

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
Université Abderrahmane Mira de Bejaia

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



جامعة بجاية  
Tasdawit n Bgayet  
Université de Béjaïa

## Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme de

**MASTER**

### *Thème*

# **Effet des huiles essentielles sur les biofilms formés par les mammites**

Présenté par :

**M<sup>lle</sup> Idir Sana et M<sup>lle</sup> Issaadi Sara**

Soutenu le : **26 juin 2023 à 08 H 30**

Devant le jury composé de :

M<sup>me</sup> KERAMANE B.

MCB

Présidente

M<sup>me</sup> SAIDANI K.

MCB

Promotrice

M<sup>me</sup> BELHAMICHE N.

MAA

Examinatrice

**Année universitaire 2022/2023**

## **Remerciements**

*Nous remercions, en premier lieu, DIEU le tout puissant de nous avoir donné la volonté, la force et la patience pour arriver là où nous sommes aujourd'hui, aussi pour entamer et terminer ce modeste travail.*

*Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de **Mme. SAIDANI Karima**, notre chère promotrice qui nous a fait l'honneur d'avoir veillée et dirigée ce travail, nous tenons à l'adresser nos vifs remerciements et à l'exprimer nos profondes gratitude pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa gentillesse, ses conseils, sa disponibilité, son aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer.*

*Nos remerciements les plus sincères vont aux membres de jurys. À **Mme. KERAMANE B.** d'avoir accepté de nous honorer en présidant de jury d'examination, ainsi qu'à **Mlle BELHAMMICHE N.** pour l'honneur qu'elle nous a fait de bien vouloir examiner notre travail.*

*Nous tenons à exprimer toute notre gratitude à **Mme. TOUATI N.** et **Mme. MERZOUK H.** et toute l'équipe du laboratoire Microbiologie pour leurs aides, leurs conseils, leurs orientations et leur patience pour mener à bien notre travail.*

*Un très grand merci à nos familles respectives pour leurs sacrifices, leurs soutiens moraux, leurs aides et leurs encouragements.*

*Enfin, nos remerciements à tous nos proches et amies qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail avec générosité et un égard exemplaire.*



# Dédicaces



*Tout en espérant être la hauteur*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chers parents, qui m'ont aidé à aller jusqu'au bout dans mes études, qui ont été toujours là pour m'encourager et me soutenir.*

*Ma chère maman Brahimi Karima*

*La femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui s'est toujours sacrifiée pour ma réussite qui m'a envelloé de son amour et de son affection, le guide de mes désirs, le donneur avec plaisir.*

*Mon cher papa Idir Lemnouer « Abed-El-Hamid »*

*Mon bras droit, ma fierté, mon pouvoir, mon soutien et mon modèle dans cette vie, qui nous a appris vouloir c'est pouvoir, que dieu te garde à nous.*

*Aujourd'hui, je vous dire avec fierté et haute voix, merci maman ! Merci papa ! Car sans vous, je ne serais jamais arrivée seule là.*

*A mes chères sœurs Kahina, Hadjer et ma chère cousine Fatima, mes cœurs, la lumière de mes yeux. Que du bonheur, réussite et construire tous vos souhaits.*

*A mon cher frère, mon fils Mohamed, qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille, que dieu le protège.*

*A mon deuxième père, mon cher oncle Idir Saadi et sa mariée M.fairouz, pour tous ses conseils et son soutien qu'il me donne, que Dieu le protège.*

*A mes très chères grandes mères Khedidja, Dhaouia, que dieu les protèges.*

*Je profite aussi de rendre hommage à mes deux grands-pères Idir Belkacem et Brahimi Houcine qui nous ont quittés. J'aurais aimé les voir aujourd'hui parmi nous, et viens ici, afin de leur dire merci et leur rendre fiers, car c'est grâce à eux que je retrouve le courage et possède plus de force pour travailler mieux afin de réaliser mes rêves Inshallah.*

*A mes très chères tantes Nour El Houda, Nadia, Salima et Fouzia, pour tous ses orientations, ses encouragements pendant tout mon cycle d'étude.*

*A toute la famille Idir et Brahimi, je suis très fière d'être la petite-fille de ces deux familles.*

