité cellulaire n'a été observée pour toutes les concentrations testées.

L'absorption à 260 nm des filtrats de traitement et de contrôle était significativement différente. Par la présence de matériaux absorbant à 260 nm dans les filtrats de *K. pneumoniae* traitées et des augmentations significatives de l'absorption à 260 nm se sont produites après le traitement avec les CMI des huiles essentielles de *Lavandula dentata*, *Origanum glandulosum* et *Mentha pulegium*

Les huiles essentielles d'*O. glandulosum* et *L. dentata* ont montré des effets inhibiteurs sur la production des leucocytes ERO par rapport aux cellules témoins non traitées. Ainsi, ces extraits peuvent agir en tant qu'agents anti-inflammatoires qui peuvent être efficaces pour protéger l'organisme d'une production excessive des ERO via une activité de piégeage des radicaux.

Les micrographies électroniques ont montré des altérations de l'apparence typique des cellules non traitées. En fait, les cellules traitées aux huiles essentielles ont perdu la forme typique de la tige et apparaissent globulaires, suggérant un changement de la paroi cellulaire, qui maintient la forme correcte de la cellule.

Nos résultats *in vitro* sont encourageants, présentent une remarquable activité antibactérienne et bactéricide contre les souches de *K. pneumoniae* résistantes aux antibiotiques, sans cytotoxicité sur les lymphocytes humains. Au lieu de cela, ils pourraient même potentialiser la réponse immunitaire, ainsi, compte tenu du rendement intéressant de l'extraction à partir des plantes sélectionnées et de l'occurrence croissante des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, elles sont suggérées comme candidats potentiels pour des médicaments antibactériens, même si des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer la biodisponibilité, les activités *in vivo* et la sécurité, pour enfin confirmer leur application potentielle à la santé humaine.

---

# Références bibliographiques

### Références bibliographiques

1. **Abebe**, G. M. (2020). The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology*, 2020: 1-10. doi:10.1155/2020/170 5814.
2. **Abrar**, S., Vajeeha, A., Ul-Ain, N., Riaz, S. (2017) Distribution of CTX-M group I and group III  $\beta$ -lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Lahore, Pakistan. *Microbial Pathogenesis*, 103, 8-12.
3. **Abu-Darwish**, M. S., Cabral, C., Ferreira, I. V., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Salgueiro, L. (2013) Essential Oil of Common Sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of Safety in Mammalian Cells and Its Antifungal and Anti-Inflammatory Potential. *BioMed Research International*, 1–9. doi:10.1155/2013/538940.
4. **ADAMS**, R. P. (1995) Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation. 1-69.
5. **Agladze**, K., Wang, X., & Romeo, T. (2005) Spatial Periodicity of *Escherichia coli* K-12 Biofilm Microstructure Initiates during a Reversible, Polar Attachment Phase of Development and Requires the Polysaccharide Adhesin PGA. *Journal of Bacteriology*, 187(24), 8237–8246. doi:10.1128/jb.187.24.8237-8246.2005.
6. **Ahmed**, O. I., El-Hady, S. A., Ahmed, M., and Ahmed, I. Z. (2013) Detection of *bla* SHV and *bla* CTX-M genes in ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Egyptian patients with suspected nosocomial infections. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 14 (3), 277-283.
7. **Ahoyo**, A. T., Baba-Moussa, L., Anagon, A. E. (2007) Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de bêta lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 37 (11), 746-752.
8. **Aitboulahsen**, M., Zantar, S., Amin, L., Mohammed, E., Abdelhay, A., Chairi, H., Hassani Zerrouk, M. (2018) Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Against Pathogens Isolated from Food, Crops and Hospitals in Morocco. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(6), 1450–1459. doi :10. 1080/09 72060x.2019. 1570348.
9. **Ait-Ouazzou**, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Conchello, P. (2012) Evaluation of the chemical composition and antimicrobial



- activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, 45(1), 313–319. doi:10.1016/j.foodres.2011.09.004.
- 10. Akrouit A.**, (2004), Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie), *Cahiers Options Méditerranéennes*, 62, 289-292.
- 11. Akturk, H.**, Sutcu, M., Somer, A., Aydın, D., Cihan, R. (2016) Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factors for progression to infection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2), 134-140.
- 12. Algieri, F.**, Rodriguez-Nogales, A., Vezza, T., Garrido-Mesa, J., Garrido-Mesa, N., Utrilla, M. P., Galvez, J. (2016) Anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Lavandula dentata* L. and *Lavandula stoechas* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 190, 142–158. doi:10.1016/j.jep.2016.05.063.
- 13. Ali, H.**, Al-Khalifa, A. R., Aouf, A., Boukhebti, H., & Farouk, A. (2020) Effect of nanoencapsulation on volatile constituents, and antioxidant and anticancer activities of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. essential oil. *Scientific Reports*, 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-59686-w.
- 14. Alibi, S.**, Ferjani, A., Boukadida, J. (2015) Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamases produced by *Klebsiella pneumoniae* clinical strains from a Tunisian Hospital. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 45(4), 139-143.
- 15. Aligiannis, N.**, Kalpotzakis, E., Mitaku, S., Chinou, IB. (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem*, 40, 4168-70.
- 16. Alitonou, G.**, Avlessi, F., Sohounhloue, D., Agnaniyet, H., Bessiere, J., Menut, C. (2006) Investigations on the essential oil of *Cymbopogon giganteus* from Benin for its potential use as an anti-inflammatory agent. *International Journal of Aromatherapy*, 16(1), 37–41. doi:10.1016/j.ijat.2006.01.001.
- 17. Amalich, S.**, Zekri, N., Soro, N.K., Fadili, K., Khabbal, Y., Mahjoubi, M., Akdim, E.H, Zaïr, T. (2015) Chemical Characterization and Antibacterial Evaluation of *Juniperus phoenicea* L. Leaves and Fruits' Essential Oils from Eastern High Atlas (Morocco), *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 13(4), 881-889.
- 18. Amarti, F.**, Satrani, B., Ghanmi, M., Farah, A., Aafi, A., Aarab, L., El Ajjouri, M., Chaouch, A. (2010) Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles

- essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14(1), 141-148.
19. **Avril**, J.L., Dabernat, H., Denis, D., Monteil, H. (1992) Bacteriologie clinique, 2<sup>ème</sup> Edition. MARKETING, 185-187.
20. **Bachiri**, L., Bammou, M., Echchegadda, G., Ibibjijen, J., El Rhaffari, L., Haloui, Z., Nassiri, L. (2017) Composition Chimique Et Activité Antimicrobienne Des Huiles Essentielles De Deux Espèces De Lavande : *Lavandula Dentata* Spp. *Dentata* et *Lavandula Pedunculata* Spp. *Pedunculata*. *European Scientific Journal, ESJ*, 13(21), 293. <https://doi.org/10.19044/esj.2017.v13n21p293>.
21. **Bachiri**, L., Echchegadda, G., Ibibjijen, J., Nassiri, L. (2016) Etude Phytochimique Et Activité Antibactérienne De Deux Espèces De Lavande Autochtones Au Maroc : «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.». *European Scientific Journal, ESJ*, 12(30), 313. [doi.org/10.19044/esj.2016.v12n30p313](https://doi.org/10.19044/esj.2016.v12n30p313).
22. **Bajpai**, V. K., Sharma, A., Baek, K. H. (2013) Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control*, 32(2), 582–590. doi :10.1016/j.foodcont.2013.01.032.
23. **Barrios**, H., Garza-Ramos, U., Mejia-Miranda, I. (2017) ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: The most prevalent clinical isolates obtained between 2005 and 2012 in Mexico. *J Global Antimicrob Resist*, 10, 243-246.
24. **Bauer**, A. W., Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 493-496.
25. **Bazargani** M. M. and Rohloff J. (2016) Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms, *Food Control*, 61, 156-164.
26. **Bekhechi**, C., Atik-Bekkara, F., & Abdelouahid, D. E. (2008) Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6(3), 153–159. doi:10.1007/s10298-008-0310-6.
27. **Belhattab**, R., Larous, L., A. Cristina Figueiredo, Santos, P. A. G., Barroso, J. G., Pedro, L. G. (2005) *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(2), 209–212. doi:10.1002/ffj.1387.

28. **Belmonte, O., Drouet, D., Alba, J., Moiton, M. P., and Kuli, B. (2010)** Évolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion : émergence des bêta-lactamases à spectre élargi. *Pathologie Biologie*, 58 (1), 18-24.
29. **Ben Haj Khalifa, A., Khedher, M. (2012)** Epidemiological study of *Klebsiella* spp. uropathogenic strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a Tunisian university hospital. *Pathologie Biologie*, 60 (2), e1–e5.
30. **Benaïcha, H., Barrijal, S., Ezzakkioui, F., and Elmalki, F. (2017)** Prevalence of PMQR genes in *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolated from North-West of Morocco. *J Global Antimicrob Resist*, 10, 321-25.
31. **Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F., & Costa, J. (2008)** Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chemistry*, 106(1), 132–139. doi :10.1016/j.foodchem.2007.05.050.
32. **Bertella, A., Benlahcen, K., Abouamama, S., Pinto, D. C. G. A., Maamar, K., Kihal, M., & Silva, A. M. S. (2018)** *Artemisia herba-alba* Asso. essential oil antibacterial activity and acute toxicity. *Industrial Crops and Products*, 116, 137–143. doi:10.1016/j.indcrop.2018.02.064.
33. **Bettaieb Rebey, I., Bourgou, S., Tounsi, M. S., Fauconnier, M.L., Ksouri, R. (2017)** Phytochemical composition and antioxidant activity of *Lavandula dentate* extracts. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 39(2), 2096-2105.
34. **Boniface, Y., Jean-Pierre, N., Philippe, S., Félicien, A., Dominique, S. (2010)** Etude chimique et activités antimicrobiennes d'extraits volatils des feuilles et fruits de *Xylopiya aethiopica* (DUNAL) A. Richard contre les pathogènes des denrées alimentaires. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim*, 029, 19-27.
35. **Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., Dakka, N. (2017)** Resistance to antibiotics and mechanisms of action of essential oils against bacteria. *Phytothérapie*, 111, 41- 49. doi 10.1007/s10298-017-1118-z
36. **Bouzouita, N., Kachouri, F., Ben Halima, M., Chaabouni M.M. (2008)** composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phœnicea*, *Journal de la Société Chimique de Tunisie*, 10, 119-125.
37. **Boyle, W., & Chow, A. (1969)** Isolation of Human Lymphocytes by a Ficoll Barrier Method. *Transfusion*, 9(3), 151-155. doi:10.1111/j.1537-2995.1969.tb05534.x

38. **Brahmi**, F., Abdenour, A., Bruno, M., Silvia, P., Alessandra, P., Danilo, F., Mohamed, C. (2016) Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* L. Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 88, 96-105. doi:10.1016/j.indcrop.2016.03.002.
39. **Brooun**, A., Liu, S., Lewis, K. (2000) A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 640-6.
40. **Bruneton J.** (1993) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3<sup>ème</sup> Ed. Tec et Doc, 482.
41. **Burt**, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
42. **Bush**, K. R., Ellison, J., Hearn, K., Pfister, T., and Taylor, G. (2019) A comparison of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in Alberta using a provincial surveillance system. *Infect Contr Hosp Epidemiol*, 40(3), 388. doi: 10.1017/ice.2018.353.
43. **Caiazza**, N.C. and O'Toole, G.A. (2004) SadB Is Required for the Transition from Reversible to Irreversible Attachment during Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal Of Bacteriology*, 186(14), 4476-4485.
44. **Calo**, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A., & Ricke, S.C. (2015) Essential oils as antimicrobials in food systems—A review. *Food Control*, 54, 111-119. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.12.040.
45. **Canillac**, N., & Mourey, A. (2001) Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18(3), 261–268. doi:10.1006/fmic.2000.0397.
46. **Carle**, S. (2009) La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important !. *Pharmactuel*, 42, 7-21.
47. **Cescutti**, P., De Benedetto, G., and Rizzo, R. (2016) Structural Determination of the Polysaccharide Isolated from Biofilms Produced by a Clinical Strain of *Klebsiella Pneumoniae*. *Carbohydrate Research*, 430, 29-35.
48. **Cesur**, S., Demiröz, A.P. (2013) Antibiotics And The Mechanisms Of Resistance To Antibiotics. *Medical Journal Of Islamic World Academy Of Sciences*, 21(4), 138-142.

49. **Cheurfa**, M., Allem, R., Sebaihia, M., Belhireche, S. (2013) Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les bactéries pathogènes responsables de gastroentérites. *Phytothérapie*, 11(3), 154–160. doi:10.1007/s10298-013-0777-7.
50. **Christensen**, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., and Barrett, F. F. (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 (6), 996-1006.
51. **Clevenger**, J. F. (1928) Apparatus for the determination of volatile oil. *American Pharmaceutical Association*, XVII, (4), 345-349.
52. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility; Twenty-Fourth informational supplement, (2014) Philadelphia.
53. **Coutinho**, I. D., Cardoso, C. A. L., Ré-Poppi, N., Melo, A. M., Vieira, M. C., Honda, N. K., Coelho, R. G. (2009) Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(4).
54. **Cubero**, M., Marti, S., Domínguez, M. Á., González-Díaz, A., Berbel, D., Ardanuy, C. (2019) Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 clinical isolates form robust biofilms at the air-liquid interface. *PLOS ONE*, 14(9), e0222628. doi:10.1371/journal.pone.0222628.
55. **Dammak**, I., Hamdi, Z., Kammoun El Euch, S., Zemni, H., Mliki, A., Hassouna, M., Lasram, S. (2019) Evaluation of antifungal and anti-ochratoxigenic activities of *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* and *Laurus nobilis* essential oils and a major monoterpene constituent 1,8-cineole against *Aspergillus carbonarius*. *Industrial Crops and Products*, 128, 85-93. doi:10.1016/j.indcrop.2018.11.006.
56. **Daoud**, Z., Salem-Sokhn, E., Dahdouh, E., Irani, J., Matar, G. M., & Doron, S. (2017) Resistance and clonality in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. and relationship with antibiotic consumption in major Lebanese hospitals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 11, 45–51. doi:10.1016/j.jgar.2017.07.011.
57. **Darfeuille-Michaud**, A., Jallat, C., Aubel, D., Sirot, D., Rich, C., Sirot, J., Joly, B. (1992) R-Plasmid-Encoded adhesive factor in *Klebsiella Pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infection And Immunity*, 60(1), 44-55.

58. **Dashti**, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M., Dashti H. M. (2009) Heat treatment of bacteria: a simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal*, 41 (2), 117-122.
59. **De Oliveira**, J. R., de Castro, V. C., Vilela, P. das G. F., Camargo, S. E. A., Carvalho, C. A. T., Jorge, A. O. C., de Oliveira, L. D. (2013) Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1). doi:10.1186/1472-6882-13-208.
60. **Delatour**, C., Chalvon, N., Prieur, N., Mateu, P. (2018) A history of community-acquired hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* severe sepsis. *Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine*, 37(3), 273–275.
61. **Deng**, J., Li, Y. T., Shen, X. (2017) Risk factors and molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Xiamen, China. *J Global Antimicrob Resist*, 11, 23–27.
62. **Denis**, F., Bingen, E., Matin, C., Ploy, M.C., Quentin, R. (2007) Bactériologie médicale. Techniques usuelles, Elsevier Masson, 314.
63. **Di Martino**, P., Bertin, Y., Girardeau, J.P., Livrelli, V., Joly, B., Darfeuille-Michaud, A. (1995) Molecular Characterization And Adhesive Properties Of Cf29k, An Adhesin Of *Klebsiella Pneumoniae* Strains Involved In Nosocomial Infections. *Infection and Immunity*, 63(11), 4336–4344.
64. **Di Napoli**, M., Maresca, V., Varcamonti, M., Bruno, M., Badalamenti, N., Basile, A., Zanfardino, A. (2020) (+)-(E)-Chrysanthenyl Acetate: A Molecule with Interesting Biological Properties Contained in the Anthemissecundiramea (*Asteraceae*) Flowers. *Applied Sciences*, 10(19), 6808.
65. **Diao**, W.R., Hu, Q.P., Zhang, H., & Xu, J.G. (2014) Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculumvulgare*Mill.). *FoodControl*, 35(1), 109-116.
66. **Dob**, T., Dahmane, D., TAYEB, B., & CHELGHOUM, C. (2005) Chemical composition of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria. *International Journal of Aromatherapy*, 15(2), 110–114. doi:10.1016/j.ijat.2005.03.010.
67. **Doit**, C., Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, E. (2010) Extended-spectrum beta-lactamase producing-enterobacteriaceae. *Archives de Pédiatrie*, 17, S140 -S144.
68. **Doorduyn**, D. J., Rooijackers, S. H. M., van Schaik, W., & Bardoel, B. W. (2016) Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*, 221(10), 1102–1109. doi:10.1016/j.imbio.2016.06.014.



69. **Dutra**, T. V., Castro, J. C., Menezes, J. L., Ramos, T. R., do Prado, I. N., Machinski, M., Filho, B. A. de A. (2019) Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. *Industrial Crops and Products*, 129, 345–349. doi:10.1016/j.indcrop. 2018.12.025.
70. **Edelstein**, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., and Stratchounski, L. (2003) Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, 47 (12), 3724-3732.
71. **El Amri**, J., Elbadaoui, K., Zair, T., Bouharb, H., Chakir, S., Alaoui, T. (2014) Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*, 82(1), 74-81. doi:10.4314/jab.v82i1.16.
72. **El Bouamri**, M. C., Arsalane, L., Kamouni, Y., Berraha, M., and Zouhair, S. (2014) Recent Evolution of the Epidemiological Profile of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Uropathogenic *Enterobacteria* in Marrakech, Morocco. *Progrès en urologie*, 24 (7), 451-455.
73. **Extremina**, C. I., Fonseca, A. F., Granja, P. L., and Fonseca, A. P. (2010) Anti-adhesion and antiproliferative cellulose triacetate membrane for prevention of biomaterial-centred infections associated with *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Antimicrob Agents*, 35 (2), 164-168.
74. **Faleiro**, M.L., Miguel, G., Guerrero, C. and Brito, J. (1999) Antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L.) ssp. *mastichina* and *Thymus albicans* Hoffmanns & Link. *Acta Horticulturae*, 501, 45- 48.
75. **Flamini**, G., Pistelli, L., Nardoni, S., Ebani, V., Zinnai, A., Mancianti, F., Pistelli, L. (2019) Essential Oil Composition and Biological Activity of “*Pompia*”, a Sardinian *Citrus* Ecotype. *Molecules*, 24(5), 908. doi:10.3390/molecules24050908.
76. **Fouquet**, M., Morange, V., & Bruyère, F. (2012) Évolution sur cinq ans des infections à germes produisant une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu. *Progrès En Urologie*, 22(1), 17-21. doi:10.1016/j.purol.2011.07.003.
77. **Freney** J., Renaud, F., Leclercq, R., Riegel, P. (2007) Précis de bactériologie clinique, 2<sup>ème</sup> édition. ESKA / LACASSAGNE, 427-429.
78. **Gillespie**, S. H., Hawkey, P.M. (2006) Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Second Edition. John Wiley & Sons Ltd, 378-382.

- 79. Giongo, J. L., Vaucher, R.A., Da Silva, A. S., Oliveira, C. B., de Mattos, C. B., Baldissera, M. D., Sagrillo, M. R., Monteiro, S. G., Custódio, D. L., Souza de Matos, M., Sampaio, P. T., Teixeira, H. F., Koester, L. S., da Veiga Junior, V. F. (2017)** Trypanocidal activity of the compounds present in *Aniba canelilla* oil against *Trypanosoma evansi* and its effects on viability of lymphocytes, *Microbial Pathogenesis*, 113, 13-18. doi: 10.1016/j.micpath.2016.12.006.
- 80. Gonçalves, M. J., Cruz, M. T., Cavaleiro, C., Lopes, M.C., & Salgueiro, L. (2010)** Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*. *Industrial Crops and Products*, 32(1), 70–75. doi:10.1016/j.indcrop.2010.03.005.
- 81. Gravey, F., Loggia, G., de La Blanchardière, A., Cattoir, V. (2017)** Bacterial epidemiology and antimicrobial resistance profiles of urinary specimens of the elderly. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 47 (4), 271-278.
- 82. Guessennd, N., Bremont, S., Gbonon, V. (2008)** Résistance aux quinolones de type qnr chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathologie Biologie*, 56 (7-8), 439-446.
- 83. Gülçin, İ., Gören, A. C., Taslimi, P., Alwasel, S. H., Kılıç, O., Bursal, E. (2019)** Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (*Mentha pulegium*) analysis of its polyphenolcontents by LC-MS/MS. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101441. doi:10.1016/j.bcab.2019.101441.
- 84. Hadi, M. H., Hameed, I. M., Ibraheam, I. A. (2017)** *Mentha pulegium*: Medicinal uses, Anti-Hepatic, Antibacterial, Antioxidant effect and Analysis of Bioactive Natural Compounds: A Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10 (10).
- 85. Harfi, B., Benahmed, A., & Karkour, L. (2019)** Characterization of *Origanum glandulosum* Desf. Essential Oils Collected from Different Culture Conditions Towards Standardized ex situ Production. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 22(3), 838–850. doi:10.1080/0972060x.2019.1646163.
- 86. Heinz, E., Ejaz, H., Scott, J.B., Wang, N., Guanjaran, S., Pickard, D., Wilksch, J., Cao, H., Ul-Haq, H., Dougan, G., Strugnell, R. (2018)** Emergence of carbapenem, beta-lactamase inhibitor and ceftazidime resistant lineages from a background of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and *K. quasipneumoniae* highlights different evolutionary mechanisms. bioRxiv.



