

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité/Option : Microbiologie Appliquée
Département : Écologie et Génie de l'Environnement

Thème

**Effet de l'hespéridine extrait d'une plante médicinale sur
la formation de biofilm chez *Klebsiella oxytoca***

Présenté par :

- BEDOUH Hiba
- DJEDADOUA Imen
- GUIBOUB Madjeda

Devant le jury :

Dr. AMRI S.
Dr. TALEB Y.
Dr. BENHALIMA L.

Présidente
Examinatrice
Promotrice

Université de Guelma
Université de Guelma
Université de Guelma

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

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

Nous remercions particulièrement les membres de jury qui ont bien voulu consacré une partie de leur temps à juger ce travail :

*Nos sincères remerciements vont à **Mme. AMRI S.**, Docteur à l'Université de Guelma, pour avoir accepté de présider le jury de soutenance.*

*Nous remercions également **Mme. TALEB Y.**, Docteur à l'Université de Guelma, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Nous témoignons nos sincères remerciements pour

***Dr. BENHALIMA L.**, pour son encadrement et ses encouragements à travers son attention, sa patience, sa grande disponibilité, sa gentillesse, ses conseils judicieux et son suivi tout au long de ce travail.*

Nous le remercions également de nous 'avoir fait confiance pour la réalisation de ce travail.

Grand merci à nos enseignants de la faculté des sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Guelma, qui ont fait de nous ce que nous sommes.

Nos remerciements vont aussi à nos parents qui ont mis à notre disposition les moyens moraux et techniques nécessaires durant notre parcours académique.

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Symboles et abréviations	
Introduction	01
Chapitre I: Synthèse bibliographique	
I. Flavonoïdes	03
I.1. Définition	03
I.2. Classification des flavonoïdes	03
I.3. Biosynthèse et plantes médicinales riches en flavonoïdes	04
I.4. Extraction et dosage des flavonoïdes	06
I.4.1. Extraction par solvant	06
I.4.2. Extraction par macération	06
I.4.3. Extraction par Soxhlet	06
I.4.4. Extraction assistée par ultrasons	07
I.4.5. Extraction par CO ₂ supercritique	07
I.5. Hespéridine et propriétés pharmacologiques	08
II. Biofilm	08
II.1. Définition	08
II.2. Mécanisme de formation d'un biofilm bactérien	08
II.2.1. Attachement des bactéries	09
II.2.2. Maturation du biofilm	09
II.2.3. Dispersion et détachement cellulaire	10
II.3. Facteurs favorisant la formation de biofilm	10
II.3.1. Caractéristiques de la surface	10

II.3.2. Caractéristiques du milieu	11
II.3.3. Propriétés des cellules	11
II.4. <i>Klebsiella oxytoca</i> et formation de biofilm	11
II.4.1. Taxonomie et caractères généraux	11
II.4.2. Résistance aux agents antibactériens	12
II.4.3. Capacité de formation de biofilm par <i>Klebsiella oxytoca</i>	12
II.5. Stratégies anti-biofilm	13
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
I. Matériel biologique	15
I.1. Choix et origine des souches bactériennes	15
I.2. Vérification de la pureté des souches bactériennes	15
I.2.1. Revivification des souches bactériennes	16
I.2.2. Isolement et caractérisation phénotypique des souches bactériennes	16
II. Étude de l'effet d'un flavonoïde naturel sur la capacité de formation de biofilm chez <i>Klebsiella oxytoca</i>	16
II.1. Obtention de l'hespéridine	17
II.2. Préparation de la solution mère et les concentrations filles de l'hespéridine	17
II.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI	18
II.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB	18
II.5. Préparation des cultures bactériennes	18
II.6. Activité anti-adhérence/ Essai d'adhésion	19
II.7. Essai de la formation de biofilm	19
III. Analyse statistique	20

Chapitre III : Résultats et Discussion

I. Caractérisation phénotypique et vérification de la pureté des souches bactériennes	22
II. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide de l'hespéridine vis-à-vis des souches de <i>Klebsiella oxytoca</i>	23
III. Activité anti-adhérence de l'hespéridine	25
IV. Étude de l'effet de l'hespéridine sur la capacité de formation de biofilm chez <i>Klebsiella oxytoca</i>	26
IV.1. Capacité de formation de biofilm en mono-espèce	26
IV.2. Capacité de formation de biofilm mixte	28
Conclusion et perspectives	35
Références bibliographiques	36
Annexe	44

Résumé

La présente étude a pour objectif la détermination de l'effet de l'héspéridine sur la formation de biofilm chez *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*). Cette capacité, de 04 souches obtenues à partir d'un milieu hospitalier, a été détectée par le test d'adhésion en microplaque par coloration au cristal violet. Huit concentrations d'héspéridine allant de 50 à 6400 µg/ml ont été testées sous l'influence de deux températures (ambiante et 37°C). La formation de biofilm en mono-espèce et mixte (*K. oxytoca* KO – *E. coli* EC) a été évaluée. Les résultats obtenus montrent que l'action de l'héspéridine sur les souches de *K. oxytoca* est bactériostatique avec une CMI de 800 µg/ml et que ce flavonoïde n'a montré qu'un faible pouvoir anti-biofilm vis-à-vis de ces souches en mono- et en double-espèces. Globalement, ce pouvoir a été observé après des longues durées et avec différentes concentrations (AV1, $p < 0,05$). Les mono-souches ont marqué une forte production du biofilm dans les deux températures même après 21 jours. Des densités optiques importantes ($0,7 \pm 0,04$; $0,8 \pm 0,01$) ont été enregistrés par les souches KO3 et KO4 vis-à-vis de $\frac{1}{4}$ CMI et de la CMI d'héspéridine. Pour les biofilms mixtes, l'héspéridine a un effet anti-biofilm important à une température ambiante sur le couple KO1-EC1 et KO2-EC2 ($0,16 < DO < 0,3$) (test T de student, $p < 0,05$). En revanche, les couples KO3-EC3 et KO4-EC4 ont montré une hyper formation de biofilm durant la majorité du temps de contact même avec les fortes concentrations d'héspéridine. La capacité de formation de biofilm par l'espèce *k. oxytoca* permet de conclure que l'héspéridine ne peut pas être considéré comme un meilleur agent anti-biofilm.

Mots clés : Activité anti-biofilm, héspéridine, *Klebsiella oxytoca*, biofilm mono-espèce, biofilm mixte.

The aim of the present study was to determine the effect of hesperidin on the ability of *klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) species to form a biofilm. The ability of 04 strains obtained from a hospital environment, was detected by the microplate adhesion test using crystal violet staining. Eight concentrations of hesperidin ranging from 50 to 6400 µg/ml were tested under the influence of two temperatures (ambient and 37°C). Single-species and mixed biofilm (*K. oxytoca* KO -*E. coli* EC) formation was evaluated. The results obtained show that the action of hesperidin on *K. oxytoca* strains is bacteriostatic with an MIC of 800 µg/ml and that this flavonoid showed only a weak anti-biofilm capacity towards these strains in mono- and double-species. Overall, this capacity was observed after long durations and with different concentrations (AV1, $p < 0.05$). Mono strains marked high biofilm production in both temperatures even after 21 days. Significant optical densities (0.7 ± 0.04 ; 0.8 ± 0.01) were recorded by KO3 and KO4 strains against $\frac{1}{4}$ MIC and hesperidin MIC. For mixed biofilms, hesperidin has a significant anti-biofilm effect at room temperature on the KO1-EC1 and KO2-EC2 couple ($0.16 < OD < 0.3$) (Student's T-test, $p < 0.05$). In contrast, the KO3-EC3 and KO4-EC4 couples showed hyper biofilm formation during the majority of the contact time even with the high concentrations of hesperidin. The capacity of biofilm formation by *K. oxytoca* species allows us to conclude that hesperidin cannot be considered as a better anti-biofilm agent.

Key words: Anti-biofilm activity, hesperidin, *Klebsiella oxytoca*, single-species biofilm, mixed biofilm.

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد تأثير الهيسبيريدين على قدرة سلالة *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) على تكوين غشاء حيوي. تم إكتشاف قدرة 04 سلالات متحصل عليها من بيئة المستشفى من خلال إختبار إلتصاق الصفائح الدقيقة بإستخدام التلوين بالبنفسج البلوري. تم إختبار ثمانية تراكيز تتراوح من 50 إلى 6400 ميكروغرام / مل. حيث قمنا بتقييم تكوين الأغشية الحيوية أحادية النوع والمختلطة (*K. oxytoca* KO -*E. coli* EC) تحت تأثير درجتي حرارة (وسطية و37 درجة مئوية). أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن للهيسبيريدين تأثير مثبت على سلالات *K. oxytoca* بتركيز أدنى قيمته 800 ميكروغرام / مل وأن هذا الفلافونويد لم يثبت إلا قدرة ضعيفة مضادة للغشاء الحيوي الأحادي و المزوج لهذه السلالات. بشكل عام، لوحظ هذا التأثير بعد فترات طويلة و بتركيز مختلفة (AV1 ، $p < 0,05$). حيث أظهرت السلالات الأحادية إنتاجًا قويًا للأغشية الحيوية في كلتا درجتي الحرارة حتى بعد 21 يومًا. كثافة ضوئية معتبرة ($0,04 \pm 0,7$; $0,01 \pm 0,8$) تم تسجيلها بواسطة سلالات KO3 و KO4 بالنسبة إلى $\frac{1}{4}$ CMI و CMI للهيسبيريدين تأثير مهم مضاد للأغشية الحيوية المختلطة في درجة حرارة الغرفة على الزوجين EC1-KO1 و EC2-KO2 (كثافة ضوئية ما بين 0,3 و0,16) ($p < 0,05$ ، إختبار T de Student). في المقابل أظهر الزوجان EC3-KO3 و EC4-KO4 تكوين مفرط للغشاء الحيوي خلال غالبية وقت التلامس حتى مع تراكيز عالية من الهيسبيريدين. إن قدرة سلالات *K. oxytoca* على تشكيل الأغشية الحيوية يلخص إلى أنه لا يمكن إعتبار الهيسبيريدين أفضل عامل مضاد للغشاء الحيوي.

الكلمات المفتاحية: نشاط مضاد للغشاء الحيوي، هسبيريدين، *Klebsiella oxytoca*، غشاء حيوي أحادي النوع، غشاء حيوي مختلط النوع.

Figure	Titre	Page
Figure 01	Structure générale des flavonoïdes	03
Figure 02	Structure de base de différents sous-groupes de flavonoïdes	04
Figure 03	Principales étapes de biosynthèse des différentes classes des flavonoïdes	05
Figure 04	Cycle de développement simplifié d'un biofilm	09
Figure 05	Étude de la capacité de formation de biofilm chez <i>Klebsiella oxytoca</i> soumise au stress de l'héspéridine	21
Figure 06	(a)Aspect macroscopique, (b) enzymes respiratoires et (c) profil biochimique de <i>Klebsiella oxytoca</i> KO1	22
Figure 07	Capacité de formation de biofilm chez des souches de <i>Klebsiella oxytoca</i> à une température ambiante et en présence d'héspéridine	27
Figure 08	Capacité de formation de biofilm chez des souches de <i>Klebsiella oxytoca</i> à la température 37°C et en présence d'héspéridine	28
Figure 09	Capacité de formation de biofilm mixte (<i>Klebsiella oxytoca</i> – <i>Escherichia coli</i>) à une température ambiante et en présence d'héspéridine	29
Figure 10	Capacité de formation de biofilm mixte (<i>Klebsiella oxytoca</i> – <i>Escherichia coli</i>) à la température 37°C et en présence d'héspéridine	30

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Origine des souches de <i>Klebsiella oxytoca</i> à étudier	15
Tableau 02	Identification des souches bactériennes à étudier	22
Tableau 03	Activité antibactérienne de l'hespéridine	23
Tableau 04	Taux d'adhérence des souches de <i>Klebsiella oxytoca</i> en présence d'hespéridine (moyenne \pm écartype)	25
Tableau 05	Préparation et inoculation de la galerie miniaturisée API 20 E	46
Tableau 06	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E	47

ADN gyrase : ADN topo-isomérase capable d'introduire des supertours négatifs dans l'ADN.	M : Molarité.
ANOVA : Analyse de la variance.	Mm : Millimètre.
AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium.	Min : Minute.
ATCC : American Type Culture Collection.	Nm : Nanomètre.
°C : Celsius.	NR : Nitrate réductase.
Ca²⁺ : Ions du calcium.	ONPG : O-nitrophényl-bêta-D-galactopyranoside.
Cat : Catalase.	OX : Oxydase.
CMB : Concentration Minimale bactéricide.	PBS : Phosphate-buffered saline.
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.	pH : Potentiel Hydrogène.
DMSO : Diméthylsulfoxyde.	QS : <i>Quorum sensing</i> .
DO : Densité Optique.	KO : <i>Klebsiella oxytoca</i> .
EC : <i>Escherichia coli</i> .	TSB : Bouillon Tryptone Soja.
EPS : Extracellular polymeric substances.	µg : Micro-gramme.
FASEB : Federation of American Societies of <i>Experimental Biology</i> .	µg/ml : Micro-gramme par millilitre.
FDA : <i>Food and Drug Administration</i> .	µl : Micro-litre.
GN : Gélose Nutritive.	(-) : Négatif.
g/l : Gramme par litre.	(+) : Positif.
HCL : Chlorure d'hydrogène.	§ : Paragraphe.
	% : Pourcentage pour cent.

Introduction

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés aux surfaces biotiques ou abiotiques, ils protègent les bactéries et leur permettent de survivre dans des conditions environnementales hostiles (**Tremblay et al., 2014**). L'établissement et le développement de biofilms bactériens sont connus pour être des processus dynamiques et complexes régulés par des propriétés biologiques intrinsèques et également par de nombreux facteurs environnementaux (**Cowle, et al., 2019**). À ce jour, la formation de biofilm est une préoccupation majeure dans divers secteurs et cause de graves problèmes pour la santé publique, la médecine et l'industrie (**Tasse, 2017**). La capacité à former un biofilm est actuellement considérée comme une caractéristique de plusieurs micro-organismes parmi lesquels *Klebsiella oxytoca* qui est l'une des nombreuses bactéries qui peuvent produire des biofilms par le biais de plusieurs types de structures adhésives, notamment la capsule et les fimbriae (**Ghasemian et al., 2019**).

Pour prévenir ou inhiber le développement des micro-organismes pathogènes et éviter la formation des biofilms, plusieurs molécules naturelles ou chimiques sont utilisées. Pendant des siècles, les plantes médicinales présentent une source évidente de nouveaux composés antimicrobiens qui sont utilisés pour traiter les maladies infectieuses (**Nisreen, 2017; Sayari et al., 2016**). De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales récentes ont montré que les composés flavonoïques, très abondants dans les plantes, ont des capacités antibactériennes remarquables (**Djahra et al., 2015**). Parmi ces composés, l'hespéridine qui est présent en forte concentration dans les agrumes et plusieurs plantes médicinales. Son utilisation a été associée à un grand nombre d'avantages pour la santé, notamment des propriétés anti-inflammatoires, anti-hypertensives et antibactériennes (**Pyrzynska, 2022**). L'innocuité de l'hespéridine a été confirmée par la FASEB (*Federation of American Societies of Experimental Biology*) à la demande de la FDA (*Food and Drug Administration*) à cause de l'absence des effets secondaires indésirables après son ingestion orale. Récemment, l'hespéridine a été testée avec succès comme médicament pour la prévention et le traitement du COVID-19 (**Cheng et al., 2021 ; Watson et al., 2014**).

La résistance aux agents antibactériens est devenue un problème mondial sérieux. *Klebsiella oxytoca* constitue aussi avec d'autres microorganismes un défi mondial pour la santé publique non en raison de leur pathogénicité mais de leur multi-résistance aux agents antibactériens. Elle a développé une résistance à plusieurs antibactériens par plusieurs

mécanismes, notamment la dégradation enzymatique et l'élimination efficace par les pompes à efflux, à les quelles s'ajoute sa capacité à former des biofilms résistants responsables de diverses pathologies infectieuses nosocomiales (**Neog et al., 2021**). Avec cette résistance croissante des bactéries, il est toujours nécessaire de chercher des molécules pour surmonter ce problème et orienter la recherche pour l'identification de nouvelles biomolécules avec une large activité antibactérienne et antibiofilm (**Jamal et al., 2018**).