*A ma très chère binôme Sara pour sa entente et sa sympathie, avec qui j'ai partagé les plus beaux moments à l'université et durant la réalisation de ce travail.*

*A mes copines Tassadit et Souad avec qui j'ai passé les beaux moments au laboratoire pendant la réalisation de ce travail*

*Tous mes chères amies surtout khaoula, nihad, samra, pour ses aides et encouragements et ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*SANA*



## Dédicaces



*Je remercie DIEU, qui illumine ma route à chaque levée, qui me guide sur le droit chemin, qui approfondit et renforce ma foi et qui a fait de moi ce que je suis.*

*Je dédie ce travail d'abord*

*A mes très chers parents, que dieu me les garde,*

*A ma mère qui que je fasse, je ne pourrais jamais te récompenser. Pour les grands sacrifices, que tu avais fait, tu étais toujours à mes côtés et tu as créé à moi, tu es ma force et mon bonheur, que dieu te garde*

*A mon père qui peut être fier de trouver ici le résultat de longs années, de sacrifices pour m'aider à avancer dans ma vie ; que dieu fasse en sorte que tu réussisses à réaliser tes rêves les plus chères, merci pour les valeurs, nobles, l'éducation et le soutien que tu m'as apporté*

*A mes chers sœurs et frères, je demande à dieu de vous protéger et je veux voir dans les plus hauts rangs, Merci pour votre confiance et votre encouragement.*

*La vie m'a donné une autre moitié mon fiancé qui était presque un deuxième père et frère pour moi, merci à toi, j'en aurais longs et beaucoup à dire, mais ce que je ressens besoin de faire, c'est de te dire*

*Ma binôme et ma copine Sana, avec qui j'ai partagé les plus beaux moments à l'université et durant la réalisation de ce travail*

*A mes copines tassadit et Souad avec qui j'ai passé les beaux moments au laboratoire pendant la réalisation de ce travail*

*Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Sara*



Liste des abréviations  
Liste des tableaux  
Liste des figures

## Table des matières

<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. Mammites bovines .....</b>	<b>2</b>
I.1. Anatomie et physiologie de la glande mammaire .....	2
I.1.1 Description de la glande mammaire .....	2
I.2. Mammites.....	4
I.2.1. Définition .....	4
I.2.2. Symptômes des mammites .....	4
I.2.3. Classification des mammites .....	4
I.2.4. Germes contaminants les mammites .....	6
I.2.5. Traitement des mammites .....	7
<b>II. Biofilms.....</b>	<b>9</b>
II.1. Historique .....	9
II.2. Définition.....	9
II.3. Caractéristiques.....	10
II.4. Structure et composition .....	10
II.5. Régulation.....	11
II.6. Etapes de formation .....	12
a. Développement d'un film de conditionnement de surface .....	13
b. Fixation réversible et irréversible des cellules à une surface .....	13
c. Formation de micro colonies .....	14
d. Maturation et la différenciation de la biofilm avec l'expression de polymères matriciels....	14
e. Dispersion des cellules du biofilm .....	14
II.7. Facteurs favorisant la formation de biofilm.....	15
a. Propriétés des surfaces .....	15
b. Propriétés du milieu aqueux environnant.....	15
c. Propriétés des cellules .....	15
II.8. Résistance aux antibiotiques.....	15
II.9. Impacts.....	17
II.9.1. Rôle positif.....	17
II.9.2. Rôle négatif.....	17

II.10. Biofilms laitiers .....	18
II.10.1. Bactéries thermophiles.....	18
II.10.2. Bactéries psychrotrophes .....	18
<b>III. Huiles essentielles.....</b>	<b>19</b>
III.1. Historique .....	19
III. 2. Définition.....	19
III.3. Composition chimique .....	20
III.3.1. Groupe des terpènes .....	20
III.3.2 Composés des phénylpropanoïdes.....	21
III.3. Méthodes d'extraction.....	22
III.3.1. Hydrodistillation.....	22
III.3.2. Distillation à la vapeur.....	22
III.3.3. Extraction par solvant.....	22
III.3.4. Pressage à froid.....	23
III.3.5. Extraction par fluide supercritiques.....	23
III.3.6. Extraction assistée par micro-ondes .....	23
III.3.7. Extraction assistée par ultrasons.....	24
III.4. Conservation des huiles essentielles.....	24
III.5. Activités biologiques .....	24
III.5.1. Activité antioxydante.....	24
III.5.2. Activité anti-inflammatoire .....	25
III.5.3. Activité antimicrobienne .....	25
III.5.5. Activité antivirale .....	25
III.5.6. Activité antifongique .....	25
III.6. Mécanismes d'action.....	26
III.7. Domaines d'application.....	27

