

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée



Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Inhibition de la formation de biofilms par quelques
huiles essentielles**

Présenté par :
M^{lle} Djafri Tassadit et M^{lle} Medjmadj Souad
Soutenu le : **26 juin 2023**

Devant le jury composé de :

M ^{me} KERAMANE B.	MCB	Examinatrice
M ^{me} SAIDANI K.	MCB	Promotrice
M ^{me} SOUAGUI S.	MCB	Présidente

Année universitaire 2022/2023



Remerciements



*Avant tout, nous tenons à remercier **Dieu** celui qui nous a créés, le tout puissant et le tout miséricordieux, qui nous a protégés, aidés et qui nous a donné la patience et le courage pour accomplir ce modeste travail.*

Notre profonde expression de reconnaissance et de remerciements est destinée à notre promotrice Mme Saïdani K. qui nous a fait l'honneur de diriger notre travail, pour son aide, ses conseils, sa disponibilité, ses encouragements et sa constante disponibilité, sa gentillesse, pour son suivi ses orientations et surtout sa patience.

Nous remercions avec grande gratitude et profond respect les membres de jury pour avoir aimablement accepté de juger ce travail. A Mme Souagui S. pour l'honneur qu'elle nous a fait de présider le jury et d'évaluer notre travail. A Mme Keramane B. pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos vifs remerciements pour Mme Touati Naïma et Mme Merzouk Hafida pour leur aide et leurs encouragements.

Nos vifs remerciements aux ingénieurs du laboratoire de microbiologie.

Nous tenons à remercier Rosa, pour son aide et ses encouragements.

Finalement, Notre reconnaissance s'étend également à nos familles, nos amis, nos proches et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

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

A mes parents et aux membres de ma famille qui n'ont cessé, à aucun moment, de me soutenir et de m'encourager par leurs prières et leurs sacrifices.

*A la prunelle de mes yeux celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse **ma mère** qui a souffert sans me laisser souffrir qui m'a soutenue durant mes études et qui ne m'a jamais privée de son amour, de son attention, de ses encouragements et de ses prières. Que dieu te garde pour moi.*

*A ma source de bonheur qui n'a jamais cessé de me soutenir, ma sœur **Melissa** et à mon seul petit frère **Raouf**. Je vous souhaite une longue vie pleine de joie et de réussite.*

*A ma très chère tante **Kahina** que je considère comme ma grande sœur, qui m'a toujours soutenue durant mes études, qui je trouve à mes côtés à tout moment. Je t'aime énormément !*

*A mon **grand-père** qui est un deuxième papa pour moi, que dieu t'offre une très longue vie !*

*A la mémoire de mes **grands-mères**, que dieu vous accueille dans son vaste paradis.*

*A mes tantes et mes oncles, mes cousins et cousines ; surtout **Nedjma** et **Sonia**.*

A mes plus proches : Lydia, Wissam, Tinhinane, Nina, Monda, Imene, Warda.

A toi Rawna, merci pour tout.

A mes amis : Wassil, Maïssa Hamidouche, Dali.

A ma chère binôme Souad pour sa compréhension, sa patience et son soutien, avec qui j'ai passé de très bon moment en réalisant ce travail.

A Sara et Sana celles avec qui j'ai partagé des meilleurs moments au laboratoire au cours de la réalisation de ce travail.

Tassadit



Dédicaces

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'accomplir ce modeste travail que je dédie à tous ceux qui me sont chers.

*A l'homme, qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour m'encourager et me rendre heureuse : **mon cher père.***

*A la femme qui a été toujours à mes côtés pour me soutenir et m'encourager pour affronter les différents obstacles : **mon adorable mère.** Ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force.*

*A mes chères sœurs **Feryel** et **Hanane** et mes chères frères **Bilal**, **Houssam**, **Youcef** et **Abderrahmane** qui n'ont pas cessé de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu vous protège et vos offre la chance et le bonheur.*

*A ma meilleure amie **Nassima** pour sa sincérité, amour et son encouragement.*

*A ma binôme **Tassadit** pour sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail.*

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail soit possible, je vous dis merci pour votre amour et votre encouragement.

*A **Sara** et **Sana** celles avec qui j'ai partagé des meilleurs moments au laboratoire au cours de la réalisation de ce travail.*

Souad



Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFNOR : Association Française de normalisation

AHL : Acyl-Homom sérine Lactones

ATB : Antibiotique

ATCC : American Type Culture Collection

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

HA : Hydrolat Aromatique

HE : Huile Essentielle

MH : Mueller Hinton

PCA : Plate Count Agar

pH : Potentiel Hydrogène

Qs : Quorum Sensing

Liste des tableaux

Tableau I : Composition de biofilm.....	5
Tableau II : Composés bioactifs des huiles essentielles étudiées.....	18
Tableau III : Tableau représentatif des souches testées.....	19
Tableau IV : Production d'exopolysaccharides sur le milieu rouge Congo.....	23
Tableau V : Résultats de l'évaluation quantitative.....	24

Liste des figures

Figure1 : Modèle représentant des étapes de la formation d'un biofilm.....	7
Figure 2 : Structures des terpènes (a) ; terpénoïdes (b) et phénylpropanoïdes (c).....	12
Figure 3 : Photographie des huiles essentielles étudiées.....	19
Figure 4 : Production d'exopolysaccharides par les souches <i>E. coli</i> (A), <i>Pseudomonas</i> (B), <i>S. aureus</i> (C), <i>K. pneumoniae</i> (D) et <i>Vibrio sp.</i> (E).....	23
Figure 5 : Aspect des microplaques des trois huiles (thym, clou de girofle, origan) sur les souches <i>E. coli</i> (A), <i>S. aureus</i> (C), <i>K. pneumonie</i> (D) et <i>Vibrio sp</i> (E).....	26
Figure 6 : Aspect de la microplaque de l'HE du clou de girofle contre <i>Vibrio sp.</i>	27
Figure 7 : Effet de l'HE de clou de girofle sur l'inhibition de la formation de biofilm de <i>Vibrio sp.</i> (A) et d' <i>E. coli</i> (B).....	28
Figure 8 : Résultats du dénombrement de <i>Vibrio sp.</i> (A) et d' <i>E. coli</i> (B) après traitement par l'HE de clou de girofle.....	29

Liste des abréviations
Liste des tableaux
Liste des figures

Table des matières

Introduction	1
Synthèse bibliographique	
I. Biofilms.....	3
I.1. Historique.....	3
I.2. Définition.....	4
I.3. Composition d'un biofilm.....	4
I.3.1. Microorganismes.....	5
I.3.2. Matrice.....	5
I.4. Rôle des biofilms.....	5
I.4.1. Rôle positif.....	6
I.4.2. Rôle négatif	6
I.5. Facteurs influençant la formation d'un biofilm	6
I.5.1. Caractéristique de la cellule.....	6
I.5.2. Caractéristiques de la surface.....	6
I.5.3. Caractéristiques du milieu.....	6
I.6. Formation d'un biofilm.	7
I.6.1. Adhérence réversible.....	8

I.6.2. Adhérence irréversible.....	8
I.6.3. Formation des micro-colonies.....	8
I.6.4. Maturation.....	8
I.6.5. Dispersion.....	8
I.7. Régulation de la formation des biofilms.....	9
I.8. Résistance aux antibiotiques.....	9
II. Huiles essentielle.....	10
II.1. Définition	10
II.2. Propriété physico-chimique des huiles essentielles	10
II.3. Composition chimique des huiles essentielles	10
II.3.1. Terpènes et terpénoïdes.....	11
II.3.1.1. Terpènes.....	11
II.3.1.2. Terpénoïdes.....	11
II.3.2. Composés aromatiques	11
II.3.3. Autres composés.....	11
II.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	12
II.4.1. Méthodes conventionnelles.....	12
II.4.1.1. Hydrodistillation	12
II.4.1.2. Extraction par solvant	13
II.4.1.3. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	13
II.4.1.4. Hydrodiffusion.....	13
II.4.1.5 Macération.....	13
II.4.2. Méthodes avancées.....	13
II.4.2.1. Extraction assistée par ultrasons.....	14
II.4.2.2. Extraction assisté par micro-ondes	14

II.4.2.3. Extraction par fluides supercritiques	14
II.5. Conservation des huiles essentielles.....	14
II.6. Mécanisme d'action et activités biologiques des huiles essentielles.....	15
II.6.1. Mécanisme d'action des huiles essentielles	15
II.6.2. Activités biologiques des huiles essentielles	15
II.6.2.1. Activité antifongique	15
II.6.2.2. Activité antioxydante	16
II.6.2.3. Activité anticancéreuse	16
II.6.2.4. Activité anti-inflammatoire	16
II.6.2.5. Activité antivirale	16
II.6.2.6. Activité antimicrobienne	16
II.7. Rôle des huiles essentielles	17
II.8. Domaines d'utilisation des huiles essentielles.....	17
II.9. Composition des huiles testés	18

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal.....	19
I.1. Huiles essentielles étudiées.....	19
I.2. Souches bactériennes testées	19
II. Méthodes.....	20
II.1. Etude de la formation des biofilms	20
II.1.1. Test au rouge Congo (Evaluation qualitative)	20
II.1.2. Production d'exopolysaccharide (test quantitatif)	20
II.2. Test d'inhibition de la formation de biofilm.....	20
II.2.1. Inhibition de la production de biofilm sur microplaques	21
II.2.2. Inhibition de la production de biofilm sur tubes	21

Résultats et discussion

I.1. Evaluation qualitative de la production des exopolysaccharides (Test au rouge Congo).....	23
I.2. Evaluation quantitative de la production d'exopolysaccharides	24
I.3. Résultats des tests d'inhibition de la formation de biofilm	25
I.3.1. Inhibition de la production de biofilm sur microplaque.....	25
I.3.2. Inhibition de la production de biofilm sur tubes	27
Conclusion	30

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Dans l'environnement, les micro-organismes sont intégrés dans des matrices d'exopolymères qui adhèrent aux surfaces, forment des communautés structurées et les protègent des influences extérieures (**Lebeaux *et al.*, 2016**). L'activation des mécanismes de survie chez les bactéries repose sur leur capacité à former des communautés appelées biofilms, générant une matrice fermée tridimensionnelle composée principalement de polysaccharides, de protéines et d'ADN (**Zurob *et al.*, 2019**).

Les biofilms bactériens sont des amas structurés, hétérogènes, plus ou moins complexes reliant des cellules ou colonies d'une ou plusieurs espèces, enrobés d'une matrice exopolymère adhésive et protectrice, et pouvant être biotiques (les bactéries s'adhèrent aux cellules de la muqueuse) ou abiotiques (l'adhérence des bactéries à un plancher, un abattoir ou à l'usine de transformation) (**Tremblay *et al.*, 2014**).

Les plantes aromatiques sont une source inépuisable, médicinale et efficace par leurs substances actives (telles que les huiles essentielles (HEs), ces dernières possèdent des activités antioxydantes, antibactériennes, antifongiques et anti-inflammatoires et anticancéreuses (**Blejan *et al.*, 2021**). De nombreux composés aromatiques tels que les acides phénoliques, les monoterpènes, les aldéhydes, les hydrocarbures terpéniques oxygénés et non oxygénés sont les principaux composants des HEs, dont la plupart sont de simples composés lipophiles (**Alsherbiny *et al.*, 2022**).

Les plantes aromatiques sont utilisées par l'Homme depuis l'Antiquité. Actuellement, l'utilisation dans les industries de la parfumerie, du cosmétique et de la pharmacie a considérablement augmenté. Les plantes sont la principale source de composés actifs, avec au moins 35 000 espèces utilisées dans le monde. L'Algérie offre une végétation riche et diversifiée de par sa position géographique (**Mouas *et al.*, 2017**). De nombreuses plantes aromatiques et médicinales poussent naturellement (**Fenghour *et al.*, 2021**). Elle est diversifiée en termes de climat et de sol, de situation géographique et de relief, et compte 3 510 espèces de flore, dont 450 se trouvent dans les hautes terres et le sud du pays (**Mouas *et al.*, 2017**).