- 87. Heinz, E.,** Ejaz, H., Scott, J.B., Wang, N., Guanjaran, S., Pickard, D., Wilksch, J., Cao, H., Ul-Haq, H., Dougan, G., Strugnell, R. (2018) Emergence of carbapenem, beta-lactamase inhibitor and ceftazidime resistant lineages from a background of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* highlights different evolutionary mechanisms. bioRxiv.
- 88. Hennequin, C.,** Robin, F. (2015) Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(3), 333–341. doi:10.1007/s10096-015-2559-7.
- 89. Hernández-González, M.,** Pérez Berumen, C. M., Sánchez Ruíz, H., Ruíz Salazar, C. V., Hernández Paz, J. F., Olivas-Armendáriz, I., Rodríguez González, C. A. (2017) Polysuccinimide functionalized with oregano's essential oil extracts, an antimicrobial extended release bio-material. *Materials Letters*, 191, 73–76. doi:10.1016/j.matlet.2017.01.035.
- 90. Heydari, M.,** Zanfardino, A., Taleei, A., Bushehri, A. A. S., Hadian, J., Maresca, V., Sorbo, S., Napoli, M.D., Varcamonti, M., Basile, A., Rigano, D. (2018) Effect of Heat Stress on Yield, Monoterpene Content and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Mentha x piperita* var. *Mitcham* and *Mentha arvensis* var. *piperascens*. *Molecules*, 23(8), 1903.
- 91. Hinsa, S. M.,** Espinosa-Urgel, M., Ramos, J. L., & O'Toole, G. A. (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular Microbiology*, 49(4) 905-918. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03615.x.
- 92. Huang, Y. T.,** Jiang, J. Y., Hsu, M. S. (2018) The prevalence of rectal carriage of *Klebsiella pneumoniae* amongst diabetic patients and their clinical relevance in Taiwan: A five-year prospective study. *J Microbiol Immunol Infect*, 51 (4), 510-518.
- 93. Hudaib, M.,** Speroni, E., Di Pietra, A. M., Cavrini, V. (2002) GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29(4), 691–700. doi :10.1016/s0731-7085(02)00119-x.
- 94. Jacoby, G. A.,** Munoz-Price L. S. (2005) Mechanisms of disease The New *b*-Lactamases. *The New England journal of medicine*, 352(4), 380-391.
- 95. Jamal, M.,** Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., ... Kamil, M. A. Bacterial biofilm and associated infections, *Journal of the Chinese Medical Association*. 2018; 81(1); 7–11. doi:10.1016/j.jcma.2017.07.012.

96. **Juan, M. T.,** Vicente J. Bened, B., C., Juan, J. (1986) Role of Capsule and O Antigen in Resistance of *Klebsiella pneumoniae* to Serum Bactericidal Activity. *Infection and Immunity*, 54 (1), 85-89.
97. **Jung, Y.,** Lee, S. S., Song, W., Kim, H. S., Uh, Y. (2018) *In vitro* activity of flomoxef against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Diag Microbiol Infect Dis*, 94 (1), 88-92.
98. **Kačániová, M.,** Vukovič, N., Hleba, L., Bobková, A., Pavelková, A., Rovná, K., Arpášová, H. (2012) Antimicrobial and antiradicals activity of *origanum vulgare* L. And *thymus vulgaris* essential oils. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2 (1), 263-271.
99. **Kaloustian, J. et Hadji-Minaglou, F.** (2012) La connaissance des huiles essentielles: qualilogie et aromathérapie. Springer-Verlag France, Paris, 16-20, 25.
100. **Khadir, A.,** Bendahou, M., Benbelaid, F., Abdoune, M. A., Abdelouahid, D. E. (2013) Pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf., récolté en Algérie. *Phytothérapie*, 11(6), 353–358. doi:10.1007/s10298-013-0820-8.
101. **Khodadadian, R.,** Rahdar, H. A., Javadi, A., Safari, M., and Khorshidi, A. (2018) Detection of VIM-1 and IMP-1 genes in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, 115, 25–30.
102. **Kol, R.,** Friedländer, M., Riklis, E., Raveh, D., & Friedlander, M. (1983) Separation of Human Lymphocytes on Ficoll-Paque Gradients: Stimulation of Cells and Depletion of a Concanavalin-A Responsive Radioresistant Subpopulation. *Radiation Research*, 95(1), 108. doi :10.2307/3576075 .
103. **Kumar, V.,** Park, S. (2018) Potential and limitations of *Klebsiella pneumoniae* as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source. *Biotechnology Advances*. 36(1), 150-167. doi:10.1016/j.biotechadv.
104. **Lagha, N.,** Abdelouahid, D. E., Hassaine, H., Robin, F., Bonnet, R. (2014) First characterization of CTX-M-15 and DHA-1  $\beta$ - lactamases among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Laghouat Hospital, Algeria. *Afri J Microbiol Res*, 8 (11), 1221-1227.
105. **Lai P , Roy J.** Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Curr. Med. Chem.*, 2004, 11, 1451–1460.
106. **Lenchenko, E.,** Blumenkrants, D., Sachivkina, N., Shadrova, N., Ibragimova, A. (2020) Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms, *Veterinary World*, 13(1), 197-200.

- 107. Liu, Y.** and Schubert, D. (1997) Cytotoxic Amyloid Peptides Inhibit Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction by Enhancing MTT Formazan Exocytosis. *Journal of Neurochemistry*, 69(6), 2285-2293.
- 108. Lorenzo, D., Paz, D., Dellacassa, D., Davies, P.** (2002) Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Brazilian archives of biology and technology*, 45(4), 519-524.
- 109. Lytsy, B., Sandegren, L., Tano, E.** (2008) The first major extended-spectrum  $\beta$ -lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15. *APMIS*, 116 (4), 302-308.
- 110. Mahboubi, M., Haghi, G.** (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(2), 325–327. doi:10.1016/j.jep.2008.07.023.
- 111. Manna, A., Saha, P., Sarkar, A., Mukhopadhyay, D., Bauri, AK.** (2012) Malabaricone-A Induces A Redox Imbalance That Mediates Apoptosis in U937 Cell Line. *PLoS ONE* 7(5): e36938. doi:10.1371/journal.pone.0036938.
- 112. Markovska, R., Stoeva, T., Boyanova, L.** (2017) Dissemination of successful international clone ST15 and clonal complex 17 among Bulgarian CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, 89 (4), 310–313.
- 113. Martínez J., Martínez L., Rosenblueth M., Silva J., Martínez-Romero E.** (2004) How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy?: The case of *Klebsiella*. *International Microbiology*, 7(4), 261-268.
- 114. Martino, P. D., Cafferini, N., Joly, B., Darfeuille-Michaud, A.** (2003) *Klebsiella pneumoniae* type pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res Microbiol*, 154, 9-16.
- 115. Mechergui, K., Jaouadi, W., Coelho, J. A., Serra, M. C., Khouja, M. L.** (2015) Biological activities and oil properties of *Origanum glandulosum* Desf: A review. *Phytothérapie*, 14(2), 102–108. doi :10.1007/s10298-015-0963-x.
- 116. Minor, L., Sansonetti, P. H., Richard, C. I., Grimond, F., Mollaret, H. H., Bercovier, H., Alonso, J. M.** (1989) Entérobactéries. In « Le Minor, L., Veron, M. bacteriologie médicale, 2<sup>ème</sup> Ed. Médecine-Sciences Flammarion, 391-395 ».
- 117. Muggeo, A., Guillard, T., Klein, F.** (2017) Spread of *Klebsiella pneumoniae* ST395 non-susceptible to carbapenems and resistant to fluoroquinolones in North-Eastern Franc. *J Global Antimicrob Resist*, 13, 98-103.

- 118. Murphy, C. N., Mortensen, M. S., Krogfelt, K. A., Clegg, S.** (2013) Role Of *Klebsiella Pneumoniae* Type 1 And Type 3 Fimbriae In Colonizing Silicone Tubes Implanted Into The Bladders Of Mice As A Model Of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Infection and Immunity*, 81(8), 3009–3017. Doi:10.1128/iai.00348-13.
- 119. Musicha, P., Msefula, C. L., Mather, A. E., Chaguza, C., Cain, A. K., Peno, C., Feasey, N. A.** (2019) Genomic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates from Malawi reveals acquisition of multiple ESBL determinants across diverse lineages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(5), 1223–1232. doi:10.1093/jac/dkz032.
- 120. Nabavi, S. M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., Nabavi, S. F.** (2015) Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: From farm to pharmacy. *Food Chemistry*, 173, 339-347. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.042.
- 121. Nabet, N., Boudries, H., Loupassaki, S., Souagui, S., 1Madani, K. Carbonell-Barrachina, Á. A.** (2017) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut. And *Origanum glandulosum* Desf. essential oils. *International Food Research Journal*, 24(6), 2518-2525.
- 122. Nabti, Z. L., Sahli, F., Laouar, H., Olowo-okere, A., Nkuimi Wandjou, J. G., Maggi, F.** (2020) Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from the Algerian Endemic *Origanum glandulosum* Desf. Against Multidrug-Resistant Uropathogenic *E. coli* Isolates. *Antibiotics*, 9(1), 29. doi:10.3390/antibiotics9010029.
- 123. Nikolić, M., Jovanović, K. K., Marković, T., Marković, D., Gligorijević, N., Radulović, S., & Soković, M.** (2014) Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five *Lamiaceae* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 61, 225–232. doi :10. 1016/j.indcrop.2014.07.011.
- 124. Notariale, R., Basile, A., Montana, E., Romano, N. C., Cacciapuoti, M. G., Aliberti, F., Gesuel, R., De Ruberto, F., Sorbo, S., Tenore, G. C., Guida, M., V. Good, K., Ausio, J., Piscopo, M .** (2018) Protamine-like proteins have bactericidal activity. The first evidence in *Mytilus galloprovincialis*. *Acta Biochimica Polonica*, 65 (4), 585–594.
- 125. Oliveira Junior, N.G., Franco O.L.** (2020) Promising strategies for future treatment of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiol*, 15(1), 63-79.
- 126. Ouedrhiri, W., Mounyr, B., Harki, E. H., Moja, S., Greche, H.** (2017) Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild

- thyme essential oils, *International Journal of Food Properties*, 20(12), 3149-3158, doi: 10.1080/10942912.2017.1280504.
- 127. Panda, P.K., Jhon, N., and Sao, S. (2016)** Antibigram, ESBL production and carbapenemase detection of *Klebsiella* spp. in hospital-acquired infection. *Apollo Medicine*, 13 (3), 156–162.
- 128. Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M. (2003)** Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 47 (11), 3554-3560.
- 129. Paul, S., Dubey, R. C., Maheswari, D. K., Kang, S. C. (2011)** *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. *Food Control*, 22(5), 725–731. doi:10.1016/j.foodcont. 2010.11.003.
- 130. Philippon, A. (2013)** Les bêta-lactamases à spectre élargi ou étendu (BLSE). *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée*, 28(5-6), 287–296. doi:10.1016/j.immbio.2013.04.006.
- 131. Pirmohammadi, A., Daneshyar, M., Farhoomand, P., Aliakbarlu, J., Hamian, F. (2016)** Effects of *Thymus Vulgaris* And *Mentha Pulegium* On Colour, Nutrients And Peroxidation Of Meat In Heat-Stressed Broilers. *South African Journal of Animal Science*, 46 (3), 278-284.
- 132. Pirzaman, A. N., Mojtahedi, A. (2018)** Investigation of antibiotic resistance and the presence of integron genes among ESBL producing *Klebsiella* isolates. *Meta Gene*, 19, 37-41.
- 133. Podschun, R. And Ullmann, U. (1998)** *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical microbiology reviews*, 11 (4), 589–603.
- 134. Prashar, A., Locke, I. C., Evans, C. S. (2004)** Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif.* 2004, 37, 221–229.
- 135. Quezel, P. et Santa, S. (1963)** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Ed. du centre national de la recherche scientifique. Paris, France.
- 136. Ramdan, B., El Malki, F., Eddarraji, K., Greche, H., Nhiri, M. (2018)** [Composition and Antibacterial Activity of Hydro-Alcohol and Aqueous Extracts Obtained from the Lamiaceae Family](#). *Pharmacognosy Journal*, 10(1), 81-91.

- 137. Rasamiravaka, T., Shaista Sheila, H. S. L., Rakotomavojaona, T., Rakoto-Alson, A. O., Rasamindrakotroka, A. (2015)** Changing Profile and Increasing Antimicrobial Resistance of Uropathogenic Bacteria in Madagascar. *Med Mal Infect*, 45 (5), 173-176.
- 138. Rasooli, I., Rezaei, M. B., Allameh, A. (2006)** Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(3), 236–241. doi:10.1016/j.ijid.2005.05.006.
- 139. Ríos, J. L. (2016)** Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. In” Preedy Victor R. Essential Oils in Food Preservation, *Flavor and Safety*, 3-8.
- 140. Rodriguez-Bano, J., Navarro, M. D., Retamar, P., Picon, E., Pascual, A. (2012)**  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactam Inhibitor Combinations for the Treatment of Bacteremia Due to Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase–Producing *Escherichia coli*: A Post Hoc Analysis of Prospective Cohorts. *Clin Infect Dis*, 54 (2),167–174.
- 141. Russi, S., Maresca, V., Zoppoli, P., Aieta, M., Marino, G., Sgambato, A., Ignomirelli, O., Ciuffi, M., Notarangelo, T., Basile, A., Falco, G., and Laurino, S. (2020)** Effect of *Feijoa sellowiana* Acetonic Extract on Proliferation Inhibition and Apoptosis Induction in Human Gastric Cancer Cells. *Applied Sciences*, 10(21), 7756.
- 142. Sawatwong, P., Sapchookul, P., Whistler, T., Gregory C.J., Sangwichian, S.O. (2019)** High Burden of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase–Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia in Older Adults: A Seven-Year Study in Two Rural Thai Provinces. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100 (4), 943 – 951. doi: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0394>.
- 143. Schnitzler, P., Astani, A., Reichling, J. (2011)** Antiviral Effects of Plant-Derived Essential Oils and Pure Oil Components in “Thormar H. *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, John Wiley& Sons, Ltd, 240”.
- 144. Seifi, K., Kazemian, H., Heidari, H., Rezagholizadeh, F., Saeed, Y. (2016)** Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1), e30682.
- 145. Senouci, B. M., Abdelouahid D. E. (2010)** Antibacterial Activity of Essential Oils of Some Algerian Aromatic Plants Against Multidrug Resistant Bacteria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(3), 362-370, doi: 10.1080/0972060X.2010.10643836.



- 146. Sfeir, J.,** Lefrançois, C., Baudoux, D., Derbré, S., Licznar, P. (2013) *In vitro* antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evid.-Based Com. Alt. Med.*, 1-10.
- 147. Shakeri, A.,** Khakdan, F., Soheili, V., Sahebkar, A., Rassam, G., Asili, J. (2014) Chemical composition, antibacterial activity, and cytotoxicity of essential oil from *Nepeta ucrainica* L. spp. *kopetdaghensis*. *Industrial Crops and Products*, 58, 315-321. doi:10.1016/j.indcrop.2014.04.009
- 148. Silva-Flores, P. G.,** Perez-Lopez, L. A., Rivas-Galindo, V. M., Paniagua-Vega, D., Galindo-Rodriguez, S. A., Alvarez-Roman, R. (2019) Simultaneous GC-FID Quantification of Main Components of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula dentate* Essential Oils in Polymeric Nanocapsules for Antioxidant Application. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 1-10.
- 149. Singh, S. K.,** Mishra, M., Sahoo, M., Patole, S., Sahu, S., Mishra, S. R., Mohapatra, H. (2017) Antibiotic resistance determinants and clonal relationships among multidrug-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 110, 31–36.
- 150. Sinha, S.,** Jothiramajayam, M., Ghosh, M., & Mukherjee, A. (2014) Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 68, 71–77. doi:10.1016/j.fct.2014.02.036
- 151. Souto, E.B.,** Severino, P., Marques, C., Andrade, L. N., Durazzo, A., Lucarini, M., Atanasov, A. G., El Maimouni, S., Novellino, E., Santini, A. (2020) *Croton argyrophyllus* Kunth Essential Oil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: Evaluation of Release Profile, Antioxidant Activity and Cytotoxicity in a Neuroblastoma Cell Line. *Sustainability*, 12, 7697. <https://doi.org/10.3390/su12187697>.
- 152. Stratakos, A. C.,** Koidis, A. (2016) Methods for Extracting Essential Oils. Methods for Extracting Essential Oils. In” Preedy Victor R. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 31-33.
- 153. Struve, C.,** Krogfelt, K. A. (2003) Role of Capsule In *Klebsiella Pneumoniae* Virulence: Lack Of Correlation Between In Vitro And In Vivo Studies. *Fems Microbiology Letters*, 2(18), 149-154.
- 154. Surgers, L.,** Boyd A., Girard P. M., Arlet, G., and Decré, D. (2018) Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Med Microbiol*, 309 (1), 13-18.

- 155. Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Sokmen, A. (2004)** Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry*, 84(4), 519–525. doi :10.1016/s0308-8146(03)00267-x.
- 156. Turgis, M., Han, J., Caillet, S., Lacroix, M. (2009)** Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*, 20(12), 1073–1079. doi:10.1016/j.foodcont.2009.02.001.
- 157. Tutar, U., Çelik, C., Karaman, İ., Ataş, M., Hepokur, H. (2016)** Anti-biofilm and antimicrobial activity of *Mentha pulegium* L essential oil against multidrug-resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15 (5), 1039-1046.
- 158. Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C. (2017)** Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J Appl Microbiol*, 123 (4), 1003–1018.
- 159. Woodford, N., Fagan, E. J., Ellington, M. J. (2005)** Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother*, 57 (1), 154-155.
- 160. Yang S. K., Yusoff K., Thomas W., Akseer R., Sultan Alhosani M., Abushelaibi A., Lim S. H. E., Lai K. S. (2020)** Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 10,819. doi.org/10.1038/s41598-019-55601-0.
- 161. Zantar, S., El Garrouj, D., Pagán, R., Chabi, M., Laglaoui, A., Bakkali, M., Zerrouk, H. (2015)** Effect of Harvest Time on Yield, Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* Essential Oils. *European Journal of Medicinal Plants*, 8(2), 1-7.
- 162. Zekri, N., Amalich, S., Boughdad, A., Alaoui El Belghiti, A., and Zair, T. (2013)** Phytochemical study and insecticidal activity of *Mentha pulegium* L. oils from Morocco against *Sitophilus Oryzae*. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 2(4), 607-619.



---

# Annexes

## Annexes

**Annexe I. Valeurs des diamètres des zones d'inhibition et de la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les entérobactéries (CLSI, 2014).**

Antibiotique	Charge de disque	diamètres de zones (mm)			Critères d'interprétation de CMI (µg/ml)		
		S	I	R	S	I	R
Ampicilline	10 µg	≥17	14–16	≤13	≤8	16	≥32
Ticarcillin	75 µg	≥20	15–19	≤14	≤16	32–64	≥128
Amoxicillin-clavulanate	20/10 µg	≥18	14–17	≤13	≤8/4	16/8 ≥	32/16
Piperacillin-tazobactam	100/10 µg	≥21	18–20	≤17	≤16/4	32/4–64/4	≥128/4
Cefotaxime	30 µg	≥26	23–25	≤22	≤1	2	≥4
Cephalothine	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32
Cefoxitine	30 µg	≥18	15–17	≤14	≤8	16	≥32
Ceftazidime	30 µg	≥21	18–20	≤17	≤4	8	≥16
Aztreonam	30 µg	≥21	18–20	≤17	≤4	8	≥16
Ertapeneme	10 µg	≥22	19–21	≤18	≤0.5	1	≥2
Imipeneme	10 µg	≥23	20–22	≤19	≤1	2	≥4
Gentamicine	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16
Tobramycine	10 µg	≥15	13–14	≤12	≤4	8	≥16
Amikacine	30 µg	≥17	15–16	≤14	≤16	32	≥64
Ciprofloxacin	5 µg	≥31	21–30	≤20	≤0.06	0.12–0.5	≥1

## Annexes

Ofloxacin	-	-	-	-	$\leq 0.12$	0.25–1	$\geq 2$
Nalidixic acid	30 $\mu\text{g}$	$\geq 19$	14–18	$\leq 13$	$\leq 16$	-	$\geq 32$
Nitrofurantoin	300 $\mu\text{g}$	$\geq 17$	15–16	$\leq 14$	$\leq 32$	64	$\geq 128$
Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25/ 23.75 $\mu\text{g}$	$\geq 16$	11–15	$\leq 10$	$\leq 2/38$	-	$\geq 4/76$

### Annexe II. Fiche des données sociodémographiques

Type d'échantillon : .....

Date du prélèvement : ..... / ..... / .....

Sexe : M / F : .....

Age .....

Service : .....