## **Matériel et méthodes**

<b>I. Matériel.....</b>	<b>28</b>
I.1. Matériel biologique .....	28
I.1.1. Huiles essentielles étudiées .....	28
I.1.2. Souches bactériennes testées.....	29
<b>II. Méthodes .....</b>	<b>30</b>
II.1. Etude de la formation des biofilms .....	30
II.1.1. Test au rouge Congo (Evaluation qualitative) .....	30

II.1.2. Production d'exopolysaccharide (Evaluation quantitatif) .....	30
II.2 Test d'inhibition de la formation de biofilm.....	30

### **Résultats et Discussion**

I.1. Evaluation qualitative de la production des exopolysaccharides (Test au rouge Congo) .....	33
I.2. Evaluation quantitative de la production d'exopolysaccharides .....	34
I.3. Résultats des tests d'inhibition de la formation de biofilm.....	35
I.3.1. Inhibition de la production de biofilm sur microplaques .....	35
I.3.2. Inhibition de la production de biofilm sur tubes .....	37

<b>Conclusion</b> .....	40
-------------------------	----

### **Références bibliographiques**

### **Annexe**



## Liste des abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AHL**: N-acyl homosérine lactones

**AI** : Autoinducteur

**ATB** : Antibiotique

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**EPS** : Exopolysaccharide

**HE** : Huile Essentielle

**IIM** : Infection Intra Mammaire

**MH** : Mueller Hinton

**PCA** : Plate Count Agar

**pH** : Potentiel Hydrogène

**SFME** : Solvent Free Microwave Extraction

**Qs** : Quorum Sensing

**UFC** : Unité Formant Colonie

## Liste des tableaux

Tableau I. Agents pathogènes majeurs impliqués dans les mammites .....	7
Tableau II. Composants de biofilm .....	10
Tableau III. Différents terpènes .....	21
Tableau IV. Classification des plantes aromatiques étudiées .....	29
Tableau V. Souches bactériennes testées .....	29
Tableau VI. Résultats de l'évaluation qualitative.....	34
Tableau VII. Résultats de l'évaluation quantitative.....	35

## Liste des figures

Figure 1: Anatomie de la glande mammaire .....	2
Figure 2: Différents structures .....	3
Figure 3: Différentes formes cliniques des mammites .....	5
Figure 4: Développement et structure d'un biofilm bactérien .....	12
Figure 5 : Structures de certains composés chimiques importants des huiles essentielles.....	21
Figure 6: Photographie des huiles essentielles étudiées.....	28
Figure 7: Production d'exopolysaccharides par les souches <i>E.coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>S.aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i> .....	33
Figure 8: Aspect des microplaques des trois huiles (thym, clou de girofle, origan) sur les souches : <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> et <i>K. pneumoniae</i> .....	36
Figure 9: Aspect de la microplaque de l'HE du thym contre <i>K. pneumoniae</i> .....	36
Figure 10: Effet de l'HE du thym sur l'inhibition de la formation de biofilm de <i>K. pneumoniae</i> et <i>S. aureus</i> .....	38
Figure 11: Résultats du dénombrement de <i>Klebsiella sp</i> et <i>S. aureus</i> après traitement par l'HE du thym.....	38