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'inhibition de la formation des biofilms par trois huiles essentielles (thym, origan et clou de girofle). Notre étude est subdivisée en trois parties :

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique dont le premier chapitre aborde les biofilms et le deuxième donne un aperçu général sur les huiles essentielles.

La seconde partie apporte la partie expérimentale basée sur la mise en évidence de la capacité des huiles essentielles, des plantes aromatiques étudiées, à inhiber la formation de biofilms de quelques bactéries pathogènes utilisées comme souches cibles.

En fin, la troisième partie présente les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Synthèse bibliographique

I. Biofilms

I.1. Historique

Au XVII^e siècle, Antoine Von Leeuwenhoek a observé pour la première fois un type de créature sur ses propres dents, une découverte appelée biofilm (**Aumeran *et al.*, 2020**). Les caractéristiques physiques et chimiques des biofilms n'ont pas été étudiées même à la fin des années 1960 et au début des années 1970. Heukelekian et Heller ont observé "l'effet bouteille" des micro-organismes marins, qui est lorsqu'ils sont attachés à une surface, leur croissance et leur activité augmentent (**Muhsin *et al.*, 2017**). Mais ce n'est que beaucoup plus tard que le terme de « film bactérien » puis de « biofilm » fut popularisé, notamment par John William Costerton dans les années 1980. Il a montré que, contrairement aux données établies, le mode de vie dominant des bactéries était sous forme de communautés complexes apparentées à un être pluricellulaire qu'il a dénommées biofilms. Au sein de ces structures, les cellules bactériennes sont entourées d'une gangue appelée matrice, produite par les bactéries elles-mêmes et qui joue un rôle majeur en assurant la cohésion de l'ensemble, voire la fixation à la surface du substrat. La majorité des bactéries sont capables de former des biofilms et les différentes étapes conduisant à la formation d'agrégats complexes et hétérogènes à partir de quelques bactéries individuelles ont été largement décrites pour certaines espèces (**Aumeran *et al.*, 2020**).

Aujourd'hui, il existe des preuves substantielles de la présence de biofilms multi-espèces dans de nombreux milieux naturels, tels que le sol où les bactéries forment une association stable avec les particules du sol ou les racines des plantes (**Sadiq *et al.*, 2021**). Les environnements aquatiques supportent également des biofilms multi-espèces, où les bactéries colonisent presque toutes les surfaces (par exemple, porte-conteneurs) qui entrent en contact avec l'eau de mer, provoquant une biocorrosion (**Carvalho, 2018**).

I.2. Définition

Les biofilms sont des agrégats de micro-organismes dans lesquels les cellules sont fréquemment intégrées dans une matrice autoproduite de substances polymères extracellulaires (EPS) qui adhèrent les unes aux autres à une surface (**Flemming et al., 2016**).

Le biofilm se caractérise par des changements dans l'adhésion irréversible des cellules microbiennes aux surfaces ou aux substrats ou les unes aux autres, incorporées dans les exopolysaccharides (EPS), et présentant des phénotypes spécifiques en termes de taux de transcription et de croissance des gènes ; il est composé d'un seul micro-organisme ou d'un mélange de bactéries, champignons, archées, protozoaires et levures comme il a une structure de canal qui contrôle la libération de gaz, de nutriments et d'antimicrobiens (**Rather et al., 2021 ; Zhao et al., 2023**).

Le biofilm est un mode de vie utilisé par des nombreux microbes pathogènes pour proliférer sous formes d'agrégats multicellulaires sur des substrats inertes inanimés ou biologiques. C'est une stratégie de survie des microorganismes face aux stress environnementaux (**Saxena et al., 2019**).

I.3. Composition d'un biofilm

Les polymères extracellulaires des biofilms sont principalement composés de mélanges complexes de biomolécules telles que l'EPS, l'ADN extracellulaire qui est libéré par des systèmes de sécrétion bactériens, les protéines et les lipides qui enveloppent les cellules bactériennes (Tableau I). Les biofilms sont constitués de deux composants : les cellules microbiennes et l'EPS sécrété, qui représentent 90 % de la biomasse totale. L'EPS contribue à l'établissement global de la structure du biofilm et se compose principalement d'exopolysaccharide qui fournissent des sites d'interactions cohésives et adhésives, de protéines qui servent de sources de carbone et d'énergie et d'ADN extracellulaire pour la transmission des gènes de résistance (**Saxena et al., 2019 ; Wang et al., 2022**).

Tableau I : Composition de biofilm (Muhsin *et al.*, 2015).

Composé	Pourcentage dans la matrice
Eau	97 %
Cellule microbienne	2 - 5 %
Protéine	1 - 2 %
Polysaccharide / (ADN/ARN)	≤ 1 - 2 %

I.3.1. Microorganismes

Les biofilms sont constitués de communautés bactériennes complexes dans lesquelles plusieurs espèces peuvent être trouvées attachées à différents matériaux (Akbas, 2015). Cependant la matrice EPS forme une barrière protectrice naturelle pour de nombreuses bactéries, ce qui permet aux bactéries qui ont changé leur mode de croissance en phase planctonique de survivre dans les biofilms en réponse à divers signaux et stress environnementaux (Nyanasegran, 2023).

I.3.2. Matrice

La formation de la matrice est un processus dynamique qui dépend de la disponibilité des nutriments, de la synthèse et de la sécrétion de substances extracellulaires. Cette matrice peut être constituée non seulement des polysaccharides, mais aussi des protéines, des acides nucléiques, de tensioactifs, des lipides, des glycolipides et des cations. Cette composition varie selon les espèces bactériennes et les conditions de croissance comme elle fournit aux microorganismes des avantages structurels et fonctionnels, tels que l'hydratation, la capture de ressources, la capacité digestive, la protection et la résistance aux agents antimicrobiens et les interactions réciproques intercellulaires qui peuvent améliorer la capacité du métabolisme de cellules dans le biofilm (Tremblay *et al.*, 2014 ; Flemming *et al.*, 2016).

I.4. Rôle des biofilms

Les biofilms ont un impact écologique et économique considérable. Ils jouent un rôle dans la survie et la sélection des bactéries dans l'environnement, mais ont aussi de nombreux effets indésirables, notamment en santé publique. Pour toutes ces raisons, de nombreuses équipes de recherche s'intéressent au mode de développement des biofilms et aux facteurs d'adhésion impliqués dans les différentes étapes de leur formation (Roux, 2006).

I.4.1. Rôle positif

Le biofilm joue un rôle clé dans de nombreux processus, tels que le traitement des eaux usées. Lors de la biodégradation et la biorestauration., les biofilms se forment dans le bioréacteur et participent à l'élimination des matières organiques, à l'adsorption des matières en suspension et à la purification des eaux usées brutes alors que dans les processus de biodégradation et de bioremédiation, ils forment des communautés microbiennes uniques pour dégrader les herbicides et les antibiotiques (Yin *et al.*, 2020).

I.4.2. Rôle négatif

Le biofilm intervient dans plusieurs types d'infections chez l'Homme, y compris les infections associées aux dispositifs médicaux par différents micro-organismes dont les staphylocoques (*Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus aureus*) et *Pseudomonas aeruginosa*, les caries dentaires, la cystite, les infections pulmonaires associées à la mucoviscidose et l'endocardite, si les dispositifs médicaux contiennent des biofilms, ils entrent en contact avec les tissus humains, les bactéries survivent et prolifèrent, et entraînent une infection nocive (Yin *et al.*, 2020).

I.5. Facteurs influençant la formation d'un biofilm**I.5.1. Caractéristique de la cellule**

La fixation des cellules bactériennes est influencée par la production d'EPS, les flagelles, les pilis fimbriales et les adhérences non fimbriales, qui aident les cellules bactériennes à établir leur premier contact physique avec un substrat. L'hydrophobicité est un autre facteur qui réduit la force répulsive entre la surface bactérienne et le substrat de colonisation, en fonction du milieu, du taux de croissance et des espèces bactériennes (Muhammad *et al.*, 2020).

I.5.2. Caractéristiques de la surface

Le caractère de la surface, tel que l'interface du support, électrostatique, hydrophobe, la rugosité de l'interface et les caractéristiques morphologiques, affecte l'attachement cellulaire et la formation du biofilm. De plus la rugosité de la surface est conditionnelle car elle joue un rôle majeur dans la formation d'un biofilm fort (Xihong *et al.*, 2017)

I.5.3. Caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion de biofilms nécessitent une machinerie enzymatique précise et des unités structurelles spécialisées qui facilitent la fixation et la colonisation des

organismes par des organismes à pilis sur les surfaces, d'où l'activation dépend des facteurs environnementaux, tels que les changements dans les niveaux d'oxygène qui peuvent affecter la formation de biofilms dans diverses espèces de bactéries (Samrot *et al.*, 2021).

La température est importante car elle affecte non seulement les activités métaboliques et enzymatiques des bactéries, mais également certains paramètres physico-chimiques (pH, activité ionique, thermocinétique, solubilité des gaz) et la solubilité des bactéries ainsi que les propriétés microbiennes de surface (Bellifa, 2014).

I.6. Formation d'un biofilm

La formation de biofilm est un processus complexe qui se fait très rapidement, en réponse à une pression environnementale, telle que le manque d'oxygène et de nutriments (Tremblay *et al.*, 2014). C'est un mécanisme largement conservé de persistance bactérienne caractérisé par l'adhérence à une surface et qui subséquente d'une matrice extracellulaire protectrice (Marshall *et al.*, 2014).

La progression à travers différentes étapes du développement du biofilm implique l'expression différentielle des gènes requis pour les différentes étapes détectées sur la figure 1.

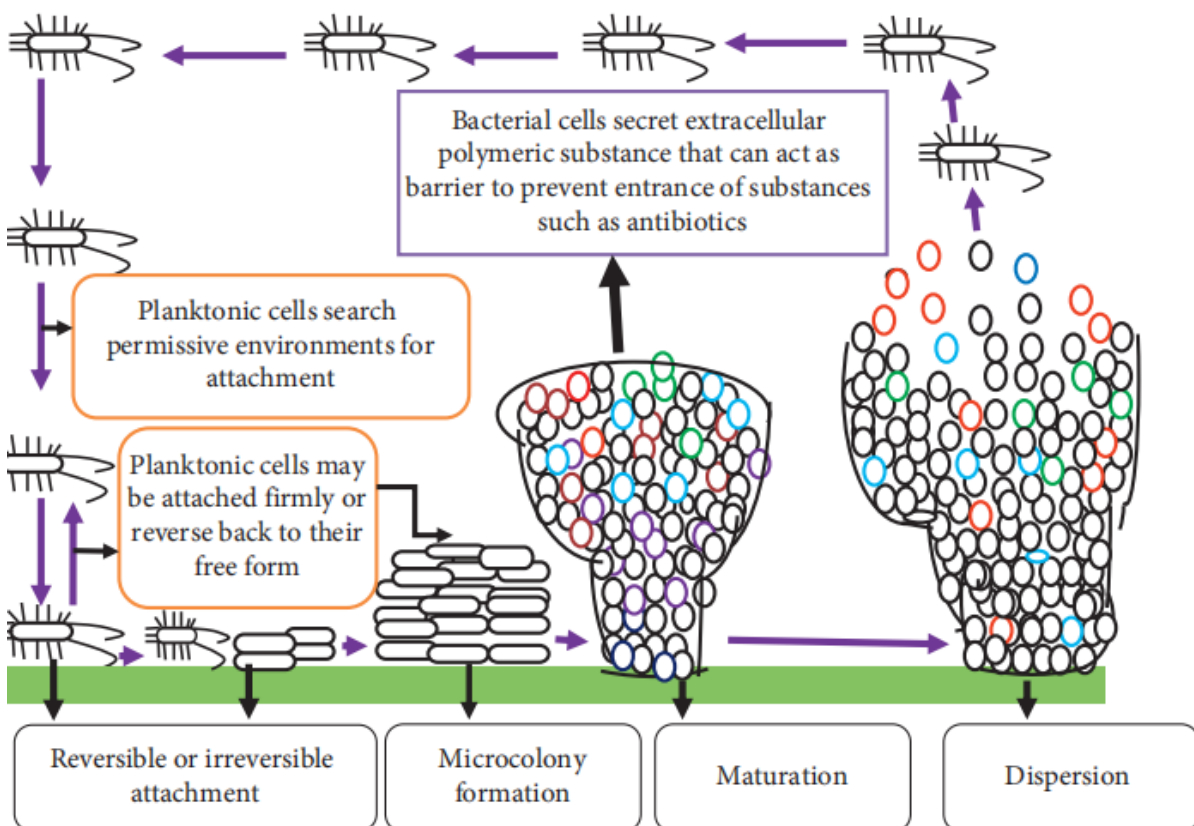


Figure1 : Modèle représentant des étapes de la formation d'un biofilm (Abebe, 2020).