Annexe III. Profil de sensibilité aux antibiotiques de *K. pneumoniae*

Code	Nom de l'antibiotique	Antibiotic class	Antibiotic subclass	Code	Valeurs critiques	Nbr e	R	R ?	I	S	S ?	Nbr e
<b>AMP_ND10</b>	Ampicilline	Penicillins	Aminopenicillin	AMP	14 - 16	40	40		0	0		0
<b>AMC_ND20</b>	Amoxicilline/Acide clavulaniqu	Beta-lactam+Inhibitors		AMC	14 - 17	40	4		14	22		0
<b>TIC_ND75</b>	Ticarcilline	Penicillins	Carboxypenicillin	TIC	16 - 23	40	40		0	0		0
<b>TZP_ND100</b>	Piperacilline/Tazobactam	Beta-lactam+Inhibitors		TZP	18 - 20	40	1		4	35		0
<b>CEP_ND30</b>	Céfalothine	Cephems	Cephalosporin I	CEP	15 - 17	40	15		1	24		0
<b>FOX_ND30</b>	Céfoxitine	Cephems	Cephameycine	FOX	15 - 17	40	0		0	40		0
<b>CTX_ND30</b>	Céfotaxime	Cephems	Cephalosporin III	CTX	23 - 25	40	15		0	25		0
<b>CAZ_ND30</b>	Ceftazidime	Cephems	Cephalosporin III	CAZ	18 - 20	39	15		0	24		0
<b>ETP_ND10</b>	Ertapenem	Penems	Carbapenems	ETP	19 - 21	39	0		0	39		0
<b>IPM_ND10</b>	imipénème	Penems	Carbapenems	IPM	20 - 22	40	0		0	40		0
<b>AMK_ND30</b>	Amikacine	Aminoglycosides		AMK	15 - 16	40	1		0	39		0
<b>GEN_ND10</b>	Gentamicine	Aminoglycosides		GEN	13 - 14	40	13		0	27		0
<b>TOB_ND10</b>	Tobramycine	Aminoglycosides		TOB	13 - 14	40	13		1	26		0

## Annexes

<b>NAL_ND30</b>	Acide nalidixique	Quinolones	Quinolone	NAL	14 - 18	40	1 3		0	2 7		0
<b>CIP_ND5</b>	Ciprofloxacin	Quinolones	Fluoroquinolone	CIP	16 - 20	40	5		2	3 3		0
<b>OFX_ND5</b>	Ofloxacin	Quinolones	Fluoroquinolone	OFX	13 - 15	40	5		0	3 5		0
<b>NIT_ND300</b>	Nitrofurantoine	Nitrofurans		NIT	15 - 16	40	4		1 4	2 2		0
<b>SXT_ND1.2</b>	Trimethoprim/Sulfamet hoxazole	Folate pathway inhibitors		SXT	11 - 15	40	2 0		0	2 0		0
<b>BETA_LACT</b>	Bêta-lactamase			BETA		15	1 5			0		
<b>ESBL</b>	BLSE			ESBL		40	1 5			2 5		

## Annexe IV. Milieux de culture utilisés

<b>Gélose nutritive</b> Peptone.....5g Extrait de viande.....1g Extrait de levure.....2g Chlorure de sodium.....15 g Agar.....15 g pH = 7.4	<b>Bouillon nutritif</b> Peptone.....5g Extrait de viande.....1g Extrait de levure.....2 g Chlorure de sodium.....15 g pH = 7.4
<b>Bouillon cœur servelle</b> Protéose-peptone.....10 g Infusion de cervelle de veau .....12,5g Infusion de cœur de bœuf.....5,0 g Glucose .....2 g Chlorure de sodium .....5 g Hydrogénophosphate de sodium .....2,5 g pH = 7,4.	<b>Milieu Mueller Hinton</b> Protéose-peptone.....10 g Infusion de cervelle de veau.....12,5 g Infusion de cœur de bœuf.....5,0 g Glucose.....2,0 g Chlorure de sodium.....5,0 g Hydrogénophosphate de sodium...2,5 g pH=7,4
<b>Gélose de MacConkey</b> Peptone pancréatique de gélatine.....17,0 g Tryptone.....1,5g Peptone pepsique de viande .....1,5 g Lactose .....10,0g Sels biliaires.....1,5g Chlorure de sodium.....5,0g Roug neutre .....30,0mg Cristal violet .....1,0mg Agar agar bactériologique.....13,5g Ph : 7,1	

**Annexe V. Effet des huiles essentielles de *L.dentata*, *O.glandulosum* et *M.pulegium* sur la libération des matériaux absorbant à 260 nm des *Klebsiella pneumoniae* BLSE.**

	<i>Origanum</i>	<i>Lavandula</i>	<i>Mentha</i>
<b>Absorbance</b> du control	0,003	0,002	0,003
<b>Absorbance</b> du control	0,003	0,004	0,003
<b>Absorbance</b> du control	0,002	0,002	0,002
La moyenne	0,002667	0,002667	0,002667
<b>l'ecart type</b>	0,000577	0,001155	0,000577
<b>Absorbance</b> des cellules traitées	1,417	1,342	1,380
<b>Absorbance</b> des cellules traitées	1,514	1,394	1,326
<b>Absorbance</b> des cellules traitées	1,467	1,298	1,372
La moyenne	1,466	1,345	1,359
<b>l'ecart type</b>	0,048508	0,048056	0,029143

**Annexe VI. Effet des huiles essentielles de *L.dentata*, *O. glandulosum* et *M. pulegium* sur la viabilité cellulaire des lymphocytes humains (test MTT) : Viabilité (%) des lymphocytes humains ( $1 \times 10^6$  cellules / mL) incubées avec du milieu seul (contrôle), et avec *Lavandula* (10 mg / mL, 17.7 mg / mL, 20 mg / mL) *Origanum* ( 2 mg / mL , 2.5 mg / mL, 5 mg / mL), *Mentha* (2 mg / mL, 3.5 mg / mL, 5 mg / mL) pendant 24h. L'analyse statistique a été réalisée par le test ANOVA à un facteur suivie de test de Tukey's (\* p <0,05; \*\* p <0,01 \*\*; \*\*\* p <0,001).**

	control	Lav.d 10mg/mL	Lav.d 17.7mg/mL	Lav.d 20mg/mL	Orig.gla 2mg/mL	Orig.gla 2.5mg/mL	Orig.gla 5mg/mL	Men.pu 2mg/mL	Men.pu 3.5mg/mL	Men.pu 5mg/mL
	100%	95,01%	92,28%	89,83%	110,87%	101,12%	99,16%	104,05%	99,53%	95,12%
	100%	94,02%	91,29%	87,81%	109,95%	100,02%	98,25%	103,73%	98,75%	94,27%
	100%	93,01%	90,20%	88,80%	108,97%	99,89%	97,19%	102,21%	97,78%	93,33%
<b>La moyenne</b>	100%	94,01%	91,26%	88,81%	109,93%	100,34%	98,20%	103,33%	98,69%	94,24%
<b>L'écart type</b>	0	0,01	0,007472	0,010101	0,009502	0,006757	0,00986	0,009831	0,008767	0,007311



---

# **Publications et Communications**

### Publications

1. **Benbrahim, C.**, Barka, M. S., Benmahdi, L., Zatout, A., and Khadir, A. Klebsiella pneumoniae producing extended spectrum  $\beta$ -lactamase in Regional Military University Hospital of Oran, Algeria: antibiotic resistance, biofilm formation, and detection of blaCTX-M and blaTEM genes. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. 2021: 22 (1).
2. **Benbrahim, C.**, Barka, M. S., Basile, A., Maresca, V., Flamini, G., Sorbo, S., Carraturo, F., Notariale, R., Piscopo, M., Khadir, A., Zatout, A. and Mechaala, S. Chemical Composition and Biological Activities of Oregano and Lavender Essential Oils. *Applied Sciences*. 2021 : 11 ; 5688.
3. Zatout, A., Djibaoui, R., Kassah-Laouar, A., **Benbrahim, C.** Coagulase negative staphylococci in Anti-Cancer Center, Batna, Algeria: antibiotic resistance pattern, biofilm formation, and detection of *mecA* and *icaAD* genes. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 21 (1): 21 – 29.

### Communications nationales

1. **BENBRAHIM Chahla**, BARKA Mohamed Salih., ZATOUT Asma, KASSAH-LAOUAR Ahmed, GHIDAOUI Nour El Islam, ADJOU DJ Fatma. Profile antibiotypique du portage nasal de staphylocoque a coagulase positive chez le personnel soignant au niveau du CHU de Batna. VIII<sup>ème</sup> Journée nationale des sciences de la nature et de la vie. Mostaganem 2018.
2. **BENBRAHIM Chahla**, ZATOUT Asma, Mohamed Salih, GHIDAOUI Nour El Islam, Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'*Origanum glandulosum* sur des bactéries de contamination alimentaire. 1<sup>ère</sup> Journée Nationale sur la nutrition et la sécurité alimentaire JNNSA. Batna 2017.
3. **Benbrahim Chahla**, Zatout Asma et Barka Mohamed Salih. Effet de l'huile essentielle de *Lavandula dentata* sur des bactéries de contamination alimentaire. 1<sup>ères</sup> journées d'étude sur la chimie et ses applications, Batna, 1, 27 novembre 2019
4. **Benbrahim Chahla**, Zatout Asma, Barka Mohamed Salih et Adjoudj Fatma. Effet inhibiteur de l'extrait de *Rosmarinus tournefortii* sur des bactéries pathogènes. Premier Colloque National de Biotoxicologie et Bioactivité, Oran, 27 Novembre, 2019.
5. **Benbrahim Chahla**, Zatout Asma et Barka Mohamed Salih. Etude de l'activité antibactérienne de *Rosmarinus officinalis* sur les bactéries de contaminations alimentaires. 1<sup>er</sup> séminaire national de l'apport des biotechnologies sur la protection de l'Environnement, M'sila, 15-16 décembre, 2019.

**6. Benbrahim Chahla**, Zatout Asma, Barka Mohamed Salih, Benmahdi Lahcène, Mechaala Sara. Antibiotic profile of extended-spectrum  $\beta$ -lactamas-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Regional Military Hospital of Oran. 3<sup>ème</sup> Rencontres Aurassiennes de Microbiologie Clinique, Batna, 11 et 12 Mars 2020.

### Communications internationales :

**1. BENBRAHIM C., ZATOUT A., BARKA M.S.**, Antibacterial activity of essential oils of some plants in the Algerian East. 29<sup>ème</sup> Congrès international des sciences biologiques et biotechnologie de l'ATSB. Sousse Tunisie 2018.

**2. Benbrahim Chahla**, Zatout Asma et Barka Mohamed Salih. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. Workshop international sur l'hygiène des process Agroalimentaires, Tlemcen, 30 octobre 2017.

**3. Benbrahim Chahla**, Zatout Asma, Ghidaoui Nour El Islam et Barka Salih. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Juniperus phoeniceae* sur les bactéries de contamination alimentaire. 3<sup>ème</sup> Congrès International de la Société Algérienne de Nutrition, Constantine, 28 -30 novembre 2017.

**4. Benbrahim C., ZATOUT A., BARKA M.S., GHIDAOUI N.I.**, Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*. The second international seminar of biology (valorisation of Arid Zone Bioresources). Bechar 2017.

**5. Benbrahim Chahla**, Zatout Asma, Barka Mohamed Salih, Adjoudj Fatma. Antibacterial activity of *Menthapulegium* essential oil against *Klebsiellapneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase. Third International symposium of Medicinal Plants and Materials, Tebessa, 25-27 février, 2020.

Article 1 :

Benbrahim et al. *Afr. J. Clin. Exper. Microbiol.*

2021; 22(1):xxxx

<https://www.afrcem.org>

African Journal of Clinical and Experimental Microbiology. ISSN1595-689X Jan

2021; Vol.22 No.1 AJCEM/2044. <https://www.ajol.info/index.php/ajcem>

CopyrightAJCEM2021:



**OriginalArticle**

**OpenAccess**

***Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamase in Regional Military University Hospital of Oran, Algeria: antibiotic resistance, biofilm formation, and detection of *bla*CTX-M and *bla*TEM genes**

\*<sup>1</sup>Benbrahim, C., <sup>1</sup>Barka, M. S., <sup>2</sup>Benmahdi, L., <sup>3</sup>Zatout, A., and <sup>1</sup>Khadir, A.

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment (LAMAABE), Department of Biology, Faculty of Nature and Life, Earth and Universal Sciences, Abou Bekr Belkaid University, 13000 Tlemcen, Algeria

<sup>2</sup>Laboratory of Microbiology, Regional Military University Hospital, Oran, Algeria

<sup>3</sup>Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Department of Biological Sciences, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Abdlhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria

\*Correspondence to: [chahla.benbrahim@univ-tlemcen.dz](mailto:chahla.benbrahim@univ-tlemcen.dz)

**Abstract:**

**Background:** *Klebsiella pneumoniae* is a bacterial pathogen commonly associated with severe nosocomial and community acquired infections especially through the acquisition of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ES $\beta$ L) and biofilm formation capacity. The objectives of this study are to determine the prevalence of *K. pneumoniae* ES $\beta$ L (KP-ES $\beta$ L)-producing isolates in the Regional Military University Hospital of Oran (HMRUO) Algeria, characterize their antibiotic resistance profile, genetically detect *bla*TEM and *bla*CTX-M genes, and evaluate their biofilm formation capacity.

**Methodology:** Different clinical specimens including blood, cerebrospinal fluids, urine and catheter, pus, peri-rectal abscess, and surgical wounds were collected from patients with suspected clinical infections in different units and departments of the hospital. The specimens were cultured on Blood, MacConkey and CLED agar (for urine only) plates and incubated aerobically for 24 hours at 37°C for preliminary identification of bacteria using conventional colony morphology, Gram stain reaction, and disk diffusion test for antibiotic susceptibility testing (AST). Confirmation of isolates, antibiogram, minimum inhibitory concentration (MIC) and detection of resistance phenotypes, were carried out by the automated Vitek 2 (BioMérieux) identification and susceptibility method. ES $\beta$ L production was confirmed by the synergy and combination disk tests. ES $\beta$ L genes were detected by conventional simplex PCR and biofilm formation was detected by the tissue culture plate (TCP) method. **Results:** A total of 630 patients' clinical samples (one sample per patient) were processed. *Klebsiella pneumoniae* was isolated in 40 (6.3%) samples, and 15 of these (37.5%) produced ES $\beta$ L. In the disk diffusion AST assay, all 40 *K. pneumoniae* isolates were resistant to ampicillin and ticarcillin while all 40 isolates were sensitive to cefoxitin, imipenem and ertapenem. KP-ES $\beta$ L producing isolates were more frequently recovered from intensive care unit (33.3%) and from urine (46.7%) samples. Group 1 *bla*CTX-M genes were detected in 13 of the 15 (86.7%) KP-ES $\beta$ L isolates, and 46.7% of these isolates were moderate biofilm producers.

**Conclusion:** There is need for health departments to put in place preventative measures through regular surveillance of these resistant pathogens and initiating appropriate infection prevention and control strategies to limit their spread in Algerian hospitals and worldwide.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, ES $\beta$ L, biofilm, PCR, antibacterial resistance

Received May 20, 2020; Revised July 14, 2020; Accepted July 26, 2020

Copyright 2021 AJCEM Open Access. This article is licensed and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License <a rel="license" href="http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided credit is given to the original author(s) and the source. Editor-in-Chief: Prof. S. S. Taiwo

### ***Klebsiella pneumoniae* productrice de-lactamase spectre tendu dans l'hôpital universitaire militaire régional d'Oran, Algérie: résistance aux antibiotiques, formation de biofilm et détection des gènes *bla*CTX-M et *bla*TEM**

\*<sup>1</sup>Benbrahim, C., <sup>1</sup>Barka, M. S., <sup>2</sup>Benmahdi, L., <sup>3</sup>Zatout, A., et <sup>1</sup>Khadir, A.

<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement, Département de Biologie, Faculté des sciences de la nature et de la vie de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid, 13000 Tlemcen, Algérie

<sup>2</sup>Laboratoire de microbiologie à l'hôpital universitaire militaire régional d'Oran, Algérie

<sup>3</sup>Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale, Département des Sciences Biologiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie.

\*Correspondance à: [chahla.benbrahim@univ-tlemcen.dz](mailto:chahla.benbrahim@univ-tlemcen.dz)

#### **Abstrait:**

**Contexte:** *Klebsiella pneumoniae* est un pathogène bactérien communément associé aux infections nosocomiales et communautaires sévères, en particulier par l'acquisition de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (ES $\beta$ L) et la capacité de formation de biofilm. Les objectifs de cette étude sont de déterminer la prévalence des isolats de *K. pneumoniae* producteurs de  $\beta$ LSE (KP- $\beta$ LSE) au CHU d'Oran (HMRUO) Algérie, caractériser leur profil de résistance aux antibiotiques, détecter génétiquement les gènes *bla*TEM et *bla*CTX-M, et évaluer leur capacité de formation de biofilm.

**Méthodologie:** Différents échantillons cliniques, y compris du sang, des liquides céphalo-rachidiens, de l'urine mictionnelle et du cathéter, du pus, des abcès périrectal et des plaies chirurgicales ont été prélevés des patients suspectés d'infections cliniques dans différentes unités et départements de l'hôpital. Les échantillons ont été cultivés sur des milieu de culture: deglose au sang, MacConkey et CLED (pour l'urine uniquement) et incubés en aérobie pendant 24 heures à 37°C pour l'identification préliminaire des bactéries en utilisant la morphologie conventionnelle des colonies, la coloration de Gram et le test de diffusion sur disque pour les tests de sensibilité aux antibiotiques (AST). La confirmation des isolats, l'antibiogramme, la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la détection des phénotypes de résistance ont été réalisés par la méthode automatisée d'identification et de sensibilité sur Vitek 2 (BioMérieux). La production de  $\beta$ LSE a été confirmée par les tests de synergie et de double disques. Les gènes de  $\beta$ LSE ont été détectés par PCR simplex conventionnelle et la formation de biofilm a été détectée par la méthode de la plaque de culture tissulaire(TCP).

**Résultats:** Un total de 630 échantillons cliniques de patients (un échantillon par patient) ont été traités. *Klebsiella pneumoniae* a été isolé dans 40 échantillons (6,3%) et 15 d'entre eux (37,5%) ont produit des  $\beta$ LSE. Dans le test AST à diffusion sur disque, tous les 40 isolats de *K. pneumoniae* étaient résistants à l'ampicilline et à la ticarcilline, tandis que les 40 isolats étaient sensibles à la céfoxitine, à l'imipénème et à l'ertapénème. Les isolats producteurs de

KP- $\beta$ LSE ont été plus fréquemment récupérés dans les unités de soins intensifs (33,3%) et dans les échantillons d'urine (46,7%). Les gènes *bla*CTX-M du groupe 1 ont été détectés dans 13 des 15 isolats de KP- $\beta$ LSE (86,7%), et 46,7% de ces isolats étaient des producteurs de biofilm modérés.

**Conclusion:** Il est nécessaire que les services de santé mettent en place des mesures préventives grâce à une surveillance régulière de ces pathogènes résistants et à la mise en place de stratégies appropriées de prévention et de contrôle des infections pour limiter leur propagation dans les hôpitaux algériens et dans le monde.

**Mots clés:** *Klebsiella pneumoniae*,  $\beta$ LSE, biofilm, PCR, résistance antibactérienne

### Introduction:

Bacterial antibiotic resistance (ATB) is constantly evolving. For over 30 years, anti-biotic resistance among enterobacteria to the third-generation cephalosporins (3GC) has been steadily increasing, notably through the production of extended-spectrum beta lactamases (ES $\beta$ Ls). These enzymes including TEM, SHV, CTX-M and their derivatives confer resistance on enterobacteria to all  $\beta$ -lactam agents with exception of cephamycins and carbapenems (1,2). While ES $\beta$ L-producing enterobacteria were mostly observed in hospitals with varying isolation frequencies from hospital to hospital, and even from department to department within the same hospital, the diffusion of these multiresistant pathogens into community is of increasing concern. The transmission of genes encoding ES $\beta$ L, mainly through plasmids, is responsible of their rapid dissemination and thus account for the increased prevalence of ES $\beta$ L-producing bacteria worldwide, which constitute a major public health problem (1,3).

*Klebsiella pneumoniae* is an important opportunistic pathogen causing nosocomial and community associated infections (4). The organism is part of the normal microflora of the intestine and commonly responsible for severe infections of the respiratory tracts (hospital acquired and ventilator associated pneumonia), catheter-related urinary tract infection, meningitis, blood stream infections (bacteremia and septicemia), infections of surgical and non-surgical wounds, diarrhea, diseases, prosthetic valve endocarditis, peritonitis, and osteomyelitis (5-11).

The first ES $\beta$ L-producing *K. pneumoniae* strains were first reported in Europe in 1982 where a new resistance to ceftazidime and aztreonam from plasmid-transmitted  $\beta$ -lactamase enzyme was quickly and easily disseminated to other Gram-negative bacteria including *Escherichia coli*. Since the discovery of these enzymes, they have not stopped growing, and today there are over than 200 different ES $\beta$ L enzymes.

The impact of the ES $\beta$ L strains is very significant, especially in the intensive care units with a high propensity for epidemic outbreaks. It has been shown in previous European studies that *K.pneumoniae* and *E. coli* were the two most common bacterial species frequently involved in ES $\beta$ L production (12).

There is need for active surveillance for ES $\beta$ L-producing pathogens in high-risk populations using appropriate antimicrobial techniques because these pathogens are generally multiresistant (12,13). ES $\beta$ L genes are typically carried by large transferable plasmids (85–275kb) on which they are often other associated genes coding for resistance to aminoglycosides, chloramphenicol, sulfonamides, trimethoprim, tetracyclines and fluoroquinolones (12). Although, the  $\beta$ -lactamase inhibitors are used to treat serious infection caused by ES $\beta$ L-producing *K.pneumoniae*, this should be done with caution because *in vitro* sensitivity does not necessarily predict *in vivo* efficacy (13).

Surveys conducted in different countries during specific time periods revealed that once a CTX-M  $\beta$ -lactamase enters a specific geographic area, it becomes predominant, and displaces or superimposes itself over TEM and SHV ES $\beta$ L variants (14). The main virulence factors contributing to the pathogenesis of *K.pneumoniae* are the capsular polysaccharides and pili type 1 and 3 (6, 7). Biofilms formation is another virulence factor. Biofilms are bacterial populations linked by exopolysaccharide matrices at the surface. This matrix of extracellular polymeric substances (EPS) consists mainly of polysaccharides, proteins, lipids and nucleic acids in varying amounts (11). The first strain of *K. pneumoniae* producing biofilms was described in the late 1988 (7). Biofilm-forming bacteria are often observed on the urinary catheter and on the surface of tissues and biomaterials usually at sites of persistent infection, where biofilm formation is a major cause of implant failure, and often limits the lifetime of many permanent medical devices (7, 11).



The ability of *K. pneumoniae* to form biofilm provides protection against the host immune system as well as to antibiotics, therefore, biofilms are a major cause of resistance to antimicrobial agents, with resultant high costs of treatment of infections caused by these strains (15). For these reasons, information on ES $\beta$ L and biofilm producing organisms are required for implementation of preventive procedures and application of infection control measures. The objectives of this study are; to determine the prevalence of ES $\beta$ L-producing *K. pneumoniae*, isolates and their antibiotic resistance profile, genetically detect *bla*TEM and *bla*CTX-M genes, and evaluate their capacity to form biofilms.

### Materials and method:

#### Study setting and design

This descriptive cross-sectional study was conducted over a period of 5 months (from October 29, 2017 to March 29, 2018) on 630 patients from different units and departments of the Regional Military University Hospital of Oran, Algeria, whose clinical samples were collected and processed at the Microbiology Laboratory of the hospital.

#### Sample and data collection, culture, bacteria isolation and identification

Clinical specimens comprising voided urine (n=333), pus (n=173), blood for culture (n=98), cerebrospinal fluids (n=12), catheter urine (n=8), perirectal abscess (n=4), and surgical wound (n=2) were collected by standard procedures from patients in different departments/units (paediatrics, infectious disease, general surgery, oncology, pneumology, haematology, intensive care unit, urology, re-education, nephrology, child surgery, and psychiatry) of the hospital, and from some external patients. From each patient, socio-demographic information including age and gender, specimen types, service units, and sampling date, were collected into a designed collection form.

Samples were cultured on

Blood and MacConkey agar plates (Fluka), with the exception of urine samples which were cultured on Cysteine Lactose Electrolytes Deficient (CLED) agar medium. All culture plates were incubated aerobically for 24 hours at 37°C, and bacteria were preliminarily identified by conventional microbiological methods of colony morphology and Gram reactions, and then purified by successive subcultures on MacConkey agar purity plates. Confirmation of *K. pneumoniae* isolates, antibiogram, minimum inhibitory concentrations (MICs) determination and detection of resistance phenotypes were performed with automated VITEK 2 (BioMérieux) ID and susceptibility platform, using GN and AST-N 233 tapes. The susceptibility results were interpreted according to the recommendations of CLSI (16).