### Introduction

La mammite est une inflammation du parenchyme du tissu mammaire qui provoque des modifications pathologiques du tissu glandulaire (**Goulart et Mellata, 2021**), causée par des bactéries associées au biofilms (**Panda et al., 2022**) et par des agents pathogènes infectieux, en particulier *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus uberis*, *Escherichia coli* et *Klebsiella* (**Sharun et al., 2021**). Elle est l'une des maladies les plus importantes affectant l'industrie laitière, car elle réduit la production et la qualité du lait et cause ainsi de grandes pertes économiques chaque année dans le monde. Le traitement de cette maladie est l'un des plus grands défis de la profession vétérinaire car un nombre croissant d'agents pathogènes développent une résistance aux antibiotiques utilisés. Par conséquent, de nouvelles approches alternatives pour limiter l'utilisation d'antibiotiques dans le traitement du bétail sont nécessaires (**Tomanic et al., 2022**). Les biofilms sont appelés communautés complexes et sessiles de microorganismes sous forme d'agrégats, soit adhérentes à n'importe quelle surface, soit dissimulées dans une matrice extracellulaire. Des agrégats complexes de microbes sous forme de biofilm leur permettent de tolérer des conditions environnementales difficiles. Certaines bactéries pathogènes associées au biofilms peuvent causer des mammites (**Panda et al., 2022**). Plusieurs espèces et genres bactériens causant des infections chez l'animal, et ayant ou non un potentiel zoonotique, sont capables de former des biofilms. *Staphylococcus aureus* est souvent impliquée dans les cas de mammite chez la vache laitière, une maladie économiquement très importante. Il est suggéré par plusieurs chercheurs que la formation d'un biofilm favorise la persistance dans la glande mammaire tout en diminuant l'efficacité des traitements aux antibiotiques (**Tremblay et al., 2014**).

Les huiles essentielles sont des liquides aromatiques obtenues à partir de matières végétales (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines). Ce sont généralement des mélanges complexes de composés naturels, polaires et non polaires, composés principalement de terpénoïdes et de leurs dérivés oxygénés (**Bozovic et Ragno et al., 2017**). L'utilisation des huiles essentielles est ancienne et est retrouvée dans différentes cultures à travers le monde, telles que celles des Egyptiens, des Grecs, des Perses et des Chinois. Aujourd'hui, les huiles essentielles sont utilisées dans les médecines traditionnelles et complémentaires, l'aromathérapie, les massothérapies, les cosmétiques, les parfums et les industries alimentaires (**Sattayakhom et al., 2023**).

Ce travail est subdivisé en deux parties : une partie théorique qui traite des généralités sur les mammites, les biofilms et les huiles essentielles. Une partie pratique dans laquelle sont développées les différentes méthodologies suivies ainsi que les résultats obtenus et leur discussion.

## I. Mammites bovines

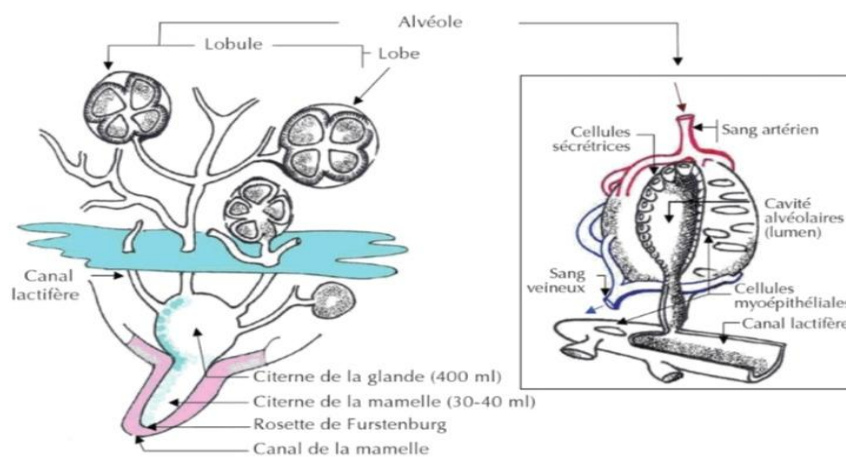
### I.1. Anatomie et physiologie de la glande mammaire

#### I.1.1 Description de la glande mammaire

La glande mammaire bovine (figure 1), également appelée mamelle ou le pis, est un organe lourd producteur de lait, 50 kg en moyenne chez une vache en lactation, pouvant parfois atteindre les 100 kg (**Remy, 2010**). Elle est divisée en deux moitiés égales (quartiers) et distinctes par un ligament suspenseur médian. Chaque moitié possède deux glandes, chacune aboutissant à un trayon qu'est constitué d'une citerne, d'un canal et d'une ouverture par laquelle le lait est évacué (figure 2). La mamelle est attachée à des muscles squelettiques qui soutiennent sa grande taille (**Shalini *et al.*, 2022**).