I.6.1. Adhérence réversible

C'est le premier contact entre les microorganismes et le support, c'est pour cette raison que la plupart des microorganismes planctoniques s'attachent d'une manière réversible aux surfaces (**Catherine *et al.*, 2018**). Les stades de cette adhésion comprennent l'agrégation lâche des bactéries qui peuvent se dissocier et revenir à des formes flottantes libres ; les interactions électrostatiques et les forces hydrodynamiques influencent les étapes initiales de la formation de biofilm sur les surfaces abiotiques qui sont facilitées par les adhésines (**Pal Singh *et al.*, 2021**).

I.6.2. Adhérence irréversible

Certaines cellules individuelles entrent alors dans la phase d'attachement irréversible où les cellules se déposent contre la surface et résistent aux tentatives de les déloger physiquement suite à une fixation irréversible, les cellules se multiplient et commencent à produire des composants de matrice de biofilm (**Catherine *et al.*, 2018**).

I.6.3. Formation des micro-colonies

Après l'adhésion des microorganismes aux surfaces ; ces derniers commencent à se multiplier et à s'agréger au sein d'EPS autoproduits conduisant à la formation de microcolonies. Les motilités médiées par les flagelles et les pilis de type IV sont importantes pour les interactions entre les micro-organismes et les surfaces, et les agrégations cellule-cellule pour former des microcolonies, respectivement (**Rather *et al.*, 2021**).

I.6.4. Maturation

La croissance de biofilm d'une manière exponentielle en provoquant une augmentation significative de son épaisseur jusqu'à l'obtention d'une structure tridimensionnelle. Dans un état optimal, il devient macroscopique et mature et se caractérise par la formation de canaux d'eau qui permettent le transport de l'oxygène et des nutriments vers des parties du biofilm (**Ammek *et al.*, 2019**). Au cours de ce processus, la motilité des microcolonies est limitée car la production de structures de surface bactériennes est inhibée et le schéma d'expression génique des cellules sessiles diffère considérablement de celui des cellules planctoniques. Cependant, l'EPS aide à renforcer le lien entre les bactéries et le substrat et la communication entre les cellules (**Zhu *et al.*, 2022**).

I.6.5. Dispersion

La dispersion représente le processus terminal de développement du biofilm. Quitter le biofilm et poursuivre un autre cycle de vie du biofilm est considéré comme une stratégie de

cellules bactériennes, certaines cellules sont transférées à la croissance planctonique. Ces cellules dispersées explorent d'autres niches et se rattachent à de nouvelles surfaces. Il s'agit d'un phénomène naturellement programmé qui permet aux cellules bactériennes de former de nouvelles microcolonies sur des substrats autrement frais en réponse à des conditions physiologiques ou environnementales spécifiques (**Muhammad *et al.*, 2020**).

I.7. Régulation de la formation des biofilms

Le quorum sensing (QS), c'est un système de communication qui intervient dans la régulation des processus variés et qui joue un rôle important dans la régulation de la formation du biofilm. Il existe une grande diversité de molécules de communication entre les bactéries. Les bactéries à Gram positif utilisent souvent des peptides cycliques d'environ 7 à 11 acides aminés. Autrement, chez les bactéries à Gram négatif, différentes molécules sont utilisées, les plus communes étant les acylhomosérines lactones (AHL), dont les tailles sont variées selon les bactéries. (**Mion *et al.*, 2019**).

I.8. Résistance aux antibiotiques

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la résistance des biofilms aux agents antibiotiques. L'un de ces facteurs est la matrice polymérique qui agit comme une barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens. La proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature favorise probablement le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques (**Yannick *et al.*, 2014**).

Le mode de vie du biofilm confère divers avantages de survie aux micro-organismes, parmi lesquels la propagation de la résistance aux antibiotiques est la plus favorable. Les microbes des biofilms sont plus résistants aux antibiotiques que leurs homologues planctoniques vivant en liberté. Les micro-organismes dans les biofilms préfèrent un mode de vie fixe qui change constamment à mesure que l'environnement fluctue (**Saxena *et al.*, 2019**).

Les biofilms ne sont pas seulement résistants aux antibiotiques et aux désinfectants, ils sont également insensibles à la phagocytose et survivent au système immunitaire de l'organisme principalement grâce à l'EPS auto-généré (**Rather *et al.*, 2021**).

II. Huiles essentielles

II.1. Définition

Une huile essentielle est définie comme un mélange complexe de composés naturels de structures organiques variées (**Bouhdid *et al.*, 2012**). Elle se trouve dans tous les organes de la plante ; on peut l'extraire à partir des feuilles, fleurs, grains, écorces et fruits (**Zhang, 2019**).

L'AFNOR a définie l'huile essentielle « essences végétales » comme étant un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés Physiques soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par l'hydrodistillation (**AFNOR, 2000**).

Les huiles essentielles sont des liquides huileux aromatiques et lipophiles (**Lopes *et al.*, 2020**). Constituées de mélanges très complexes et variables de différents composés bioactifs à différentes concentrations (**González *et al.*, 2021 ; Chaudhari *et al.*, 2021**). Classés en deux groupes chimiques : les terpénoïdes (monoterpénoïdes et sesquiterpénoïdes) et les phénylpropanoïdes, qui proviennent de précurseurs différents du métabolisme primaire et sont synthétisés par des voies métaboliques distinctes (**Lopes *et al.*, 2020**).

II.2. Propriété physico-chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont très sensibles à la lumière, la chaleur et l'oxydation, elles se constituent des molécules aromatiques de très faible masse moléculaire (**Degryse *et al.*, 2008**). Ces huiles sont volatiles, inflammables et odorantes avec une densité généralement inférieure à celle de l'eau. D'une manière générale les huiles essentielles sont incolores comme elles peuvent prendre une couleur jaune pâle ou bleu claire qui est due à une activité anti-inflammatoire de l'HE (**Deschepper, 2017**).

II .3. Composition chimique des huiles essentielles

La composition des HEs varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les parties de la plante, la période et la zone géographique de récolte (**Burt, 2004**).

II .3.1. Terpènes et terpénoïdes

II.3.1.1. Terpènes

Les terpènes se définissent comme des hydrocarbures issus d'un couplage d'un nombre d'unités isopréniques à 5 atomes de carbone (C_5H_8), ; ils se subdivisent selon le nombre d'entités isoprènes dans un monoterpène formé de deux isoprènes (cyclique ou linéaire) ($C_{10}H_{16}$), en sesquiterpènes, formés de trois isoprènes ($C_{15}H_{24}$), leur présence est importante car ils sont responsables de produire l'odeur distincte des HEs. Ajoutant les diterpènes ($C_{20}H_{32}$), triterpènes ($C_{30}H_{48}$) et tetraterpènes ($C_{40}H_{64}$) qui sont des molécules à longue chaîne et qui se trouvent dans les HEs à faible quantité (**Sharma *et al.*, 2017 ; Alonso-Gato *et al.*, 2021 ; Angane *et al.*, 2022**).

II.3.1.2. Terpénoïdes

Ce sont des terpènes dérivés des composés ayant un ou plusieurs groupes chimiques fonctionnels (alcool, aldéhyde, cétone, acide, esters...etc.) (**Yang *et al.*, 2020**). Les groupes hydroxyles de ces terpénoïdes sont responsables de l'activité antimicrobienne des huiles comme le menthol, le thymol... etc (**Gyawali et Ibrahim, 2014**).

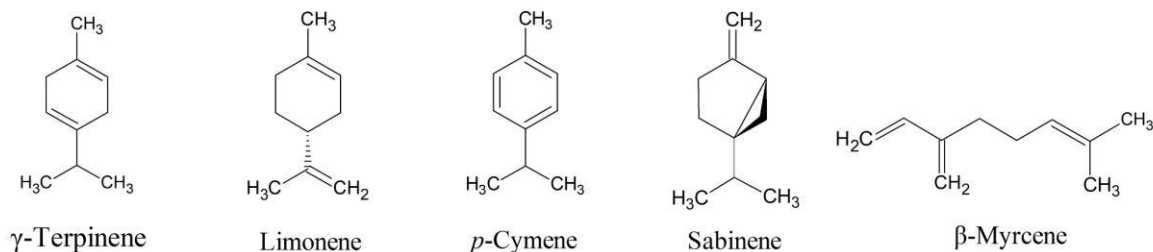
II.3.2 Composés aromatiques

Sont principalement des dérivés du phénylpropane (C_6-C_3), parmi lesquels se trouvent des aldéhydes (cinnamaldéhyde), des alcools (alcool cinnamique), des phénols (chavicol, eugénol), des dérivés méthyle (anéthol, estragol) ou méthylène dioxy (myristicine, safrol) (**Abdelli, 2017**). Ces dérivés forment un groupe de constituants naturels produits dans les plantes à partir de la phénylalanine ; sont des substances odorantes présentes dans les HEs avec une excellente activité antimicrobienne (**Yahiaoui, 2019 ; Da Silva *et al.*, 2021**).

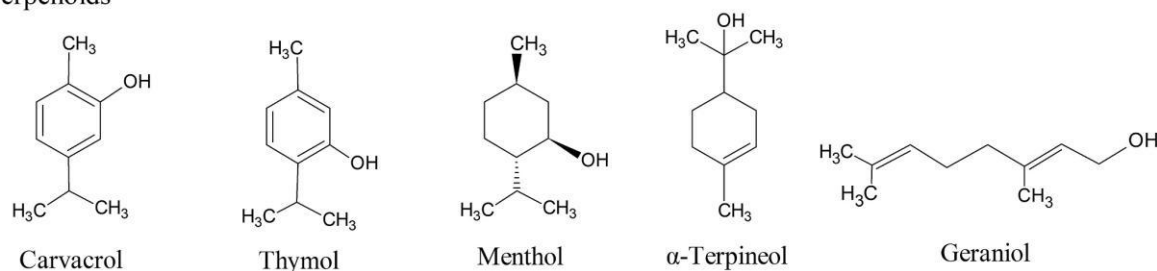
II.3.3. Autres composés

Selon le mode d'extraction utilisé, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques entraînés lors de l'hydrodistillation : carbures, acides, alcools, aldéhydes, esters, éthers ...etc. Ces composés peuvent être azotés, soufrés, carotènes ou acide gras (**Couic-Marinier et Lobstein, 2013**).

a. Monoterpenes



b. Terpenoids



c. Phenylpropanoids

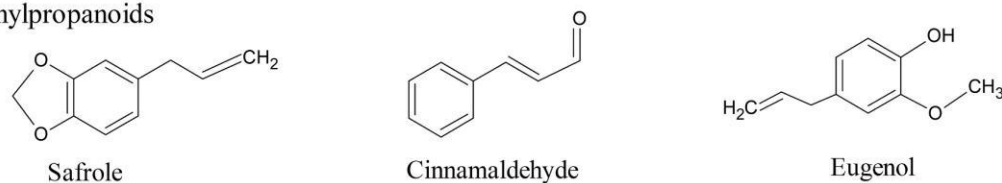


Figure 2 : Structures des terpènes (a) ; terpénoïdes (b) et phénylpropanoïdes (c)
(Da Silva *et al.*, 2021).