Dans la présente étude, nous avons évalué l'activité antibiofilm de l'hespéridine, un flavonoïde extrait d'une plante médicinale, en fonction de la température et de la durée vis-à-vis de *Klebsiella oxytoca* isolée d'un milieu hospitalier.

Par conséquent, nous nous sommes fixés trois objectifs majeurs :

- Evaluation de la capacité de l'espèce à étudier à former un biofilm *in vitro* ;
- Détermination de l'effet antibactérien d'un flavonoïde « l'hespéridine » vis-à-vis de l'espèce à étudier ;
- Evaluation de la capacité anti-biofilm de l'hespéridine.

Ce manuscrit s'organise autour de trois parties :

- La première partie constitue un état de l'art de notre sujet d'étude. Elle présente une généralité sur les flavonoïdes ainsi que l'hespéridine et ses effets pharmacologiques, les caractéristiques structurales et fonctionnelles des biofilms bactériens et les caractères généraux et la capacité de formation de biofilm chez l'espèce bactérienne à étudier ;
- La deuxième est entièrement consacrée à la description de la méthodologie utilisée ;
- La troisième partie englobe les résultats expérimentaux obtenus, suivie d'une discussion engendrée par ces résultats. Enfin, cette étude est clôturée par une conclusion et des perspectives proposées.

Partie I :
Synthèse
bibliographique

I. Flavonoïdes

I.1. Définition

Les flavonoïdes, un groupe de substances naturelles à structure phénolique variable, sont des métabolites secondaires très répandus chez les végétaux et abondamment présents dans les fruits, les légumes, les céréales et le thé (**Panche *et al.*, 2016**). Les flavonoïdes sont caractérisés par un squelette basique de flavone à 15 atomes de carbone, C6-C3-C6, avec deux cycles benzéniques (A et B) liés par un cycle pyranique à trois atomes de carbone (C) (Fig. 01) (**D'Amelia *et al.*, 2018**).

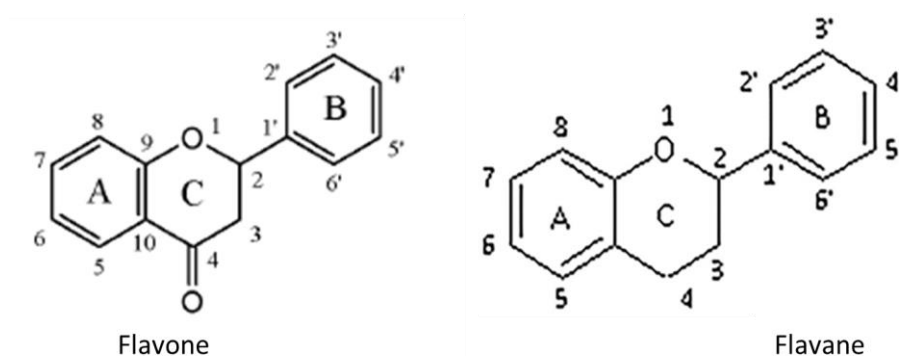


Figure 01 : Structure générale des flavonoïdes (**Tzanova *et al.*, 2020 ; Wang *et al.*, 2018**).

I.2. Classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent être classés en trois grandes catégories : les bioflavonoïdes, les iso-flavonoïdes (phytoestrogènes) et les néo-flavonoïdes (flavonoïdes blancs) et subdivisés en différents sous-groupes en fonction du carbone du cycle C sur lequel est fixé le cycle B et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C, ces sous-groupes sont les suivants : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanols ou catéchines, anthocyanines et chalcones (Fig. 02) (**Ramesh *et al.*, 2021 ; Panche *et al.*, 2016**).

La double liaison C2-C3 du cycle C a disparu chez les flavanones. Les flavanols sont aussi appelés flavan-3-ols. Cette sous-famille comprend 4 formes de catéchines. La molécule possède deux atomes de carbone asymétriques, C2 et C3, donnant naissance à 4 stéréoisomères. Les flavan-3-ols sont très présents dans le cacao, en revanche les isoflavones ne sont présentes que dans les végétaux (**Emeraux, 2019**).

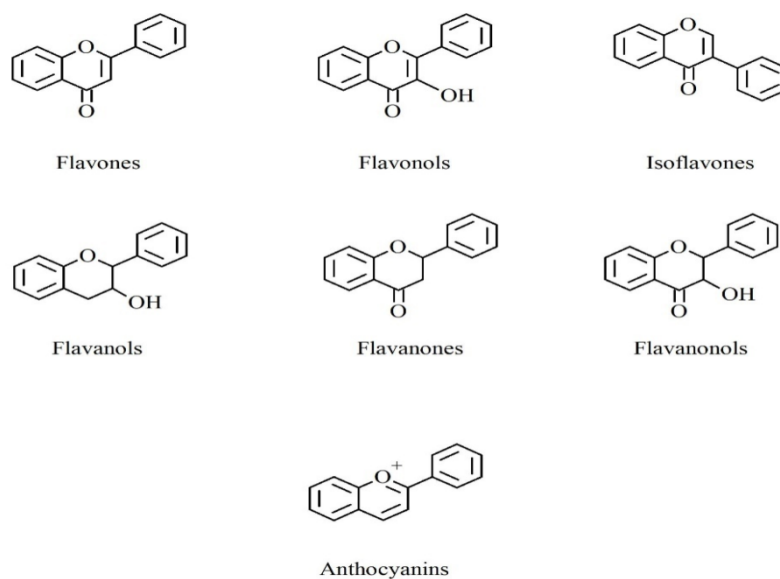


Figure 02 : Structure de base de différents sous-groupes de flavonoïdes (**Bertelli *et al.*, 2021**).

I.3. Biosynthèse et plantes médicinales riches en flavonoïdes

Les flavonoïdes sont synthétisés via la voie des phénylpropanoïdes, qui convertit l'acide aminé phénylalanine en 4-coumaroyl-CoA qui entre dans la biosynthèse des flavonoïdes (Fig. 03) (**Ferreyra *et al.*, 2012**). La formation de flavonoïdes est la condensation du malonyl-CoA, de la coenzyme A et de l'ester trimoléculaire de l'acide hydroxycinnamique. Le p-coumaroyl-CoA et les 3 malonyl-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). La chalcone a tendance à s'isomériser en flavanones sous l'action de la chalcone isomérase, induisant ainsi une fermeture de cycle stéréospécifique, aboutissant à une seule Flavanones. Cette chalcone peut également être cyclisée en aurone. C'est le précurseur de tous les flavonoïdes (**Glossman-Mitnik *et al.*, 2004**).

Plusieurs plantes médicinales sont des bonnes sources de flavonoïdes qui sont largement utilisés dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et alimentaire (**Efferth et Greten, 2012**). La quantité et le type de flavonoïdes présents dans les plantes peuvent varier en fonction de plusieurs facteurs, tels que la variété de la plante, les conditions de culture, la saison, etc (**Vogiatzoglou, 2015; Pérez-Jiménez, 2010**).

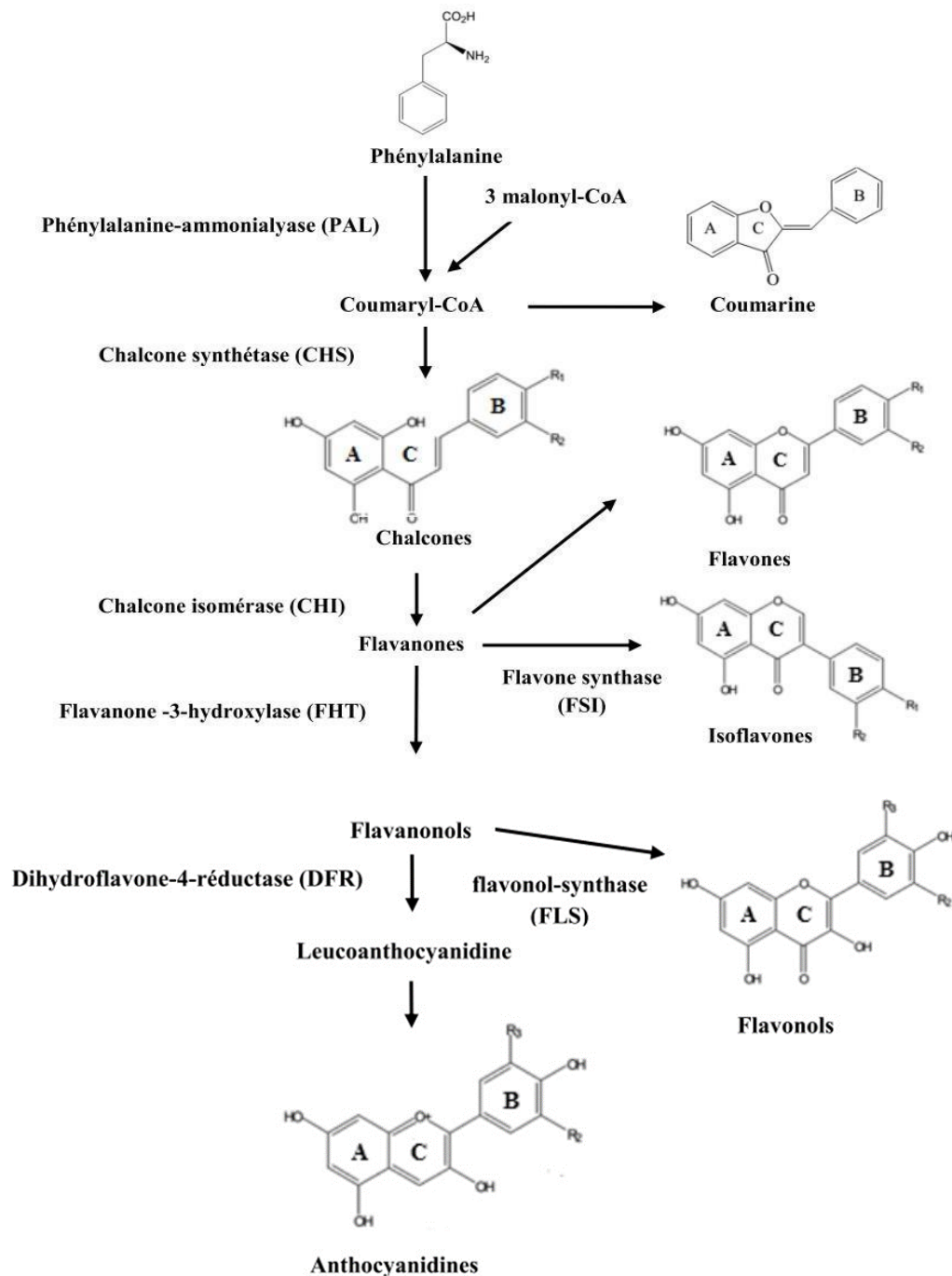


Figure 03 : Principales étapes de biosynthèse des différentes classes des flavonoïdes (Saffidine, 2015).

Parmi les plantes riches en flavonoïdes, nous citons : les agrumes (oranges, citrons, pamplemousses, etc.), le thé vert, les baies (myrtilles, fraises, mûres, framboises, etc.), les légumes verts à feuilles (épinards, chou frisé, etc.), les légumineuses (haricots, lentilles, pois chiches, etc.), les oignons et l'ail, le cacao et les herbes aromatiques (thym, romarin, basilic, origan, etc.) (Erlund, 2004).

Les plantes médicinales les plus importantes qui contiennent des flavonoïdes sont des plantes appartenant aux familles des *Lamiaceae* telle que *Mentha piperita*, des *Asteraceae* comme *Artemisia campestris* L., des *Zygophyllaceae* (*Zygphyllum album* L.), des *Fabaceae* (*Acacia nilotica* L.), des *Apiaceae* (*Deverra scoparia*) et des *Rutaceae* (*Citrus limon*) (**Bradai et al., 2020**).

I.4. Extraction et dosage des flavonoïdes

Il existe plusieurs techniques d'extraction des flavonoïdes, les plus courantes sont les suivantes :

I.4.1.Extraction par solvant

Cette méthode est la plus couramment utilisée pour extraire les flavonoïdes des plantes. Elle consiste à utiliser un solvant organique (comme l'éthanol, le méthanol ou l'acétone) pour extraire les composés phytochimiques de la matière végétale. La matière végétale est broyée et mélangée avec le solvant, puis le mélange est agité et filtré pour éliminer les impuretés. Enfin, le solvant est évaporé pour récupérer les flavonoïdes sous forme de poudre ou de liquide concentré. Cette méthode est simple et peu coûteuse, mais elle peut endommager les composés cibles en raison de l'utilisation d'un solvant (**Mansur et al., 2019**).

I.4.2. Extraction par macération

Cette méthode est également basée sur l'utilisation d'un solvant organique pour extraire les flavonoïdes de la matière végétale. La différence avec la méthode précédente est que la matière végétale est laissée en contact avec le solvant pendant une période prolongée (généralement plusieurs heures à plusieurs jours) pour permettre une extraction plus complète. Cette méthode est souvent utilisée pour extraire les flavonoïdes de plantes à haute teneur en huiles essentielles, car elle permet d'extraire les flavonoïdes sans endommager les huiles essentielles (**Faye et al., 2022**).

I.4.3. Extraction par Soxhlet

Cette méthode est souvent utilisée pour extraire des composés volatils et non volatils

des plantes. Elle utilise un appareil appelé Soxhlet, qui permet d'extraire les flavonoïdes à partir de la matière végétale en utilisant un solvant en continu. La matière végétale est placée dans une cartouche en cellulose, qui est placée dans le Soxhlet. Le solvant est chauffé et vaporisé, puis il se condense et retourne dans la cartouche en cellulose pour extraire les flavonoïdes. Cette méthode est plus coûteuse et plus lente que les méthodes d'extraction par solvant **(Oluwaseun, 2018)**.

I.4.4. Extraction assistée par ultrasons

Cette méthode utilise des ondes ultrasonores pour briser les parois cellulaires de la matière végétale et faciliter l'extraction des flavonoïdes. Elle est souvent utilisée pour extraire les flavonoïdes de plantes à parois cellulaires dures ou épaisses. La matière végétale est mélangée avec un solvant organique, puis le mélange est soumis à des ondes ultrasonores pendant une période donnée. Cette méthode est plus rapide et plus efficace que les méthodes traditionnelles d'extraction par solvant, mais elle peut être coûteuse en raison de l'utilisation d'un équipement spécialisé **(Wang, 2019)**.

I.4.5. Extraction par CO₂ supercritique

Cette méthode utilise du dioxyde de carbone à l'état supercritique pour extraire les flavonoïdes de la matière végétale. C'est une méthode respectueuse de l'environnement, car elle n'utilise pas de solvants toxiques et elle est capable d'extraire des composés très purs **(Putra et al., 2019)**.

Pour le dosage des flavonoïdes, il existe plusieurs techniques qui peuvent varier en fonction des spécificités des flavonoïdes à doser et des échantillons à analyser. Chaque méthode de dosage des flavonoïdes a ses avantages et ses limites, et le choix de la méthode dépendra des besoins spécifiques de l'étude **(De Paepe et al., 2016)**. Ces techniques sont souvent spectrophotométriques basées sur une interaction chimiquement encore mal connue, et les recherches traitant ces types d'interactions se font de plus en plus rares. La technique de trichlorure d'aluminium est la plus utilisée, elle utilise généralement un standard, qui réagit avec le trichlorure d'aluminium (AlCl₃), puis l'établissement d'une courbe d'étalonnage qui sert à projeter les absorbances des échantillons étudiés **(Yildirim et al., 2017 ; Karimi et al., 2016)**.