#### Synergy test for ES $\beta$ L production

Synergy test was performed under the same conditions of the antibiogram after detection of resistance phenotypes by VITEK 2 (BioMérieux) ID. Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) disk (20/10 $\mu$ g) was placed at 30 mm center to center of ceftazidime (CAZ) disk (30 $\mu$ g), cefotaxime (CTX) disk (30 $\mu$ g), ceftriaxone (CRO) disk (30 $\mu$ g) and aztreonam (ATM) disk (30  $\mu$ g) on MH agar plate that has been inoculated with 0.5 McFarland standards suspension of *K. pneumoniae* isolates. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 was used as control. ES $\beta$ L production results in the appearance of an image of synergy or champagne plug (17).

#### Combination disk test for ES $\beta$ L production

The combination disk test was performed by placing clavulanic acid disk (10 $\mu$ g) and a third generation cephalosporin (3GC) disk at a distance of 30 mm on a MH agar plate that has been inoculated with 0.5 McFarland standards suspension of *K. pneumoniae* isolates (test), and *K. pneumoniae* ATCC 700603 as control. ES $\beta$ L production was phenotypically confirmed when the inhibition zone diameter of the 3GC disk tower applied after diffusion of the clavulanic acid disk is  $\geq$  5 mm in relation



to the inhibition zone diameter of the 3GC disk tower(17).

### **Molecular detection of ES $\beta$ L genes**

Conventional simplex PCR for the detection of *bla*CTX-M and *bla*TEM genes was performed in the laboratory of Department of Public Health in Naples, Italy, with specific primers (18-20) as shown in Table 1. The bacterial DNA was extracted by the boiling method (21). PCR was performed in a thermal cycler (Applied Biosystems 2720, California, USA) and the amplification conditions were; initial denaturation at 94°C for 5 mins followed by 30 cycles at 94°C for 25 seconds, annealing at 52°C for 40 seconds, elongation for 72°C for 50 seconds and final elongation at 72°C for 6 minutes. The PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel, visualized in the UV transilluminator after staining with ethidium bromide, and then photographed. The molecular weight marker (100 bp) was used to determine the sizes of the expected bands (Table1).

### **Biofilm formation by Tissue Culture Plate method (TCP)**

Test for biofilm formation for the *K. pneumoniae* isolates was performed as previously described (22, 23) with some modifications. For this purpose, 96-well polystyrene microplates were used. Isolates were grown on nutrient agar for 18-24 hours at 37°C. One colony of each strain was inoculated in 5 ml of Brain Heart Infusion Broth (BHIB) and incubated at 37°C for 24h. Then diluted to 1:100 in BHIB + 2% sucrose.

Each well in the microplate was filled with 200 $\mu$ L of this dilution (three independent cultures for each species). A sterile broth of BHIB+2% sucrose was used as a negative control. The microplates were incubated at 37°C for 24 to 48 hours, after which the well contents were gently removed and rinsed four times with TBS (pH 7.2) and allowed to dry at 60°C for 30 min. Then, the cells adhering to the polystyrene support in the wells were coloured with 200 $\mu$ L of 1% (w/v) crystal violet for 30 minutes incubation at room temperature. The extra purple crystal violet was poured out and rinse four times at the sterile physiological waters. 200 $\mu$ L of ethanol 95% (v/v) was added to each well and left for 15 minutes before reading the optical density (OD) at 550nm using a microplate reader (Bio-Rad ELISA, PR5100).

The interpretation of the results was carried out according to Vuotto et al., (15). The OD of the strains was obtained by the average of the three wells and compared to the OD (mean absorbance) of the negative control (OD<sub>c</sub>). Non-biofilm producer had OD $\leq$ OD<sub>c</sub>, weak biofilm producer had OD<sub>c</sub> < OD  $\leq$  2xOD<sub>c</sub>, moderate biofilm producer had 2OD<sub>c</sub> < OD  $\leq$  4xOD<sub>c</sub>, and strong biofilm producer had 4xOD<sub>c</sub> < OD.

### **Statistical analysis**

Data were analysed and presented on Excel sheet as frequency distribution tables and simple graphs. The susceptibility data were analyzed and interpreted using the WHONet 5.6 antibiotic susceptibility surveillance software

Table 1: Primer sequences used for PCR detection of ESβL genes

Gene	Sequence	Sequences (5'--3')	Size of the fragments (pb)
CTX-M group 1	CTX-M - F	5'-AAA AAT CAC TGC GCC AGTTC	415
CTX-M group 2	CTX-M - R	5'-AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT	552
	CTX-M - F	5'-CGA CGC TAC CCC TGC TAT T	
CTX-M group 9	CTX-M - R	5'-CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG	205
	CTX-M - F	5'-CAA AGA GAG TGC AACGGA TG	
CTX-M group 8	CTX-M - R	5'-ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC	666
	CTX-M - F	5'-TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC	
CTX-M group 25	CTX-M - F	5'-GCA CGA TGA CAT TCG GG	327
CTX-M group 8/25	CTX-M - R	5'-AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	
TEM	TEM - F	5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT G	861
	TEM - R	5'-TTA CCA ATG CTT CAG TGA G AAT	

F = Forward; R= Reverse; bp = base pair

**Results:**

During the study period, a total of 630 samples from 630 patients with clinical infections were collected and processed for isolation and identification of bacteria in the laboratory. *K. pneumoniae* was isolated in 40 (6.3%) samples. In the AST assay, all the *K. pneumoniae* isolates were resistant (100%) to ampicillin and ticarcillin, 10% to amoxicillin/clavulanic acid, and 2.5% to piperacillin/tazobactam. On the other hand, 100% of the isolates were sensitive to ceftazidime, imipenem and ertapenem, while sensitivity to other antibiotics were amikacin (97.5%), ofloxacin (87.5%), ciprofloxacin (82.5%), nalidixic acid (67.5%), gentamicin (67.5%), tobramycin (65%), cefotaxime (62.5%), ceftazidime (61.5%), cephalothin (60%), nitrofurantoin (55%), and trimethoprim/sulfamethoxazole (50%)

(Fig 1). The MIC of cefotaxime (CTX) was  $\geq 64\mu\text{g/ml}$ , MIC of ceftazidime (CAZ) ranged from 1- $\geq 64\mu\text{g/ml}$ , MIC of ceftazidime (FOX) was in the range of  $\leq 4-8\mu\text{g/ml}$  and MIC of amoxicillin/clavulanic acid (AMC) was between 16 and  $\geq 32\mu\text{g/ml}$ . Fifteen (15) of the 40 (37.5%) *K. pneumoniae* isolates were ES $\beta$ L-producing strains (Fig 2a,b) but no carbapenemase producing strain was detected.

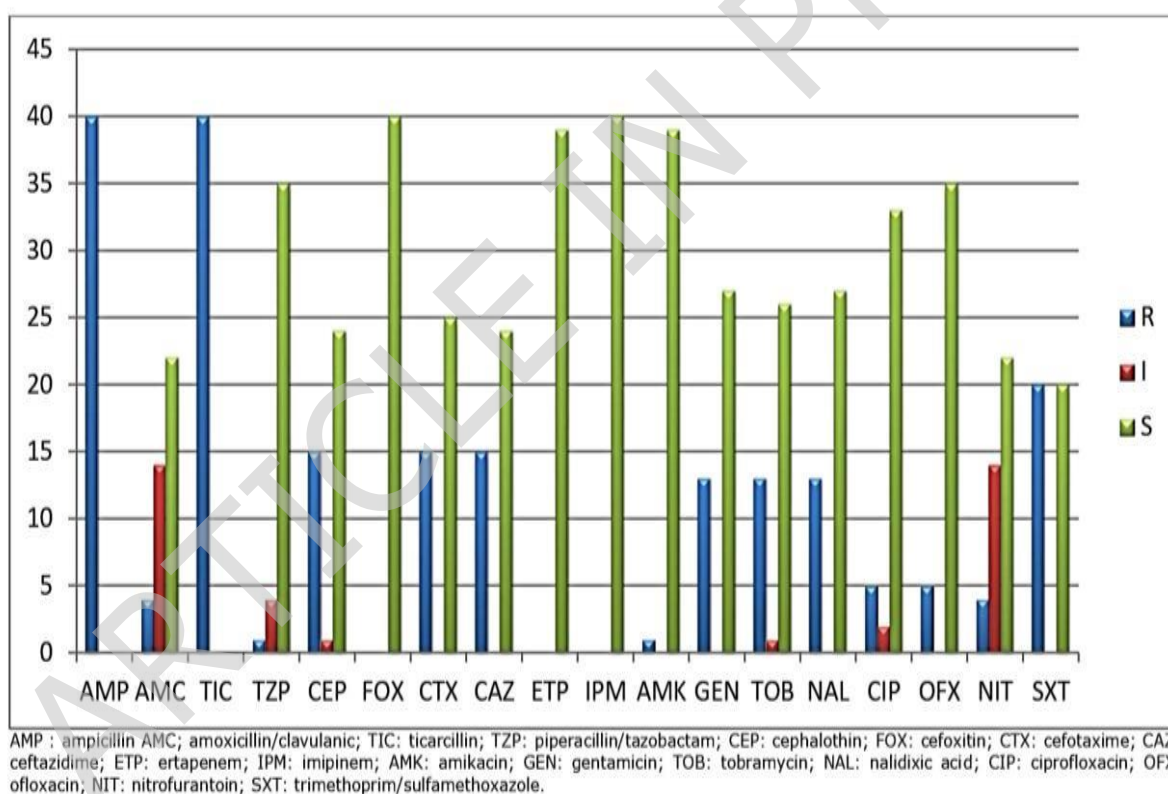


Fig 1: Antimicrobial susceptibility profiles of *Klebsiella pneumoniae* isolates



Fig 2a: ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. A: test positive by synergy; B: test positive by combination disk

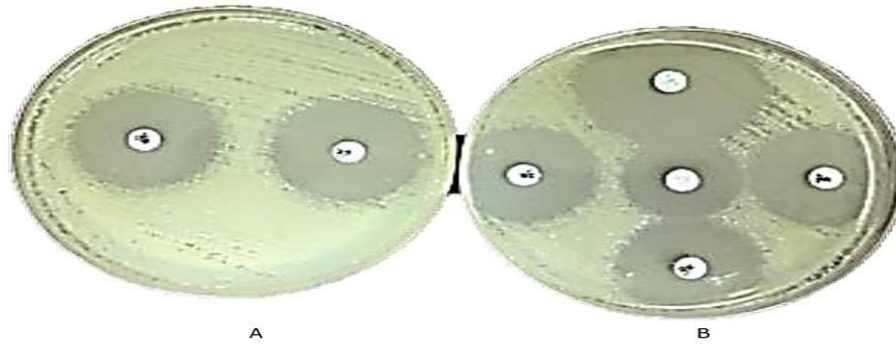


Fig 2b: Non-ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. A: test negative by combination disk; B: test negative by synergy

The ESβL-producing isolates were more frequently recovered from urine (46.7%), followed by pus, blood culture and perirectal abscess (13.3% each), and least from surgical wounds and catheters (6.7% each). There were no ESβL-producing strains in the cerebrospinal fluids (Table 2).

Table 2: Distribution of *Klebsiella pneumoniae* and KP-ESβL isolates according to patients' samples

Samples	Number positive for <i>K. pneumoniae</i> (%)	No positive for ESβL (%)
Surgical wound (n=2)	1 (2.5)	1 (6.7)
Perirectal abscess (n=4)	2 (5.0)	2 (13.3)
Catheter urine (n=8)	2 (5.0)	1 (6.7)
Cerebrospinal fluid (n=12)	2 (5.0)	0
Blood (n=98)	2 (5.0)	2 (13.3)
Pus (n=173)	11 (27.5)	2 (13.3)
Urine (n=333)	20 (50.0)	7 (46.7)
Total (n=630)	40	15 (37.5)

Twenty-seven *K. pneumoniae* isolates (65.7%) were recovered from male patients, 13 (48.2%) of which were ESβL producers, while 13 isolates (32.5%) were recovered from female patients, 2 (15.4%) of which were ESβL producers. The age group distribution of the patients with KP-ESβL-producing isolates shows that 3 patients (20%) were in the age group 21-30 years, while 2 patients (13.3%) each were in agegroups <10 years, 10-20 years, 31-40 years, 41-50

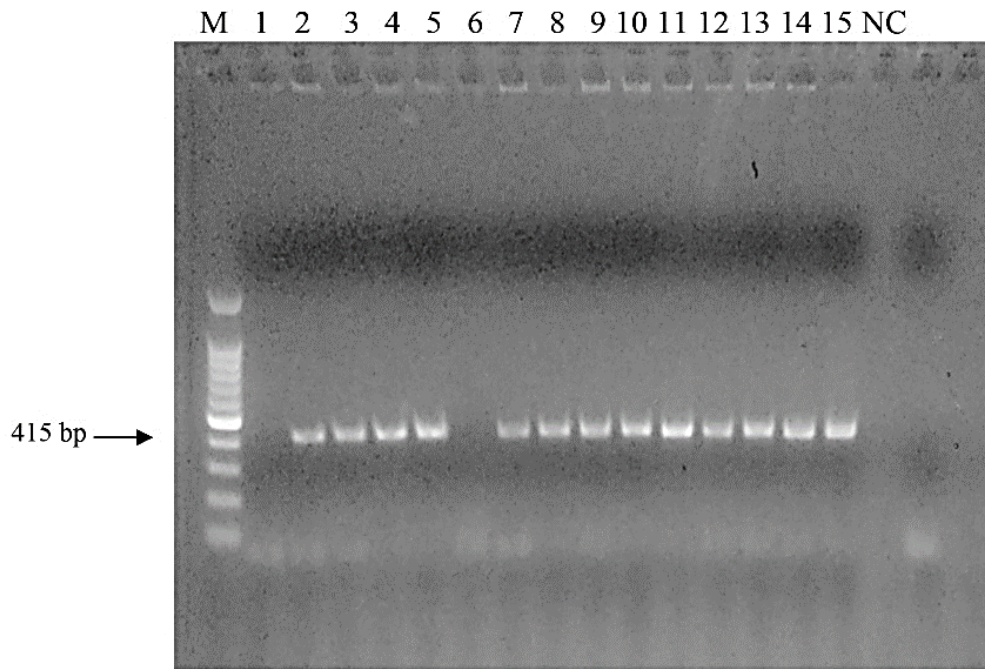
years, 51-60 years and >60 years. Most ESβL-producing strains were isolated in the intensive care unit (33.3%, n=5), followed by general surgery (20%, n=3), paediatrics and urology units (13.3%, n=2) each, and 6.7% (n=1) each from nephrology, re-education and psychiatry units (Table 3).

Table 3: Distribution of *Klebsiella pneumoniae* and KP-ESβL isolates by departments/units of patients

Service	Number of <i>K. pneumoniae</i> isolates	No positive for ESβL (%)
Paediatrics	3	2 (13.3)
Infectious disease	6	0
General surgery	6	3 (20)
Oncology	1	0
Pneumology	3	0
Haematology	1	0
Intensive care unit	8	5 (33.3)
Urology	5	2 (13.3)
Re-education	1	1 (6.7)
Nephrology	4	1 (6.7)
Child surgery	1	0
Psychiatry	1	1 (6.7)
Total	40	15 (37.5)

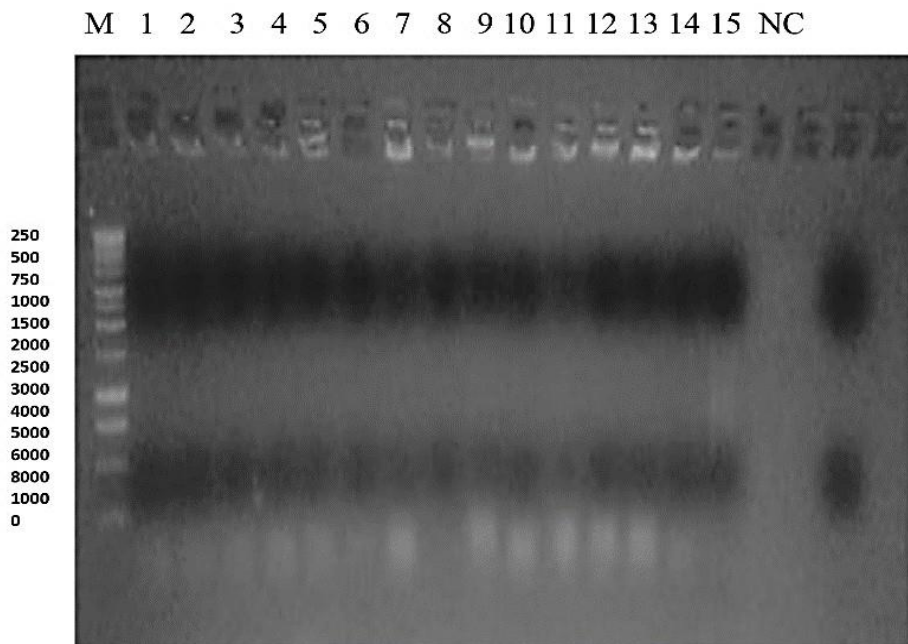
Group 1 *bla*CTX-M gene was detected by PCR from 13 (86.7%) of the 15 KP-ESβL producing isolates, while 2 (13.3%) isolates did not contain the gene (Fig 3a). No *bla*TEM gene was detected in any of the isolates (Fig 3b). The results of the biofilm formation with TCP test for KP-ESβL producing isolates showed that 7 (46.7%) were moderate, 7 (46.7%) were weak biofilm producers, while 1 (6.7%) was non biofilm producer (Fig 4).





First lane, molecular weight marker; Gene Ruler 100 bp DNA ladder, lanes numbered 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 show 415 bp bands of PCR products while lanes number 1 and 6 shows negative result. NC: Negative control

Fig 3a: Gel electrophoresis of the PCR products of *bla*<sub>CTX-M</sub> gene



First lane, molecular weight marker; Gene Ruler 100 bp DNA ladder, lanes number 1 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 shows negative result. NC: Negative control

Fig 3b: Gel electrophoresis of the PCR products of *bla*<sub>TEM</sub> gene

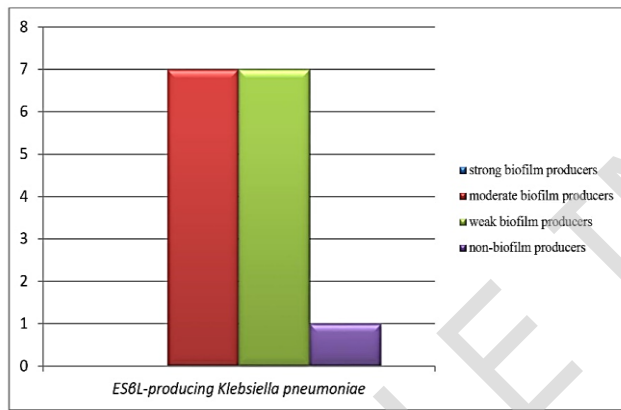


Fig 4: Detection of biofilm formation by the TCP method

## Discussion:

During the study period, *K. pneumoniae* was involved in 6.3% of clinical infections among the 630 patients, a rate that is similar to that reported by Khalifa and Khedher (12). All the *K. pneumoniae* isolates were resistant to ampicillin and ticarcillin (100%), which is consistent with the findings of Lagha et al., (24) and Muggeo et al., (25) in their previous studies. However, they were highly sensitive to amoxicillin/clavulanic acid (AMC) (90%) and piperacillin/tazobactam (97.5%), a finding that is also consistent with that of Rasamiravaka et al., (26) especially for AMC, although Muggeo et al., (25) and Khalifa and Khedher (12) reported *K. pneumoniae* isolates with intermediate resistance to AMC in their studies, while higher AMC resistance rates were reported by Lagha et al., in 2014 (24) and Benaicha et al., in 2017 (27). However, for piperacillin/tazobactam combination, the resistance rate (2.5%) in our study is lower than the rates reported by Lagha et al., (24) and Muggeo et al., (25). The decrease in the resistance rate may be an indicator of the presence of CTX-M type  $\beta$ -lactamases and the association of penicillinases with inhibitors, which permit recovery of the activity of the molecules. The  $\beta$ -lactamase inhibitors have structural similarity with penicillin, and are effective against many sensitive

organisms expressing class A lactamases (17). In addition, the combination of penicillin and  $\beta$ -lactamase inhibitor has been actively used in the treatment of infections caused by ES $\beta$ L-producing bacteria and could be proposed for outpatient treatment of urinary tract infections caused by ES $\beta$ L-producing *Escherichia coli* strains (1,28).

All the *K. pneumoniae* isolates in the study were sensitive to ceftazidime, imipenem and ertapenem which agrees with the reports of Alibi et al., (20) and Lagha et al., (24), although different susceptibility rates have been reported in many other studies (11, 15,25,26,29). Currently, carbapenems are the only class of antimicrobials historically effective against KP-ES $\beta$ L producing strains (13).

However, it is essential to ensure the rational use of carbapenems because there are no new antibiotics in the pipeline available for use in the near future for the treatment of infections caused by ES $\beta$ L-producing Enterobacteriaceae (1). On the otherhand, *K. pneumoniae* isolates in our study were highly sensitive to amikacin, ofloxacin and ciprofloxacin, and moderately sensitive to cephalothin, cefotaxime, ceftazidime, gentamicin, tobramycin, and nalidixic acid, which agrees with findings of some other studies (15, 17, 24, 27, 29).

However, Muggeo et al., (25) and Rasamiravaka et al., (26) reported lower sensitivity (83%) to amikacin in their studies compared to 97.5% in our own study. Only half of the *K. pneumoniae* isolates were sensitive to trimethoprim/sulfamethoxazole and nitrofurantoin. Rasamiravaka et al., (26) and Vuotto et al., (15) have reported differing susceptibility rates of *K. pneumoniae* isolates to trimethoprim/sulfamethoxazole in their studies. The fluoroquinolones (FQ) are the potential drug of choice for treating infections caused by  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteria that are

## Publications et communication

usually FQ sensitive (25). However, Muggeo et al., (25) reported 100% resistance of *K. pneumoniae* ST395 to fluoro-quinolones in north-eastern France, which is contrary to the findings of high susceptibility in our study. *Klebsiella* species are naturally sensitive to FQ, but the misuse of these antibiotic in human and veterinary medicine practices have, over the past decades, resulted in evolution of resistance to this antibiotic family, reduced their effectiveness, and compromised the future use of this important class of antibacterial drugs (12).