II.4. Méthodes d'extraction des huiles essentielles

L'extraction des HEs dépend de l'état et de la forme du matériel végétal utilisé pour déterminer leur qualité ; en effectuant des méthodes différenciées conventionnelles et classiques (Basavegowda *et al.*, 2021).

II.4.1. Méthodes conventionnelles

Ce sont les méthodes les plus utilisés puisque sont faciles et reproductibles, sans l'usage des solvants organiques. Ces méthodes sont basées sur le procédé de distillation par chauffage d'une matrice végétale pour récupérer l'HE (Gonzalez *et al.*, 2021).

Les différentes méthodes classiques utilisées pour extraire l'HE sont : hydrodistillation, extraction par solvant, extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau, hydrodiffusion et macération.

II.4.1.1. Hydrodistillation

C'est la technique d'extraction des huiles essentielles la plus utilisée et la plus ancienne, dont les composés volatiles des produits naturels sont également entraînés avec la

vapeur d'eau. Le principe de cette technique consiste à immerger la matière végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition à pression atmosphérique (**Brunetton, 2016**).

II.4.1.2. Extraction par solvant

Le caractère hydrophobe et non polaire des HEs permet leur extraction par des solvants organiques (**Reyes et al., 2014**), Cependant l'extraction des substances odorantes volatiles se fait à partir des organes de végétaux trop fragiles et qui ne supportent pas la chaleur (thermolabiles) (**Yahiaoui, 2019**).

II.4.1.3. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des HEs. Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est soumis à l'action d'un courant de vapeur sans macération. (**Boukhatem et al., 2019**).

II.4.1.4. Hydrodiffusion

C'est une co-distillation descendante ; une variante de l'entraînement à la vapeur. Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange « vapeur d'eau – huile essentielle » dispersé dans la matière végétale. L'hydrodiffusion permet d'interdire le contact entre l'eau et le matériel végétale et d'économiser l'énergie due à la réduction de la consommation de la vapeur (**Triaux, 2019**).

II.4.1.5 Macération

Il s'agit d'une technique d'extraction simple qui s'effectue à température ambiante pendant au moins 3 jours avec de fréquentes agitations, d'où le matériau en poudre se place dans le récipient fermé qui contient un solvant approprié (eau, alcool, huile) puis le laisser sous agitation jusqu'à ce que la matière soluble soit dissoute. Cette méthode permet la libération de l'HE par les composés thermolabiles. L'inconvénient de cette technique est qu'elle nécessite un long temps d'extraction et une faible efficacité d'extraction (**Basavegowda et al., 2021**).

Cependant ces méthodes présentent plusieurs inconvénients, notamment un long temps d'extraction, l'utilisation de grands volumes de solvant et d'énergie, et une éventuelle dégradation thermique et hydrolyse de certains des composants d'intérêt suite à un contact prolongé avec de l'eau bouillante ou de la vapeur (**Gonzalez et al., 2021**).

II.4.2. Méthodes avancées

Plusieurs nouvelles techniques sont actuellement disponibles pour l'extraction des HEs à partir des plantes. Ces huiles peuvent augmenter l'efficacité de la production et contribuer à la protection de l'environnement en réduisant l'utilisation de solvants et d'énergie fossile, ou la

génération de substances dangereuses (**Reyes et al., 2014**). Comme elles peuvent améliorer les performances d'extraction réduisent le temps d'extraction et la consommation d'énergie pour obtenir des extraits organiques. Cependant Ces méthodes améliorent le rendement d'extraction des composés organiques en appliquant une énergie micro-ondes ou ultrasonique, qui peut détruire les parois cellulaires de la matrice végétale, permettant aux composés de mieux s'écouler du matériel biologique (**Gonzalez et al., 2021**). Parmi les méthodes avancés d'extraction on site : extraction par ultrasons, extraction assisté par micro-ondes et extraction par fluides supercritiques.

II.4.2.1. Extraction assistée par ultrasons

C'est une méthode simple, efficace et peu coûteuse qui utilise pour l'extraction des ondes sonores de haute intensité. C'est un procédé efficace et propre car il permet l'intensification et la sélectivité des HEs en stimulant leur libération à partir des matières végétales. De plus, les ultrasons augmentent la pénétration du solvant dans la paroi cellulaire des plantes par cavitation, ce qui facilite à son tour la libération des produits intracellulaires de la plante (**Chemat et al., 2017**).

II.4.2.2. Extraction assisté par micro-ondes

C'est une méthode qui est basée sur le chauffage par micro-ondes dans lequel l'HE libérée de la matière végétale est emportée par la vapeur d'eau ; c'est une autre technique où les micro-ondes sont appliquées pour accélérer l'extraction de l'HE où un taux d'extraction plus élevé peut-être atteint avec des coûts de processus réduits (**Radivojac et al., 2021**).

II.4.2.3. Extraction par fluides supercritiques

C'est une méthode d'extraction utilisée pour extraire des HEs telles que le thym, le romarin..., c'est une alternative bien documentée et efficace pour obtenir des parfums, fragrances et principes actifs purs sans traces de solvants. Les matières végétales sont placées à l'intérieur d'une cuve d'extraction dans laquelle le SCF est chargé par le bas sous un débit spécifique à travers une vanne de dépressurisation jusqu'à ce que les conditions d'extraction soient atteintes. Cette méthode est la plus couramment utilisée vu ses paramètres critiques modestes (**Basavegowda et al., 2021**).

II.5. Conservation des huiles essentielles

La majorité des molécules constitutives des huiles essentielles sont insaturées, ce qui les rend instables et sensibles à l'altération. Les réactions secondaires telles que le réarrangement moléculaire, la polymérisation, hydrolyse, oxydation, fermentation, etc. En prenant certaines précautions, il est possible de limiter ces dégradations : L'utilisation de

flacons de faible volume en aluminium, en acier inoxydable ou en verre brun, entièrement remplis et fermés de manière étanche, stockage à basse température à 4 °C, et conservation sous atmosphère d'azote (Aljaafari *et al.*, 2021).

II.6. Mécanisme d'action et activités biologiques des huiles essentielles

II.6.1. Mécanisme d'action des huiles essentielles

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K⁺) : ce mécanisme a été observé avec l'huile de l'arbre à thé sur les bactéries Gram⁺ (*Staphylococcus aureus*) et Gram⁻ (*E. coli*) et levure (*Candida albicans*) *in vitro*. Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP. Une inhibition de la décarboxylation des acides aminés chez *Enterobacter aerogenes* a aussi été rapportée. Les huiles essentielles peuvent aussi inhiber la synthèse de l'ADN, ARN, des protéines et des polysaccharides (El amri *et al.*, 2014).

II.6.2. Activités biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont produites par des plantes de la famille des Composées, des Ombellifères qui fonctionnent comme des attractifs pour les pollinisateurs, des déterminants de la structuration de la végétation ou des facteurs de régulation de la structure communautaire via l'allélopathie. Une étude plus approfondie a révélé que les huiles essentielles possèdent diverses activités biologiques telles qu'une activité antioxydant, cytotoxique, anti-inflammatoire, antimicrobienne, etc. Dans la plupart des cas, les activités biologiques d'une huile essentielle particulière sont déterminées par un ou deux de ses principaux composants, mais un effet synergique peut se produire dans d'autres circonstances (Zhou *et al.*, 2019).

II.6.2.1. Activité antifongique

Les maladies fongiques peuvent avoir différentes conséquences sur les plantes telles que des altérations de leur physiologie, pour cela, différentes huiles essentielles de plantes (et leurs constituants dominants) ont prouvé une activité antifongique contre différents champignons phytopathogènes disant que leurs mécanismes d'action sont inconnus mais

peuvent être liés à leur capacité à dissoudre/perturber l'intégrité des membranes et des parois cellulaires des champignons. Comme dans différentes études, les propriétés antifongiques sont basées sur l'inhibition de la croissance mycélienne fongique *in vitro*. (**Alonso-Gato et al., 2021**).

II.6.2.2. Activité antioxydante

Les antioxydants neutralisent les substances instables appelées radicaux libres développés sous la forme d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui sont responsables du stress oxydatif, des dommages à l'ADN et des dommages aux membranes cellulaires et à d'autres parties de la cellule. Cependant, l'activité antioxydante des HEs dépend de la présence de composants bioactifs capables d'éteindre ces radicaux peroxydes ou d'inhiber la réaction d'oxydation des matières organiques (**Nascimento et al., 2020**).

II.6.2.3. Activité anticancéreuse

Les huiles essentielles et le cancer sont des sujets d'actualité, les chercheurs essayant d'impliquer les huiles essentielles dans la guérison du cancer (**Patharakorn et al., 2017**). L'utilisation des huiles essentielles pour traiter le cancer est un exemple de thérapie alternative cependant certaines huiles de diverses espèces végétales ont montré leurs activité anticancéreuse (**Sharma et al., 2023**).

II.6.2.4. Activité anti-inflammatoire

Les huiles essentielles ont été signalées comme ayant un fort potentiel anti-inflammatoire. La plupart d'entre eux ont d'abord été reconnus et impliqués dans le traitement des maladies oxydatives et inflammatoires. L'herbe la plus populaire *Cymbopogon citratus* a été utilisée comme agent anti-inflammatoire et analgésique (**Wani et al., 2021**).

II.6.2.5 Activité antivirale

Il a été démontré que les huiles essentielles ont un énorme potentiel antiviral contre différents types de virus causant des maladies chez l'homme. L'action antivirale d'un mélange d'oléorésines et d'huiles essentielles de différentes herbes aromatiques et plantes médicinales a été évaluée contre le virus de la bronchite infectieuse à coronavirus à la fois *in vivo* et *in vitro* (**Wani et al., 2021**).

II.6.2.6. Activité antimicrobienne

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour la recherche et le développement de nouveaux agents antimicrobiens provenant de diverses sources pour lutter contre la résistance microbienne. Par conséquent, une plus grande attention a été accordée au dépistage de l'activité antimicrobienne et à ses méthodes d'évaluation (**Lopes et al., 2020**).

Toutes les huiles essentielles testées jusqu'à présent ont montré une certaine activité antimicrobienne. Cette activité varie d'une huile essentielle à l'autre et d'une souche microbienne testée à l'autre, mais elle est toujours dose-dépendante. L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est strictement liée à leur composition chimique. Les constituants et leurs concentrations relatives dans les huiles essentielles ne dépendent pas seulement de l'espèce végétale (**Kalemba et kunich, 2003**).

Les huiles essentielles ont été étudiées en tant qu'agents antimicrobiens potentiels ces extraits de plantes pourraient non seulement être utilisés pour lutter contre les infections cutanées par exemple, mais également jouer un rôle dans la conservation des aliments en raison de leur activité antimicrobienne combinée à leur propriété antioxydante (**Ramsey et al., 2020**).

II.7. Rôle des huiles essentielles

Les composés organiques des essences volatiles émis par les plantes jouent un rôle très important dans la formation des nuages et l'augmentation des degrés de précipitation aboutissant à la formation des gouttelettes. Cela est également admis que leur libération résulte d'une réponse à un événement extérieur et favoriserait un chimiotropisme attirant ainsi les insectes pollinisateurs mais aussi, un mécanisme de défense contre des agressions externes (insectes, chaleur, sécheresse, présence de polluants tels que l'ozone) (**Soualeh et Soulimani, 2016**).