I.5. Hespéridine et propriétés pharmacologiques

L'hespéridine ($C_{28}H_{34}O_{15}$) est un glycoside flavonoïde qui a été isolé pour la première fois en 1828 par le chimiste français Lebreton à partir d'écorces d'agrumes. L'hespéridine et d'autres bioflavonoïdes similaires, autrefois appelés "vitamine P", se trouvent en abondance dans les agrumes, notamment les citrons, les oranges, les citrons verts et les pamplemousses (**Man et al., 2019 ; Xiong et al., 2019**).

Des études pharmacologiques modernes ont montré que l'hespéridine possède des propriétés anticancérogènes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antitumorale, antibactérienne, antidépressive antihyperglycémiques, antiadipogènes, antihyperlipidémiques, antihypertensives et cardioprotectrices, protégeant le système cardiovasculaire et le système gastro-intestinal. Ce qui indique qu'elle offre un large éventail de bienfaits pour la santé en ce qui concerne les maladies chroniques (notamment le cancer et le diabète) (**Cheng et Zhou, 2023**).

II. Biofilm

II.1. Définition

Le biofilm est un mode de vie en communautés qui permet à des microorganismes d'adopter un comportement de groupe. Les biofilms sont le plus souvent fixés à un support et ils sont ubiquitaires (**Aumeran et al., 2020**). Au sein d'un biofilm les microorganismes sont englobés dans une matrice constituée des substances polymériques extracellulaires « EPS » sécrétées par les cellules elles-mêmes, et vivent dans des microniches et profitent d'un milieu homéostatique, avec un accès important à l'oxygène et aux nutriments, favorisé par un système de circulation grâce à la présence de canaux élémentaires dans le biofilm. Ce mode de vie est donc une réponse adaptative des microorganismes qui favorise leur persistance dans l'environnement (**El Houry, 2021**).

II.2. Mécanisme de formation d'un biofilm bactérien

La formation d'un biofilm peut être décrite en trois étapes : l'attachement, la maturation et la dispersion (Fig. 04) :

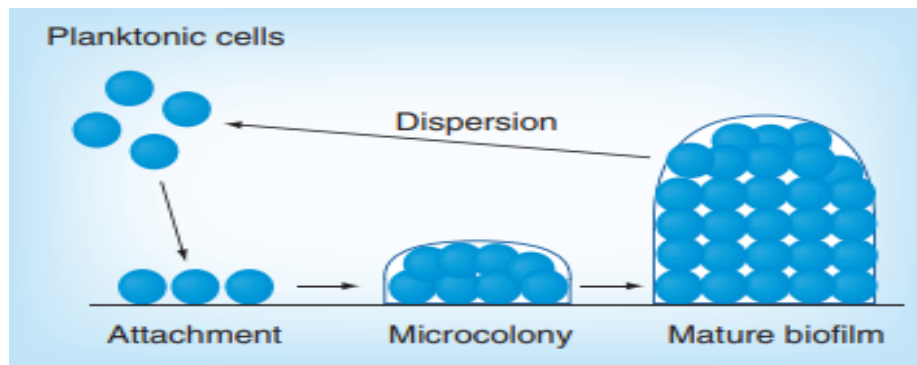


Figure 04 : Cycle de développement simplifié d'un biofilm (Nira *et al.*, 2015).

II.2.1. Attachement des bactéries : Dans un premier temps, les cellules bactériennes sous forme planctonique vont s'agréger sur des surfaces biotiques ou abiotiques par transport passif (sédimentation) ou transport actif, notamment en faisant intervenir des structures spécifiques de bactéries (comme les flagelles). Il le fait en deux étapes (EL Khoury, 2021 ; Goetz, 2018) :

- **Adhésion réversible ou l'amarrage :** Correspond à un faible attachement des cellules bactériennes aux surfaces et implique des interactions faibles telles que les forces de Van Der Waals et les liaisons électrostatiques. Elle est régie par des variables physico-chimiques qui définissent l'interaction entre la bactérie et la surface cible.
- **Adhésion irréversible ou la phase d'ancrage :** C'est la phase de consolidation de l'adhésion. Elle s'établit grâce à des éléments de surface de la bactérie (pilis, fimbriae, ...), ou grâce à un contact direct entre la paroi bactérienne et le substrat ou grâce à la sécrétion de molécules qui assurent le lien entre la paroi bactérienne et le substrat. Les bactéries produisent en plus des exopolymères qui les englobent et les fixent à la surface.

II.2.2. Maturation du biofilm : Dès que l'attachement au substrat devient irréversible, le biofilm entame des phases de croissance et de maturation, sa multiplication conduit à la formation de colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface selon les propriétés de surface des bactéries et des matériaux. Certaines caractéristiques, telles que la formation d'une matrice extracellulaire qui renferme des communautés microbiennes, contribuent à la formation de biofilm. La formation d'une matrice extracellulaire qui enrobe des communautés microbiennes permet de distinguer les

biofilms matures des jeunes biofilms. Dans le passé, la matrice polymérique extracellulaire qui entoure les biofilms était également appelée « couche visqueuse ». Cette couche de matériau polymère extracellulaire (EPS) offre divers avantages à la communauté des biofilms, notamment en favorisant l'adhérence aux surfaces, en permettant le développement de biofilms multicouches et en permettant l'évolution de la communauté des biofilms pour s'adapter à l'environnement. Les biofilms multicouches se développent et agissent comme une barrière à l'afflux de médicaments et d'autres substances toxiques (**Chaminda, 2017**).

II.2.3. Dispersion et détachement cellulaire : C'est la dernière étape du cycle de vie d'un biofilm mature. Il peut être considéré comme un phénomène intervenant de manière passive et donc être dû aux mouvements de fluides provoquant des phénomènes d'érosion (pertes de petites molécules) ou de « desquamation » (pertes de biomasses importantes). La dispersion du biofilm peut être le résultat de plusieurs indices, tels que les modifications de la disponibilité des nutriments, les fluctuations de l'oxygène, l'augmentation des produits toxiques ou d'autres conditions induisant un stress. Les bactéries se détacheraient alors de manière volontaire pour repasser dans un mode de vie planctonique afin de trouver de meilleures ressources en colonisant de nouvelles niches écologiques engendrant la formation d'autres biofilms. Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques des bactéries du biofilm, comme l'antibiorésistance (**Ansari *et al.*, 2017 ; Laurie, 2017**).

II.3. Facteurs favorisant la formation de biofilm

La formation de biofilm est liée à trois principaux facteurs :

II.3.1. Caractéristiques de la surface

Les surfaces rugueuses sont préférentiellement colonisées en raison de forces répulsives plus faibles et d'une surface accrue pour la fixation. Cependant, certaines souches de bactéries sauvages colonisent également les surfaces lisses. Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur : d'une part, le caractère hydrophobe des microorganismes leur permet de se fixer plus facilement sur des surfaces hydrophobes et non polarisées que sur des matériaux

hydrophiles. D'autre part, la présence préalable d'un film protéique sur un biomatériau influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (**Dolan et al., 2002 ; Donlan et al., 2002**).

II.3.2. Caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion des biofilms nécessitent un équipement enzymatique précis et des entités structurales spécifiques dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clés (température, pH -conditions optimales de formation de biofilms en situation de neutralité-, concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques, sources de carbone disponibles, etc) (**Martinez et Casadevall, 2007**).

II.3.3. Propriétés des cellules

L'hydrophobicité de la surface de la cellule, la présence de fimbriae et de flagelles, et la production d'exopolysaccharides influencent l'attachement des bactéries sur une surface (**Palmer et al., 2007**).

II.4. *Klebsiella oxytoca* et formation de biofilm

II.4.1. Taxonomie et caractères généraux

Klebsiella oxytoca (*K. oxytoca*) est une bactérie Gram-négative immobile, anaérobie, en forme de bâtonnet avec une capsule de polysaccharide proéminente qui résiste aux mécanismes de défense de l'hôte (**Trivedi et al., 2015**). Elle appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, ordre des *Enterobacteriales*, phylum *Proteobacteria*, Classe : *Gamma proteobacteria*, constituent la flore normale du tractus gastro-intestinal et peuvent être trouvées dans l'eau et le sol. Elle est présente dans les intestins de 2 à 10 % des personnes en bonne santé (**Singh et al., 2016 ; Herzog et al., 2014**).

K. oxytoca est positive pour l'indole, le lactose, la lysine décarboxylase, le mannitol, l'ONPG et la réduction du nitrate en nitrite mais elle est négative pour l'ornithine décarboxylase (**Jing et al., 2021**). La culture de *Klebsiella* s'effectue sur les milieux sélectifs des entérobactéries (Drigalski, Hektoen, Mac Conkey...) ; l'espèce *K. oxytoca* forme souvent des colonies muqueuses avec un diamètre de 3 à 4 mm en 18-24 h à 37°C (**Carip et al., 2015 ; Prescott et al., 2003**).

K. oxytoca est un agent pathogène opportuniste important qui joue un rôle important dans le développement d'une variété d'infections nosocomiales et communautaires. Cette bactérie est couramment isolée chez des patients atteints de septicémie, de bactériémie, d'arthrite septique, d'infections des tissus mous, de cholécystite, d'infections des voies urinaires et, plus récemment, de nourrissons souffrant de coliques (**Darby et al., 2014**). Elle est capable de provoquer diverses infections, en particulier la colite hémorragique associée aux antibiotiques après l'administration d'agents antimicrobiens et d'autres infections associées aux soins de santé chez les patients immunodéprimés (**Jing et al., 2021**).

II.4.2. Résistance aux agents antibactériens

Les *Klebsiella* spp. sont d'importants agents pathogènes infectieux qui possèdent une résistance aux agents antimicrobiens. Il a été démontré qu'elles partagent des gènes de résistance aux antimicrobiens et des gènes de facteurs de virulence par recombinaison (**Moradigaravand et al., 2017**). *K. oxytoca* a également développé sa résistance à un large éventail d'antibiotiques par le biais de divers mécanismes, notamment la dégradation enzymatique et l'élimination efficace par des pompes d'efflux (**Nakul et al., 2021**). Elle a la capacité de persister dans une variété de niches, y compris les environnements humides (**Vergara-López et al., 2013 ; Lowe et al., 2012**). Le facteur de virulence le mieux caractérisé chez *K. oxytoca* antibiorésistante est le groupe de gènes biosynthétiques de la kleboxymycine qui code pour la cytotoxine kleboxymycine ou la tilivalline, toutes deux impliquées dans les changements pathologiques provoqués par la colite hémorragique associée aux antibiotiques (**Yang et al., 2022**).

II.4.3. Capacité de formation de biofilm par *Klebsiella oxytoca*

K. oxytoca est capable de se développer et d'adhérer à de nombreuses surfaces, formant des biofilms qui le protège contre les antibiotiques, les phagocytes et les bactériophages et contribue ainsi à leur survie (**Chen et al., 2013 ; Arampatzi et al., 2011**).

Les *Klebsiella* spp. produisent des biofilms par le biais de plusieurs types de structures adhésives que l'on retrouve à la fois chez *Klebsiella pneumoniae* et *K. oxytoca*, notamment la capsule et les fimbria de type 1 et 3 (**Ghasemian et al., 2019**). Le *quorum sensing* est aussi

un grand régulateur des fonctions bactériennes, il contrôle la formation de biofilms, la formation de facteurs de virulence et le processus d'infection (**Chen et al., 2018**).

II.5. Stratégies anti-biofilm

Différentes stratégies sont envisagées pour prévenir ou inhiber le développement du biofilm (**Blackman et al., 2021 ; Flemming et al., 2016**) :

- ✓ La première stratégie anti-biofilm cible l'étape d'adhésion du développement du biofilm bactérien. Elle implique la modification des propriétés physiochimiques des surfaces pour créer des surfaces antiadhésives et/ou l'incorporation d'agents antimicrobiens sur les surfaces pour empêcher la colonisation bactérienne. Les surfaces microbiennes étant hydrophobes par nature, la prévention de l'adhésion bactérienne peut être obtenue par un revêtement de surface avec des polymères hydrophiles (**Harding et al., 2014**). À titre d'exemple, les biosurfactants entravent la formation de biofilms en modifiant la capacité d'adhésion des cellules par une diminution de l'hydrophobie de la surface cellulaire. La perturbation de la membrane et l'inhibition de la chaîne de transport d'électrons, limitant ainsi la demande d'énergie cellulaire (**Satpute et al., 2016**) ;
- ✓ La deuxième stratégie anti-biofilm cible le *quorum sensing* (QS), qui est le mécanisme de régulation permettant aux cellules bactériennes de répondre aux besoins liés à la densité cellulaire, par l'expression de gènes spécifiques. L'utilisation de molécules capables d'interférer avec le QS est une stratégie prometteuse pour contrer l'adaptation bactérienne aux surfaces et empêcher le développement du biofilm (**Hazan et al., 2016 ; Wu et al., 2015**). À titre d'exemple, les substances phytochimiques inhibent le mécanisme de détection du *quorum sensing* principalement en bloquant les inducteurs du QS comme les autoinducteurs de type 2 (**Ciric et al., 2019**) ;
- ✓ La troisième stratégie anti-biofilm cible la matrice EPS. Elle implique l'utilisation de substances capables de détruire l'intégrité physique des biofilms. La perte subséquente de la matrice hautement protectrice du biofilm peut entraîner

l'exposition des cellules microbiennes sessiles aux agents antimicrobiens (**Klare et al., 2016**). De nombreux produits naturels dérivés de plantes possèdent des fonctions antimicrobiennes et anti-biofilm *in vitro* parmi lesquels les flavonoïdes qui ont la capacité à inactiver les adhésines microbiennes, les enzymes et les protéines de transport cellulaire. En fait, les flavonoïdes sont synthétisés par les plantes en réponse à une infection microbienne et sont donc des substances antimicrobiennes très efficaces contre un large éventail de micro-organismes (**Nisreen, 2017**). Ils sont de puissants inhibiteurs de la topoisomérase comme l'ADN gyrase qui est nécessaire non seulement à la survie des bactéries dans le biofilm, mais aussi à leur propagation dans une nouvelle zone (**Roy et al., 2018**).

Partie II :
Matériel et
Méthodes

Les travaux expérimentaux de la présente étude ont été réalisés au niveau du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université 8 Mai 1945 Guelma.

I. Matériel biologique

I.1. Choix et origine des souches bactériennes

Quatre souches bactériennes choisies pour la présente étude appartenant à l'espèce *Klebsiella oxytoca*. Ces souches ont été isolées à partir d'un milieu hospitalier de la région de Guelma (Tableau 01).

Le choix de cette espèce bactérienne est basé sur :

- ✓ Son caractère ubiquitaire dans l'environnement hospitalier ;
- ✓ Sa capacité de résistance vis-à-vis de différents agents chimiques ;
- ✓ Sa capacité de formation de biofilm selon des études antérieures (Suttasattakrit *et al.*, 2022).

Tableau 01 : Origine des souches de *Klebsiella oxytoca* à étudier.

Espèce bactérienne	Code	Date de prélèvement	Point de prélèvement	Matériaux du point de prélèvement	Méthode de conservation
<i>Klebsiella oxytoca</i>	KO1	03/03/2019	Poignée de porte d'une chambre de patient	Inox	GN inclinée en tube
	KO2	03/03/2019	Lavabo	Céramique	GN inclinée en tube
	KO3	12/04/2020	Poignée de porte d'une chambre de patient	Inox	GN inclinée en tube
	KO4	12/04/2020	Lavabo	Céramique	GN inclinée en tube

GN : gélose nutritive.

I.2. Vérification de la pureté des souches bactériennes

La purification est une étape très importante, elle conduira à la souche pure ce qui facilitera les études phénotypiques (Delarras, 2007).

Afin de vérifier la pureté des souches bactériennes étudiées, nous avons suivi les étapes suivantes :

I.2.1. Revivification des souches bactériennes

À partir de chaque bactérie conservée sur la gélose nutritive, des colonies ont été introduites dans des tubes contenant 5 ml du Bouillon Tryptone Soja (TSB) à l'aide d'une anse de platine stérile. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 heures (**Noyce et al., 2006**).