In our study, 15 of the 40 (37.5%) *K. pneumoniae* isolates were ES $\beta$ L-producing strains, which is proximate to 41.1% rate reported by Pirzaman et al., (2). Different prevalence rates for ES $\beta$ L-producing strains have been reported in Tunisia (12), Algeria (24) and Russia (30), and ES $\beta$ L rates are usually higher in Asian countries, with up to 75% (17).

The phenomenon of ES $\beta$ L production has been observed in various pathogenic bacteria, but more frequent in *E. coli* and *K. pneumoniae*. The KP-ES $\beta$ L strains were most frequently recovered from urine in our study which is consistent with the findings of other studies (2, 26, 27, 31, 32, 33), probably because urine is about the most commonly collected specimens for clinical investigation. Infections caused by ESBL-producing bacteria can occur in people of all ages, but distribution could be determined by the immunological status of patients and prevalence of antibiotic misuse. KP-ES $\beta$ L isolates were recovered across all age groups in our study but most frequently in age group 21-30 years (20%), although the number of isolates from patients in our studies is too few to make any significant inference. However, Lagha et al., (24) reported that the most KP-ES $\beta$ L were recovered

from patients between the ages 27-85 years, Gravey et al., (34) reported 4.1% KP-ES $\beta$ L rate in the age group 18-64 years and 4.2% in the age group >65 years. *K. pneumoniae* isolates as well as KP-ES $\beta$ L strains were mostly recovered from male patients in our study. This is in close agreement with those of Bush et al., (33), Deng et al., (35) and Lagha et al., (24).

Also, most KP-ES $\beta$ L strains were isolated from the intensive care and general surgery units of the hospital, with 33.3% and 20% rates respectively. This agrees with the finding of Lagha et al., (24), but Khalifa and Khedher (12) reported lower rates than ours, with rates of 5% in paediatrics, 2.5% in medical resuscitation, and 0% in surgical unit. Numerous studies have reported isolation of KP-ES $\beta$ L strains from hospitalized patients and nosocomial epidemics caused by these strains have been reported mainly in intensive care units (20). We did not isolate KP-ES $\beta$ L strain from infectious, oncology, pneumology, haematology and child surgery departments of the hospital. Although, this might suggest good infection prevention and control practices in these service departments, the limited KP-ES $\beta$ L strains in this study cannot allow us to generalize this finding.

PCR assays detected group 1 *bla*CTX-M genes in most (86.7%) of the KP-ES $\beta$ L producing isolates, while few (13.3%) isolates did not carry the gene. This is similar to what Alibi et al., (20) reported in their study for *bla*CTX-M but in addition, they reported *bla*TEM in 56.8% of their isolates. However, Paterson et al., (36) reported 23.3% *bla*CTX-M and 87% *bla*TEM among their isolates. In Abidjan, Côte d'Ivoire, Guessennd et al., (31) reported that 63.4% of their strains carried *bla*TEM, 58.5% carried group 1 *bla*CTX-M, none carried groups 2 and 9 *bla*CTX-M, one strain carried group 8 *bla*CTX-M and three strains carried *bla*TEM, *bla*SHV



and group 1 *bla*CTX-M. In another study in Korea by Jung et al., (32), only group 1 *bla*CTX-M (75.9%) and/or group 9 *bla*CTX-M (20.5%) were reported. In an Egyptian study, *bla*CTX-M was reported in three cases and *bla*TEM was detected only in one case (37). KP-ES $\beta$ L strains carrying *bla*CTX-M and/or *bla*TEM genes are usually resistant to third generation cephalosporins (ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime), and several studies have shown that the presence of these genes could confer resistance to the third-generation cephalosporins (38). With the widespread use of cefotaxime and ceftriaxone (36), it is not surprising that *bla*CTX-M ES $\beta$ L strains are now found in many countries and reported at high rates among *K. pneumoniae* and other bacteria pathogens (20).

It has been widely reported in the literature that biofilm production provides a significant benefit by protecting pathogens against host immune system and reducing susceptibility to antibiotic therapy. In our study, 46.7% of KP-ES $\beta$ L strains were moderate and 46.7% were mild biofilm producers, which agrees with the finding of Seifi et al., (7). Martino et al., (39) reported 48.5% of *K. pneumoniae* strains to be strong biofilm producers; Vuotto et al., (15) reported 67.5% of strains to be potent, and 25% to be moderate biofilm producers, and Khodadadian et al., (11) reported 91.2% of their isolates to be biofilm producers. Surgers et al., (40) have reported a close relationship between several virulence factors and the ability to produce biofilm. The ability of *K. pneumoniae* strains to adhere and colonize inert surfaces may be a general feature of this species, as high incidence of effective adhesion of *K. pneumoniae* strains to glass and polypropylene surfaces in clinical and water distribution systems, have been observed (39).

### Conclusion:

Infections caused by ES $\beta$ L-producing Gram-negative bacteria are increasing, particularly in immunocompromised patients and in high-risk units of hospitals. These infections are associated with higher costs of healthcare in Algeria and worldwide, as a result of prolonged hospitalization and the use of expensive drugs. The prevalence of KP-ES $\beta$ L-producing strains reported in this study is a reflection of the level of infection prevention and control practices in our hospital.

Surveillance of these antibiotic resistant pathogens by detection of  $\beta$ -lactamases and molecular identification of prevalent ES $\beta$ L genes, as well as good knowledge of biofilms formation, will be essential for reliable epidemiological characterization of these pathogens, in order to prevent the risk of transmission, and implement antibiotic stewardship and appropriate infection control measures.

### Acknowledgements:

The authors acknowledge the staff of Public Health Department, Federico II University, Naples, Italy and Laboratory of Microbiology at the Regional Military University Hospital Oran, Algeria, for their collaborations

### References:

1. El Bouamri, M. C., Arsalane, L., Kamouni, Y., Berraha, M., and Zouhair, S. Recent Evolution of the Epidemiological Profile of the Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing Uropathogenic Enterobacteria in Marrakech, Morocco. *Progrès en urologie*. 2014; 24 (7):451-455.
2. Pirzaman, A. N., and Mojtahedi, A. Investigation of antibiotic resistance and the presence of integron genes among

## Publications et communication

- ESBL producing *Klebsiella* isolates. Meta Gene. 2018; 19:37-41.
3. Belmonte, O., Drouet, D., Alba, J., Moiton, M. P., and Kuli, B. Évolution de la résistance des entérobactéries aux antibiotiques sur l'île de la Réunion: émergence des bêta-lactamases à spectre élargi. Pathologie Biologie. 2010; 58(1): 18-24.
  4. Markovska, R., Stoeva, T., Boyanova, L., et al. Dissemination of successful international clone ST15 and clonal complex 17 among Bulgarian CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017; 89 (4):310–313.
  5. Akturk, H., Sutcu, M., Somer, A., et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factors for progression to infection. Braz J Infect Dis. 2016; 20 (2): 134- 140.
  6. Cescutti, P., De Benedetto, G., and Rizzo, R. Structural Determination of the Polysaccharide Isolated from Biofilms Produced by a Clinical Strain of *Klebsiella Pneumoniae*. Carbohydrate Research. 2016; 430:29-35.
  7. Seifi, K., Kazemian, H., Heidari, H., et al. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. Jundishapur J Microbiol. 2016; 9 (1):e30682.
  8. Delatour, C., Chalvon, N., Prieur, N., and Mateu, P. A history of community-acquired hyper-virulent *Klebsiella pneumoniae* severe sepsis. Anaesthesia Critical Care and Pain Medicine. 2018; 37 (3): 273–275.
  9. Huang, Y. T., Jiang, J. Y., Hsu, M. S., et al. The prevalence of rectal carriage of *Klebsiella pneumoniae* amongst diabetic patients and their clinical relevance in Taiwan: A five-year prospective study. J Microbiol Immunol Infect. 2018; 51 (4):510-518.
  10. Hauser, N., Tanner, E., Keuroghlian, M., and Koduri, L. A case of *Klebsiella oxytoca* endo- carditis in an intravenous drug user. ID Cases. 2017; 9:77-78.
  11. Khodadadian, R., Rahdar, H. A., Javadi, A., Safari, M., and Khorshidi, A. Detection of VIM-1 and IMP-1 genes in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. Microbial Pathogenesis. 2018; 115:25–30.
  12. Ben Haj Khalifa, A., and Khedher, M. Epidemiological study of *Klebsiella* spp. uropathogenic strains producing extended-spectrum  $\beta$ - lactamase in a Tunisian university hospital. Pathologie Biologie. 2012; 60(2):e1–e5.
  13. Panda, P. K., Jhon, N., and Sao, S. Antibigram, ESBL production and carbapenemase detection of *Klebsiella* spp. in hospital-acquired infection. Apollo Medicine. 2016; 13 (3):156–162.
  14. Barrios, H., Garza-Ramos, U., Mejia-Miranda, I., et al. ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: The most prevalent clinical isolates obtained between 2005 and 2012 in Mexico. J Global Antimicrob Resist. 2017; 10:243-246.
  15. Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. J Appl Microbiol. 2017; 123 (4):1003–1018.
  16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility; Twenty-Fourth informational supplement, 2014 Philadelphia.
  17. Abrar, S., Vajeeha, A., Ul-Ain, N., and Riaz, S. Distribution of CTX-M group I and group III  $\beta$ - lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Lahore, Pakistan. Microbial Pathogenesis. 2017; 103:8-12.
  18. Lytsy, B., Sandegren, L., Tano, E., et al. The first major extended-spectrum  $\beta$ - lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15. APMIS. 2008; 116 (4): 302 -308.
  19. Woodford, N., Fagan, E. J., and Ellington, M. J. Multiplex PCR for rapid

## Publications et communication

- detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 57 (1): 154-155.
20. Alibi, S., Ferjani, A., and Boukadida, J. Molecular characterization of extended spectrum beta-lactamases produced by *Klebsiella pneumoniae* clinical strains from a Tunisian Hospital. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 2015; 45(4): 139-143.
21. Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M., Dashti H. M. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal.* 2009; 41 (2):117-122.
22. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., and Barrett, F. F. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *J Clin Microbiol.* 1985; 22 (6): 996- 1006.
23. Extremina, C. I., Fonseca, A. F., Granja, P. L., and Fonseca, A. P. Anti-adhesion and antiproliferative cellulose triacetate membrane for prevention of biomaterial-centred infections associated with *Staphylococcus epidermidis*. *Int J Antimicrob Agents.* 2010; 35 (2):164-168.
24. Lagha, N., Abdelouahid, D. E., Hassaine, H., Robin, F., and Bonnet, R. First characterization of CTX-M-15 and DHA-1  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Laghouat Hospital, Algeria. *Afri J Microbiol Res.* 2014; 8 (11):1221-1227.
25. Muggeo, A., Guillard, T., Klein, F., et al. Spread of *Klebsiella pneumoniae* ST395 non-susceptible to carbapenems and resistant to fluoroquinolones in North-Eastern France. *J Global Antimicrob Resist.* 2017; 13:98-103.
26. Rasamiravaka, T., Shaista Sheila, H. S. L., Rakotomavojaona, T., Rakoto-Alson, A. O., and Rasamindrakotroka, A. Changing Profile and Increasing Antimicrobial Resistance of Uropathogenic Bacteria in Madagascar. *Med Mal Infect.* 2015; 45 (5):173-176.
27. Benaicha, H., Barrijal, S., Ezzakkioui, F., and Elmalki, F.
28. Prevalence of PMQR genes in *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolated from North-West of Morocco. *J Global Antimicrob Resist.* 2017; 10: 321-325.
29. Rodriguez-Bano, J., Navarro, M. D., Retamar, P., Picon, E., and Pascual, A.  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactam Inhibitor Combinations for the Treatment of Bacteremia Due to Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli*: A Post Hoc Analysis of Prospective Cohorts. *Clin Infect Dis.* 2012; 54 (2):167–174.
30. Singh, S. K., Mishra, M., Sahoo, M., et al. Antibiotic resistance determinants and clonal relationships among multidrug-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis.* 2017; 110:31–36.
31. Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., and Stratchounski, L. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47 (12):3724–3732.
32. Guessenn, N., Bremont, S., Gbonon, V., et al. Résistance aux quinolones de type qnr chez les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi à Abidjan en Côte d'Ivoire. *Pathologie Biologie.* 2008; 56 (7-8): 439-446.
33. Jung, Y., Lee, S. S., Song, W., Kim, H. S., and Uh, Y. *In vitro* activity of flomoxef against extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2018; 94 (1): 88-92.
34. Bush, K. R., Ellison, J., Hearn, K., Pfister, T., and Taylor, G. A comparison of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in Alberta using a provincial surveillance system. *Infect Contr Hosp*

## Publications et communication

Epidemiol. 2019;1.

**35.** Gravey, F., Loggia, G., de La Blanchardière, A., and Cattoir, V. Bacterial epidemiology and antimicrobial resistance profiles of urinary specimens of the elderly. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2017; 47 (4):271-278.

**36.** Deng, J., Li, Y. T., Shen, X., et al. Risk factors and molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Xiamen, China. *J Global Antimicrob Resist*. 2017; 11:23–27.

**37.** Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., et al. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47 (11):3554-3560.

**38.** Ahmed, O. I., El-Hady, S. A., Ahmed, M., and Ahmed, I. Z. Detection of bla SHV and bla CTX- M genes in ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Egyptian patients with suspected nosocomial infections. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2013; 14 (3):277-283.

**39.** Ahoyo, A. T., Baba-Moussa, L., Anagon, A. E., et al. Incidence d'infections liées à *Escherichia coli* producteur de bêta lactamase à spectre élargi au Centre hospitalier départemental du Zou et Collines au Bénin. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2007; 37 (11):746-752.

**40.** Martino, P. D., Cafferini, N., Joly, B., and Darfeuille-Michaud, A. *Klebsiella pneumoniae* type pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res Microbiol*. 2003; 154:9-16.

**41.** Surgers, L., Boyd A., Girard P. M., Arlet, G., and Decré, D. Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Med Microbiol*. 2018; 309 (1): 13-1.

# Chemical Composition and Biological Activities of Oregano and Lavender Essential Oils

Chahla Benbrahim 1,\* , Mohammed Salih Barka 1 , Adriana Basile 2 , Viviana Maresca 2 , Guido Flamini 3 , Sergio Sorbo 4 , Federica Carraturo 2 , Rosaria Notariale 5 , Marina Piscopo 2 , Abdelmounaim Khadir 1, Asma Zatout 6 and Sara Mechaala 7

<sup>1</sup> Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment (LAMAABE), Department of Biology, University of Tlemcen, Tlemcen 13000, Algeria;

mohammedsalih.barka@univ-tlemcen.dz (M.S.B.); abdelmounaim.Khadir@univ-tlemcen.dz (A.K.)

<sup>2</sup> Department of Biology, Federico II University, 80126 Naples, Italy; adbasile@unina.it (A.B.); viviana.maresca@unina.it (V.M.); federica.carraturo@unina.it (F.C.); marina.piscopo@unina.it (M.P.)

<sup>3</sup> Dipartimento di Chimica Bioorganica, Università di Pisa, Via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy; guido.flamini@farm.unipi.it

<sup>4</sup> Ce.S.M.A. Department of Biology, University Federico II, 80126 Naples, Italy; sersorbo@unina.it

<sup>5</sup> Department of Precision Medicine, School of Medicine, University of Campania “Luigi Vanitelli”, Via de Crecchio, 80138 Naples, Italy; rosaria.notariale@unicampania.it

<sup>6</sup> Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Department of Biological Sciences, Faculty of Natural Sciences and Life, University of Abdlhamid Ibn Badis, Mostaganem 27000, Algeria; asma.zatout@univ-mosta.dz

<sup>7</sup> Laboratory of Genetics, Biotechnology, and Valorization of Bio-resources (GBVB), Faculty of Exact Sciences and Sciences of Nature and Life, Mohamed Khider University, Biskra 07000, Algeria; s.mechaala@univ-biskra.dz

\* Correspondence: chahla.benbrahim@univ-tlemcen.dz

---

**Citation:** Benbrahim, C.; Barka, M.S.; Basile, A.; Maresca, V.; Flamini, G.; Sorbo, S.; Carraturo, F.; Notariale, R.; Piscopo, M.; Khadir, A.; et al. Chemical Composition and Biological Activities of Oregano and Lavender Essential Oils. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 5688. <https://doi.org/10.3390/app11125688>

Academic Editor: Natália Martins

Received: 24 May 2021

Accepted: 18 June 2021

Published: 19 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Copyright:** © 2021 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland.

This article is an open access article

distributed under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license ([https://creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

4.0/).

**Abstract:** Folk medicine uses wild herbs, especially from the Lamiaceae family, such as oregano and lavender, in the treatment of many diseases. In the present study, we investigated the antibacterial activity of the essential oils of *Origanum glandulosum* Desf. and *Lavandula dentata* L. against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. The chemical composition of essential oils and their effect on the ultrastructure of the tested bacteria and on the release of cellular components that absorb at 260 nm were studied. Furthermore, the cytotoxicity and the production of reactive oxygen species in human lymphocytes treated with essential oils were evaluated. Thymol (33.2%) was the major constituent in *O. glandulosum*, and  $\alpha$ -pinene (17.3%) was the major constituent in *L. dentata*. We observed ultrastructural damage in bacteria and increased release of cellular material. Furthermore, ROS production in human lymphocytes treated with essential oils was lower than in untreated lymphocytes and no cytotoxicity was observed. Therefore, the essential oils of lavender and oregano could be used as a source of natural antibacterial and antioxidant agents with potential pharmacological applications.

**Keywords:** *Origanum glandulosum*; *Lavandula dentata*; *Klebsiella pneumoniae*; antibacterial activity; transmission electron microscopy TEM; cell viability; ROS.

## 1. Introduction

Infections caused by multidrug-resistant bacteria have become a major global public health problem, particularly through the acquisition of new antibiotic resistance, a consequence of the excessive and inappropriate use of antibiotics [1,2]. Over the past 30 years, extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) have diffused in most species of Enterobacteriaceae. Previous European studies have shown that *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* were the species most frequently responsible for ESBL secretion [3], especially *K. pneumoniae*, part of the natural intestinal microflora, but regarded as an opportunistic pathogen [4,5].



## Publications et communication

The colonization of biological tissues by *K. pneumoniae* frequently causes a large variety of diseases [6–12]. *Klebsiella pneumoniae*, belonging to the Enterobacteriaceae family, is a common opportunistic hospital-associated pathogen, accounting for about one-third of all Gram infections overall. It is involved in extra-intestinal infections including urinary tract infections, cystitis, pneumoniae, surgical wound infections, and life-threatening infections such as endocarditis and septicemia. Along with its high prevalence, *K. pneumoniae* is a major source of antibiotic resistance. Data retrieved from the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Instance=GeneralAtlas>) accessed on 1 May 2021) for the years 2005–2015 show non-susceptible rates for *K. pneumoniae* and *Escherichia coli* against the four major antibiotic classes, namely the third-generation cephalosporins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and carbapenems.

It is therefore urgent to make available new molecules with antibacterial effects and which can act against multidrug-resistant strains. Natural substances are promising sources of alternatives drugs [13]. Essential oils have numerous activities, ranging from antibacterial and antiradical [14], insecticide, acaricide, antifungal, cytotoxic, antiviral, antiprotozoan, anthelmintic, antiseptic, and antiinflammatory [15,16], antitumoral, antioxidant, antiallergic, anticonvulsant, antidepressant, contraceptive, antimutagen, analgesic, and diuretic [17], and anticancer activity as well as activity in preventing the development of cardiovascular and degenerative diseases [18]. Folk medicine uses wild herbs, especially from the Lamiaceae family, such as oregano and lavender, in the treatment of many illnesses [19]. *Origanum glandulosum* Desf. is an endemic plant in the African-Mediterranean countries, namely Algeria, Tunisia, and Morocco [2,20]. This plant is used by local populations in traditional medicine to treat numerous diseases and is also commonly used as a skin powder in traditional bathrooms [2,20–23]. *O. glandulosum* is also used in culinary preparations, as a food additive, in the breeding of bees, as a powerful disinfectant, and as an ingredient in perfumes [22,24]. *O. glandulosum* is rich in essential oils that have antibacterial, antifungal, insecticidal, antioxidant, antithrombin, antimutagenic, angiogenic, antiparasitic, and antihyperglycemic properties [20,24,25]. In the literature, thymol, carvacrol, -terpinene, and p-cymene are reported as the main components [2,24]. These chemicals have received increasing interest, particularly carvacrol, due to their many biological activities, including antibacterial and antifungal activities, antispasmodic effects, acetylcholine esterase inhibition, lipid peroxidase inhibition, radical scavenging effect, and cardiac depressant activity [24]. *Lavandula dentata* L. grows indigenously on the mountainous regions bordering the Mediterranean with a temperate and mild climate, whose soils are poor and rocky, and is also wildly common on some islands in the Atlantic and in northern Africa, the Middle East, Arabia, and India [18]. It is cultivated for its aromatic flowers. Various ethnobotanical investigations are in favor of their use in therapy for the treatment of digestive disorders, such as inflammatory liver and intestinal diseases, but also for other inflammatory disorders [26–28]. The plant is also employed in cosmetics, as scent to perfume linen, in the laundry and soap industry, as well as a wound disinfectant [18,27,28]. Recent pharmacological studies relating to the essential oils of *L. dentata* have revealed a broad spectrum of biological activities [18,28].

The aim of this study was to assess in vitro the antibacterial activity of the essential oils of *O. glandulosum* and *L. dentata* against multidrug-resistant *K. pneumoniae* strains. The chemical composition of essential oils and their effect on the ultrastructure of the tested bacteria and on the release of cellular components that absorb at 260 nm were studied. Furthermore, the cytotoxicity and the production of ROS in human lymphocytes treated with essential oils were evaluated.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material and Essential Oils Extraction

## Publications et communication

*Lavandula dentata* L. and *Origanum glandulosum* Desf. were collected in Madegh forest (Oran, Algeria) in March 2016, carefully cleaned, and left to dry in the shade. The essential oils were obtained by steam distillation using a Clevenger type apparatus on 200 g (dry weight) of plant material for 3 h. The resulting oils were dehydrated with magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>) and stored at 4 °C in the dark [29]. The essential oil yield, the ratio of the weight of the extracted oil to the dry weight of the plant, was calculated according to the formula by Cheurfa et al. [30].