II.8. Domaines d'utilisation des huiles essentielles

Les HEs peuvent être utilisées de diverses manières, notamment comme substituts aux traitements traditionnels, comme parfums d'ambiance, ingrédients de cuisine ou composants de cosmétiques et de produits ménagers à fabriquer soi-même. De plus, puisque ces produits sont disponibles en pharmacie et parapharmacie, ils sont de plus en plus souvent vendus dans les supermarchés, les magasins biologiques, les jardinerie et sur Internet. Les points de vente sont également nombreux. La qualité des produits et des conseils diffère en fonction du lieu d'achat (**Noury et al., 2022**). Les huiles essentielles sont connues pour leur utilisation dans plusieurs domaines. Ils sont utilisés en médecine pour traiter diverses maladies telles que les rhumatismes, la fièvre et le diabète, et elles ont également des effets antioxydants, antifongiques et insecticides. Elles sont utilisées en industrie comme arômes pour améliorer la saveur et empêcher l'oxydation des aliments (**Irshad et al., 2020**).

II.9. Composition des huiles essentielles étudiées

Dans notre travail, nous sommes avons étudié trois huiles essentielles suivantes : *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L. et *Syzygium aromaticum* L., Celles-ci, sont composées de diverses molécules bioactives tels que le thymol, l'eugénol, le p-cymène, le α -pinène, le carvacrol, Ces composés bioactifs sont reconnus d'avoir de nombreuses activités thérapeutiques (antibactériennes, antiinflammatoires, antifongiques, antioxydants, etc) (tableau II).

Tableau II : Composés bioactifs des huiles essentielles étudiées.

Huile essentielle	Composé bioactif	Propriété	Référence
Thym (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	Thymol, p-cymène Carvacrol, α -pinène	Antiparasitaires Antibiofilm Anti-inflammatoire Antibactérienne	Kowalczyk <i>et al.</i>, 2020 ; Winska <i>et al.</i>, 2019
Origan (<i>Origanum vulgare</i> L. <i>ssp.</i> <i>Glandulosum</i>)	Thymol carvacrol γ - terpinène p-cymène	Antibactérienne Antifongique Antioxydant	Leyva-López <i>et al.</i>, 2017 ; Ali <i>et al.</i>, 2020
Clou de girofle (<i>Syzygium</i> <i>aromaticum</i> L.)	Eugénol Acétate d'Eugényle β -caryophyllène	Anti-infectieux Antioxydante Anti-inflammatoire Antimicrobienne	Barbelet, 2015 ; Batiha <i>et al.</i>, 2020

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

I.1. Huiles essentielles étudiées

Dans ce présent travail, trois huiles essentielles sont étudiées. Il s'agit de *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L. sp. et *Syzygium aromaticum* L. (achetées à la pharmacie). La photographie des HEs est présentée dans la figure 3.



Figure 3 : Photographie des huiles essentielles étudiées.

I.2. Souches bactériennes testées

Dans cette étude, nous avons testées cinq souches bactériennes (tableau III), afin d'évaluer l'inhibition de la formation des biofilms par les huiles essentielles étudiées.

Tableau III : Tableau représentatif des souches testées.

Souche	Référence
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebseila pneumoniae</i>	Souche de laboratoire
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 6633
<i>Vibrio sp</i>	Souche de laboratoire
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 433300

ATCC: American type culture collection

II. Méthodes

II.1. Etude de la formation des biofilms

II.1.1. Test au rouge Congo (Evaluation qualitative)

La gélose au rouge Congo (8 g/L) permet la détection de souches productrices de biofilm. Le milieu BHI, additionné de Rouge Congo et de saccharose (annexe I), est ensemencé en stries avec la souche à tester. La lecture est faite après une nuit d'incubation à 37 °C et 24 heures supplémentaires à température ambiante. Les souches productrices de biofilm donnent des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges, à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variable donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir (Ziebuhr *et al.*, 2001).

II.1.2. Production d'exopolysaccharide (test quantitatif)

C'est une technique qui permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm décrite par Christensen *et al.* 1982 (Yang *et al.*, 2019). A partir d'une boîte de culture de 24h, ensemencer 30 mL de bouillon BHI (Brain Heart Infusion) supplémenté de 1 % de glucose puis incubé à 37 °C pendant 24 h (Poliana *et al.*, 2012). Les cellules bactériennes ont été éliminées par centrifugation (4000 × g pendant 10 min, 20 °C), et deux volumes d'éthanol froid à 95 % ont été ajoutés à un volume de culture et maintenus à 4 °C pendant 24 h pour précipiter les EPS. Ensuite, les précipités obtenus ont été récupérés par centrifugation (2000 × g, 10min, 4 °C), lavés avec de l'eau distillée et séchés à 60 °C jusqu'à obtention d'un poids constant. Le poids séché a ensuite été mesuré pour déterminer la quantité d'EPS produite par les souches testées (Albuquerque *et al.*, 2018).

II.2. Test d'inhibition de la formation de biofilm

Les souches cibles sont d'abord repiquées sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Muller Hinton (MH), puis incubées à 37 °C pendant 24 heures pour l'obtention d'une culture jeune. Une ou plusieurs colonies bien isolées de chaque culture pure sont prélevées et transférées dans 9 mL d'eau physiologique afin de préparer une suspension bactérienne de 10⁸ unités formant colonies (UFC/mL) qui correspond aux normes de McFarland équivalentes à une densité optique de 0,5 à une longueur d'onde de 630 nm.

II.2.1. Inhibition de la production de biofilm sur microplaques

Pour évaluer la formation de biofilm des souches étudiées sur des plaques de polystyrène, une méthode semi-quantitative a été utilisée, comme décrit par **Ait Ouali et al (2014)**. Brièvement, 50 μL de chaque suspension bactérienne (10^8 UFC/mL) et 50 μL de différentes dilutions, allant de 1/2 jusqu'à 1/128, des huiles essentielles testées, ont été ajoutées aux puits de microplaques stériles à 96 puits déjà remplis de 100 μL de bouillon Mueller Hinton (MH). Les microplaques ont été laissées pendant 15 minutes sous légère agitation avant d'être incubées à 37 °C. Après 24 heures, les cultures ont été aspirées et les cellules non adhérentes ont été éliminées par deux lavages des puits avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, 10 mM, pH 7,2). Ensuite, 200 μL d'éthanol à 96 % ont été ajoutés à chaque puits afin de fixer les cellules adhérentes. Après 15 minutes de fixation, les puits ont été égouttés, séchés et colorés avec du cristal violet à 1 % pendant 30 minutes. Les cellules colorées ont été lavées deux fois avec 200 μL de PBS avant d'extraire le colorant avec 200 μL d'éthanol à 96 %. Le nombre de cellules a été quantifié à l'aide d'un lecteur de microplaques en mesurant l'absorbance (A) à 630 nm (**Stepanovic et al., 2000**).

En considérant A_c comme absorbance du contrôle (milieu MH inoculé avec la souche cible), les interprétations suivantes ont été appliquées :

$A \leq A_c$: non adhérent (non producteur de biofilm);

$2 A_c \geq A > A_c$: faiblement adhérent (producteur de biofilm faible);

$4 A_c \geq A > 2 A_c$: modérément adhérent (producteur de biofilm modéré);

$A > 4 A_c$: fortement adhérent (producteur de biofilm fort) (**Ait Ouali et al., 2014**).

II.2.2. Inhibition de la production de biofilm sur tubes

Dans cette méthode décrite par **Merritt et al. (2005)**, 250 μL de chaque suspension bactérienne et 250 μL des huiles testées sont ajoutés aux tubes déjà remplis par 500 μL de bouillon Mueller Hinton (MH). Les tubes ont été laissés pendant 15 minutes sous légère agitation avant d'être incubées à 37 °C. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, deux tests sont réalisés :

1. Pour ce deuxième test, les surnageants ont été aspirés par micropipette puis lavés deux fois par PBS. La paroi des tubes a été grattée à l'aide d'une pipette pasteur. Ensuite, 1 mL de l'eau physiologique ont été ajoutés. Une fois mélangé par un vortex, 100 μL de la suspension

bactérienne ont été ajoutés à 9 mL d'eau physiologique. Enfin, un dénombrement en surface a été réalisé en prélevant 100 μ L de ce mélange et les ensemencés sur des boîtes de Pétri gélosées.

2. Les cultures ont été aspirées et les cellules non adhérentes ont été éliminées par deux lavages avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, 10 mm, pH 7,2). Ensuite, 200 μ L d'éthanol à 96 % ont été ajoutés à chaque tube afin de fixer les cellules adhérentes. Après 15 minutes de fixation, les tubes ont été égouttés, séchés et colorés avec du cristal violet à 1 % pendant 30 minutes. Les cellules colorées ont été lavées deux fois avec 200 μ L de PBS avant d'extraire le colorant avec 200 μ L d'éthanol à 96 %. Le nombre de cellules a été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre en mesurant l'absorbance (A) à 630 nm.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

I.1. Evaluation qualitative de la production des exopolysaccharides (Test au rouge Congo)

La production des exopolysaccharides des cinq souches testées a été évaluée par une technique qualitative classique, qui est la méthode au Rouge Congo. Les résultats sont illustrés dans la figure 4 et décrits dans le tableau V.

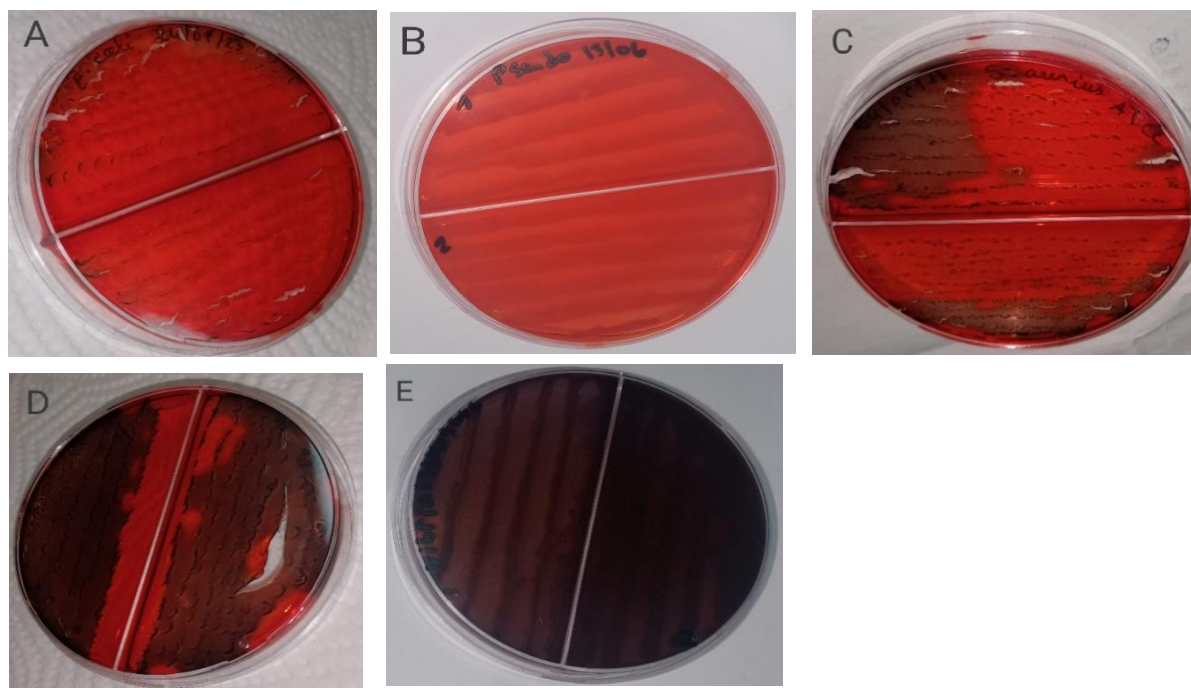


Figure 4 : Production d'exopolysaccharides par les souches *E. coli* (A), *Pseudomonas* (B), *S. aureus* (C), *K. pneumoniae* (D) et *Vibrio* sp. (E).