I.2.2. Isolement et caractérisation phénotypique des souches bactériennes

À partir du milieu TSB présentant une croissance bactérienne, nous avons ensemencé la gélose Hektoen qui est un milieu sélectif pour les entérobactéries pathogènes, il permet une première orientation quant à l'identification de l'espèce isolée sur la base de l'attaque de trois glucides : lactose, salicine et saccharose. Une différenciation supplémentaire (présence de thiosulfate et de citrate de fer dans le milieu) qui se traduit par des colonies à centre noir dû à la formation de sulfure de fer (**Joffin et Leyral, 2014**).

Les souches bactériennes ont subi une caractérisation phénotypique à savoir la caractérisation morphologique selon les méthodes classiques de microbiologie décrites par **Guiraud (2003)** et la caractérisation biochimique par utilisation du système miniaturisé API 20 E (Annexe).

II. Étude de l'effet d'un flavonoïde naturel sur la capacité de formation de biofilm chez *Klebsiella oxytoca*

Cette partie de l'expérimentation porte sur la détection de la capacité des souches bactériennes isolées des sites hospitaliers à former de biofilms sous l'effet d'un flavonoïde « l'hespéridine » extrait d'une plante médicinale.

La technique utilisée est celle du « Test d'adhésion en microplaque par coloration au cristal violet » (**Camps, 2011 ; Crémet et al., 2013**).

Cette méthode utilise la spectrophotométrie pour mesurer la capacité des souches bactériennes à adhérer à une surface et/ou à former un biofilm dans les puits des microplaques. Le cristal violet colore les bactéries et la matrice des biofilms (**Pantanella et al., 2013**).

II.1. Obtention de l'héspéridine

L'héspéridine a été fournie par un laboratoire pharmacologique sous forme de poudre pure à 99 %. Elle a été extraite à partir des feuilles de la plante médicinale *Mentha × piperita*. Les feuilles ont été collectées et séchées à l'air libre à l'ombre pendant 7 jours à la température ambiante puis elles sont broyées en une poudre grossière. Cette dernière a été tamisée à l'aide d'un tamis à pores de 1 mm et stockée dans des récipients en plastique étanches.

Différents extraits (aqueux, méthanolique, acétate éthylique) ont été préparé afin de chercher la présence des flavonoïdes. Après filtration sur papier Whatman et concentration sous vide des extraits, la présence de flavonoïdes a été confirmée par l'utilisation d'un ruban de magnésium et quelques gouttes d'HCl concentré dans de l'eau bouillante. La formation d'une couleur rouge indique la présence de flavonoïdes (flavonones, flavanols). L'héspéridine a été isolée par chromatographie sur colonne et HPLC (chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression qui est une technique d'analyse séparative, basée sur une migration progressive des composés dans une colonne supportant les hautes pressions) (De et al., 2010).

II.2. Préparation de la solution mère et les concentrations filles de l'héspéridine

L'héspéridine a été initialement dissoute dans du DMSO à 2 % (Le diméthylsulfoxyde, un solvant polaire, qui dissout à la fois des composés polaires et non-polaires, et qui est miscible dans une large gamme de solvants organiques, ainsi que dans l'eau) à raison de 200 mg/ml afin de préparer la solution mère et ensuite diluée dans du bouillon Muller-Hinton jusqu'à la concentration finale souhaitée.

La détermination de la capacité de formation de biofilm chez les souches sélectionnées a été réalisée en absence de l'héspéridine et en présence de huit concentrations filles allant de 50 µg/ml (1/16 CMI) jusqu'à 6400 µg/ml (8 CMI). La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) a été déterminé à l'avance (§ II.3) (Dheilly et al., 2010).

II.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

La CMI est la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien (en mg/l) qui, dans des conditions *in vitro* définies, inhibe l'apparition d'une croissance visible d'un micro-organisme au cours d'une période définie.

La CMI est déterminée selon la méthode de micro-dilution en bouillon de la norme **EN ISO 20776-1 (2019)** :

- Sur une microplaque de 96 puits, mélanger 100 µl de la concentration désirée et 100 µl d'inoculum bactérien (ajusté à 0,5 Mac Farland);
- Incuber les microplaques empilées les unes sur les autres (Pour éviter le dessèchement) à 37°C pendant 18 heures ;
- Examiner la croissance bactérienne dans chaque puits (se traduit par une turbidité). La CMI sera la plus petite concentration qui inhibe complètement la croissance visible. Il est important de vérifier le témoin de croissance positif auquel en comparant les autres cupules pour définir la CMI. Un témoin négatif peut être aussi utilisé (DMSO à 2 %).

II.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB

À partir de tous les puits dans lesquels il n'y avait pas de croissance visible (selon la présence de turbidité), 10 µL ont étéensemencés sur la gélose Mueller-Hinton. Après incubation à 37°C pendant 24h, la concentration la plus faible, à laquelle la croissance cellulaire était complètement supprimée, a été considérée comme la CMB (la réalisation d'un témoin bactéricide est recommandée) (**Florov et al., 2022**).

II.5. Préparation des cultures bactériennes

La formation de biofilm en mono-espèce et mixte a été testée. Le biofilm mono-espèce est représenté par la souche bactérienne *Klebsiella oxytoca*. Le biofilm mixte est représenté par le couple : *Klebsiella oxytoca* (KO) – *E. coli* (EC). Cette dernière a été isolée du même milieu hospitalier (Bacille à Gram négatif appartenant aux entérobactéries).

Les cultures bactériennes sont préparées comme suite :

- Préparer les monos- et les cultures bactériennes mixtes (ajustées à 0,5 Mac Farland) dans des tubes en verre contenant le bouillon TSB avec différentes concentrations de l'hespéridine ;
- Incuber les tubes pendant 1, 4, 8, 16 et 21 jours à 25°C et à 37°C sans agitation (**Florence, 2014**).

II.6. Activité anti-adhérence/ Essai d'adhésion

L'activité anti-adhérence de l'hespéridine a été déterminée selon la technique décrite par **Wang et al. (2017)**. Brièvement, 2 ml des cultures de 10^6 cellules/mL de *Klebsiella oxytoca* avec CMI et $\frac{1}{4}$ CMI de l'hespéridine ont été répartie en 6 puits d'une microplaque puis incubées à 37°C pendant 24h. Les bactéries non adhérentes ont été décantées, et l'adhérence restante a été éliminée à l'aide de 0,5 M de l'hydroxyde de sodium, ensuite, les cellules ont été quantifiées à 600 nm.

Pourcentage d'adhérence (%) = $[\text{DO des cellules adhérentes} / (\text{DO des cellules adhérentes} + \text{DO des cellules surnageantes})]$.

II.7. Essai de la formation de biofilm

D'après la technique de **Florov et al. (2022)**:

- Répartir 200 μl de chaque suspension bactérienne dans les puits d'une microplaque de 96 puits à fond plat en polystyrène ;
- Incuber la microplaque à 37°C pendant 24 heures ;
- Après incubation, vider la microplaque délicatement et laver les puits pendant 2 min avec une solution de PBS (Phosphate-buffered saline) afin d'enlever les bactéries non adhérentes au support ;
- Sécher la microplaque à 50°C pendant 30 minutes afin de fixer les bactéries ;
- Introduire dans chaque puits 200 μL d'une solution de cristal violet à 0,1 % pendant 15 minutes à la température ambiante ;
- Éliminer la solution de cristal violet ensuite rincer trois fois avec la solution de PBS pour enlever le colorant en excès puis séchés 10 min à température ambiante ;

- Remettre en solution le cristal violet qui a pénétré dans les bactéries par l'ajout de 200 μ L d'éthanol à 95 % dans chaque puits, ce qui permet d'améliorer la sensibilité de lecture avec le spectrophotomètre ;
- Après 10 min d'attente, lire l'absorbance à 595 nm.

La figure 05 illustre le protocole suivi afin d'étudier l'effet de l'hespéridine sur la capacité de formation de biofilm chez *Klebsiella oxytoca*.

III. Analyse statistique

Afin de visualiser et de comparer l'effet de différentes concentrations de l'hespéridine et des deux températures testées sur la capacité de la formation de biofilm, les résultats sont soumis au test ANOVA à un critère (AV1) et au test T de Student, respectivement (La normalité des distributions a été évaluée préalablement par la valeur W de Shapiro-Wilk's, les distributions étant la plupart du temps symétriques). Les différences ont été considérées significatives à une probabilité $p \leq 0,05$. L'étude statistique a été réalisée par le logiciel statistique SPSS 25.0.

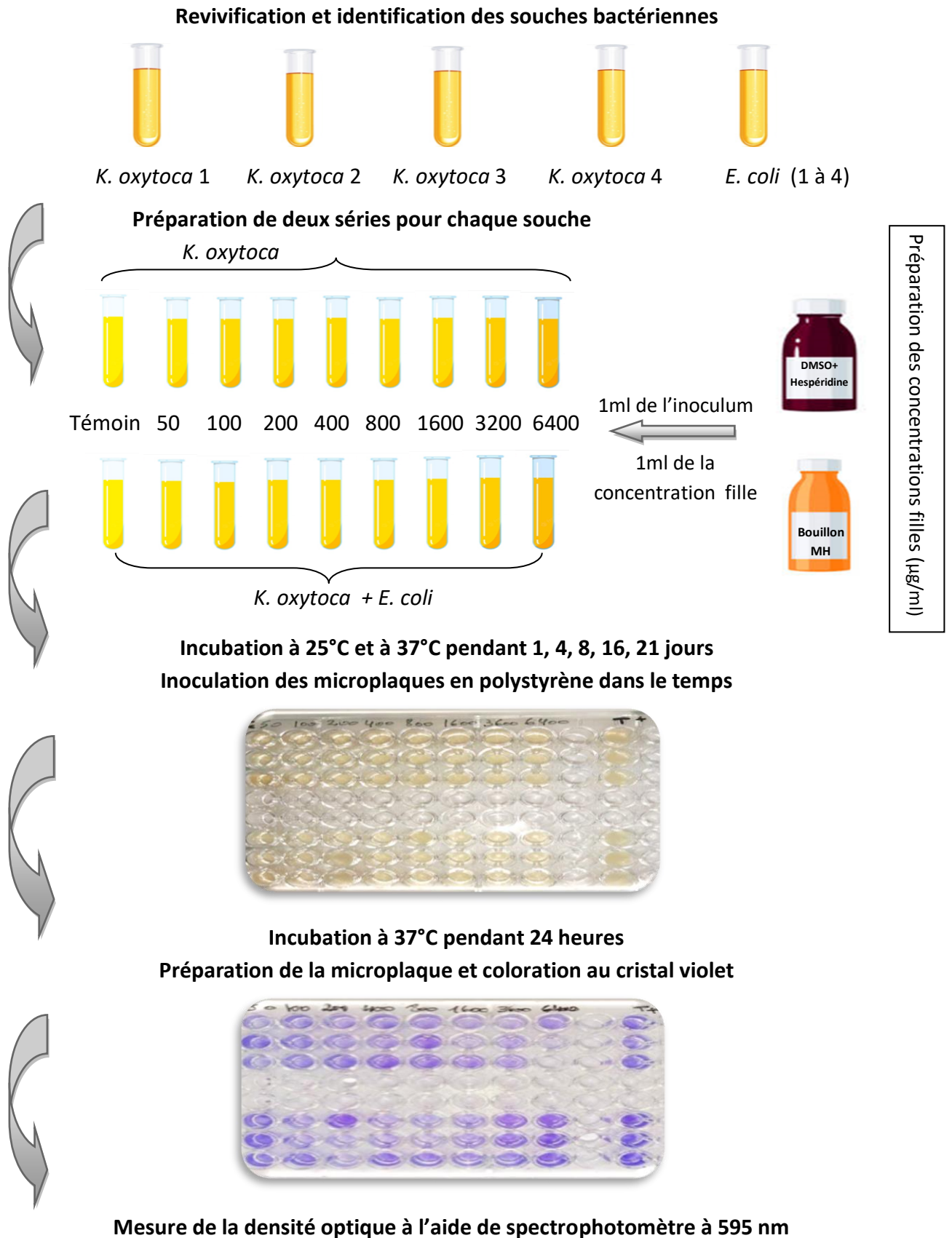


Figure 05 : Étude de la capacité de formation de biofilm chez *Klebsiella oxytoca* soumise au stress de l'hespéridine.

Partie III :
Résultats et
discussion

I. Caractérisation phénotypique et vérification de la pureté des souches bactériennes

La caractérisation phénotypique des souches bactériennes à étudier a confirmé la pureté de nos isolats (Tableau 02).

Tableau 02 : Identification des souches bactériennes à étudier.

Bactérie	Code	Aspect microscopique	Enzymes respiratoires	Type de l'API	Code de l'API	Degré de similitude (%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	KO1	Bacilles à Gram (-)	Cat (+) OX (-) NR (+)	API 20E	7274773	100 %
	KO2				5255771	99,9 %
	KO3				5055773	100 %
	KO4				5241773	100 %

Cat : catalase, OX : oxydase, NR : nitrate réductase, (+) : positif, (-) : négatif.

La figure 06 illustre les résultats de l'isolement et des différents tests d'identification de la souche KO1.

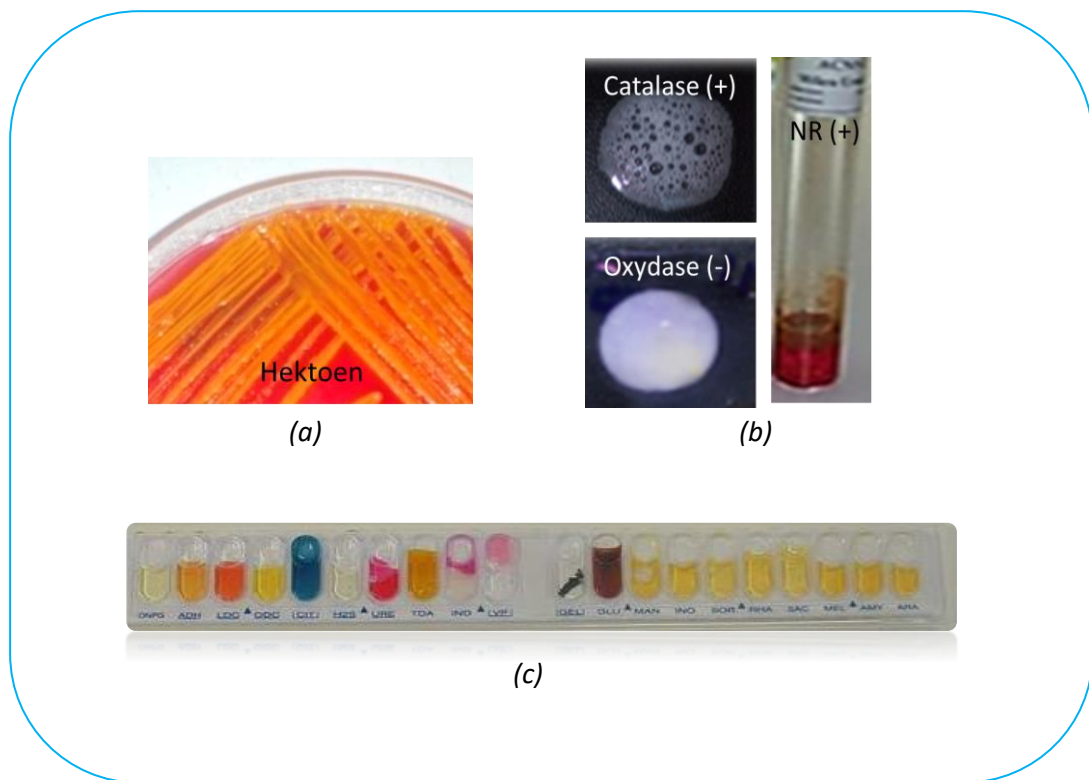


Figure 06 : (a) Aspect macroscopique, (b) enzymes respiratoires et (c) profil biochimique de *Klebsiella oxytoca* KO1.

II. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide de l'hespéridine vis-à-vis des souches de *Klebsiella oxytoca*

La valeur de la CMI de l'hespéridine obtenue est de 800 µg/ml pour la totalité des souches de *Klebsiella oxytoca* étudiées. En milieu solide, les CMB de l'hespéridine enregistrées vont de 6400 µg/ml à plus de cette plus forte concentration utilisée dans la présente étude. La détermination du rapport CMB/CMI montre que l'action de ce flavonoïde sur les bactéries testées est bactériostatique (Tableau 03).