**Figure 1:** Anatomie de la glande mammaire (**Hanzen, 2009**).



**Figure 2 :** Différentes structures internes de la glande mammaire (Remy, 2010).

- ❖ **Alvéole** : alvéole glandulaire appelé également des acini mammaires est l'unité fonctionnelle de la glande mammaire en lactation. Chaque alvéole est tapissée d'une seule couche de cellules épithéliales mammaires liminales cuboïdales à cylindriques, qui participent principalement à la synthèse et à la sécrétion du lait, recouvert par les cellules myoépithéliales qui sont en contact direct avec la matrice extracellulaire (Shalini *et al.*, 2022).
- ❖ **Canaux galactophores** : auront pour le rôle d'acheminer le lait produit par les acini mammaires, vers la citerne du pis (20 % du lait stocké dans les canaux galactophores) (Hanzen, 2009 ; Remy, 2010).
- ❖ **Citerne** : la citerne de la mamelle reçoit le lait provenant des conduits lactifères du parenchyme mammaire. Le lait stocké (20 % du lait) dans la citerne est évacué vers les sinus du trayon, puis acheminé dans le canal du trayon (Hanzen, 2009 ; Remy, 2010).
- ❖ **Trayon** : est une structure cylindrique, creuse, d'une longueur de 5 à 7 cm et d'un diamètre de 2 à 4 cm. Sa paroi fibro-élastique, riche en fibre musculaire lisse, assure par sa souplesse, une facilité de trait. Elle est recouverte à l'extérieur par une peau glabre, dépourvue de glande, et à l'intérieur par un épithélium stratifié kératinisé (Hanzen, 2009 ; Remy, 2010).



## I.2. Mammites

### I.2.1. Définition

La mammité est une inflammation de la glande mammaire généralement causée par une infection bactérienne (**Cooper et al., 2016**), principalement des bactéries, qui se développent dans la citerne de la glande après avoir pénétré par le canal du trayon. Il s'agit de la maladie la plus répandue et la plus coûteuse dans l'industrie laitière en raison de la réduction et du rejet du lait, de l'abattage précoce involontaire, des services vétérinaires et des coûts de main-d'œuvre (**Banos et al., 2017**). La mammité entraîne une forte diminution de la production laitière et des revenus de l'exploitation. La santé publique est potentiellement menacée car la mammité peut transmettre des zoonoses et des maladies associées à des toxines alimentaires. C'est pourquoi la consommation directe de lait cru n'est pas recommandée en raison de la forte probabilité de contamination par des micro-organismes provenant de la vache, du pâturage, de la machine à traire et des récipients. La pasteurisation du lait est donc obligatoire pour garantir sa sécurité et prolonger sa durée de conservation (**Maros et al., 2020**).

### I.2.2. Symptômes des mammites

Les symptômes des mammites sont des douleurs mammaires et des signes inflammatoires comme : chaleur, rougeurs et érythème, Un tableau systémique d'intensité variable est associé (température supérieure à 38,5 °C, faiblesse, douleur articulaires, frisson, nausées...) symptômes rappelant un tableau grippal. Dans jusqu'à 80 % des cas, il existe des lésions douloureuses sur le mamelon (irritation, crevasses) (**Blanca et al., 2016**).

### I.2.3. Classification des mammites

On distingue deux formes des mammites selon la sévérité de l'infection de la mamelle : cliniques et sub-cliniques (**Paramasivam et al., 2023**).