### 2.2. Bacterial Strains

Fifteen extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) *Klebsiella pneumoniae* strains were isolated in different medical specimens (urine, pus, blood culture, cerebrospinal fluid, catheter, peritoneal abscess, surgical wound) from the various departments of the Regional Military University Hospital of Oran, Algeria. Different clinical specimens including blood, cerebrospinal fluids, urine and catheter, pus, perirectal abscess, and surgical wounds were collected from patients with suspected clinical infections in different units and departments of the hospital. The specimens were cultured on blood, MacConkey, and CLED agar (for urine only) plates and incubated aerobically for 24 h at 37 °C for preliminary identification of bacteria using conventional colony morphology, Gram stain reaction, and disc diffusion test for antibiotic susceptibility testing (AST). Confirmation of isolates, antibiogram, minimum inhibitory concentration (MIC), and detection of resistance phenotypes were carried out using the automated Vitek 2 (BioMérieux) identification and susceptibility method. ESBL production was confirmed by the synergy and combination disc tests. ESBL genes were detected by conventional simplex PCR. A total of 630 clinical samples of patients (one sample per patient) were processed. *Klebsiella pneumoniae* was isolated in 40 (6.3%) samples, and 15 of these (37.5%) produced ES<sub>L</sub>. In the disc diffusion AST assay, all 40 *K. pneumoniae* isolates were resistant to ampicillin and ticarcillin while all 40 isolates were sensitive to ceftiofexim, imipenem, and ertapenem. Group 1 bla<sub>CTX-M</sub> genes were detected in 13 of the 15 (86.7%) KP-ES<sub>L</sub> isolates, and 46.7% of these isolates were moderate biofilm producers. The strains were kept in storage media and cultured in Mueller–Hinton broth at 37 °C for 18–24 h before the test. *Klebsiella pneumoniae* ATCC (700603) was used as control.

### 2.3. Antibacterial Activity Test

#### 2.3.1. Disc Diffusion Assay

The activity of the oil was assessed by the agar diffusion technique. Briefly, a strain culture of 18–24 h on Mueller–Hinton broth was prepared at a concentration of 10<sup>8</sup> CFU/ML and then seeded on Mueller–Hinton agar (Fluka BioChemika, Madrid, Spain) by swabbing according to the recommendations of The Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI 2014). A sterile paper disc (6 mm diameter) imbibed with 10 µL of the tested oil was placed in the center of the seeded dish [31,32] and the plates were then stored for 1 h at room temperature. After 24 h of incubation at 37 °C, the inhibition zones were measured (mm). All experiments were performed in triplicate. The susceptibility of bacterial strains to the essential oil was classified as follows: not susceptible for a diameter of lesser than 8 mm, moderately susceptible (+) for a diameter ranging from 8 to 14 mm, susceptible (++) for a diameter of 14 to 20 mm, and very susceptible (+++) for a diameter greater than 20 mm [1].

#### 2.3.2. Determination of MIC and MBC

After growing on Mueller–Hinton (MH) agar plates, bacterial strains were suspended in MH broth. The minimum inhibitory concentration MIC values were determined using MH broth dilution method according to Khadir et al. [32] and Bazargani et al. [33] with some modifications. The inoculum suspensions were prepared from 6 h broth cultures (diluted to 1/100) and adjusted to a 0.5 McFarland standard turbidity. The essential oil extracts, sterilized by 0.45 µm Millipore filters, were added to MH broth medium. Serial 10-fold dilutions were made in the MH broth and 1% of Tween 80 (Fluka Bio Chemika, Spain) was added to ensure

## Publications et communication

the miscibility of the oils. Final oil concentrations ranged between 50 and 0.098 mg/mL for *O. glandulosum* and 100 and 0.19 mg/mL for *L. dentata*, following 2-fold dilution. A positive control consisting of 100  $\mu$ L of bacterial suspension in MH and a negative control consisting of MH broth with Tween 80 at 1% were used. After testing concentrations diluted tenfold, the lowest concentration that had shown inhibitory activity was subjected to further twofold dilution for more precise measurement of MIC. The bacterial suspensions were aerobically incubated for 24 h at 37  $^{\circ}$ C. The MIC was defined as the lowest concentration able to inhibit any visible bacterial growth. To determine the minimum bactericidal concentration (MBC), a 10  $\mu$ L aliquot from each tube showing no visible growth was distributed into plates of MHA. MBC was the lowest concentration which did not give culture on the agar plates after 24 h at 37  $^{\circ}$ C.

### 2.4. Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) Analysis

As reported in Flamini et al. [34], gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analyses were performed with a Varian CP-3800 instrument (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) using a non-polar DB-5 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) capillary column (length: 30 m; internal diameter 0.25 mm; film thickness 0.25  $\mu$ m) and a ion trap mass detector Varian Saturn 2000 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), with the following temperature program: from 60 to 240  $^{\circ}$ C at 3  $^{\circ}$ C/min, injector and transfer line temperature 220 and 240  $^{\circ}$ C, respectively. The carrier gas was He at 1 mL/min and the injection volume 1  $\mu$ L.

The identification of the constituents was based on the comparison of their retention times (Rt) with those of the pure reference samples and their linear retention indices (LRI) determined using the tR of a series of n-alkanes. The detected mass spectra were compared to those listed in the NIST (National Institute of Standards & Technology) and ADAMS commercial libraries, as well as in a homemade mass spectra library.

### 2.5. Measurement of Release of 260-nm Absorbing Cellular Materials

Measurement of the release of cellular materials absorbing at 260 nm from *K. pneumoniae* ESBL cells was performed in 2 mL aliquots of the bacterial inocula, which were diluted in MHB to obtain 1  $\times$  10<sup>6</sup> CFU/mL. Then, 1 mL of the suspensions were incubated with the essential oils at the MIC at 37  $^{\circ}$ C for 60 min, then filtered through filter membranes (0.22  $\mu$ m) and the absorbance of the filtrates was measured at 260 nm using a Thermo Helios Omega UV-Vis spectrophotometer. Bacterial suspensions without essential oils were used as controls and similarly tested [35].

### 2.6. Transmission Electron Microscopy TEM

Bacterial suspensions (5 mL) at 1  $\times$  10<sup>7</sup> CFU/mL were incubated (at 37  $^{\circ}$ C for 24 h) without (negative control) and with the essential oils of the most active plant, *O. glandulosum*, at concentration corresponding to the MIC value. After incubation, the bacterial suspensions were centrifuged at 1300 g for 10 min at room temperature and the pellets underwent fixation in 2.5% glutaraldehyde buffered solution for 2 h at room temperature and post-fixation in 1% osmium tetroxide buffered solution for 1.5 h at room temperature. The specimens then underwent dehydration with ethyl alcohol and embedding in Spurr resin. Sections 50 nm thick were stained with uranyl acetate replacement (UAR) dye (Electron Microscopy Sciences) and lead citrate. Observations were carried out under a Philips EM 208S TEM at 80 KV.

### 2.7. Blood Collection and Polymorphonuclear Leukocytes (PMN) Isolation

The blood was collected from three healthy fasting donors subjected to peripheral blood sampling in K3EDTA vacutainers (Becton Dickinson, Plymouth, UK). PMN isolation was performed following the protocol reported by Russi et al. [36] and Di Napoli et al. [37].

In summary, PMNs were isolated using a discontinuous gradient. The blood was centrifuged at 200 g for 25 min at room temperature. The PMN layer was collected and washed twice in PBS.



## 2.8. Cell Viability Test

In order to study the safety of the essential oils, their cytotoxicity was evaluated by the MTT test on human lymphocytes, which were purified by Ficoll-Paque density gradient centrifugation [38,39]. Briefly, 432.9  $\mu\text{L}$  of RPMI1640 medium ( $1 \times 10^6$  lymphocytes/mL) were treated with 20.3, 40.6, and 81.2 mg/mL of *L. dentata* and 2.6, 5.2, and 10.4 mg/mL of *O. glandulosum* essential oils and incubated at 24–37  $^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . The three concentrations correspond to the mean MIC value, half the mean MIC value, and double the mean MIC value. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) was prepared according to the manufacturer's instructions (MTT Cell Viability assay Kit; Biotum, Inc.) and 40  $\mu\text{L}$  of a 5 mg/mL MTT solution was added and incubated for 2 h at 37  $^{\circ}\text{C}$ . The produced water-insoluble blue formazan crystals were dissolved in 500  $\mu\text{L}$  of dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) by shaking for 15 min using an orbital shaker at 20  $^{\circ}\text{C}$  [40]. Absorbance was measured at 570 and 630 nm to obtain the cell viability percentage, calculated using the following formula:  $(\text{OD}(570 \text{ nm}) - \text{OD}(630 \text{ nm}) \text{ treated}) / (\text{OD}(570 \text{ nm}) - \text{OD}(630 \text{ nm}) \text{ untreated}) \times 100\%$  [17,41].

All experiments were performed in triplicate, and the relative cell viability was expressed as a percentage relative to the untreated control cells (cells in RPMI 1640 medium).

## 2.9. Reactive Oxygen Species ROS Generation

Dichlorofluorescein (DCF) assay was performed to quantify ROS generation according to Manna et al. [42]. The leukocytes were treated with essential oils (MIC values and double MIC values: Origanum 5.2 and 10.4 mg/mL and Lavandula 40.6 and 81.2 mg/mL) for 6 h and then incubated with the non-polar and non-fluorescent 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), at 10  $\mu\text{M}$  as final concentration, for 15 min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . ROS quantity was monitored by fluorescence (excitation wavelength of 350 nm and an emission wavelength of 600 nm) on a microplate reader. Results were expressed as fluorescence intensity.

## 2.10. Statistical Analysis

The absorption at 260 nm, the ROS generation, and the cell viability of human lymphocytes were examined by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison post hoc test. GraphPad Prism 5 was utilized for statistical analysis.

## 3. Results

### 3.1. Essential Oils Extraction

The average essential oil yields for *L. dentata* and *O. glandulosum* samples are 1.2% and 3.15% respectively.

### 3.2. Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) Analysis

The results of GC/MS chemical analyses of the essential oils are shown in Table 1. In *L. dentata* essential oil, 43 components were identified by GC/MS. The main constituents are  $\beta$ -pinene (17.3%), followed by myrtenal (10.2%), trans-pinocarveol (8.7%),  $\alpha$ -thujene (7.2%), linalool (6.8%), and 1.8-cineole (6.1%). Among the identified 23 components, the analysis of *O. glandulosum* essential oil revealed that the main compounds are thymol (33.2%),  $\alpha$ -terpinene (25.4%), p-cymene (16.1%), and carvacrol (13.0%) (Table 1).

**Table 1.** Chemical composition of the essential oils from *O. glandulosum* and *L. dentata*.

Constituents	LRI	<i>O.glandulosum</i>	<i>L. dentata</i>
$\alpha$ -thujene	933	0,9	7,2
$\alpha$ -pinene	941	0,6	
camphene	955		1,0
thuja-2,4(10)-diene	959		0,4

## Publications et communication

1-octen-3-ol	981	0,3	
$\beta$ -pinene	982	0,2	17,3
3-octanone	987	0,2	
myrcene	992	1,4	
$\alpha$ -phellandrene	1006	0,2	
$\alpha$ -terpinene	1020	2,9	
<i>p</i> -cymene	1028	16,1	1,1
limonene	1032	0,5	5,1
1,8-cineole	1034		6,1
$\gamma$ -terpinene	1063	25,4	
<i>cis</i> -linalool oxide (furanoid)	1076		0,3
terpinolene	1090		0,8
linalool	1101	0,6	6,8
hotrienol	1103		0,2
<i>endo</i> -fenchol	1112		0,2
<i>cis-p</i> -menth-2-en-1-ol	1123		0,6
$\alpha$ -campholenal	1125		1,2
<i>trans</i> -pinocarveol	1141		8,7
<i>cis</i> -verbenol	1142		0,4
<i>trans</i> -verbenol	1143		2,2
pinocarvone	1164		4,1
isomenthone	1165		
borneol	1167	0,1	1,7
<i>p</i> -mentha-1,5-dien-8-ol	1168		0,5
4-terpineol	1179	0,6	0,9
cryptone	1185		3,6
$\alpha$ -terpineol	1191	0,4	1,0
myrtenol	1193		
myrtenal	1194		10,2
verbenone	1207		0,3
<i>trans</i> -carveol	1220		1,1
methyl thymol	1234	0,1	
cumin aldehyde	1241		3,9
carvone	1244		1,6
methyl carvacrol	1245	0,2	
piperitone	1254		0,6
phellandral	1272		0,8
bornyl acetate	1287		
<i>p</i> -cymen-7-ol (syn. cumin alcohol)	1290		0,7
thymol	1291	33,1	
<i>p</i> -mentha-1,8-dien-7-ol (syn. perilla alcohol)	1297		0,5
carvacrol	1299	13,0	
( <i>E</i> )-3-hexenyl ( <i>E</i> )-2-methylbut-2-enoate	1325		0,4
$\beta$ -caryophyllene	1419	1,5	0,2

## Publications et communication

<b>β-selinene</b>	1487		1,1
<b>β-bisabolene</b>	1508	0,2	
<b>trans-γ-cadinene</b>	1514		0,2
<b>trans-calamenene</b>	1523		0,5
<b>β-sesquiphellandrene</b>	1525	1,2	
<b>caryophyllene oxide</b>	1582	0,2	0,4
<b>β-eudesmol</b>	1650		1,6
<b>α-cadinol</b>	1652		
<b>α-bisabolol oxide B</b>	1654		0,5
<b>cadalene</b>	1673		0,4
<b>α-bisabolol</b>	1686		0,2
<b>cis-14-nor-muurol-5-en-4-one</b>	1687		1,5
<b>Monoterpene hydrocarbons</b>		48,2	32,9
<b>Oxygenated monoterpenes</b>		48,1	54,6
<b>Sesquiterpene hydrocarbons</b>		2,9	2,4
<b>Oxygenated sesquiterpenes</b>		0,2	4,2
<b>Diterpenes</b>		0,0	0,0
<b>Non-terpene derivatives</b>		0,5	4,0
<b>Total identified</b>		<b>99,9</b>	<b>98,1</b>

LRI: retention index on a HP-5 MS column.

### 3.3. Antibacterial Activity

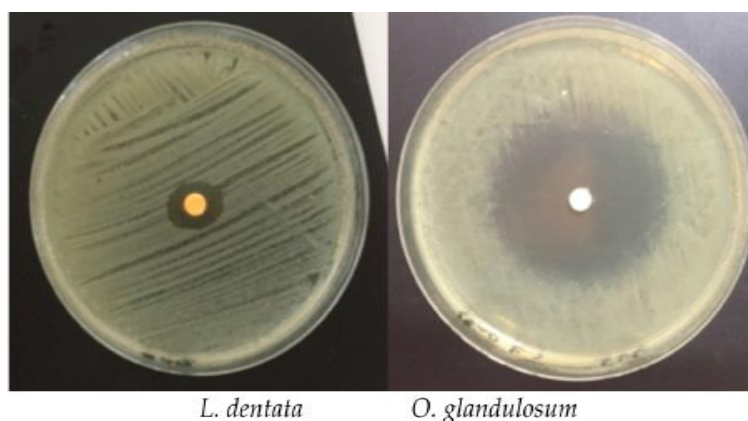
The diameters of the inhibition zones caused by application of the essential oils on β-lactamase expanded spectrum producing *K. pneumoniae* are summarized in Table 2.

The essential oils extracted from *L. dentata* exert a growth inhibiting activity against ESBL *K. pneumoniae* strains with an average inhibiting zone of  $9.3 \pm 0.9$  mm. The inhibition zone diameters observed with *O. glandulosum* show remarkable sensitivity of the tested bacteria with an average of  $43.5 \pm 6.7$  mm (Figure 1).

*O. glandulosum* essential oils were found to be the most active with mean MIC and MBC values equal to 5.2 and 7.4 mg/mL followed by *L. dentata* with mean MIC and MBC values equal to 40.6 and 48.1 mg/mL, respectively (Table 2).

**Table 2.** The table shows the inhibition haloes, expressed as mm, and MIC and MBC values, expresses as mg/mL, obtained with *O. glandulosum* and *L. dentata* essential oils tested against ESBL *K. pneumoniae* strains.

<i>O. glandulosum</i>			<i>L. dentata</i>		
Inhibition Zone	MIC	MBC	Inhibition Zone	MIC	MBC
$43.5 \pm 6.7$	$5.2 \pm 3.3$	$7.4 \pm 5.1$	$9.3 \pm 0.9$	$40.6 \pm 25.5$	$48.1 \pm 25.7$



**Figure 1.** Inhibition halo of the *L. dentata* and *O. glandulosum* on activity against specific ESBL *K. pneumoniae* strains, by disc diffusion method observed at the MIC values

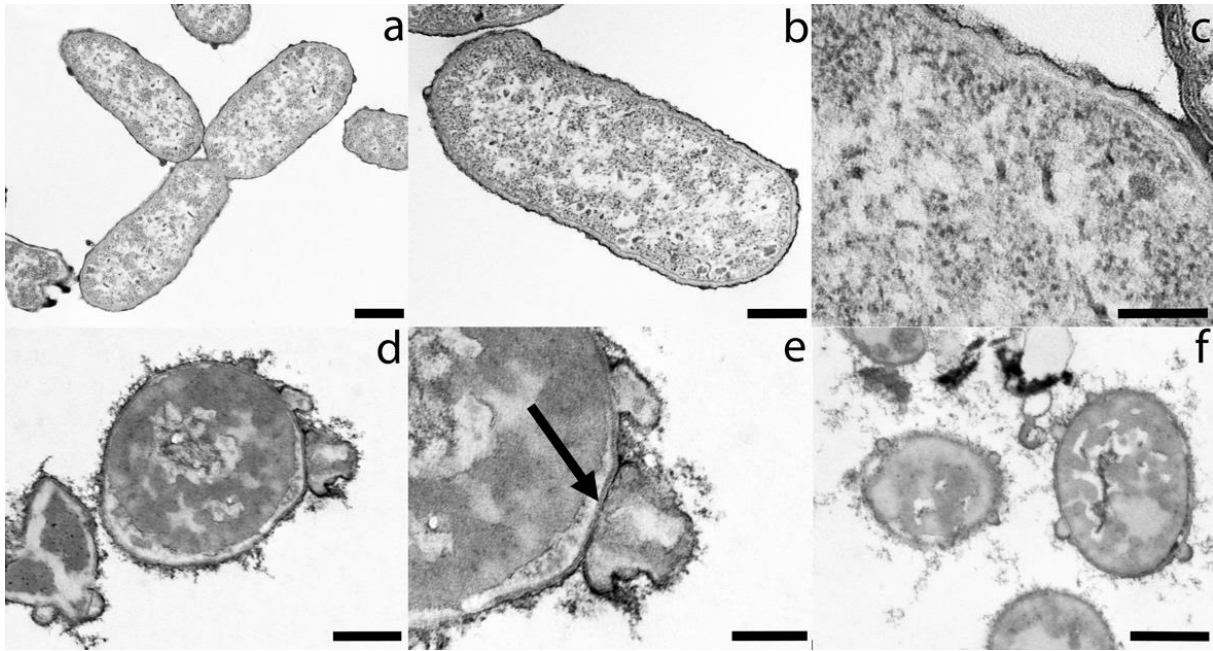
The essential oils of *O. glandulosum* were found to be more active than the essential oils of *L. dentata*. In fact, *O. glandulosum* essential oils have mean MIC and MBC values equal to 5.2 and 7.4 mg/mL, while *L. dentata* have mean MIC and MBC values equal to 40.6 and 48.1 mg/mL respectively (Table 2). 3.4. Measurement of Release of 260 nm Absorbing Cellular Materials. In this study, the absorption at 260 nm of the treated and untreated filtrates was significantly different. Table 3 shows the absorbent materials at 260 nm in the treated *K. pneumoniae* filtrates. Significant increases in absorption at 260 nm occurred after treatment with the essential oils of *L. dentata* and *O. glandulosum* at the MIC values. The treated filtrates gave an absorbance of 1.417 for *O. glandulosum* and 1.342 for *L. dentata*. Control untreated filtrates showed an absorbance of 0.003 and 0.002 (Table 3).

### 3.5. TEM (Transmission Electron Microscopy) Observation

Under TEM microscope, untreated samples appeared as typically rod-shaped cells (Figure 2a,b), delimited by a well visible, typically smooth, and multi-layered surface (Figure 2b,c). The protoplast has a normal grainy appearance, more electron-dense in the periphery and more clear in the center (Figure 2b,c). Differently, oregano and lavender essential oil-treated cells lost the typical rod shape and appear globular (Figure 2d–f). The protoplast is not grainy but shows large electron dense areas (Figure 2d–f). The cell surface developed bulges and external curly filaments (Figure 2d–f). At higher magnification, the bulges can appear as dilation of the outer membrane, while the inner one and the wall maintain their continuity (arrow in Figure 2e).

**Table 3.** Effect of essential oils from *L. dentata* and *O. glandulosum*, tested at MIC values (40.6 mg/ml of *L. dentata* EO; 5.2 mg/mL of *O. glandulosum* EO) on the release of the 260 nm absorbent material from ESBL *K. pneumoniae*. Lower case letters denote significant difference at  $p < 0.05$  between samples.