Tableau 03 : Activité antibactérienne de l'hespéridine

Code de la souche	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)	CMB/CMI	Activité antibactérienne*
KO1	800	6400	8	Bactériostatique
KO2	800	6400	8	Bactériostatique
KO3	800	>6400	>8	Bactériostatique
KO4	800	>6400	>8	Bactériostatique

*CMB/CMI<4 => activité bactéricide ; 4<CMB/CMI<32 => activité bactériostatique ; CMB/CMI>32 => Bactérie tolérante

Les flavonoïdes omniprésents dans les herbes médicinales sont aujourd'hui utilisés dans plusieurs domaines d'intérêts pharmaceutiques, nutritionnels et agrochimiques. Plusieurs chercheurs ont découvert que les flavonoïdes sont des composés antibactériens de premier plan qui pourraient contribuer à remplir le pipeline de découverte de médicaments en réponse à la résistance croissante aux antibiotiques (**Porras et al., 2021**). Selon nos résultats, il apparaît nettement que l'hespéridine montre un effet inhibiteur sur la croissance des *K. oxytoca*. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature scientifique qui cite l'efficacité intrinsèque de l'hespéridine pour inhiber et/ou détruire rapidement plusieurs types de bactéries pathogènes dont *Klebsiella oxytoca*. **Özçelik et al. (2008)** ont évalué l'effet de six flavonoïdes sur *Klebsiella* ; leurs résultats ont montré que tous les flavonoïdes testés possèdent une activité antimicrobienne *in vitro* contre toutes les souches isolées de *Klebsiella* aux concentrations de 32 - 64 µg/ml. Les travaux de **Yarmolinsky et al. (2023)** ont confirmé aussi que l'hespéridine était significativement efficace contre toutes les souches multi-résistantes testées y compris *Klebsiella*. En revanche, **Duda-Chodak (2012)** qui

a évalué l'influence de différents flavonoïdes dont l'hésperétine et hespéridine sur la croissance de bactéries à Gram négatif, a montré que l'hésperidine n'a eu qu'un faible effet sur les bactéries mais l'hésperétine a inhibé la croissance de presque toutes les bactéries analysées avec une CMI égale à 250 µg/ml.

Le mécanisme exact, par lequel l'hésperidine inhibe ou tue les bactéries, est aujourd'hui encore inconnues, cependant, plusieurs théories sont développées et étudiées. En outre, il a été montré que le mécanisme de toxicité des flavonoïdes vis-à-vis des micro-organismes se fait par privation des ions métalliques tels que le fer. Par conséquent, les flavonoïdes connus par leur pouvoir antioxydant puissant, pourraient avoir potentiellement un effet dans la chélation de fer et empêcher ainsi la pénétration intracellulaire du cofacteur Ca^{2+} à la cellule bactérienne, ce qui provoque l'inhibition de leur activité (**Basli et al., 2012**). **Farnesi et al. (2009)** ont indiqué que l'effet antibactérien des flavonoïdes peut être dû à une perturbation métabolique dans les canaux ioniques en raison d'une altération des réactions de phosphorylation / déphosphorylation. Par ailleurs, **Fathima et Rao (2016)** ont rapporté que le mode d'action des flavonoïdes sur les bactéries s'est avéré être une explosion oxydative par la génération d'espèces réactives de l'oxygène qui provoquent une altération de la perméabilité membranaire et des dommages à la membrane.

L'enregistrement de valeurs importantes de CMB pourrait s'expliquer par la résistance de nos souches à l'hésperidine. Selon **Sharif et al. (2009)** et **Inouye et al. (2001)**, la résistance des bactéries à Gram négatif est liée à l'hydrophilie de leurs membranes ainsi que leur richesse en lipopolysaccharides qui empêchent la pénétration des molécules hydrophobes telles que les polyphénols. De plus, **Jubair et al. (2021)** ont mentionné que les porines (protéines de la membrane externe bactérienne) contrôlent bien le passage de plusieurs matériaux y compris les flavonoïdes. **Reiter et al. (2017)** ont montré que le genre *Klebsiella* résiste aux flavonoïdes grâce aux pompes d'efflux qui sont des transporteurs protéiques situés dans la membrane cytoplasmique et qui jouent le rôle de régulateurs de l'environnement interne des bactéries.

III. Activité anti-adhérence de l'hespéridine

L'activité anti-adhérence de l'hespéridine a été déterminée pour les mono-souches et pour les cultures mixtes (dont les souches EC sont des *Escherichia coli*). Les résultats obtenus montrent qu'après un jour, le taux d'adhésion de la majorité des souches était plus faible en présence de 800 µg/ml (CMI) d'hespéridine. Le pouvoir d'adhésion le plus faible a été enregistré chez la souche KO1, tandis que les cultures mixtes ont représenté des taux d'adhésion plus élevés (Tableau 04).

Tableau 04 : Taux d'adhérence des souches de *Klebsiella oxytoca* en présence d'hespéridine (moyenne ± écartype)

Souche bactérienne	Adhésion en présence de ¼ CMI d'hespéridine (%)	Adhésion en présence de CMI d'hespéridine (%)
KO1	35,31 ± 0,47	15,58 ± 0,58
KO2	37,45 ± 0,16	26 ± 0,9
KO3	34,3 ± 0,1	32,11 ± 0,5
KO4	34,38 ± 0,13	22,56 ± 0,8
KO1-EC1	44,16 ± 0,3	38 ± 0,2
KO2-EC2	41,93 ± 0,06	28,59 ± 0,38
KO3-EC3	42,3 ± 0,11	36,9 ± 0,5
KO4-EC4	39,62 ± 0,3	27,61 ± 0,37

L'attachement des bactéries aux surfaces est la forme prédominante de survie des bactéries dans la nature et dans les différents écosystèmes créés par l'homme. Par conséquent, la production excessive de biomasses fixées sur les surfaces peut porter atteinte à la santé publique, en particulier en milieu hospitalier et essentiellement vis-à-vis des populations fragilisées (Masson, 2015). Selon nos résultats, il apparaît clairement que les cultures mixtes (isolées d'un milieu hospitalier) ont une capacité d'adhérer à une surface plus importante que celle des mono-cultures même en présence d'un agent anti-adhérence. Filloux et Vallet (2003) ont confirmé que les bactéries à Gram négatif, dont *Klebsiella oxytoca* et *Escherichia coli*, ont une capacité d'adhésion grâce aux flagelles et aux pili de type IV (des structures fibrillaires présentes au pôle de certaines bactéries à Gram négatif). Lorsque les deux bactéries sont présentes sur une même surface, dans un premier temps,

chaque bactérie s'attache transitoirement, temps pendant lequel la bactérie va chercher à évaluer la surface sur laquelle elle se trouve, puis une association stable entre les deux micro-organismes s'établit. Ces rassemblements de bactéries conduisent à la formation de micro-colonies dont la différenciation mène à l'élaboration du biofilm (**Hancock et al., 2010**).

Ces dernières années plusieurs études ont basé sur des composés naturels d'origine végétale afin de lutter contre l'adhésion des microorganismes sur les différentes surfaces. Dans la présente étude, nous avons constaté que l'héspéridine possède une activité anti-adhérence non négligeable surtout avec son CMI vis-à-vis de toutes les souches de *Klebsiella oxytoca* en enregistrant des taux d'adhésion inférieur à 50 %. **Damte et al. (2013)** ont trouvé que les flavonoïdes des plantes médicinales peuvent réduire 71 % de la mobilité des bactéries à Gram négatif en réduisant leur attachement aux surfaces et par conséquent le développement du biofilm.

IV. Étude de l'effet de l'héspéridine sur la capacité de formation de biofilm chez *Klebsiella oxytoca*

IV.1. Capacité de formation de biofilm en mono-espèce

La formation de biofilm chez *K. oxytoca* a été déterminée en modifiant la température pour mieux comprendre l'influence de ce paramètre impératif.

À une température approximative de 22 à 25°C, nous avons observé que les souches KO1 et KO2 sont capables de former des biofilms même après 21 jours. Par ailleurs, après 16 jours leur pouvoir adhérent était plus faible. Les souches KO3 et KO4 ont montré une faible diminution de DO par rapport aux témoins, mais leur capacité d'adhésion reste importante dès le premier contact (un jour) avec les différentes concentrations d'héspéridine. Les concentrations de l'héspéridine qui ont montré un effet anti-adhésion important sont 800 µg/ml vis-à-vis de la souche KO1 après 16 jours et 50 µg/ml vis-à-vis de la souche KO2 (Fig. 07).

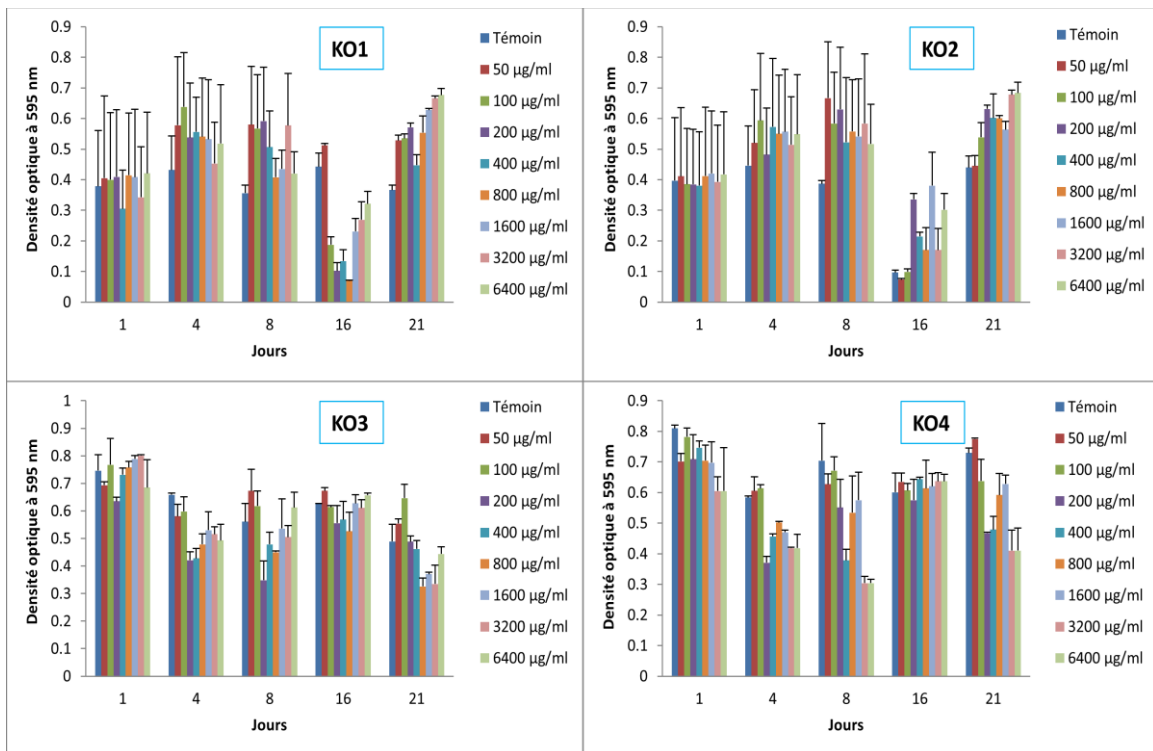


Figure 07 : Capacité de formation de biofilm chez des souches de *Klebsiella oxytoca* à une température ambiante et en présence d’hespéridine.

De même à 37°C et en présence de différentes concentrations d’hespéridine, les souches d’*K. oxytoca* montrent généralement une aptitude à la formation de biofilm. Les souches KO1 et KO2 présentent des densités optiques plus élevées que le contrôle après des courtes et de longues durées de contact avec l’hespéridine (4, 8 et 21 jours). Les valeurs de DO les plus élevées des souches KO3 et KO4 sont enregistrés vis-à-vis de la ¼ CMI ($0,7 \pm 0,04$) après 8 jours et vis-à-vis de la CMI d’hespéridine ($0,8 \pm 0,01$) après 1 jour, respectivement. La concentration de l’hespéridine qui a montré une plus forte réduction d’attachement est 100 µg/ml ($0,18 \pm 0,002$) vis-à-vis de la souche KO1 après 16 jours (Fig. 08).

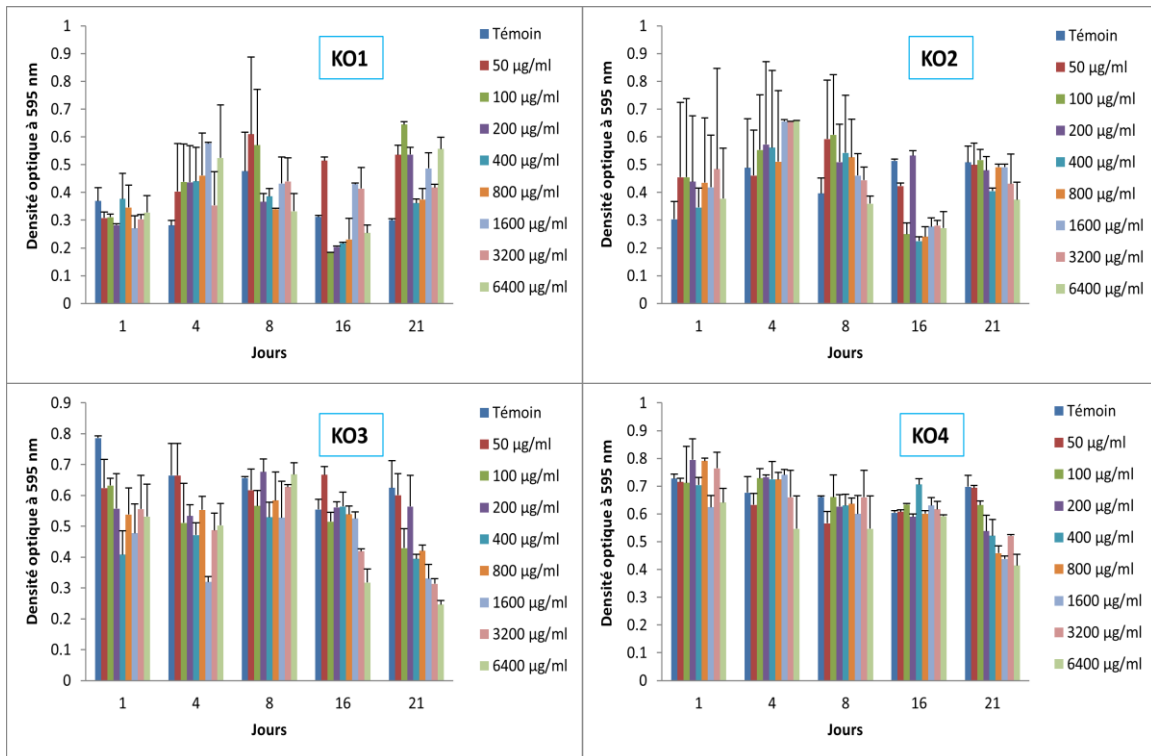


Figure 08 : Capacité de formation de biofilm chez des souches de *Klebsiella oxytoca* à la température 37°C et en présence d’hespéridine.

IV.2. Capacité de formation de biofilm mixte

En analysant la figure 09, nous pouvons constater que l’hespéridine a un effet antibiofilm important à une température ambiante sur le couple KO1-EC1 et KO2-EC2. Après 16 jours les concentrations allant de 400 à 6400 µg/ml ont réduit les densités optiques du couple KO1-EC1 à une valeur inférieure à 0,16. Tandis que, le couple KO2-EC2 a faiblement produit un biofilm ($DO < 0,3$) après 4 et 16 jours globalement en présence de différentes concentrations d’hespéridine.