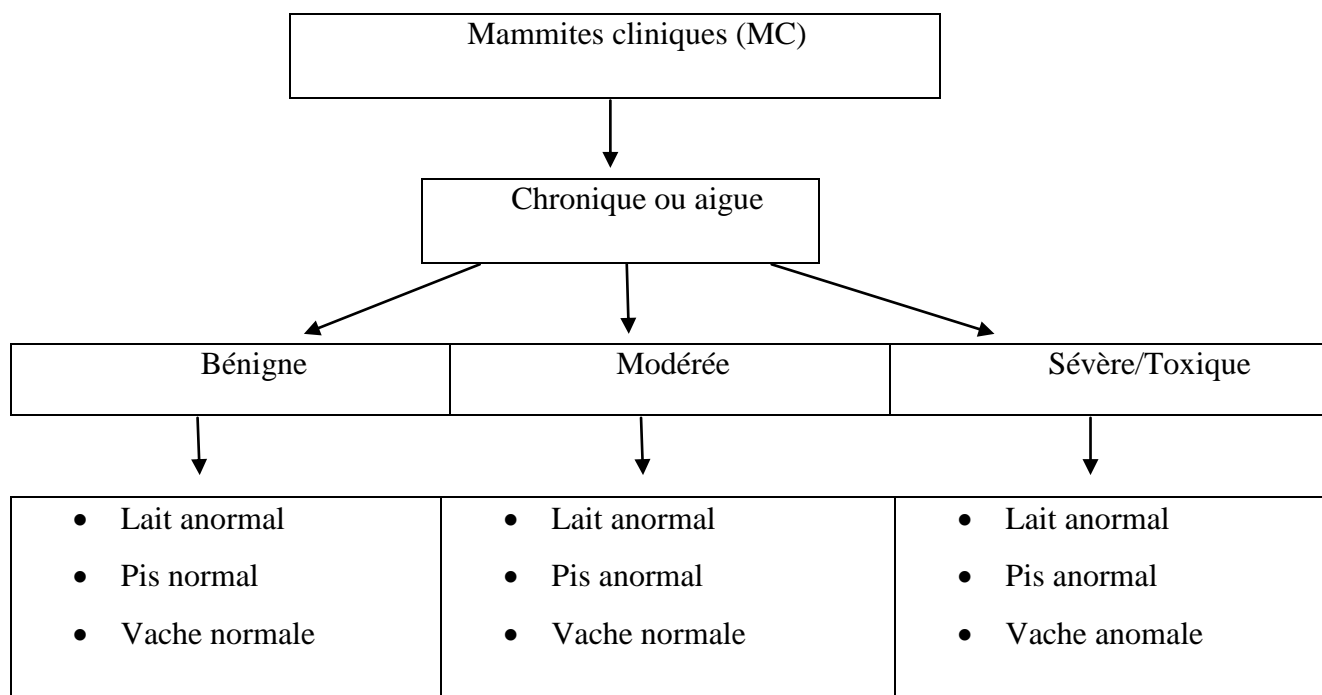
#### I.2.3.1. Mammites sub-cliniques

La mammité subclinique est une inflammation de la glande mammaire qui se produit sans signes évidents et qui peut évoluer vers une mammité clinique ou vice versa. Ce type de mammité se traduit par une diminution non évidente de la production laitière, ainsi que par des modifications de la qualité et du contenu du lait. La perte de quartier(s) ou de trayon(s) peut résulter d'une inflammation sévère ou chronique (**Abayeneh et al., 2022**). La mammité sub-clinique constitue rarement une menace immédiate pour la vie de l'animal et est 15 à 40 fois plus fréquente que la mammité clinique. Cette forme de la maladie ne peut être détectée

par l'inspection visuelle du pis ou du lait, qui semblent tous deux normaux (**Déborat brito et al., 2022**).

**I.2.3.2. Mammites cliniques**

La mammite clinique est définie comme une glande mammaire ayant des sécrétions lactées modifiées (plus aqueuses, présence de grumeaux, etc.) plus ou moins les signes cardinaux de l'inflammation (enflure, douleur, rougeur et chaleur). Elle sera considérée aigüe ou suraigüe dans la situation de changements soudains, et chronique lorsque la situation est récurrente ou continue. Elle peut aussi être qualifiée de mammite clinique bénigne (sécrétion lactées modifiées sans inflammation du pis) ou modérée (sécrétions lactées modifiées avec inflammation du pis). Lorsque la mammite cause des signes cliniques en dehors de la glande mammaire (tels que la fièvre, une déshydratation de l'animal, une baisse ou un arrêt de l'appétit, de la faiblesse, etc.), cette condition est généralement considérée comme une mammite clinique aigüe ou sarigüe sévère et toxique (figure 3) (**Philippe, 2004**).