Tableau IV : Production d'exopolysaccharides sur le milieu au rouge Congo.

Souche	Couleur
<i>Vibrio sp</i>	Tapis noir
<i>Escherichia coli</i>	Colonies noirs
<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonies noirs
<i>Klebseila pneumoniae</i>	Colonies noirs
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonies noirs

D'après la figure 4 et le tableau V, un noircissement des colonies sur les boîtes de Pétri ensemencées par les souches *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *Vibrio sp.*, a été observé, ceci indique la production d'exopolysaccharides par ces souches. Tandis que les boîtes de Pétri ensemencées par la souche *Pseudomonas aeruginosa* n'a présenté aucun noircissement des colonies ; ce qui indique que cette dernière n'est probablement pas productrice d'EPS ou bien les conditions de culture ne sont pas optimales. L'étude réalisée par **Filoux et Vallet (2003)**. a révélé que certaines souches de *Pseudomonas* sont capables de produire des exopolysaccharides. Une production d'exopolysaccharides par la souche *S. aureus* est aussi observée par **Terki et al. (2021)**.

I.2. Evaluation quantitative de la production d'exopolysaccharides

Afin de s'assurer de la production d'exopolysaccharides par les souches testées, une extraction et quantification de ces derniers a été évaluée par gravimétrie. Cette méthode bien que simple mais imprécise. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau V.

Tableau V : Résultats de l'évaluation quantitative.

Souche	Quantité d'EPS produite (mg)
<i>Escherichi coli</i>	15,9 ± 2,12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11 ± 1,41
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pas de production
<i>Vibrio sp.</i>	12,95 ± 1,20
<i>Staphylococcus aureus</i>	28,9 ± 2,69

Les résultats obtenus dans ce présent travail, pour la détermination du poids sec représentant la quantité d'EPS produite par chaque souche, ont révélé les souches productrices d'EPS et qui sont donc capables de former un biofilm. D'après le tableau V, les souches sont avérées capables de produire des EPS à des quantités plus ou moins variables selon l'espèce selon l'ordre décroissant suivant : *S. aureus*, *E. coli*, *Vibrio sp.* et *K. pneumoniae*. Le résultat obtenu pour l'espèce *P. aeruginosa* confirme son incapacité à produire des EPS.

I.3. Résultats des tests d'inhibition de la formation de biofilm**I.3.1. Inhibition de la production de biofilm sur microplaques**

L'effet inhibiteur des trois huiles essentielles étudiées (origan, thym et clou de girofle) sur la formation du biofilm par les souches cibles productrices d'EPS a été effectué par la méthode des microdillutions sur microplaques de 96 puits (figure 5). Les résultats de la mesure des absorbances (à 630 nm) sont récapitulés dans le tableau V.

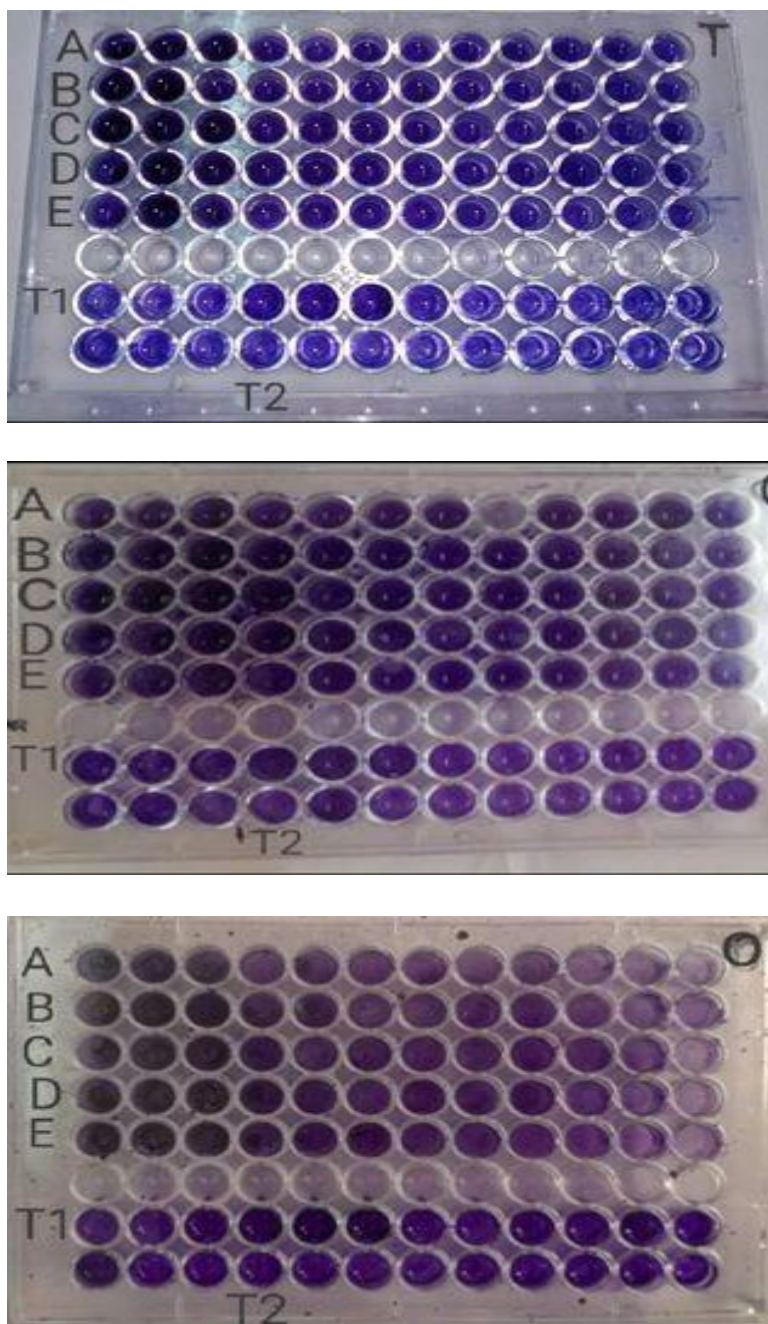


Figure 5 : Aspect des microplaques des trois huiles (thym, clou de girofle, origan) sur les souches : *E. coli* (A), *S. aureus* (C), *K. pneumoniae* (D) et *Vibrio* (E).

La figure 5 montre l'aspect visuel des biofilms formés dans les puits témoins (milieu inoculé par les souches testées) et les puits traités par les HEs étudiées. La masse du biofilm mesuré par l'absorbance du cristal violet à 630 nm, était relativement importante dans les puits témoins, la coloration est vraiment accentuée dans les puits traités par les HEs à fortes concentrations. Ceci est dû à l'interaction des HEs avec le polystyrène des microplaques qui a

provoqué un blanchiment des puits et une agrégation du cristal violet dans les interstices du polystyrène ce qui a engendré de fortes absorbances et faussant ainsi nos résultats.

De ce fait, une autre microplaque (figure 6) a été utilisée cette fois ci pour étudier l'effet inhibiteur de l'HE de clou de girofle, à de plus faibles concentrations, sur la formation du biofilm de *Vibrio sp.* .

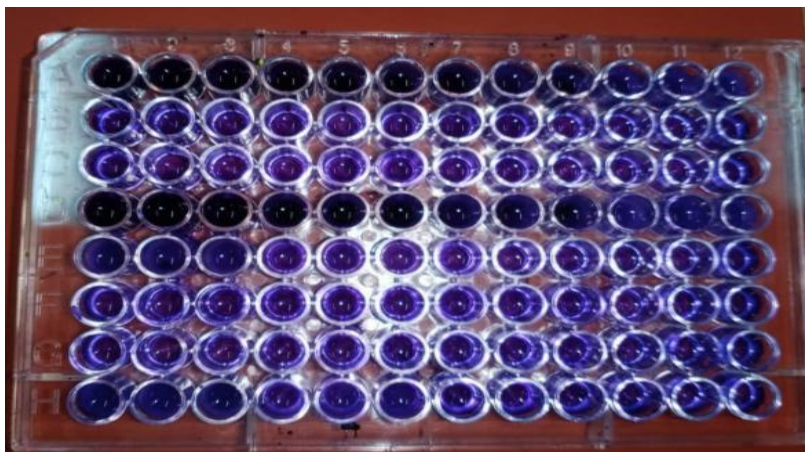


Figure 6 : Aspect de la microplaque de l'HE du clou de girofle contre *Vibrio sp.*

La figure 6 montre la biomasse formée par *Vibrio sp.* dans les puits témoins (milieu inoculé par cette souche) et les puits traités par l'HE de clou de girofle. La masse du biofilm mesuré par l'absorbance du cristal violet à 630 nm, était importante dans les puits témoins avec une moyenne des absorbances de 1,178. Alors que les valeurs des absorbances des puits traités par l'HE du clou de girofle étaient relativement faibles aux dilutions 1/32, 1/64 et 1/128 ($A = 0,81 ; 0,78 ; 0,78$, respectivement). Ceci indique la capacité de cette huile essentielle à inhiber relativement l'adhésion des cellules et donc la formation du biofilm.

I.3.2. Inhibition de la production de biofilm sur tubes

L'inhibition de la formation de biofilm a été également testée sur tube pour l'HE de clou de girofle vis-à-vis *Vibrio sp.* et *E. coli*, par coloration au cristal violet et aussi par la détermination des UFC, ceci pour une meilleure visualisation du biofilm et la quantification des cellules adhérentes après élimination des cellules planctoniques. Cette méthode (dénombrement) bien plus longue, évite l'un des inconvénients de l'essai au cristal violet : ce dernier colore non seulement les cellules mais également tout matériau adhérent à la surface et par conséquent, la coloration au cv peut surestimer le nombre de bactéries adhérentes (Merritt *et al.*, 2005).

Les résultats présentés dans les figures 7 et 8 montrent l'apparition d'un anneau et d'une pellicule sur les parois des tubes témoins révélant ainsi la formation du biofilm contrairement aux tubes ayant reçu de faibles concentrations en HE où on observe leur absence, ce qui indique que les cellules n'ont pas pu s'adhérer au paroi du tube en polystyrène et donc étaient retirées dans le surnageant. Les concentrations les plus élevées en HE ont, comme on l'observe dans les figures, provoqué l'altération des tubes avec un aspect blanchâtre comme précédemment souligné dans les microplaques.