Par ailleurs, la formation de biofilm a été plus élevée en présence d’hespéridine chez le couple KO3-EC3 et KO4-EC4. Des pics de formation de biofilm ont été enregistrés chez la souche mixte KO3-EC3 en présence de 50 et 800 µg/ml d’hespéridine au cours du 1^{er} jour, de 200 µg/ml au cours du 16^{ème} jour et en présence de 1600 µg/ml au cours du 21^{ème} jour. Le couple KO4-EC4 a formé un biofilm modéré à important ($0,3 \leq DO \leq 0,7$) durant la majorité du temps de contact avec les différentes concentrations d’hespéridine ce qui reflète leur faible effet anti-biofilm (Fig. 09).

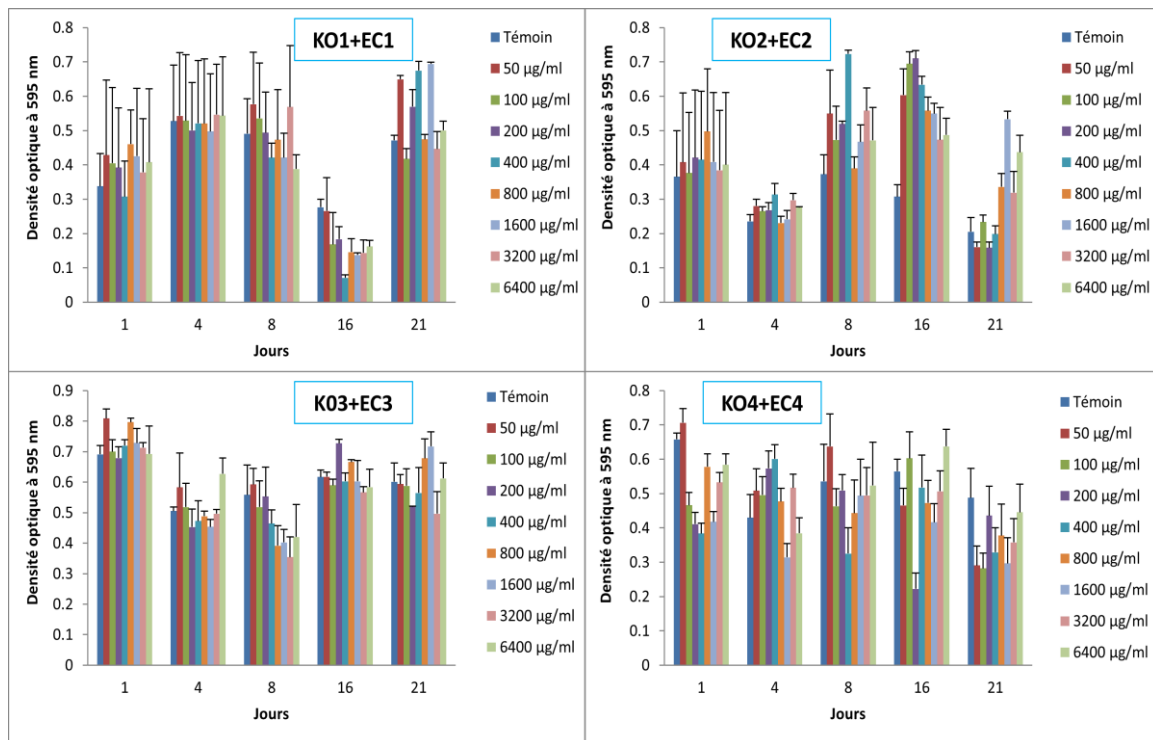


Figure 09 : Capacité de formation de biofilm mixte (*Klebsiella oxytoca* – *Escherichia coli*) à une température ambiante et en présence d’hespéridine.

Les résultats illustrés par la figure 10 indiquent que les souches KO3-EC3 et KO4-EC4 sont fortement productrice de biofilm même à 37°C. Une stabilité remarquable a été enregistrée vis-à-vis des différentes concentrations d’hespéridine durant toute la période d’étude pour le couple KO3-EC3. Une hyper augmentation de la densité optique du couple KO4-EC4 a été enregistré durant les premières durées de contact. En revanche, les valeurs minimales de densité optique ont été notée avec les concentrations 3200 et 6400 µg/ml d’hespéridine pendant le 21^{ème} jour (DO < 0,14).

Généralement, le couple KO1-EC1 montre une capacité modéré de production du biofilm. Cette capacité a connu une diminution importante après 16 jours de contact avec 3200 µg/ml d’hespéridine. Le couple KO2-EC2 a également donné des DO < 0,2 en présence de 3200 et 6400 µg/ml d’hespéridine après 21 jours de contact (Fig. 10).

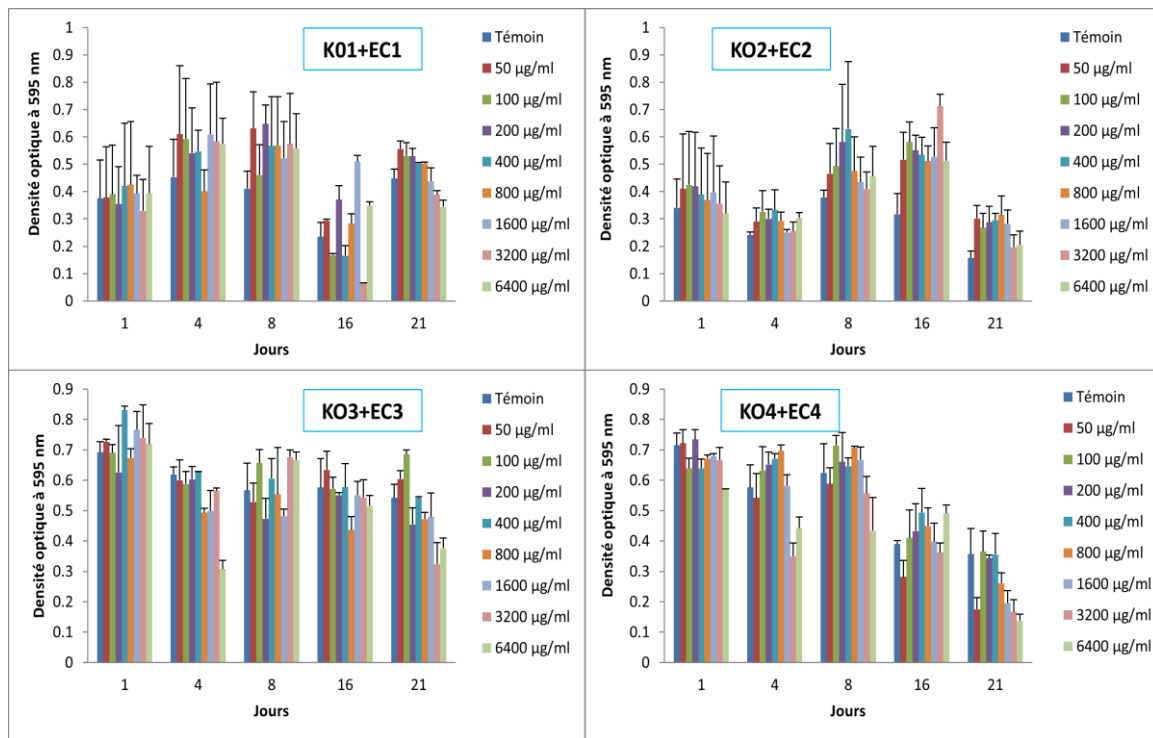


Figure 10 : Capacité de formation de biofilm mixte (*Klebsiella oxytoca* – *Escherichia coli*) à la température 37°C et en présence d’hespéridine.

Les biofilms sont des communautés microbiennes attachées à une surface avec des propriétés distinctes, qui ont un impact considérable sur notre santé. Ces dernières années, plusieurs composés naturels sont testés afin d’éradiquer la formation de biofilm de plusieurs bactéries y compris *Klebsiella oxytoca*. Plusieurs flavonoïdes ont données des résultats promoteurs ce qui a orienté les chercheurs vers ces molécules d’origine végétale (**Abebe, 2020**).

La présente étude montre que l’hespéridine, un flavonoïde naturel, n’a qu’un faible pouvoir anti-biofilm vis-à-vis des biofilms de *K. oxytoca* en mono- et en double-espèces. Globalement, ce pouvoir a été observé après des longues durées et avec différentes concentrations (AV1, $p < 0,05$). En revanche, notre espèce bactérienne répond par une adaptation qui augmente dans certains cas avec le temps. Nos résultats sont en concordance avec les travaux de **Wang et al. (2021)** qui ont évalué l’effet inhibiteur et anti-biofilm de plusieurs flavonoïdes (la rutine, le kaempférol, la quercétine, la naringine, la sinensétine et l’hespéridine). Leurs résultats ont montré que la rutine, le kaempférol et la quercétine à

256 µg/ml ont présenté une inhibition du biofilm, tandis que la naringine, la sinensétine et l'hespéridine n'ont montré aucun effet inhibiteur sur la formation du biofilm chez *Klebsiella* avec les différentes concentrations testés. Lorsqu'ils ont augmenté la concentration jusqu'à 512 µg/ml, l'hespéridine a montré un faible effet. Par contre, **Met et al. (2022)** ont confirmé que les flavonoïdes, y compris l'hespéridine, ont montré une capacité anti-biofilm significative vis-à-vis des bactéries à Gram négatif.

Selon la littérature, les flavonoïdes peuvent inhiber la formation de biofilm par plusieurs mécanismes. **Ceruso et al. (2020)** et **Prescott et al. (2018)** ont rapporté que les flavonols inhibent la mobilité bactérienne par la perte de flagelles et perturbe la fonction des adhésines membranaires et donc peuvent inhiber la formation de biofilm. Il a été rapporté aussi que certains flavonoïdes sont capables d'atténuer la virulence de certaines bactéries pathogènes via l'inhibition de récepteurs impliqués dans les signaux de *quorum sensing* (**Silva et al., 2016**).

L'instabilité de l'effet de l'hespéridine pourrait s'expliquer d'une part par l'interaction de la molécule et la souche bactérienne ainsi que les différents facteurs environnementaux tels que le pH et la température, et d'autre part, par la résistance des souches de *K. oxytoca*. **Choi et al. (2022)** ont rapporté que le changement de solubilité de l'hespéridine pouvait affecter leurs efficacités biologiques. **Agarwal et al. (2011)** ont montré que les biofilms de différentes souches d'un même genre peuvent se comporter différemment même s'ils sont incubés dans les mêmes conditions, de telles observations ont été attribuées à des variations de sérovars, à l'origine des souches ou à des mutations dans les gènes qui contrôlent les biofilms.

La capacité de formation des biofilms de nos isolas remarquée après une diminution importante des densités optiques, confirme que nos souches ont développé des mécanismes d'adaptation à l'hespéridine. Comme il a été signalé précédemment, ces résultats peuvent être s'expliquer par le fait que *K. oxytoca* a d'une part la capacité à résister aux flavonoïdes ce qui est confirmé par l'étude de **Mezoued et Naib (2021)**. D'autre part, *K. oxytoca* a plusieurs propriétés qui l'aident à former des biofilms même en présence des agents antibactériens comme l'hespéridine. Les travaux d'**Abebe (2020)** sont similaires à nos

résultats qui ont montré que les isolats de *K. oxytoca* montrent une forte production de biofilm dans différentes conditions de croissance et la majorité des isolats étaient également résistants aux agents antimicrobiens. **Abbas et al. (2020)** confirment que *K. oxytoca* est un meilleur producteur de biofilm en possédant les gènes *pilQ*, *matB*, *fimA* et *mrkA* qui jouent un rôle significatif dans le pouvoir adhérent. Ils ont noté aussi que les fimbriae de type 1 et 3 et les adhésines permettent à cette bactérie de coloniser et de produire un biofilm et en outre de résister aux agents antibactériens (**khonsari et al., 2021**). Le curli, un type de fimbriae composé de protéines appelées curlines et de fibres amyloïdes fonctionnelles de surface, est un autre facteur de virulence important chez *Klebsiella*, connu pour être impliqué dans l'attachement des cellules aux surfaces, ainsi que dans l'agrégation des cellules, ce qui permet la formation de biofilms (**Anes et al., 2017**). L'étude de **Zheng et al. (2018)** évaluant la formation de biofilms chez des souches de *Klebsiella* a révélé une association positive avec le niveau d'expression du gène de virulence *wcaG*, impliqué dans la biosynthèse des capsules et la capacité de formation de biofilm.

En ce qui concerne le biofilm mixte, la présente étude montre que le couple *E. coli* et *K. oxytoca* peut être un meilleur producteur de biofilm ce qui est représenté par les couples KO3-EC3 et KO4-EC4, comme il peut présenter un potentiel plus faible par rapport aux biofilms en mono-espèces (le cas des couples KO1-EC1 et KO2-EC2). Selon **Tan et al. (2017)**, les interactions au sein d'un biofilm mixte peuvent être de nature coopérative (synergique), compétitive (antagoniste) ou neutre. Les interactions synergiques sont basées sur la promotion de la formation de biofilms par coagrégation, la coopération métabolique (une espèce utilise un métabolite produit par une espèce voisine), et peuvent également augmenter la résistance aux agents antibactériens par rapport aux biofilms en mono-espèce. D'autre part, les interactions antagonistes sont basées sur la compétition pour les nutriments et l'inhibition de la croissance (**Harriott et Noverr, 2009**). Les travaux de **Hola et al. (2010)** montrent que *Klebsiella* et *E. coli* construisent fortement un biofilm mixte. **Yang (2011)** révèle que la production de curli peut favoriser la relation synergique entre *E. coli* et *Klebsiella*. En revanche, **Guillermo et Galvan (2018)** ont montré qu'au sein d'un biofilm hétérogène, le genre *Klebsiella* a induit un effet néfaste sur *E. coli*, qui se traduit par une compétition des nutriments. Ils ont confirmé que *Klebsiella* est capable d'exprimer de grandes quantités de molécules sidérophores en réponse à la privation de fer, alors que

E. coli le fait dans une bien moindre mesure. Des résultats similaires ont été également mis en évidence par **Galván et al. (2016)**, qui ont expliqué la réduction du nombre de cellules d'*E. Coli* cultivables dans les biofilms à deux espèces par l'hypothèse du détachement cellulaire favorisé par l'association avec *Klebsiella* et l'existence d'un probable effet de *Klebsiella* sur la souche étudiée. Cela peut être justifié par la production des métabolites et de polymères spécifiques conduisent à des activités antagonistes entre les deux espèces. Lorsqu'ils ont fait une comparaison entre le développement de biofilms simples et de biofilms doubles, ils ont montré une réduction significative du nombre de cellules d'*E. Coli* cultivables dans les biofilms bi-espèces. Inversement, le nombre de cellules de *Klebsiella* était similaire dans les biofilms à deux espèces et dans les biofilms à une seule espèce, à tous les moments analysés.

La résistance de nos biofilms mixtes à l'hespéridine pourrait s'expliquer par le fait que les biofilms peuvent présenter une résistance aux antimicrobiens supérieures de trois fois ou plus à celle trouvée chez des cellules planctoniques de la même souche. De plus, une communauté bactérienne mixte constitue une forme de barrière supplémentaire par rapport aux biofilms monospécifiques en raison d'une certaine forme d'interaction synergique (**Klayman et al., 2009**). La diminution de la sensibilité aux antimicrobiens n'est pas liée à un seul mécanisme de résistance, mais à une synergie de plusieurs mécanismes comme le ralentissement de la pénétration des antimicrobiens par la matrice exopolysaccharidique et l'augmentation du transfert génétique au sein de biofilm (**Seghir et al., 2017**).