**Figure 3 :** Différentes formes cliniques des mammites (**Philippe, 2004**).

#### **I.2.4. Germes contaminants les mammites**

Plus de 140 organismes potentiellement pathogènes ont été identifiés comme étant à l'origine de la mammite des vaches. La maladie est divisée en quatre catégories en fonction de l'organisme impliqué : la mammite bactérienne, mycosique/fongique/algique, mycoplasmique et nocardique. Les virus ont une importance clinique mineure. La mammite est une maladie multifactorielle impliquant les microbes, l'hôte et l'environnement. Selon l'épidémiologie, la mammite est classée comme contagieuse ou environnementale (**Abayeneh et al., 2022**).

##### **I.2.4.1. Germes pathogènes majeurs**

Les germes pathogènes majeurs sont appelés ainsi majeurs du fait de leur importance tant économique qu'épidémiologique (**Remy, 2010**), sont scindés à leur tour en deux groupes distincts : contagieux et environnementaux (Tableau I) (**Abayeneh et al., 2022**).

###### **I.2.4.1.1. Micro-organismes contagieux**

La mammite contagieuse est une infection intra mammaire (IIM) transmise d'une vache dont la mamelle est infectée à une vache saine (**Abayeneh et al., 2022**). Les agents pathogènes contagieux sont adaptés pour survivre au sein de l'hôte et se propagent d'une vache à l'autre principalement par le biais du processus de traite. Ils peuvent se propager facilement et largement au sein d'un troupeau (**Kabelitz et al., 2021**).

###### **I.2.4.1.2. Micro-organismes de l'environnement**

On parle de mammite environnementales lorsque les infections sont causées par des agents pathogènes dont le principal réservoir est l'environnement dans lequel vit la vache (**Abayeneh et al., 2022**). Les pathogènes environnementaux sont capables de survivre en dehors de l'hôte et font partie de la microflore normale de l'environnement de la vache. L'exposition aux streptocoques de l'environnement se produit pendant et entre la traite, pendant la période de tarissement ou avant la mise basse des génisses. L'exposition aux pathogènes est liée à leur abondance dans l'environnement, qui est influencée, par exemple, par l'humidité et la température. Ils envahissent la mamelle lorsque le canal du trayon est ouvert après la traite ou après un dommage (**Kabelitz et al., 2021**).

**Tableau I** : Agents pathogènes majeurs impliqués dans les mammites (Maros *et al.*, 2020 ; Kabelitz *et al.*, 2021).

Germes pathogènes majeurs environnementaux	Germes pathogènes majeurs contagieux
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i></li> <li>• <i>Streptococcus uberis</i></li> <li>• <i>Klebsiella pneumoniae</i></li> <li>• <i>Enterobacter aerogenes</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i></li> <li>• <i>Streptococcus agalactiae</i></li> <li>• <i>Streptococcus dysgalactiae</i></li> <li>• <i>mycoplasma spp</i></li> <li>• <i>Corynebacterium bovis</i></li> </ul>

#### I.2.4.2 Germes pathogène mineurs

On qualifie de pathogènes mineurs les microorganismes qui produisent des infections modérées, principalement de type subclinique. Les staphylocoques à coagulase négative (SCN) et *Corynebacterium bovis* en sont les principaux représentants. *Les staphylocoques*, *Streptococcus agalactiae* et *Streptococcus dysgalactiae* sont présents préférentiellement dans la mamelle et sur la peau des trayons alors que les entérobactéries et les entérocoques se situent préférentiellement (litière, fourrage, air) (Vikou, 2019).

#### I.2.5. Traitement des mammites

Il existe plusieurs types de traitement utilisés lors des mammites cliniques et subcliniques qui sont influencés par les facteurs suivants (Phillipe, 2004) :

- L'agent responsable de l'infection de la glande mammaire ;
- L'âge de la vache ;
- Le stade de la lactation ;
- La présence des mammites cliniques et subcliniques dans la passé (récidive) ;
- La production laitière et la situation de quota ;
- La valeur de l'animal comme vache de réforme ;
- La disponibilité des sujets de remplacements ;
- Autre problèmes médicaux concomitants.