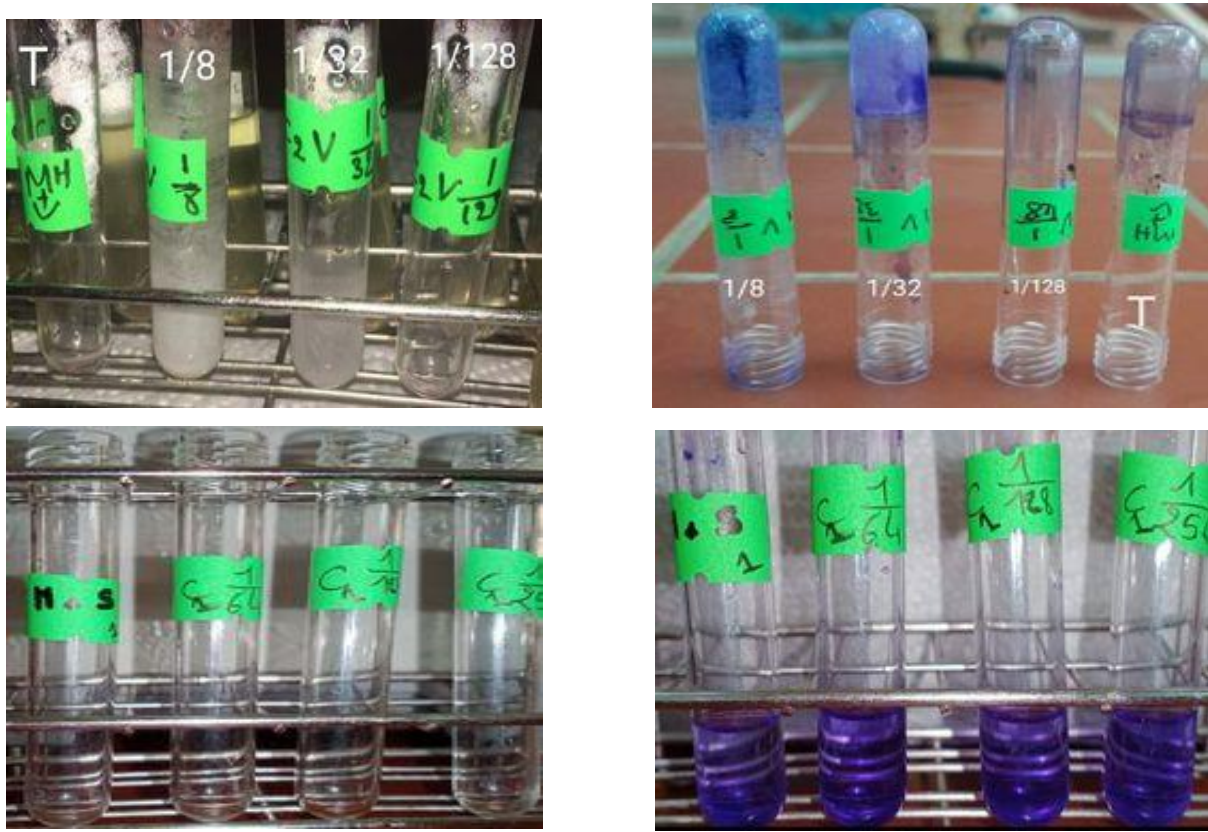


Figure 7 : Effet de l'HE de clou de girofle sur l'inhibition de la formation de biofilm de *Vibrio sp.* (A) et d'*E. coli* (B).

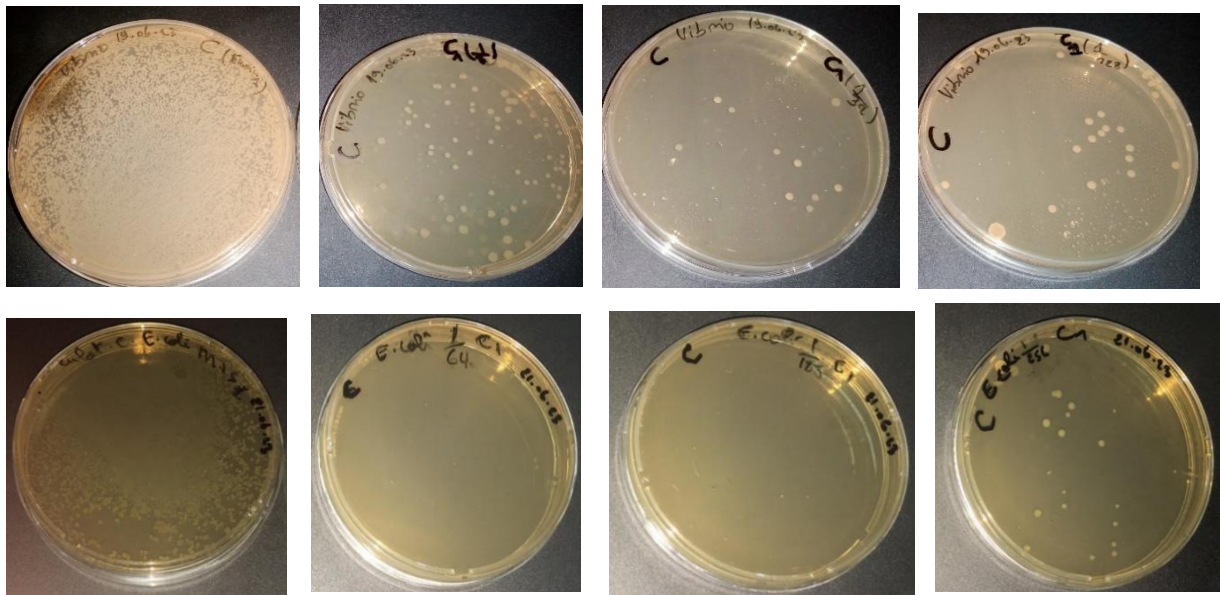


Figure 8 : Résultats du dénombrement de *Vibrio sp.* (A) et d'*E. coli* (B) après traitement par l'HE de clou de girofle.

Les quantifications de cellules planctoniques adhérentes et en suspension dans les tubes ont également été effectuées pour vérifier s'il y a réellement une diminution de la masse du biofilm en présence de l'HE et non à une agrégation du CV dans la matrice du polystyrène.

Les boîtes de Pétri témoin (milieu inoculé par les souches) ont montré une forte charge bactérienne contrairement aux boîtesensemencées à partir des tubes traités avec l'HE, où des UFC les plus faibles voire inexistantes ont été observées lorsque les souches *E. coli* et *Vibrio sp.* ont été cultivées en présences de l'HE de clou de girofle à des concentrations croissantes allant de 1/64 à 1/256. Cette absence de colonie indique la capacité de l'HE du clou de girofle à inhiber la formation du biofilm.

Conclusion

Conclusion

Les biofilms ont un impact écologique et économique considérable. Ils jouent un rôle dans la survie et la sélection des bactéries dans l'environnement, mais ont aussi de nombreux effets indésirables, notamment en santé publique. Ce travail ayant pour but la détermination de l'activité antibiofilm de trois huiles essentielles thym, origan et clou de girofle *vis-à-vis* de cinq souches (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Vibrio sp.* et *S. aureus*).

La méthode au rouge Congo (évaluation qualitative) ainsi que l'évaluation quantitative ont révélé que les souches *K. pneumoniae*, *Vibrio sp.*, *S. aureus* et *E. coli* sont capable de produire des exopolysaccharides.

Les données expérimentales des microplaques ont démontré que l'huile essentielle du thym possède une activité antibiofilm à l'égard de la majorité des souches testées. Et le clou de girofle a une forte activité antibiofilm *vis-à-vis* les deux souches *Vibrio sp.* et *E. coli*.

Le dénombrement sur boîte a démontré que les souches *Vibrio sp.* et *E. coli* sont modérément formatrices de biofilm qui a été inhibé par *Syzygium aromaticum L.* cela indique l'efficacité de cette huile sur les deux souches. En perspectives, il serait souhaitable de :

- Améliorer l'évaluation de l'activité antibiofilm des huiles essentielles étudiées ;
- Elargir la gamme des souches cibles ;
- Déterminer le profil chimique des huiles essentielles étudiées et tester leurs composés actifs.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abebe, G. M. (2020). The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination. *International journal of microbiology*, 2020.

Abdelli, W. (2017). Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris*, Thèse de doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem. 214 p.

AFNOR, 2000. Normes française : huile essentielle. Paris, Association Française de Normalisation.

Ait Ouali, F.; Al Kassaa, I.; Cudennec, B.; Abdallah, M.; Bendali, F.; Sadoun, D.; Chihib, N.-E.; Drider, D. (2014). Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *Int. J. Food Microbiol.*, 191, 116–124.

Akbas M.Y. (2015). Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. pp 383- 394.

Ali, H., Al-Khalifa, A. R., Aouf, A., Boukhebt, H., & Farouk, A. (2020). Effect of nanoencapsulation on volatile constituents, and antioxidant and anticancer activities of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. essential oil. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9.

Aljaafari, MN, AlAli, AO, Baqais, L., Alqubaisy, M., AlAli, M., Molouki, A., ... & Lim, SHE (2021). Tour d'horizon des applications thérapeutiques potentielles des huiles essentielles. *Molécules*, 26 (3), 628.

Alonso-Gato, M., Astray, G., Mejuto, J. C., & Simal-Gandara, J. (2021). Essential Oils as Antimicrobials in Crop Protection. *Antibiotics* 2021, 10, 34.

Ammek M, B. F. (2019). Evaluation de la capacité des souches de *Pseudomonas spp* à former des biofilms.

Angane, M., Swift, S., Huang, K., Butts, C. A., & Quek, S. Y. (2022). Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry. *Foods*, 11(3), 464.

Aumeran, C., Balestrino, D., Forestier, C. (2020), Biofilms bactériens et santé, Encyclopédie de l'Environnement, [en ligne ISSN 2555-0950] url : <http://www.encyclopedie-environnement.org/?p=11013>

Basavegowda, N., & Baek, K. H. (2021). Synergistic antioxidant and antibacterial advantages of essential oils for food packaging applications. *Biomolecules*, 11(9), 1267.

Batiha, G. E. S., Alkazmi, L. M., Wasef, L. G., Beshbishy, A. M., Nadwa, E. H., & Rashwan, E. K. (2020). *Syzygium aromaticum* L.(Myrtaceae): Traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. *Biomolecules*, 10(2).

Bellifa S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat. Université abou bekr belkaid, Tlemcen.

Blejan, E. I., Popa, D. E., Costea, T., CIOACĂ, A., Olariu, L., Ghica, M. ... & Arsene, A. L. (2021). The in vitro antimicrobial activity of some essential oils from aromatic plants. *EOs*, 20(29), 38.

Borges do Nascimento, I. J., Cacic, N., Abdulazeem, H. M., Von Groote, T. C., Jayarajah, U., Weerasekara, I., ... & Marcolino, M. S. (2020). Novel coronavirus infection (COVID-19) in humans: a scoping review and meta-analysis. *Journal of clinical medicine*, 9(4), 941.

Bouhdid, S., 2012, Les huiles essentielles de l'origan compact et cannelle de Ceylan pouvoir antibactérienne et mécanisme d'action, *Journal de pharmacie chimique*, Volume 31(3), p:142.

Boukhatem MN, Ferhat A et Kameli A. (2019). Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : Revue de littérature. *Revue Agrobiologia*. Département de Biologie et Physiologie Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 9(2),1653-1659p.

Brij Pal Singh, Sougata Ghosh, Ashwini Chauhan (2020). Development, dynamics and control of antimicrobial-resistant bacterial biofilms: *Environmental Chemistry Letter* V19. Pp1983–1993.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.

Catherine R. Armbruster and Matthew R. Parsek (2018). New insight into the early stages of biofilm formation, | vol.115 no.17.

Chaudhari, A. K., Singh, V. K., Kedia, A., Das, S., & Dubey, N. K. (2021). Essential oils and their bioactive compounds as eco-friendly novel green pesticides for management of storage insect pests: prospects and retrospects. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(15), 18918-18940.

Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 540-560.

Da Silva, B. D., Bernardes, P. C., Pinheiro, P. F., Fantuzzi, E., & Roberto, C. D. (2021). Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Science*, 176, 108463.

De Albuquerque, T.M.R.; Garcia, E.F.; De Oliveira Araújo, A.; Magnani, M.; Saarela, M.; De Souza, E.L. (2018). In Vitro Characterization of Lactobacillus Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 10, 704–716.

De Carvalho, C. C. (2018). Marine biofilms: a successful microbial strategy with economic implications. *Frontiers in marine science*, 5, 126.

Deschepper, R., 2017, Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie, Thèse doctorat université marseille, p:12et 14.

El Amri, J., Elbadaoui, K. H. A. L. I. D., Zair, T., Bouharb, H. A. Y. A. T. E., Chakir, S. A. Ĩ. D., & Alaoui, T. I. (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silene vulgaris* sur différentes souches testées. *Journal of Applied Biosciences*, 82, 7481-7492.