Absorbance (260 nm)	
control	0.003 ± 0.001 a
<i>O. glandulosum</i>	1.466± 0.048 b
<i>L. dentata</i>	1.345± 0.048 c

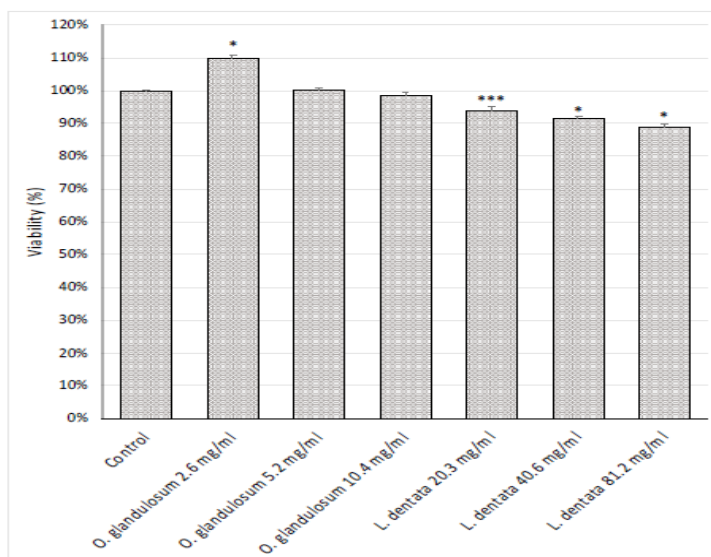


**Figure 2.** The figure shows TEM micrographs of untreated *K. pneumoniae* samples (a–c) and *K. pneumoniae* treated with *O. glandulosum* (d,e) and *L. dentata* (f) essential oil at the mean MIC value. (a) Three typical rod-shaped cells. Those lined up are still dividing. (b) A bacterial cell taken at higher magnification shows the grainy protoplast delimited by a smooth external cell wall. (c) Detail of a bacterial cell shows the grainy protoplast and the multi-layered surface, taken at higher magnification. (d) A *O. glandulosum* essential oil-treated bacterial cell with a globular-shape appearance. The protoplast, not grainy, is electron dense in large areas. The surface developed large bulges and an external hairy material. (e) Details of the altered cell taken at higher magnification. The arrow shows the continuity of the inner membrane and the cell wall. (f) Bacterial cells treated with *L. dentata* essential oil. The protoplast, with no grainy appearance, appears moderately dense in large areas. Scale bars: 500 nm (a,f); 300 nm (b,d); 200 nm (c,e).

### 3.6. Cell Viability Test

Both the essential oils exhibited a good safety profile against lymphocytes after a 24 h incubation (Figure 3). Lavender and oregano essential oils showed only mild cytotoxic effects and no reduction in cell viability was observed at all tested concentrations.

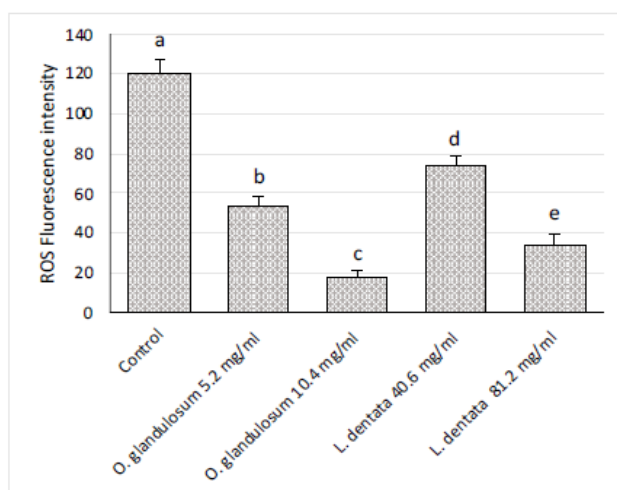




**Figure 3.** Effect of essential oils of *L. dentata* and *O. glandulosum* on the cell viability of human lymphocytes (MTT test): viability (%) of human lymphocytes ( $1 \times 10^6$  cells/mL) incubated with medium alone (control), Origanum (2.6, 5.2, and 10.4 mg/mL) and Lavandula (20.3, 40.6, and 81.2 mg/mL) for 24 h. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's test (\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

### 3.7. Reactive Oxygen Species (ROS) Generation

As can be seen from Figure 4, ROS production in PMNs decreases when treated with *O. glandulosum* and *L. dentata* extracts compared to the control. Notably, ROS levels decrease when leukocytes have been treated with double MIC concentrations for both essential oil extracts. In particular, the extract of *O. glandulosum* is more active than that of *L. dentata*.



**Figure 4.** Effect of essential oil extracts (*O. glandulosum* 5.2 and 10.4 mg/mL and *L. dentata* 40.6 and 81.2 mg/mL) on ROS production in polymorphonuclear neutrophils (PMN). Data were presented as mean and standard error and were analyzed with a paired t-test. Bars not accompanied by the same letter were significantly different at  $p < 0.05$ .

## 4. Discussion

The results of this work show that both *L. dentata* and *O. glandulosum* are valid sources of essential oils with useful biological activities, and oregano essential oil in particular proved to be most active for the tested activities. For *L. dentata*, our essential oil yields are in agreement with the literature data: 1.44% [43], 0.89% [18], and 1.1% [44]. Higher yields than ours were

## Publications et communication

found by Bachiri et al. [28], Bachiri et al. [27], and Dammak et al. [45]: 2.9%, 2.6%, and 1.76% respectively. Conversely, Dob et al. [46] and Silva-Flores et al. [47] reported yield results lower than ours: 0.79% and 0.53% respectively. As for *O. glandulosum*, our essential oil yields are comparable to those obtained with the same species by Belhattab et al. [23], while Bekhechi et al. [22] and Bendahou et al. [21] found yields higher than ours. These differences in the yields of essential oils are not surprising and may be related to different conditions and factors, namely the species, genotype, environment, harvest period, place of drying, and geographical origin of the plant [27,28]. Among the identified 23 components, analysis of *O. glandulosum* essential oil revealed that the main compounds were thymol (33.2%),  $\gamma$ -terpinene (25.4%), p-cymene (16.1%), and carvacrol (13.0%) (Table 1).

Among the identified 23 components, analysis of *O. glandulosum* essential oil revealed that the main compounds were thymol (33.2%),  $\gamma$ -terpinene (25.4%), p-cymene (16.1%), and carvacrol (13.0%) (Table 1). As for the chemical composition, the percentage of 1,8-cineole (6.1%) in the oil of *L. dentata* revealed a dissimilarity with those described in the literature. Dob et al. [46] reported that the main constituents of the oil were 1,8-cineole (38.4%), cis-verbenol (4.3%), p-cymen-8-ol (3.8%), and fenchone (2.3%). Ouedrhiri et al. [44] found that the two monoterpenes  $\alpha$ -pinene (25.82%) and 1,8-cineole (10.82%) were the main essential oil compounds of *L. dentata*. Dammak et al. [45] showed that the main component was 1,8-cineole. Silva-Flores et al. [47] identified 16 components, with oxygenated monoterpenes (80.71%) as main constituents followed by monoterpene hydrocarbons (16.19%); within these chemical classes, the main constituents were 1,8-cineole (68.59%) and  $\alpha$ -pinene (11.53%), respectively. As for the chemical composition of *O. glandulosum* essential oil, the results of this work are comparable to some literature data on the same species [21,25,32], but different results have also been obtained by Belhattab et al. [23], who found that the major compounds in *O. glandulosum* were carvacrol (47.0%),  $\gamma$ -terpinene (13.4%), p-Cymene (11.2%), and thymol (6.6%). Nabet et al. [48] also found that the main compounds were  $\gamma$ -terpinene (29.4%) and carvacrol (12.9%). Nabti et al. [2] found that the 4 main components detected in plants from different Algeria regions were thymol (15.1–56.3%), carvacrol (2.8–59.6%),  $\gamma$ -terpinene (9.8–21.8%), and p-cymene (8.5–13.9%). Considering the availability of *O. glandulosum* in Algeria and their richness in essential oil as well as the homogeneity and the stability of the chemical composition of its essential oil, this plant is likely to have an industrial interest and can also be recommended as a potential source of thymol [22].

The previously reported differences in the chemical composition, in particular in the quantity of the main components of the essential oils, may be due to variations in many factors such as climate, thermal range, duration of sunshine, collection period, type of soil, and the considered organs of the plant [2,18,27]. These chemical differences may also affect their biological activities [27,49]. Hence, the composition of the essential oils has been the subject of several studies, from which it can be concluded that the plants exhibit chemical variability. Nikolić et al. [50] and Dammak et al. [45] reported that the biological activities of the essential oils depend on their chemical composition. It is noteworthy that the tested essential oils show remarkable antibacterial activity against antibiotic-resistant bacterial strains.

As for *O. glandulosum*, which is the more active, our antibacterial results are in agreement with those reported by Bendahou et al. [21], who noted in their study that the *O. glandulosum* essential oils exhibited an antimicrobial activity against 10 Gram-negative bacteria. Similarly Bekhechi et al. [22] noted that *O. glandulosum* essential oils were very active against the Gram-negative and Gram-positive strains tested (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Citrobacter freundii*; *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*) some of which also ATCC. Among these *K. pneumoniae*, both obtained from clinical isolates and the ATCC strain, was inhibited by the essential oil of oregano, while *P. aeruginosa* was resistant, as often happens for this

bacterium. Nabti et al. [2] also reported that the essential oils from *O. glandulosum* showed good antibacterial activity against uropathogenic multiresistant strains of *E. coli*, while Bendahou, et al. [21] and Bekhechi et al. [22] reported that the essential oil of oregano was active precisely on *K. pneumoniae* as our data also showed. The antimicrobial activity of *O. glandulosum* essential oils was possibly related to its phenolic components, such as thymol, carvacrol, but also to their biosynthetic intermediates p-cymene and c-terpinene. It has been suggested that phenolic derivatives may cause membrane-disrupting activities [21]. In fact, Nabet et al. [48] reported that phenolic components and their precursors contained in essential oils are responsible for high antifungal activity. Nabti et al. [2] found that carvacrol and thymol were the most active components and showed good antibacterial activity (MIC and MBC ranging from 0.25 to 0.5 mg/mL), p-cymene was less active, and -terpinene was totally inactive against all the strains tested. There are reports in the literature that oregano essential oils have the ability to sensitize the cell membrane phospholipid bilayer, causing increased permeability and leakage of vital intracellular constituents or alteration of the enzyme systems in Gram-positive and Gram-negative bacteria [48,51]. Hernández-González et al. [52] in their study attributed the antimicrobial capacity of oregano essential oil to thymol and carvacrol, capable of disintegrating the outer membrane of the microorganism, causing cell death. The results on *L. dentata* antibacterial activity are according to literature data on lavender species [27,28,53]. Yang et al. [54] found remarkable antibacterial activity in the essential oils of *Lavandula angustifolia* against multidrug-resistant (MDR) *K. pneumoniae* strains and also highlight the probable mechanism of action. In contrast, Mohamed and Eddine [43] found that *L. dentata* essential oils had very low antibacterial activity against antibiotic-resistant strains of *K. pneumoniae*, which was however evaluated only by the disc diffusion method. Our data do not agree with this last statement as we have obtained interesting MIC values. The antibacterial activity of Moroccan *L. dentata* essential oils is quite different from the Algerian oils and different results have been found in other studies [28].

The above reported differences in the antibacterial activity could be related to the bacterial species tested and the previously discussed differences in the chemical composition of the oils. As for the ways of action of the essential oils on the bacterial cells, the antimicrobial activity could result from the joint association of several mechanisms on different cellular targets, like plasma membrane, cell wall, or bacterial DNA [27,54]. The oil could cross cell membranes, get inside the cell, and interact with critical intracellular sites for antibacterial activity. It has already been reported that monoterpenes act on both Gram-positive and Gram-negative bacteria, damaging their biomembranes and, in particular, disrupting the lipid fraction of the plasma membrane, impairing membrane permeability and causing leakage of intracellular materials [55]. Furthermore, literature data suggest that an antibacterial agent's ability to kill bacteria may be a function of the stable interaction complex between drug-related topoisomerase and cleaved DNA. On this basis, the effect of the antibacterial agent could also be the generation of double-stranded DNA breaks that are trapped by covalently bound topoisomerase. Consequently, the DNA replication machinery stops and that immediately leads to bacteriostasis and possibly to cell death [35]. Yang et al. [54] related the antibacterial effect of lavender against multidrug-resistant *K. pneumoniae* strains to different ways of action. The TEM observations showed that essential oil treatments induced alterations in the typical appearance of the untreated cells. In fact, the essential oil-treated cells lost the typical rod shape and appear globular, suggesting a change to the cell wall, which maintains the correct shape of the cell. Literature data show damage to the bacterial cell wall under essential oil treatments. Rasooli et al. [56] observed severe effects of thyme essential oils on the *Listeria* cell wall, leading to a rupture of the wall which lost its smoothness and uniformity. Dutra et al. [51] showed disruption of the cell wall and deformation of the integrity of *Alicyclobacillus* spp. after treatment with *Origanum vulgare*



## Publications et communication

essential oil. The bulged appearance of treated cells are in agreement to Yang et al. [54], who found that multidrug-resistant *K. pneumoniae* upon exposure to lavender essential oil developed a corrugated envelope with irregularities, well evident under scanning electron microscopy (SEM). Yang et al. [54] also demonstrated disruption of bacterial membranes under essential oil treatments via oxidative stress. This is consistent with our observations of bulged surfaces under TEM. Our image showing protrusion of the outer membrane, which is damaged first, while the continuity of the cell wall and the inner membrane is still maintained, could represent a first step in the damage to the bacterial surface. In fact, lavender essential oil was found to modify the bacterial membrane permeability of MDR *K. pneumoniae* strains. Change in membrane permeability could easily lead to swelling phenomena, giving images of surface bulging like those we observed for the essential oil-treated samples, and when the disruption involves both membranes and the cell wall, leaking of cytoplasmic material occurs [54]. Loss of cell material is demonstrated by our findings of the increased release of 260 nm absorbent material from the bacterial cells after essential oil exposure. This also suggests that the essential oils caused significant and irreversible damage to the cytoplasmic membrane and disruption of permeability. This is also consistent with previous results showing similar data related to plant essential oils tested against bacterial strains [35,52,57,58]. Furthermore, the evaluation of the release of absorbent materials from the treated cells can suggest a way of action of essential oils against bacteria. In fact, an important characteristic of essential oils and their main components (carvacrol, terpenes, phenols, aldehydes, and ketones) is hydrophobicity, which allows them to accumulate in bacterial and fungal cell membranes, causing their disruption and consequent antibacterial activity [57–59]. It has already been reported that monoterpenes act on both Gram-positive and Gram-negative bacteria, damaging their biomembranes and, in particular, disrupting the lipid fraction of the plasma membrane, impairing membrane permeability and causing leakage of intracellular materials [55].

Damage to treated cells is also suggested by the appearance of the bacterial cytoplasm. In fact, the cytoplasm of the treated bacteria lost its typical grainy appearance and developed large moderately dense areas, which suggests cytoplasm degeneration. Furthermore, observations of the external curly filaments suggest development of an external capsule, which could be induced by the essential oil exposure. It was demonstrated in *K. pneumoniae* that the construction of a capsule is upregulated by antimicrobial peptides [60]. The safety of the tested substances has been evaluated by the cell viability test. It clearly showed that the essential oils tested did not have cytotoxicity activity against human lymphocytes under the used MTT test. Instead, *O. glandulosum* essential oils even activated the lymphocyte compared to the untreated ones. In the case of cytotoxic compounds, this phenomenon can be interpreted as a rescue mechanism. At low subtoxic concentrations, cells escape detrimental stimuli by the induction of proliferation, while at higher concentrations, this defense mechanism is overridden by the cytotoxic effects [61].

The respiratory chain, other electron transport systems, and cell enzymes convert the MTT and other tetrazolium salts into formazan crystals. The quantity of these crystals can be determined by spectrophotometry and is used to estimate the number of mitochondria and, thus, the number of viable cells in the sample. Our results are consistent with those in the literature, reporting no cytotoxicity on several cell lines treated with the essential oils of several plant species, such as *Thymus zygis* subsp. *sylvestris* [49], *Aniba canelilla* [62], and *Salvia officinalis* [63]. However, testing cytotoxicity is essential, especially in the case of substances with good profiles of biological activities. In fact, lemon myrtle oil has been shown to have significant antimicrobial activity against different organisms, but in vitro cytotoxicity tests indicated a very toxic effect against primary cell cultures of fibroblasts of human skin [49]. Sinha et al. [64] detected a reduction in viability of human lymphocytes treated with the essential oils of palmarosa, citronella, lemongrass, and vetiver, including loss

## Publications et communication

of integrity of the plasma membrane associated with necrosis. Another study showed that lavender oil is cytotoxic in vitro on human skin cells (endothelial cells and fibroblasts) at a concentration of 0.25% (v/v) [65]. In addition, carvacrol is known to be toxic to mammalian cells at high concentrations; on the other hand, protective effects on DNA have been observed with carvacrol on mammalian cells cultured in vitro [49]. The excessive ROS production is deleterious for cells and tissues since they change the structure and function of biomolecules.

*O. glandulosum* and *L. dentata* extracts displayed inhibitory effects on leukocyte ROS production compared to untreated control cells. Thus, these extracts can act as antiinflammatory agents as may be efficient in protecting the organism from excess ROS production via radical scavenging activity. The test of ROS generation confirms the activation of the lymphocytes under the essential oil treatments. The activity on lymphocytes is very interesting because these cells play a crucial role in the immune system. Hence, the essential oils, in addition to fighting bacterial infections, could also be able to activate the immune system. It should be noted that a reduction in (excessive) ROS production can indeed reduce tissue damage/inflammation on one side, but that this may be at the expense of the antibacterial efficacy of the cells via ROS, but the strong direct effect of essential oils could compensate for this reduction.

Concluding, the in vitro results of the essential oils showed interesting activities. *O. glandulosum* and *L. dentata* show remarkable antibacterial and bactericidal activity against antibiotic-resistant *K. pneumoniae* strains, with no cytotoxicity on human lymphocytes. Instead, they could even potentiate the immune response. Thus, taking into account the interesting yield of the extraction from the selected plants and the increasing occurrence of antibiotic-resistant bacteria strains, they are suggested as potential candidate for antibacterial drugs, even though further studies are required to assess the bioavailability, the in vivo activities, and safety to finally confirm their potential application to human health.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.B. and S.M.; methodology, C.B., V.M., S.S., R.N. and M.S.B.; validation, C.B. and M.S.B.; formal analysis S.S., V.M., R.N., M.P., F.C. and G.F.; investigation, C.B. and M.S.B.; resources, V.M., M.P., A.B. and R.N.; data curation, A.Z., S.S. and V.M.; writing original draft preparation, C.B., V.M., S.S., A.B., S.M. and M.S.B.; writing—review and editing, C.B., A.B. and M.S.B.; visualization, A.K., C.B. and S.M.; supervision, S.M.; project administration, S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** This study did not involve humans or animals.

**Informed Consent Statement:** Written informed consent has been obtained from the patients to publish this paper.

**Acknowledgments:** We are grateful to the Department of Biology, Federico II University, Naples, Italy, and The Laboratory of Applied Microbiology in the Department of Biology, SNV, University of Oran1 Ahmed Ben Bella, Algeria.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Bertella, A.; Benlahcen, K.; Abouamama, S.; Pinto, D.C.; Maamar, K.; Kihal, M.; Silva, A.M.S. *Artemisia herba-alba* Asso. Essential oil antibacterial activity and acute toxicity. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *116*, 137–143. [[CrossRef](#)]
2. Nabti, L.Z.; Sahli, F.; Laouar, H.; Olowo-Okere, A.; Wandjou, J.G.N.; Maggi, F. Chemical

Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from the Algerian Endemic *Origanum glandulosum* Desf. against Multidrug-Resistant Uropathogenic *E. coli* Isolates. *Antibiotics* **2020**, *9*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Khalifa, A.B.H.; Khedher, M. Epidémiologie des souches de *Klebsiella* spp. uropathogènes productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre

## Publications et communication

- élargi dans un hôpital universitaire Tunisien, 2009. *Pathol. Biol.* **2012**, 60, e1–e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Wyres, K.L.; Holt, K.E. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends Microbiol.* **2016**, 24, 944–956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Markovska, R.; Stoeva, T.; Boyanova, L.; Stankova, P.; Pencheva, D.; Keuleyan, E.; Murjeva, M.; Sredkova, M.; Ivanova, D.; Lazarova, G.; et al. Dissemination of successful international clone ST15 and clonal complex 17 among Bulgarian CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2017**, 89, 310–313. [[CrossRef](#)]
6. Panda, P.; Jhon, N.; Sao, S.; Information, P.E.K.F.C. Antibioqram, ESBL production and carbapenemase detection of *Klebsiella* spp. in hospital-acquired infection. *Apollo Med.* **2016**, 13, 156–162. [[CrossRef](#)]
7. Akturk, H.; Sutcu, M.; Somer, A.; Aydın, D.; Cihan, R.; Ozdemir, A.; Coban, A.; Ince, Z.; Citak, A.; Salman, N. Carbapenemresistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: Risk factors for progression to infection. *Braz. J. Infect. Dis.* **2016**, 20, 134–140. [[CrossRef](#)]
8. Cescutti, P.; De Benedetto, G.; Rizzo, R. Structural determination of the polysaccharide isolated from biofilms produced by a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Carbohydr. Res.* **2016**, 430, 29–35. [[CrossRef](#)]
9. Delatour, C.; Chalvon, N.; Prieur, N.; Mateu, P. A history of community-acquired hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* severe sepsis. *Anaesth. Crit. Care Pain Med.* **2018**, 37, 10. Hauser, N.; Tanner, E.; Keuroghlian, M.; Koduri, L. A case of *Klebsiella oxytoca* endocarditis in an intravenous drug user. *IDCases* **2017**, 9, 77–78. [[CrossRef](#)]
11. Huang, Y.-T.; Jiang, J.-Y.; Hsu, M.-S.; Hsu, H.-S.; Liao, C.-H.; Hsueh, P.-R. The prevalence of rectal carriage of *Klebsiella pneumoniae* amongst diabetic patients and their clinical relevance in Taiwan: A five-year prospective study. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2018**, 51, 510–518. [[CrossRef](#)]
12. Khodadadian, R.; Rahdar, H.A.; Javadi, A.; Safari, M.; Khorshidi, A. Detection of VIM-1 and IMP-1 genes in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *Microb. Pathog.* **2018**, 115, 25–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Boniface, Y.; Jean-Pierre, N.; Philippe, S.; Félicien, A.; Dominique, S. Etude chimique et activités antimicrobiennes d'extraits volatils des feuilles et fruits de *Xylopiya aethiopica* (DUNAL) A. Richard contre les pathogènes des denrées alimentaires. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim.* **2010**, 29, 19–27.
14. Kacaniová, M.; Vukovič, N.; Hleba, L.; Bobková, A.; Pavelková, A.; Rovná, K.; Arpasova, H. Antimicrobial and Antiradicals Activity of *Origanum vulgare* L. and *Thymus Vulgaris* Essential Oils. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **2012**, 2, 263–271.
15. Faleiro, L.; Miguel, G.; Guerrero, C.; Brito, J. Antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus mastichina* (L.) L. ssp *Mastichina* and *Thymus albicans* Hofmanns & Link. *Acta Hort.* **1999**, 45–48. [[CrossRef](#)]
16. Alitonou, G.; Avlessi, F.; Sohounhloue, D.; Agnaniet, H.; Bessiere, J.-M.; Menut, C. Investigations on the essential oil of *Cymbopogon giganteus* from Benin for its potential use as an anti-inflammatory agent. *Int. J. Aromather.* **2006**, 16, 37–41. [[CrossRef](#)]
17. De Oliveira, J.R.; De Castro, V.C.; Vilela, P.D.G.F.; Camargo, S.E.A.; Carvalho, C.A.T.; Jorge, A.O.C.; De Oliveira, L.D. Cytotoxicity of Brazilian plant extracts against oral microorganisms of interest to dentistry. *BMC Complement. Altern. Med.* **2013**, 13, 208. [[CrossRef](#)]
18. Rebey, I.B.; Bourgou, S.; Tounsi, M.S.; Fauconnier, M.L.; Ksouri, R. Phytochemical composition and antioxidant activity of *Lavandula dentate* extracts. *J. New Sci.* **2017**, 39, 2096–2105.
19. Naghibi, F.; Mosadegh, M.; Mohammadi, M.S.; Ghorbani, A.B. Labiatae Family in Folk Medicine in Iran: From Ethnobotany to Pharmacology. *Iran. J. Pharm. Res.* **2005**, 4, 63–79.
20. Ali, H.; Al-Khalifa, A.R.; Aouf, A.; Boukhebt, H.; Farouk, A. Effect of nanoencapsulation on volatile constituents, and antioxidant and anticancer activities of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. essential oil. *Sci. Rep.* **2020**, 10, 1–9. [[CrossRef](#)]
21. Bendahou, M.; Muselli, A.; Grignon-Dubois, M.; Benyoucef, M.; Desjobert, J.-M.; Bernardini, A.-F.; Costa, J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.* **2008**, 106, 132–139. [[CrossRef](#)]
22. Bekhechi, C.; Atik-Bekkara, F.; Abdelouahid, D.E. Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie* **2008**, 6, 153–159. [[CrossRef](#)]
23. Belhattab, R.; Larous, L.; Figueiredo, A.C.; Santos, P.A.G.; Pedro, L.G. *Origanum glandulosum* Desf. grown wild in Algeria: Essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour Fragr. J.* **2004**, 20, 209–212. [[CrossRef](#)]
24. Mechergui, K.; Jaouadi, W.; Coelho, J.A.; Serra, M.C.; Khouja, M.L. Biological activities and oil properties of *Origanum glandulosum* Desf: A review. *Phytothérapie* **2015**, 14, 102–108. [[CrossRef](#)]
25. Harfi, B.; Benahmed, A.; Karkour, L. Characterization of *Origanum glandulosum* Desf. Essential Oils Collected from Different Culture Conditions Towards Standardized ex situ