L'application du test T de Student montre qu'il existe des différences significatives entre les températures d'incubation ($p > 0,05$), donc ces dernières ont un effet direct sur la capacité de formation de biofilm chez *K. oxytoca*. Plusieurs études sont similaires à nos résultats. L'évaluation quantitative de la formation de biofilms chez des bactéries à Gram négatif à des températures différentes (22 et 35°C) par **Piras et al. (2015)**, a montré que la quantité de biofilm formée après incubation à 22°C était significativement plus élevée ($p = 0,01$) à celle formée à 35°C. Il a été démontré que la production de fimbriae agrégatifs dans les isolats est possible à 22 mais pas à 35°C. **Nguyen et al. (2014)**, ont observé aussi que la quantité de biofilm formé par des isolats de bactéries à Gram négatif en présence des agents antibactériens et à des températures différentes (37 et 42°C) diminuait avec

l'élévation de la température. Les études d'**Ignatova et al. (2020)** ont montré que plus de 3 milles souches de *Klebsiella* ont une augmentation significative de la formation de biofilm à 22°C, par contre environ 300 souches ont formé un meilleur biofilm à 37°C et a réduit de manière significative son activité de biofilm à 22°C. Ils ont supposé que la dépendance à la température de la formation de biofilms chez les souches testées est une conséquence de leur adaptation à long terme à certaines niches écologiques.

Le temps de contact avec l'agent anti-biofilm joue également un rôle important dans la capacité de formation d'un biofilm. Plusieurs études ont signalé que plus que la bactérie est résistante plus que la formation de biofilm augmente principalement avec l'augmentation de la durée de contact. Cependant, le temps nécessaire à la formation du biofilm peut varier en raison de l'interaction entre différents facteurs environnementaux tels que l'abondance des nutriments et la température (**Shatila et al., 2021**).

À l'issue de ce travail, il ressort que les souches de *K. oxytoca* isolées d'un environnement hospitalier sont considérées comme résistantes et capables à former des biofilms en mono-espèce et mixte en présence de l'héspéridine et à différentes températures. Donc, une limite de l'utilisation de l'héspéridine peut être discutée, il s'agit du risque de diminution de son activité antibactérienne en raison de résistances et la capacité de formation des biomasses.

Conclusion et Perspectives

Les résultats du suivi de l'effet de l'hespéridine sur la capacité de formation de biofilm chez *Klebsiella oxytoca*, ainsi que l'étude de son activité antibactérienne, permettent la mise en évidence de la conclusion suivante :

- L'hespéridine possède un effet bactériostatique vis-à-vis des souches étudiées ;
- Le test d'adhésion confirme que l'hespéridine a un pouvoir anti-adhérence non négligeable surtout avec son CMI vis-à-vis de toutes les souches de *K. oxytoca* en enregistrant des taux d'adhésion inférieure à 50 % ;
- Toutes les souches de *K. oxytoca* ont la capacité de former un biofilm monospécifique et mixte en absence et en présence d'hespéridine ;
- Les cultures mixtes ont une capacité d'adhérer à une surface plus importante que celle des monocultures même en présence d'un agent anti-adhérence ;
- Le paramètre température semble avoir une influence importante sur la formation du biofilm ;
- À une température ambiante, l'hespéridine a montré un effet antibiofilm appréciable sur les biofilms en mono-espèces et mixtes (KO1, KO2, KO1-EC1 et KO2-EC2) ;
- À 37°C, des pics de formation de biofilm ont été enregistrés chez le couple KO3-EC3 en présence de l'hespéridine ;
- L'instabilité de l'effet anti-biofilm de l'hespéridine en fonction des souches, des concentrations et de la durée de contact.

En perspectives, il s'avère donc intéressant de réaliser d'autres études plus approfondies pour :

- Déterminer les facteurs favorisant le développement de biofilm chez *Klebsiella oxytoca* seule et en association avec *Escherichia coli* en présence de composés naturels anti-biofilms;
- Comprendre les mécanismes d'action de l'hespéridine et identifier leurs cibles d'interaction avant d'en tirer des avantages thérapeutiques ;
- Étudier l'effet synergique possible entre les flavonoïdes et d'autres agents antibactériens comme les antibiotiques sur la formation de biofilm bactérien.

Références Bibliographiques

A

- Abbas, A. F., Al-Saadi, A. G. M., Alkhudhairi, M. K. (2020).** Biofilm formation and virulence determinants of *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from patients with colorectal cancer. *Journal of gastrointestinal cancer*. 51: 855-860.
- Abebe, G. M. (2020).** Detection of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae* from Animal Origin Foods. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*. 5(3): 120.
- Agarwal R.K., Singh S., Bhilegaonkar K.N., Singh V.P. (2011).** Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. *International Food Research Journal*. 18(4): P: 1493.
- Alara, Oluwaseun R., Abdurahman, Nour H., Ukaegbu., Chinonso I. (2018).** Soxhlet extraction of phenolic compounds from *Vernonia cinerea* leaves and its antioxidant activity. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. 11: 12-17.
- Anes, J., Hurley, D., Martins, M., Fanning, S. (2017).** Exploring the genome and phenotype of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Frontiers in microbiology*. 8: 1913.
- Arampatzi, S. I., Giannoglou, G., Diza, E. (2011).** Biofilm formation: A complicated microbiological process. *Aristotle University Medical Journal*. 38(2): 21-29.
- Aumeran C., Balestrino D., Forestier C. (2020).** Biofilms bactériens et santé. Encyclopédie de l'environnement. 1p.

B

- Basli A., Chibane M., Madani K., Oukil N. (2012).** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie : *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*. 10:2–9.
- Bertelli, A., Biagi, M., Corsini, M., Bainsi, G., Cappellucci, G., Miraldi, E. (2021).** Polyphenols: From theory to practice. *Foods*. 10(11): 2595.
- Bradai, L., Bouallala, M., Halassa, K., Bouras, N. (2020).** Diversité et utilisation des plantes médicinales cultivées dans le Sud de Oued Righ. *Afr. Rev. Sci. Tech. Dev*. 5(1): 61-70.
- Blackman, L. D., Qu, Y., Cass, P., Locock, K. E. (2021).** Approaches for the inhibition and elimination of microbial biofilms using macromolecular agents. *Chemical Society Reviews*. 50(3) : 1587-1616.

C

- Camps M. (2011).** Bio-essais anti-adhésion sur des bactéries marines pour le criblage de molécules et de revêtements antifouling. Thèse de Doctorat en biologie marine. Université de Toulon, Toulon. p42.
- Carip, C., Salavert, M. H., Tandeau, A. (2015).** *Microbiologie, hygiène et droit alimentaire*. Lavoisier-Tec et Doc. p; 80-81.
- Ceruso M., Clement J. A., Todd M. J., Zhang F., Huang Z., Anastasio A., Liu, Y. (2020).** The Inhibitory Effect of Plant Extracts on Growth of the Foodborne Pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Antibiotics*. 9(6): 319.
- Chaminda Jayampath Seneviratne. (2017).** Microbial Biofilms Omics Biology, Antimicrobials and Clinical Implications.london. *CRC Press*. P; 7.
- Chen, M., Yu, Q., & Sun, H. (2013).** Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *International journal of molecular sciences*. 14(9): 18488-18501.
- Chen, X., Zhang, L., Zhang, M., Liu, H., Lu, P., Lin, K. (2018).** Quorum sensing inhibitors: a patent review (2014–2018). *Expert opinion on therapeutic patents*. 28(12): 849-865.
- Cheng, F. J., Huynh, T. K., Yang, C. S., Hu, D. W., Shen, Y. C., Tu, C. Y., Ho, C. Y. (2021).** Hesperidin is a potential inhibitor against SARS-CoV-2 infection. *Nutrients*. 13(8): 2800.
- Cheng, Y. S., Zhou, Y. (2023).** Impact of citrus fruit and hesperidin intake on multiple health outcomes: An umbrella review. *Journal of Nutritional Oncology*. 10-1097.
- Choi, S. S., Lee, S. H., Lee, K. A. (2022).** A comparative study of hesperetin, hesperidin and hesperidin glucoside: Antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activities in vitro. *Antioxidants*. 11(8): 1618.
- Ciric, A. D., Petrovic, J. D., Glamoclija, J. M., Smiljkovic, M. S., Nikolic, M. M., Stojkovic, D. S. (2019).** Natural products as biofilm formation antagonists and regulators of quorum sensing functions: a comprehensive review update and future trends. *South African Journal of Botany*. 120: 65–80.

- Cowle, M. W., Webster, G., Babatunde, A. O., Bockelmann-Evans, B. N., Weightman, A. J. (2019). Impact of flow hydrodynamics and pipe material properties on biofilm development within drinking water systems. *Environmental technology*. 41(28) : 3732-3744.
- Crémet L., Corvec S., Batard E., Auger M., Lopez I., Pagniez F., Dauvergne S., Caroff N. (2013). Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 75(3): 252-5.

D

- D'Amelia, V., Aversano, R., Chiaiese, P., Carputo, D. (2018). The antioxidant properties of plant flavonoids: Their exploitation by molecular plant breeding. *Phytochemistry Reviews*. 17: 611–625.
- Damte, D., Gebru, E., Lee, S. J., Suh, J. W., Park, S. C. (2013). Evaluation of Anti-Quorum Sensing Activity of 97 Indigenous Plant Extracts from Korea through Bioreporter Bacterial Strains *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microb. Biochem. Technol.* 5: 42–46.
- Darby, A., Lertpiriyapong, K., Sarkar, U., Seneviratne, U., Park, D. S., Gamazon, E. R., Fox, J. G. (2014). Cytotoxic and pathogenic properties of *Klebsiella oxytoca* isolated from laboratory animals. *PLoS one*. 9(7) : 100542.
- Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. *Technique et Documentation*. p: 289- 476.
- De Lansing M Prescott *et al.* (2018). Microbiologie de Prescott. 5^{ème} édition. Rue de bosquet, 7, B1348 Louvain-la Neuve. Chapitre 8 : le contrôle des microorganismes dans l'environnement. P 180.
- De Paepe, D., Valkenborg, D., Van Eenoo, P., Deventer, K. (2016). Strategies for optimizing mass spectrometric detection of flavonoids. *Mass Spectrometry Reviews*. 35(2): 240-254.
- De S., Dey Y., Ghosh, A. (2010). Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the different extracts of tuber of *Amorphaphallus paeoniifolius* (Araceae). *Int J Pharm Biol Res*. 1:150-157.
- Dheilly A., Soum-Soutéra E., Klein G. L., Bazire A., Compère C., Haras D., Dufour A. (2010). Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 316. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(11): 3452-3461.
- Djahra, A. B., Bordjiba, O., Benkherara, S. (2015). Activité antibactérienne des flavonoïdes d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare* L. de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*. 24 : 29-37.
- Dolan, R. M., J. W. Costerton. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 15: 167-193.
- Donlan RM. (2002). Biofilms: Microbial life on surface. *Emerg. Infect. Dis*. 8 (9): 881-890.
- Duda-Chodak, A. (2012). The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *J Physiol Pharmacol*. 63(5): 497-503.

E

- Efferth, T., Greten, H. J. (2012). The European directive on traditional herbal medicinal products: friend or foe for plant-based therapies? *Journal of Chinese Integrative Medicine*. 10(4) : 357-361.
- EL Khoury N. (2021). Intégration des bactéries planctoniques dans le biofilm et étude fonctionnelle du gène plasmidique Bthur62720 chez *Bacillus thuringiensis*. Thèse de doctorat en Bactériologie, Université ParisSaclay, France. 26-29p.
- Emeraux, E. (2019). Propriétés biologiques des flavonoïdes: étude bibliographique et évaluation de l'activité antioxydante (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- EN ISO 20776-1 (2019). Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes —Partie 1: Méthode de référence de microdilution en bouillon pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses. Valable sur: iso.org/fr.
- Erlund I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*. 24(10); 851-874.

F

- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., Casati, P. (2012).** Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in plant science*. 3: 222.
- Farnesi, A. P., Aquino-Ferreira, R., Jong, D. D., Bastos, J. K., Soares, A. E. E. (2009).** Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. *Genetics and molecular Research*. 8(2): 635-640.
- Fathima, A., Rao JR. (2016).** Selective toxicity of Catechin a natural flavonoid towards bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100:6395-6402.
- FAYE, P. G., NDIAYE, E. M., NDIAYE, B., CISSE, O. I. K., AYEISSOU, N. C., CISSE, M. (2022).** Effet de la macération, de l'infusion et la décoction sur l'extraction aqueuse des polyphénols des feuilles séchées de *Combretum Micranthum*. *Afrique Science*. 21(3): 114-126.
- Filloux, A., Vallet, I. (2003).** Biofilm: positioning and organisation of bacterial communities. *Med Sci*. 1 (19): 77-83.
- Firoz Ahmad Ansari., Huma Jafri., Iqbal Ahmad., Hussein H Abulreesh. (2017).** Biofilms in Plant and Soil Health. 276-278 p.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., Kjelleberg, S. (2016).** Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 14(9): 563-575.
- Florence B.J. (2014).** Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat en Microbiologie et Biochimie, Université de Toulon, France. 76p.
- Frolov N., Detusheva E., Fursova N., Ostashevskaya I., Vereshchagin A. (2022).** Microbiological Evaluation of Novel Bis-Quaternary Ammonium Compounds: Clinical Strains, Biofilms, and Resistance Study. *Pharmaceuticals*. 15: 514.

G

- Galvan, E. M., Mateyca, C., Ielpi, L. (2016).** Role of interspecies interactions in dual-species biofilms developed in vitro by uropathogens isolated from polymicrobial urinary catheter-associated bacteriuria. *Biofouling*. 32(9): 1067-1077.
- Ghasemian, A., Mobarez, A. M., Peerayeh, S. N., Abadi, A. B. (2019).** The association of surface adhesin genes and the biofilm formation among *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *New microbes and new infections*. 27: 36-39.
- Glossman-Mitnik., D; Mendoza-Wilson., A. M. (2004).** Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, 681.
- Goetz C. (2018).** Caractérisation de molécules antibiofilm produites par des souches de *staphylocoques* isolées dans des cas de mammite bovine. Thèse de doctorat en Sciences vétérinaires, Université de Montréal, Canada. 37p-41p.
- Guillermo, E., Juarez., Estela, M. Galván. (2018).** Role of nutrient limitation in the competition between uropathogenic strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in mixed biofilms, 34(3):287-298.
- Guiraud J. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod. P: 185-265.

H

- Hancock V., Dahl M., Klemm P. (2010).** Abolition of Biofilm Formation in Urinary Tract *Escherichia coli* and *Klebsiella* Isolates by Metal Interference through Competition for Fur. *In Applied and Environmental Microbiology*. 76(12): 3836-3841.
- Harding, J. L., Reynolds, M. M. (2014).** Combating medical device fouling. *Trends in biotechnology*. 32(3): 140-146.
- Harriott, M. M., Noverr, M. C. (2009).** *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 53(9): 3914-3922.
- Hazan, R., Que, YA., Maura, D. (2016).** Auto poisoning of the respiratory chain by a quorum-sensing regulated molecule favors biofilm formation and antibiotic tolerance. *Curr Biol*. 26(2):195-206.

- Herzog, K. A., Schneditz, G., Leitner, E., Feierl, G., Hoffmann, K. M., Zollner-Schwetz, I., Högenauer, C. (2014).** Genotypes of *Klebsiella oxytoca* isolates from patients with nosocomial pneumonia are distinct from those of isolates from patients with antibiotic-associated hemorrhagic colitis. *Journal of clinical microbiology*. 52(5): 1607-1616.
- Holá, V., Ruzicka, F., Horka, M. (2010).** Microbial diversity in biofilm infections of the urinary tract with the use of sonication techniques. *FEMS Immunology et Medical Microbiology*. 59(3): 525-528.

I

- Ignatova NI., Alexandrova NA., Zaslavskaya MI., Abramychева DV. (2020).** Влияние условий культивирования на интенсивность биоплёнокообразования штаммами *Klebsiella pneumoniae* [Evaluation of the influence of culturing on the intensity of biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* strains.]. *Klin Lab Diagn*. 65(8):512-515. Russian.
- Inouye S., Yamaguchi H., Takizawa T. (2001).** Screening of the antibacterial effects of variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 7(4): 251-254.

J

- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Kamil, M. A. (2018).** Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the chinese medical association*. 81(1):7-11.
- Jing Yang., Haiyan Long., Ya Hu., Yu Feng., Alan McNally., Zhiyong Zong. (2021).** *Klebsiella oxytoca* Complex: Update on Taxonomy, Antimicrobial Resistance, and Virulence. P: 2-5-8.
- Joffin J.N. et G. Leyral. (2014).** Microbiologie technique. Tome 1 : Dictionnaire des techniques, (CRDPA).Ed. Scérène. 368 p.
- Jubair, N., Rajagopal, M., Chinnappan, S., Abdullah, N. B., Fatima, A. (2021).** Review on the antibacterial mechanism of plant-derived compounds against multidrug-resistant bacteria (MDR). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2021.