El-Sherbiny, G. M., & Elbestawy, M. K. (2022). A review—plant essential oils active against *Helicobacter pylori*. *Journal of Essential Oil Research*, 34(3), 203-215.

Fenghour, H., Bouabida, H., Dris, D., & Houhamdi, M. (2021). Effet antibactérien des huiles essentielles de deux plantes *Eucalyptus camaldulensis* et *Artemisia herba alba* sur certaines souches bactériennes. *Diversité des biosystèmes*, 29 (2), 73-77.

Filloux, A., & Vallet, I. (2003). Biofilm: mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Medecine/Sciences*, 19, 77-83.

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.

Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Ed. Dunod. Paris, P: 652.

Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). Mécanisme d'action antibactérienne des huiles essentielles. In *Phytothérapie anti-infectieuse* (pp. 193-208). Springer, Paris.

GRAB. (2018). Liste des produits phytosanitaires autorisés en agriculture biologique sur cultures maraîchères et fraise (p. 1-14). GRAB (Groupe de Recherche en Agriculture Biologique).

Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food control*, 46, 412-429.

Haro-González, J. N., Castillo-Herrera, G. A., Martínez-Velázquez, M., & Espinosa Andrews, H. (2021). Clove essential oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. *Molecules*, 26(21), 6387.

Irchad, M. ; Subhani, M A. ; Saqib, A. et Hussain, A. (2020). Importance biologique des huiles essentielles. *Huiles Essentielles-Huiles de la Nature*, Vol 1.

Kalembe, D., Kunich, A. (2003.): Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.

Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*, 25(18), 4125.

Lebeaux, D., Lucet, J. C., & Barbier, F. S. (2016). Nouvelles recommandations pour les infections associées au biofilm: implications en réanimation. *Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties*. *Molecules*, 22(6), 989.

Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Vazquez-Olivo, G., & Heredia, J. B. (2017). Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules*, 22(6), 989.

Lobstein, A., Couic-Marinier, F., & Barbelet, S. (2017). Huile essentielle de Clou de Girofle. *Actualités Pharmaceutiques*, 56(569), 59-61.

Marshall, J. M., Flechtner, A. D., La Perle, K. M., & Gunn, J. S. (2014). Visualization of extracellular matrix components within sectioned *Salmonella* biofilms on the surface of human gallstones. *PloS one*, 9(2), e89243.

Merrit JH, Kadouri DE, O'Toole GA. (2005). Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol*. Jul;Chapter 1:Unit 1B.1.

Akbas, M. Y., & Cag, S. (2016). Use of organic acids for prevention and removal of *Bacillus subtilis* biofilms on food contact surfaces. *Food science and technology international*, 22(7), 587-597.

Mion, S., Rémy, B., Plener, L., Brégeon, F., Chabrière, E., & Daudé, D. (2019). Quorum quenching lactonase strengthens bacteriophage and antibiotic arsenal against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Frontiers in microbiology*, 2049.

Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., ... & Huang, T. (2020). Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in microbiology*, 11, 928.

Muhsin, J., Ufaq, T., Tahir, H., & Saadia, A. (2015). Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *J Microbiol Biotechnol*, 4, 1-14.

Muzamil Ahmad Plutôt· Kuldeep Gupta· Manabendra Mandal. Biofilm microbien : formation, architecture, résistance aux antibiotiques et stratégies de contrôle. *Journal brésilien de microbiologie* (2021) 52: 1701–1718. *Journal brésilien de microbiologie* (2021) 52: 1701–1718.

Mouas, Y., Benrebaha, F. Z., & Chaouia, C. (2017). Évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *Rosmarinus officinalis* L. *Revue Agrobiologia*, 7(1), 363-370.

Noury, F., Mazetier, P., & Lohéziec-Le Dévéhat, F. (2022, August). Retrospective surveys on intoxications with essential oils. In *Annales Pharmaceutiques Françaises*.

Références bibliographiques

Nyanasegran, P. K., Nathan, S., Firdaus-Raih, M., Muhammad, N. A. N., & Ng, C. L. (2023). Biofilm Signaling, Composition and Regulation in *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 15.

Patharakorn, T., Arpornsuwan, T., Wetprasit, N., Promboon, A., & Ratanapo, S. (2010). Antibacterial activity and cytotoxicity of the leaf essential oil of *Morus rotundiloba* Koidz. *Journal of medicinal plants research*, 4(9), 837-843.

Ramsey, J. T., B. Carrie Shropshire, Tibor R. Nagya, Kevin D. Chambers, Yin Lib, and Kenneth S. Korach (2020). *Essential Oils and Health* p.291-305.

Ramsey, J. T., Shropshire, B. C., Nagy, T. R., Chambers, K. D., Li, Y., & Korach, K. S. (2020). Focus: Plant-based medicine and pharmacology: Essential oils and health. *The Yale journal of biology and medicine*, 93(2), 291.

Reyes-Jurado, F., Cervantes-Rincón, T., Bach, H., López-Malo, A., & Palou, E. (2014). Antimicrobial activity of Mexican oregano (*Lippia berlandieri*), thyme (*Thymus vulgaris*), and mustard (*Brassica nigra*) essential oils in gaseous phase. *Industrial Crops and Products*, 131, 90-95.

Roux, A., & Ghigo, J. M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie vétérinaire de France*, 159(3), 261-268.

Sadiq, F. A., Wenwei, L., Wei, C., Jianxin, Z., & Zhang, H. (2021). Transcriptional changes in *Bifidobacterium bifidum* involved in synergistic multispecies biofilms. *Microbial ecology*, 1-13.

Samrot, A. V., Abubakar Mohamed, A., Faradjeva, E., Si Jie, L., Hooi Sze, C., Arif, A., ... & Kumar, S. S. (2021). Mechanisms and impact of biofilms and targeting of biofilms using bioactive compounds—A review. *Medicina*, 57(8), 839.

Saxena P, Joshi Y, Rawat K, Bisht R. (2019). Biofilms: Architecture, Resistance, Quorum Sensing and Control Mechanisms. *Indian J Microbiol*. 2019 Mar; 59(1):3-12.

Sharma, S. H., Thulasingham, S., & Nagarajan, S. (2017). Terpenoids as anti-colon cancer agents—A comprehensive review on its mechanistic perspectives. *European journal of pharmacology*, 795, 169-178.

Barbelet, S. (2015). Le giroflier: historique, description et utilisations de la plante et de son huile *essentielle* (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

Stepanovi'c, S.; Vukovi'c, D.; Daki'c, I.; Savi'c, B.; Švabi'c-Vlahovi'c, M. (2000). A modified microliter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Method*, 40, 175–179.

Tolker-Nielsen, T., & Molin, S. (2000). Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial ecology*, 40, 75-84.

Tremblay, Y. D., Caron, V., Blondeau, A., Messier, S., & Jacques, M. (2014). Biofilm formation by coagulase-negative staphylococci: impact on the efficacy of antimicrobials and disinfectants commonly used on dairy farms. *Veterinary Microbiology*, 172(3-4), 511-518.

Triaux, Z., 2019, Développement de méthodes d'extraction et d'analyse de molécules terpéniques à activité anti-inflammatoire, thèse doctorat, chimie analytique, université de Strasbourg, p:70.

Wani, A. R., Yadav, K., Khursheed, A., & Rather, M. A. (2021). An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses. *Microbial Pathogenesis*, 152, 104620.

Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative?. *Molecules*, 24(11), 2130.

Xihong Z., Fenghuan Z, Wang J. ,Nanjing Z. (2017). Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens : food safety perspectives, V7, 36670.

Yahiaoui,M,. (2019). Application des huiles essentielles dans le domaine des emballages alimentaires, Thèse de doctorat, faculté des Sciences Mathématiques, Physiques et Naturelles de Tunis.

Yannick D.N., Skander H, et Mario J. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique *Canadian Journal of Veterinary Research* 78(2) pp 110-116.

Références bibliographiques

Wang, Y., Bian, Z., & Wang, Y. (2022). Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(19-20),

Zhang, N., & Yao, L. (2019). Anxiolytic effect of essential oils and their constituents: a review. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(50), 13790-13808.

Zhu, W., Mei, J., Zhang, X., Zhou, J., Xu, D., Su, Z., ... & Zhu, C. (2022). Photothermal Nanozyme-Based Microneedle Patch against Refractory Bacterial Biofilm Infection via Iron-Actuated Janus Ion Therapy. *Advanced Materials*, 34(51)

Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V. et Hacker J. (2001). Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology*. 336: 195-203.

Zurob, E., Dennett, G., Gentil, D., Montero-Silva, F., Gerber, U., Naulín, P., ... & Parra, C. (2019). Inhibition of wild *Enterobacter cloacae* biofilm formation by nanostructured graphene-and hexagonal boron nitride-coated surfaces. *Nanomaterials*, 9(1), 49.

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de culture utilisés pour 1 L d'eau distillée (**Guiraud, 1998**).

Bouillon Muller Hinton 1% glucose

- 21 g bouillon Muller Hinton
- 10 g glucose
- pH $7,3 \pm 0,2$

Gélose de Muller Hinton

- 38 g MH
- pH $7,3 \pm 0,2$

Gélose au Rouge Congo

- 0,8 g Rouge Congo
- 36 g saccharose
- 14 g agar
- 37 g poudre BHIB
- pH $7,4 \pm 0,2$

Annexe II : Préparation des solutions pour 1L d'eau distillée

Eau physiologique

- 9 g NaCl
- pH= 7,2 ± 0,2

Tampon PBS

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,42 g K₂HPO₄
- 0,24 g KH₂PO₄
- pH= 7,2 ± 0,2

Résumé

L'objectif de ce travail est d'évaluer la capacité de trois huiles essentielles (thym, origan et clou de girofle) à inhiber la formation de biofilms par les souches *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *Vibrio sp.* L'évaluation qualitative et quantitative de la production des exopolysaccharides par ces souches a révélé qu'à l'exception de *P. aeruginosa*, toutes les autres souches sont productrices d'EPS. Un test d'inhibition de la production de biofilm a été réalisé sur microplaques. La masse du biofilm mesurée par l'absorbance du cristal violet est vraiment importante dans les puits traités par les HEs, à de fortes concentrations. Une autre microplaque a été utilisée cette fois ci pour étudier l'effet inhibiteur de l'HE du clou de girofle, à de plus faibles concentrations, sur la formation du biofilm de *Vibrio sp.* Les faibles valeurs des absorbances des puits traités par l'HE du clou de girofle aux dilutions 1/32, 1/64 et 1/128 ($A = 0,81; 0,78; 0,78$, respectivement), ont indiqué la capacité de cette huile essentielle à inhiber l'adhésion des cellules et donc la formation du biofilm. Ceci a été confirmé par le dénombrement en surface réalisé à partir des suspensions préparées à partir des puits traités par l'HE du clou de girofle.

Mots clés: biofilm, clou de girofle, exopolysaccharides, huile essentielle, *Vibrio sp.*

Abstract

The aim of this work was to evaluate the ability of three essential oils (thyme, oregano and clove) to inhibit biofilm formation by *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *Vibrio sp.* strains. Qualitative and quantitative evaluation of exopolysaccharide production by these strains revealed that, with the exception of *P. aeruginosa*, all other strains are EPS producers. A biofilm production inhibition test was performed on microplates. Biofilm mass measured by crystal violet absorbance was really high in HE-treated wells, at high concentrations. Another microplate was used this time to study the inhibitory effect of clove EO, at lower concentrations, on *Vibrio sp.* biofilm formation. The low absorbance values of wells treated with clove EO at dilutions of 1/32, 1/64 and 1/128 ($A = 0.81; 0.78; 0.78$, respectively), indicated the ability of this essential oil to inhibit cell adhesion and hence biofilm formation. This was confirmed by surface counts carried out on suspensions prepared from clove EO-treated wells.

Keywords: biofilm, clove, exopolysaccharides, essential oil, *Vibrio sp.*