## Publications et communication

- Production. J. Essent. Oil Bear. Plants **2019**, *22*, 838–850. [[CrossRef](#)]
26. Algieri, F.; Rodriguez-Nogales, A.; Vezza, T.; Garrido-Mesa, J.; Mesa, N.G.; Utrilla, M.P.; González-Tejero, M.R.; Casares-Porcel, M.; Mesa, J.M.; Contreras, M.D.M.; et al. Anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts of *Lavandula dentata* L. and *Lavandula stoechas* L. J. Ethnopharmacol. **2016**, *190*, 142–158. [[CrossRef](#)]
27. Bachiri, L.; Bammou, M.; Echchegadda, G.; Ibjibijen, J.; El Rhaffari, L.; Haloui, Z.; Nassiri, L. Composition Chimique et Activité Antimicrobienne des Huiles Essentielles de Deux Espèces de Lavande: *Lavandula Dentata* spp. *Dentata* et *Lavandula Pedunculata* spp. *Pedunculata*. Eur. Sci. J. ESJ **2017**, *13*, 293. [[CrossRef](#)]
28. Bachiri, L.; Echchegadda, G.; Ibjibijen, J.; Nassiri, L. Etude Phytochimique et Activité Antibactérienne de Deux Espèces de Lavande Autochtones Au Maroc: «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.». Eur. Sci. J. ESJ **2016**, *12*. [[CrossRef](#)]
29. Clevenger, J.F. Apparatus for the Determination of Volatile Oil. J. Am. Pharm. Assoc. **1928**, *17*, 345–349. [[CrossRef](#)]
30. Cheurfa, M.; Allem, R.; Sebahia, M.; Belhireche, S. Effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les bactéries pathogènes responsables de gastroentérites. Phytothérapie **2013**, *11*, 154–160. [[CrossRef](#)]
31. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol. **1966**, *45*, 493–496. [[CrossRef](#)]
32. Khadir, A.; Bendahou, M.; Benbelaid, F.; Abdoune, M.A.; Abdelouahid, D.E. Pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf., récolté en Algérie. Phytothérapie **2013**, *11*, 353–358. [[CrossRef](#)]
33. Bazargani, M.M.; Rohloff, J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. Food Control **2016**, *61*, 156–164. [[CrossRef](#)]
34. Flamini, G.; Pistelli, L.; Nardoni, S.; Ebani, V.V.; Zinnai, A.; Mancianti, F.; Ascricchi, R.; Pistelli, L. Essential Oil Composition and Biological Activity of “Pompia”, a Sardinian Citrus Ecotype. Molecules **2019**, *24*, 908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bajpai, V.K.; Sharma, A.; Baek, K.-H. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. Food Control **2013**, *32*, 582–590. [[CrossRef](#)]
36. Russi, S.; Maresca, V.; Zoppoli, P.; Aieta, M.; Marino, G.; Sgambato, A.; Ignomirelli, O.; Ciuffi, M.; Notarangelo, T.; Basile, A.; et al. Effect of Feijoa Sellowiana Acetonic Extract on Proliferation Inhibition and Apoptosis Induction in Human Gastric Cancer Cells. Appl. Sci. **2020**, *10*, 7756. [[CrossRef](#)]
37. Di Napoli, M.; Maresca, V.; Varcamonti, M.; Bruno, M.; Badalamenti, N.; Basile, A.; Zanfardino, A. (+)-(E)-Chrysanthenyl Acetate: A Molecule with Interesting Biological Properties Contained in the *Anthemis secundiramea* (Asteraceae) Flowers. Appl. Sci. **2020**, *10*, 6808. [[CrossRef](#)]
38. Boyle, W.; Chow, A. Isolation of Human Lymphocytes by a Ficoll Barrier Method. Transfusion **1969**, *9*, 151–155. [[CrossRef](#)]
39. Kol, R.; Friedlander, M.; Riklis, E.; Raveh, D. Separation of Human Lymphocytes on Ficoll-Paque Gradients: Stimulation of Cells and Depletion of a Concanavalin-A Responsive Radioresistant Subpopulation. Radiat. Res. **1983**, *95*, 108. [[CrossRef](#)]
40. Liu, Y.; Schubert, D. Cytotoxic Amyloid Peptides Inhibit Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction by Enhancing MTT Formazan Exocytosis. J. Neurochem. **2002**, *69*, 2285–2293. [[CrossRef](#)]
41. Notariale, R.; Basile, A.; Montana, E.; Romano, N.C.; Cacciapuoti, M.G.; Aliberti, F.; Gesuele, R.; De Ruberto, F.; Sorbo, S.; Tenore, G.C.; et al. Protamine-like proteins have bactericidal activity. The first evidence in *Mytilus galloprovincialis*. Acta Biochim. Pol. **2018**, *65*, 585–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Manna, A.; Saha, P.; Sarkar, A.; Mukhopadhyay, D.; Bauri, A.K.; Kumar, D.; Das, P.; Chattopadhyay, S.; Chatterjee, M. Malabaricone-A Induces A Redox Imbalance That Mediates Apoptosis in U937 Cell Line. PLoS ONE **2012**, *7*, e36938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## Publications et communication

- Mohamed, S.B.; Eddine, A.D. Antibacterial Activity of Essential Oils of Some Algerian Aromatic Plants Against Multidrug Resistant Bacteria. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2010**, *13*, 362–370. [[CrossRef](#)]
44. Ouedrhiri, W.; Mounyr, B.; Harki, E.H.; Moja, S.; Greche, H. Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils. *Int. J. Food Prop.* **2017**, *20*, 3149–3158. [[CrossRef](#)]
45. Dammak, I.; Hamdi, Z.; El Euch, S.K.; Zemni, H.; Mliki, A.; Hassouna, M.; Lasram, S. Evaluation of antifungal and antiochratoxigenic activities of *Salvia officinalis*, *Lavandula dentata* and *Laurus nobilis* essential oils and a major monoterpene constituent 1,8-cineole against *Aspergillus carbonarius*. *Ind. Crop. Prod.* **2019**, *128*, 85–93. [[CrossRef](#)]
46. Dob, T.; Dahmane, D.; Tayeb, B.; Chelghoum, C. Chemical composition of the essential oil of *Lavandula dentata* L. from Algeria. *Int. J. Aromather.* **2005**, *15*, 110–114. [[CrossRef](#)]
47. Silva-Flores, P.G.; Pérez-López, L.A.; Rivas-Galindo, V.M.; Paniagua-Vega, D.; Galindo-Rodríguez, S.A.; Álvarez-Román, R. Simultaneous GC-FID Quantification of Main Components of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula dentata* Essential Oils in Polymeric Nanocapsules for Antioxidant Application. *J. Anal. Methods Chem.* **2019**, *2019*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Nabet, N.; Boudries, H.; Chougui, N.; Loupassaki, S.; Souagui, S.; Burló, F.; Hernández, F.; Carbonell-Barrachina, Á.A.; Madani, K.; Larbat, R. Biological activities and secondary compound composition from *Crithmum maritimum* aerial parts. *Int. J. Food Prop.* **2016**, *20*, 1843–1855. [[CrossRef](#)]
49. Gonçalves, M.; Cruz, M.; Cavaleiro, C.; Lopes, M.; Salgueiro, L. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*. *Ind. Crop. Prod.* **2010**, *32*, 70–75. [[CrossRef](#)]
50. Nikolic, M.; Jovanović, K.K.; Marković, T.; Marković, D.; Gligorijević, N.; Radulović, S.; Soković, M. Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, *61*, 225–232. [[CrossRef](#)]
51. Dutra, T.V.; Castro, J.C.; de Menezes, J.L.; Ramos, T.R.; Prado, I.N.D.; Machinski, M.; Mikcha, J.M.G.; Filho, B.A.D.A. Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. *Ind. Crop. Prod.* **2019**, *129*, 345–349. [[CrossRef](#)]
52. Hernández-González, M.; Berumen, C.P.; Ruíz, H.S.; Salazar, C.R.; Paz, J.H.; Olivas-Armendáriz, I.; Martel-Estrada, S.; González, C.R. Polysuccinimide functionalized with oregano's essential oil extracts, an antimicrobial extended release bio-material. *Mater. Lett.* **2017**, *191*, 73–76. [[CrossRef](#)]
53. Btissam, R.; Fatima, E.M.; Kamal, E.; Hassane, G.; Mohamed, N. Composition and Antibacterial Activity of Hydro-Alcohol and Aqueous Extracts Obtained from the Lamiaceae Family. *Pharmacogn. J.* **2017**, *10*, 81–91. [[CrossRef](#)]
54. Yang, S.-K.; Yusoff, K.; Thomas, W.; Akseer, R.; Alhosani, M.S.; Abushelaibi, A.; Lim, E.; Lai, K.-S. Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Heydari, M.; Zanfardino, A.; Taleei, A.; Bushehri, A.A.S.; Hadian, J.; Maresca, V.; Sorbo, S.; Di Napoli, M.; Varcamonti, M.; Basile, A.; et al. Effect of Heat Stress on Yield, Monoterpene Content and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Mentha x piperita* var. *Mitcham* and *Mentha arvensis* var. *piperascens*. *Molecules* **2018**, *23*, 1903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Rasooli, I.; Rezaei, M.B.; Allameh, A. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Infect. Dis.* **2006**, *10*, 236–241. [[CrossRef](#)]
57. Turgis, M.; Han, J.; Caillet, S.; Lacroix, M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control* **2009**, *20*, 1073–1079. [[CrossRef](#)]
58. Paul, S.; Dubey, R.; Maheshwari, D.K.; Kang, S.C. *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. *Food Control* **2011**, *22*, 725–731. [[CrossRef](#)]
59. Diao, W.-R.; Hu, Q.-P.; Zhang, H.; Xu, J.-G. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Food Control* **2014**, *35*, 109–116. [[CrossRef](#)]
60. Llobet, E.; Campos, M.A.; Giménez, P.; Moranta, D.; Bengoechea, J.A. Analysis of the Networks Controlling the Antimicrobial- Peptide-Dependent Induction of *Klebsiella pneumoniae* Virulence Factors. *Infect. Immun.* **2011**, *79*, 3718–3732. [[CrossRef](#)]
61. Sertel, S.; Eichhorn, T.; Plinkert, P.K.; Efferth, T. Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* **2011**, *31*, 81–87.
62. Giongo, J.L.; Vaucher, R.A.; Da Silva, A.S.; Oliveira, C.B.; De Mattos, C.B.; Baldissera, M.D.; Sagrillo, M.R.; Monteiro, S.G.; Custódio, D.L.; De Matos, M.S.; et al. Trypanocidal activity of the compounds present in Aniba canelilla oil against *Trypanosoma evansi* and its effects on viability of lymphocytes. *Microb. Pathog.* **2017**, *103*, 13–18. [[CrossRef](#)]

## Publications et communication

63. Abu-Darwish, M.S.; Cabral, C.; Ferreira, I.; Gonçalves, M.J.; Cavaleiro, C.; Cruz, M.T.; Al-Bdour, T.H.; Salgueiro, L. Essential Oil of Common Sage (*Salvia officinalis*L.) from Jordan: Assessment of Safety in Mammalian Cells and Its Antifungal and Anti-Inflammatory Potential. *BioMed Res. Int.* **2013**, 2013, 1–9. [[CrossRef](#)]

64. Sinha, S.; Jothiramajayam, M.; Ghosh, M.; Mukherjee, A. Evaluation of toxicity of essential

oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, 68, 71–77. [[CrossRef](#)]

65. Prashar, A.; Locke, I.C.; Evans, C.S. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif.* **2004**, 37, 221–229. [[CrossRef](#)]

**العنوان:** تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات النباتات العطرية على *Klebsiella pneumoniae* التي تنتج طيف واسع من  $\beta$ -lactamase

#### الملخص

أصبحت العدوى التي تسببها البكتيريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية مشكلة صحية عامة عالمية كبرى ، لا سيما من خلال إكتساب ال  $\beta$ -lactamases à spectre élargie والقدرة على تكوين البيوفيلم. لذلك من الضروري توفير جزيئات طبيعية جديدة لها تأثيرات مضادة للبكتيريا ويمكن أن تعمل ضد هذه السلالات متعددة المقاومة كمصادر طبيعية واعدة وبدائل للأدوية. تهدف الدراسة المقترحة إلى تقييم التأثير المثبط لأربعة زيوت أساسية ( *Origanum glandulosum* , *Lavandula dentata* , *Mentha pulegium* و *Juniperus phoenicea* ) ضد سلالات *Klebsiella pneumoniae* التي تنتج  $\beta$ -lactamase à spectre élargie المعزولة من المستشفى العسكري الجهوي الجامعي بوهان الجزائر. من خلال تحديد آلية عملها عن طريق قياس إطلاق المكونات الخلوية الماصة عند 260 نانومتر ، قياس السمية الخلوية في الخلايا الليمفاوية البشرية ، وتوليد أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) ومراقبة تأثير الزيوت الأساسية على مستوى جدار الخلية بالمجهر الإلكتروني، و تحليل تركيبات الزيوت الأساسية للنباتات بواسطة GC-MS، كانت نسبة 37.5 % BLSE *Klebsiella pneumoniae* كشف تحليل الPCR عن وجود جين *bla CTX-M* من المجموعة 1 بنسبة عالية (86.7%) ، و 46.7% من بينهم كانوا منتجين معتدلين للبيوفيلم. أظهرت سلالات *Klebsiella pneumoniae* BLSE حساسية كبيرة من *Origanum glandulosum* و *Mentha pulegium*. أعطوا في المتوسط ، على التوالي ، منطقة تثبيط: 43.45 / 13.06 مم ، أقل تركيز مثبط CMI: 5.14 / 7.22 مج / مل و CMB: 10.64 / 7.35 مج / مل. من ناحية أخرى، فإن الزيت العطري من *Lavandula dentata* أقل نشاطاً. بينما لم يكن لل *Juniperus phoenicea* أي تأثير مضاد. لم تظهر هذه المكونات أي تأثير سام ضد الخلايا الليمفاوية بعد 24 ساعة من الحضارة، وجود مواد ماصة عند مستوى 260 نانومتر في العينة المفترزة التي تمت معالجتها مقارنة بالخلايا الغير معالجة. أظهر اختبار ROS تأثيرات مثبطة على إنتاج كريات الدم البيضاء ROS مقارنة بالخلايا الشاهدة، بالإضافة إلى ذلك ، هناك تغييرات في جدار الخلية وكذلك فقدان محتوى السيترولازم الذي أظهره الميكروسكوب الإلكتروني، وتشير نتائج هذه الدراسة إلى أن زيوتنا الأساسية يمكن استخدامها كمصدر للعقاقير الطبيعية المضادة للبكتيريا التي لها تطبيقات دوائية محتملة

**الكلمات المفتاحية:** *Klebsiella pneumoniae* ، PCR ،  $\beta$ -lactamase ، زيت أساسي ، نشاط مضاد للجراثيم ، سمية خلوية.

**Titre :** Evaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne d'extraits des plantes aromatiques sur *Klebsiella pneumoniae* productrice de  $\beta$ -lactamase à spectre élargie

#### Résumé

Les infections causées par les bactéries multirésistantes sont devenues un problème majeur de santé publique mondiale, en particulier par l'acquisition de  $\beta$ -lactamases à spectre élargie et la capacité de formation de biofilm. Il est donc urgent de mettre à disposition de nouvelles molécules naturelles qui ont des effets antibactériens et qui peuvent agir contre ces souches multirésistantes en tant que sources prometteuses d'alternatives naturelles aux médicaments. L'étude proposée est d'évaluer l'effet inhibiteur de quatre huiles essentielles (*Origanum glandulosum*, *Lavandula dentata*, *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*) sur des souches de *Klebsiella pneumoniae* productrice de  $\beta$ -lactamase à spectre élargie d'origine hospitalière. Algérie. En déterminant leur mécanisme d'action par la mesure de la libération de composants cellulaires absorbant à 260 nm, la cytotoxicité dans les lymphocytes humains, la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et l'observation des effets des huiles essentielles au niveau de la paroi cellulaire par microscopie électronique. Les compositions des huiles essentielles des plantes ont également été analysées par GC-MS. L'incidence de *K pneumoniae* BLSE a été de 37,5%. L'analyse par PCR de ces dernières, a révélé la présence de gène *bla CTX-M* du groupe 1 avec un pourcentage élevé (86,7%), et 46,7% d'eux était des productrices modérés de biofilm. Les souches de *Klebsiella pneumoniae* BLSE ont montré une grande sensibilité aux HES d'*Origanum glandulosum* et de *Mentha pulegium*. Elles ont donné en moyenne respectivement, une zone d'inhibition 43,45 / 13,06 mm, une CMI = 5,14 / 7,22 mg/mL et une CMB = 7,35 / 10,64 mg/mL. Par contre l'huile essentielle de *Lavandula dentata* était moins active. Alors que *Juniperus phoenicea* n'a exercé aucun effet antibactérien. Les composés présentaient un bon profil de sécurité contre les lymphocytes après 24 heures d'incubation et la présence de matériaux absorbants à 260 nm dans les filtrats de *K.pneumoniae* traités. Le test de génération des ERO a montré des effets inhibiteurs sur la production des leucocytes polymorphonucléaires ERO par rapport aux cellules témoins. De plus, il y a des altérations dans la paroi cellulaire ainsi que la perte de contenu cytoplasmique visualisé par MET. Les résultats de cette étude suggèrent que nos huiles essentielles peuvent être utilisées comme source d'agents antibactériens naturels avec des applications pharmacologiques potentielles.

**Mots clé :** *Klebsiella pneumoniae*, PCR,  $\beta$ -lactamase, huile essentielle, activité antibactérienne, cytotoxicité.

**Title:** Evaluation *in vitro* of the antibacterial activity of extracts of aromatic plants on *Klebsiella pneumoniae* producing broad spectrum  $\beta$ -lactamase

#### Abstract

Infections caused by multidrug-resistant bacteria have become a major global public health problem, in particular through the acquisition of extended spectrum  $\beta$ -lactamases and the ability to form biofilm. It is therefore urgent to make available new natural molecules which have antibacterial effects and which can act against these multiresistant strains as promising natural sources of alternatives to drugs. The proposed study is to evaluate the inhibitory effect of four essential oils (*Origanum glandulosum*, *Lavandula dentata*, *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*) on strains of *Klebsiella pneumoniae* extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing from hospital. Algeria. Determining their mechanism of action by measuring the release of cellular components absorbing at 260 nm, cytotoxicity in human lymphocytes, generation of reactive oxygen species (ROS) and observing the effects of essential oils on the cellular wall by electron microscopy. The compositions of essential oils of plants were also analyzed by GC-MS. The incidence of *K. pneumoniae* ESBL was 37.5%. PCR analysis of these revealed the presence of *bla CTX-M* group 1 gene with a high percentage (86.7%), and 46.7% of them were moderate biofilm producers. The ESBL *K. pneumoniae* strains showed great sensitivity to *Origanum glandulosum* and *Mentha pulegium* EOs. They gave on average, respectively, a zone of inhibition 43.45 / 13.06 mm, a MIC = 5.14 / 7.22 mg / mL and a CMB = 7.35 / 10.64 mg / mL. On the other hand, the essential oil of *Lavandula dentata* is less active. While *Juniperus phoenicea* did not exert any antibacterial effect. The compounds exhibited a good safety profile against lymphocytes after 24 hours of incubation and the presence of absorbent material at 260 nm in the treated *K. pneumoniae* filtrates. ROS production in polymorphonuclear leukocytes decreases when treated with *O. glandulosum* and *L. dentata* extracts compared to the control. In particular, the extract of *O. glandulosum* is more active than that of *L. dentate*. In addition, there are alterations in the cell membrane Thus, the loss of cytoplasmic content visualized by TEM. The results of this study suggest that our essential oils can be used as a source of natural antibacterial agents with potential pharmacological applications.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, PCR,  $\beta$ -lactamase, essential oil, antibacterial activity, cytotoxicity.