K

- Karimi, A., Moradi, M.-T., Alidadi, S., et Hashemi, L. (2016).** Anti-adenovirus activity, antioxidant potential, and phenolic content of black tea (*Camellia sinensis* Kuntze) extract. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 13(4):357-363.
- Khonsari, M. S., Behzadi, P., Foroohi, F. (2021).** The prevalence of type 3 fimbriae in Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical urine samples. *Meta Gene*. 28: 100881.
- Klare, W., Das, T., Ibugo, A., Buckle, E., Manefield, M., Manos, J. (2016).** Glutathione-disrupted biofilms of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains exhibit an enhanced anti-biotic effect and a novel biofilm transcriptome. *Antimicrob AgentsChemother*. 60(8):4539–4551.
- Klayman, B. J., Volden, P. A., Stewart, P. S., Camper, A. K. (2009).** *Escherichia coli* O157: H7 requires colonizing partner to adhere and persist in a capillary flow cell. *Environmental science et technology*. 43(6) : 2105-2111.

L

- Laurie Favre. (2017).** Caractérisation par analyse métabolomique de biomarqueurs bactériens au sein de biofilms marins. Thèse de doctorat en Ecologie Chimique. Université de Toulon, France. 16-19p.
- Lowe, C., Willey, B., O’Shaughnessy, A., Lee, W., Lum, M., Pike, K. (2012).** Outbreak of extended-spectrum β -lactamase–producing *Klebsiella oxytoca* infections associated with contaminated handwashing sinks. *Emerging infectious diseases*. 18(8): 1242.

M

- Man, M. Q., Yang, B., Elias, P. M. (2019).** Benefits of hesperidin for cutaneous functions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
- Mansur, A. R., Song, N. E., Jang, H. W., Lim, T. G., Yoo, M., Nam, T. G. (2019).** Optimizing the ultrasound-assisted deep eutectic solvent extraction of flavonoids in common buckwheat sprouts. *Food chemistry*. 293:438-445.
- Martinez LR., Casadevall A. (2007).** Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Applied and environmental microbiology*. 73(14): 4592-4601.
- Masson J-L. (2015).** Le cuivre sur les surfaces en milieux de santé pour lutter contre les infections nosocomiales. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Lorraine. P : 12-15.
- Met Ivanov., Novović, K., Malešević, M., Dinić, M., Stojković, D., Jovčić, B., Soković, M. (2022).** Polyphenols as inhibitors of antibiotic resistant bacteria—mechanisms underlying rutin interference with bacterial virulence. *Pharmaceuticals*. 15(3) : 385.
- Mezoued, K., Naib, H. (2021).** Evaluation de quelques activités biologiques d'extraits de brindilles issues de trois variétés d'olivier collectées au niveau de Tizi-Ouzou (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Moradigaravand, D., Martin, V., Peacock, S. J., Parkhill, J. (2017).** Population structure of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* within hospitals across the United Kingdom and Ireland identifies sharing of virulence and resistance genes with *K. pneumoniae*. *Genome Biology and Evolution*. 9(3): 574-584.

N

- Nan YANG. (2011).** Role of *Escherichia coli* curli in relation with intestinal components - mucin, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis* .thèse de doctorat. Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie et Modélisation (E2M2) Spécialité : Ecologie microbienne.
- Neog, N., Phukan, U., Puzari, M., Sharma, M., Chetia, P. (2021).** *Klebsiella oxytoca* and emerging nosocomial infections. *Current Microbiology*. 78(4): 1115-1123.
- Nguyen, H. D. N., Yang, Y. S., Yuk, H. G. (2014).** Biofilm formation of *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT-Food Science and Technology*. 55(1): 383-388.
- Nira Rabin ., Yue Zheng ., Clement Opoku-Temeng ., Yixuan Du ., Eric Bonsu Herman O Sintim .(2015).** Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*. 7(4): 500.
- Nisreen Husain. (2017).** biological activities and role of flavonoids in human health-a review. *Indian Journal of Scientific Research*. 12(2):193-196.
- Noyce J.O., Michels H., Keevil C.W. (2006).** Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *Journal of Hospital Infection*. 63(3): 289-297.

O

- Özçelik, B., Orhan, D., Özgen S., Ergun, F. (2008).** Antimicrobial Activity of Flavonoids against Extended-Spectrum -Lactamase (ES_L)-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7 (4): 1151-1157.

P

- Palmer J., Flint S., Brooks J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34(9): 577-588.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*. 5: e47.
- Pantarella F., Valenti P., Natalizi T., Passeri D., Berlutti F. (2013). Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali di Igiene*. 25(1) : 31-42.
- Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F., Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European journal of clinical nutrition*. 64(3): S112-S120.
- Piras, F., Fois, F., Consolati, S. G., Mazza, R., Mazzette, R. (2015). Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses. *Journal of food protection*. 78(10): 1875-1878.
- Porras G., Chassagne F., Lyles J., Marquez L., Dettweiler A. Samarakoon T., Shabih S., Farrokhi D., Quave C. (2021). Ethnobotany and the Role of Plant Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. *Chem. Rev.* 121 (6): 3495–3560.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C., Dusart J. (2003). *Microbiologie*. 2ème édition. Bruxelles: De Boeck. p: 834.
- Putra, N. R., Wibobo, A. G., Machmudah, S., Winardi, S. (2020). Recovery of valuable compounds from palm-pressed fiber by using supercritical CO₂ assisted by ethanol: modeling and optimization. *Separation Science and Technology*. 55(17): 3126-3139.
- Pyrzynska, K. (2022). Hesperidin: A review on extraction methods, stability and biological activities. *Nutrients*. 14(12): 2387.

R

- Ramesh, P., Jagadeesan, R., Sekaran, S., Dhanasekaran, A., Vimalraj, S. (2021). Flavonoids: classification, function, and molecular mechanisms involved in bone remodelling. *Frontiers in Endocrinology*. p. 1564.
- Reiter, J., Levina, N., Van der Linden, M., Gruhlke, M., Martin, C., Slusarenko, A. J. (2017). Diallylthiosulfinate (Allicin), a volatile antimicrobial from garlic (*Allium sativum*), kills human lung pathogenic bacteria, including MDR strains, as a vapor. *Molecules*. 22(10):1711.
- Roy R., Tiwari M., Donelli G., Tiwari V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 9(1):522–554.
- R. R. Watson., V. R. Preedy., S. Zibadi. (2014). Chapter 58, editors. Polyphenols in Human Health and Disease. San Diego: *Academic Press*. 747:56.

S

- Saffidine, K. (2015). Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *carthamus caeruleus L.* et de *plantago major L.* (Doctoral dissertation).
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Banat, I. M., Sangshetti, J. N., Patil, R. H., Gade, W. N. (2016). Multiple roles of biosurfactants in biofilms. *Current pharmaceutical design*. 22(11): 1429-1448.
- SAYARI N., SAIDI M.N., SILA A., ELLOZ-CHAABOUNI S., BOUGATEF A. (2016). Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of Ononis natrix leaves extracts. *Free Radicals and Antioxidants*. 6(1): 23-33.
- Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Sari-Belkharroubi, L., Boucherit, K. (2017). Risque infectieux lié à la formation des biofilms multi-espèces (*Candida*–*bactéries*) sur cathéters vasculaires périphériques. *Journal de Mycologie Médicale*. 27(1), 20-27.
- Sharif, S., Singh, M., Kim, S. J., Schaefer, J. (2009). *Staphylococcus aureus* peptidoglycan tertiary structure from carbon-13 spin diffusion. *Journal of the American Chemical Society*. 131(20): 7023-7030.
- Shatila, F., Yaşa, İ., Yalçın, H. T. (2021). Biofilm formation by *Salmonella enterica* strains. *Current Microbiology*. 78: 1150-1158.

- Singh, L., Cariappa, M. P., Kaur, M. (2016).** *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen? *Medical journal armed forces india*. 72:S59-S61.
- Silva, L. N., Zimmer, K. R., Macedo, A. J., Amp; Trentin, D. S. (2016).** Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chemical reviews*. 116(16): 9162-9236.
- Suttasattakrit, K., Khamkeaw, A., Tangwongsan, C., Pavasant, P., Phisalaphong, M. (2022).** Ionic Silver and Electrical Treatment for Susceptibility and Disinfection of *Escherichia coli* Biofilm-Contaminated Titanium Surface. *Molecules*. 27(1) : 180.

T

- Tan, C. H., Lee, K. W. K., Burmølle, M., Kjelleberg, S., Rice, S. A. (2017).** All together now: experimental multispecies biofilm model systems. *Environmental Microbiology*. 19(1): 42-53.
- Tasse, J. (2017).** Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilm dans la prise en charge des infections ostéo-articulaires à staphylocoques (Doctoral dissertation, Université de Lyon).
- Tebibel Gueziane. (2008).** Microbiologie : travaux pratiques 2 ème année. (138): P 61-63, 94.
- Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., Jacques, M. (2014).** Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 78(2): 110-116.
- Trivedi, M. K., Patil, S., Shettigar, H., Bairwa, K., Jana, S. (2015).** Phenotypic and biotypic characterization of *Klebsiella oxytoca*: An impact of biofield treatment. *Microbial & Biochemical Technology*. 7(4): 202-205.
- Tzanova, M., Atanasov, V., Yaneva, Z., Ivanova, D., Dinev, T. (2020).** Selectivity of current extraction techniques for flavonoids from plant materials. *Processes*. 8(10): 1222.

V

- Vergara-López, S., Domínguez, M. C., Conejo, M. C., Pascual, Á., Rodríguez-Baño, J. (2013).** Wastewater drainage system as an occult reservoir in a protracted clonal outbreak due to metallo-β-lactamase-producing *Klebsiella oxytoca*. *Clinical microbiology and infection*. 19(11): E490-E498.
- Vogiatzoglou, A., Mulligan, AA., Lentjes, MA., Luben, RN., Spencer, JP., Schroeter, H., Khaw, KT., Kuhnle, GG. (2015).** Flavonoid intake in European adults (18 to 64 years). *PLoS one*, 10(5), e0128132.

W

- Wang S., Wang C., Gao L. Cai H., Zhou Y., Yang Y., Xu C., Ding W., Chen J., Muhammad I., Chen X., He X., Liu D. and Li Y. (2017).** Rutin Inhibits *Streptococcus suis* Biofilm Formation by Affecting CPS Biosynthesis. *Frontiers in Pharmacology*. 8:379.
- Wang, T. Y., Li, Q., Bi, K. S. (2018).** Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 13(1): 12-23.
- Wang, Y., Li, X., Wang, Y., Li, L., Yu, S. (2019).** Ultrasound-assisted extraction of flavonoids from Ginkgo biloba leaves: optimization and comparison with conventional methods. *Ultrasonics Sonochemistry*. 52: 38-47.
- Wang, J., Ma, W., Wang, X. (2021).** Insights into the structure of *Escherichia coli* outer membrane as the target for engineering microbial cell factories. *Microbial Cell Factories*. 20(1): 1-17.
- Wu, H., Moser, C., Wang H-Z. (2015).** Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci*. 7(1):1-7.

X

XIONG, Haijun., WANG., Jin, RAN., Qian. (2019). Hesperidin: A therapeutic agent for obesity. *Drug Design, Development and Therap.* 3855-3866.

Y

Yang, J., Long, H., Hu, Y., Feng, Y., McNally, A., Zong, Z. (2022). *Klebsiella oxytoca* complex: update on taxonomy, antimicrobial resistance, and virulence. *Clinical Microbiology Reviews.* 35(1): e00006-21.

Yarmolinsky, L., Nakonechny, F., Budovsky, A., Zeigerman, H., Khalfin, B., Sharon, E., Nisnevitch, M. (2023). Antimicrobial and Antiviral Compounds of *Phlomis viscosa* Poiret. *Biomedicines.* 11(2): 441.

Yildirim, A. B., Guner, B., Karakas, F. P., Turker, A. U. (2017). Evaluation of antibacterial, antitumor, antioxidant activities and phenolic constituents of field-grown and in vitro-grown *Lysimachia vulgaris* L. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines.* 14(2): 177-187.

Z

Zheng, J. X., Lin, Z. W., Chen, C., Chen, Z., Lin, F. J., Wu, Y., Deng, Q. W. (2018). Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 8: 21.

Annexe

1. Composition des milieux de culture (Delarras, 2007 ; Gueziane, 2008).**• PBS (g/ litre d'eau distillée)**

Protéase peptone	12 g
Extrait de levure	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Thiosulfate de sodium	5,0 g
Sels biliaires	9,0 g
Agar agar	1,4 g
pH=7,5	

• TSB Bouillon Tryptone-Soja (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	20 g
Chlorure de sodium	5,0 g
hydrogénophosphate de potassium	2,5 g
Glucose	2,5 g
pH= 7,3 ± 0,2 / autoclavage 15 min à 121°C.	

• Bouillon Muller-Hinton (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	17,5 g
Extrait de viande	2,0 g
Amidon	1,5 g
pH=7,3 / autoclavage 20 min à 121°C	

- **La gélose Mueller-Hinton (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone	17,5 g
Extrait de viande	2,0 g
Amidon	1,5 g
Agar	17,0 g

pH=7,3 / autoclavage 20 min à 121°C

- **La gélose Hektoen (g/ litre d'eau distillée)**

Protéose peptone	12 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Citrate de fer ammoniacal	1,5 g
Lactose	12 g
Fuchsine acide	0,1 g
Gélose	14 g
Extrait de levure	03 g
Sels biliaires	09 g
Salicine	02 g
Saccharose	12 g
Bleu de bromothymol	0,065 g

PH =7,5 ± 0,2. Ne pas autoclaver ou surchauffer.

- **Solution de cristal violet 0.1% (g/litre d'eau distillée)**

Cristal violet	0,1 g
Eau distillée	100 ml

2. Galerie biochimique miniaturisé API 20 E.

Tableau 05 : Préparation et inoculation de la galerie miniaturisée API 20 E

(Source : <http://www.biomerieux.com>).

Type de l'API	Caractéristiques	Préparation Galerie/inoculum	Inoculation de la galerie	Lecture	Identification
API 20 E	<ul style="list-style-type: none"> - Comporte 20 tests - Destinée aux entérobactéries et à autre bacilles à Gram négatif. 	<ul style="list-style-type: none"> - Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ; - Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation ; - Faire une suspension bactérienne : cultures jeune dans un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile. 	<ul style="list-style-type: none"> - Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne ; - Remplir uniquement les tubes des autres tests ; - Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine ; - Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures. 	<ul style="list-style-type: none"> - Lecture directe ou après addition de réactifs : se référant au tableau de lecture spécifique à l'API ; - Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun. - Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. Un nombre à 7 chiffres est obtenu, il sert de code d'identification. 	<p>L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification <i>apiweb</i>™.</p> <p>Enter manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.</p>

Tableau 06 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E

(Source : <http://www.biomerieux.com>).

Test	Groupements active	Réactions / Enzymes	Résultats	
ONPG	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Negative	Positive
			incolore	Jaune
ADH	L-Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge-Orangé
LDC	L-Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
ODC	L-Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
 CIT 	TriSodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
H2S	Thiosulfate de sodium	Production de H2S	Incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge-Orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
IND	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose
IVPI	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+ VP2	
			Incolore	Rose/rouge
IGELI	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/jaune-gris
MAN	D-Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SOR	D-Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
RHA	L-Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SAC	D-Saccharose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
MEL	D- Melibiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
Réduction des nitrates (GLU tube)	Potassium nitrate	Production de NO2	NIT 1+NIT 2, 2-3 min	
			Jaune	Rouge
		Réduction au N2	Zn / 5 min	
			Orange-rouge	Jaune
OF-O	glucose	Oxydation du glucose	vert	Jaune
OF-F	glucose	Fermentation du glucose sous l'huile	vert	Jaune