**I.2.5.1. Stratégie de traitement**

La mammite est la maladie la plus importante dans l'industrie laitière. Les antibiotiques sont considérés comme le premier choix dans le traitement de la maladie, comme il existe plusieurs options et stratégies pour le traitement de la mammite, en fonction des facteurs spécifiques de chaque cas. Cependant, les restrictions croissantes sur l'utilisation d'ATB dans le secteur laitier ont conduit à la recherche de nouvelles approches thérapeutiques, telles que le développement de vaches laitières résistantes à la mammite, l'utilisation de nouvelles technologies et outils diagnostiques et thérapeutiques, l'application de vaccins modernes contre la mammite, ainsi que l'utilisation de plantes médicinales, de nutraceutiques, de peptides antibactériens, de bactériocines ; de thérapie par anticorps, de bactériophages, de lysines phages et de probiotiques comme alternatives aux ATB. Ces approches émergentes ont le potentiel de réduire l'utilisation d'ATB, de prévenir la résistance aux antimicrobiens et de promouvoir la santé des vaches laitières, tout en améliorant la qualité du lait produit (Amr El Sayed *et al.*, 2021).

## II. Biofilms

### II.1. Historique

L'origine de la recherche en microbiologie est souvent associée aux observations d'Antone Van Leeuwenhoek qui, au XVII<sup>e</sup> siècle et grâce à un microscope de son invention, a mis en évidence la présence d'organismes microscopiques à la surface de ses dents. Bien que d'abord identifiées fixées sur un support solide, ce sont les formes libres et planctoniques des microorganismes, qui ont été les plus étudiées ; dès lors, l'essentiel des connaissances acquises résulte de travaux principalement réalisés sur ces formes, cultivées dans des milieux nutritifs liquides et agités. Quelques travaux attirent cependant l'attention sur les interactions existantes entre les microorganismes et les surfaces. En 1933, Arthur Henrici plonge des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de microorganismes qui s'épaissit progressivement. En 1943, Claude Zobell montre que, dans un récipient rempli de liquide, les bactéries colonisant les parois sont plus nombreuses que celles en suspension. Enfin, dans les années 1980, les travaux de William Costerton mettent en évidence que l'essentiel de la biomasse microbienne est fixé sur des surfaces et constitue des populations hétérogènes englobées dans une matrice extracellulaire riche en eau, en sucres et en protéines. Présentes dans tous les environnements et associées à des surfaces minérales, végétales (surface des feuilles) ou animales (surfaces des muqueuses, surfaces dentaires etc.), elles sont appelées biofilms (**Roux ghigo, 2006**).

Le terme biofilm a été proposé en 1978 pour désigner une communauté de microorganismes enrobés d'une matrice hydratée, riche en polymère extracellulaire, et en contact avec une surface .il est à présent associé à de nombreuses formations microbiennes caractérisées par l'expression de propriétés biologiques originales en comparaison avec des organismes isolés en suspension (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

### II.2. Définition

Les biofilms sont des communautés microbiennes complexes contenant des bactéries et des champignons. Ces microorganismes synthétisent et secrètent une matrice protectrice qui lie fortement le biofilm à une surface vivante ou non (**Delorme, 2012**).

Les biofilms sont généralement définis comme des communautés de microorganismes attachés à une surface intégrés dans une matrice extracellulaire (**Wang et al., 2020**).

### II.3. Caractéristiques

Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats bactériens intégrés dans une matrice protectrice autoproduite (Nesse *et al.*, 2023).

Les bactéries peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique (cellules de la muqueuse) qu'à une surface abiotique (plancher ou équipement à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation). La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. On estime d'ailleurs que 80% de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm. Les biofilms bactériens isolés de divers environnements partagent des caractéristiques communes : les cellules bactériennes sont retenues ensemble par une matrice polymérique composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. Le développement du biofilm survient en réponse à des signaux extracellulaires soit présents dans l'environnement proche de la bactérie ou produits par les cellules bactériennes elles-mêmes. La caractéristique la plus importante est que le biofilm protège les bactéries contre le système immunitaire de l'hôte, la dessiccation et les biocides (antibiotiques et désinfectants). La présence de biofilms pourra avoir comme effet d'interférer avec un traitement adéquat de l'animal ou une désinfection efficace des surfaces (Tremblay *et al.*, 2014).

### II.4. Structure et composition

Un biofilm est une communauté bactérienne constituée d'une ou de plusieurs espèces bactériennes qui adhèrent à une surface biologique ou artificielle et sont organisées en plusieurs couches cellulaires au sein d'une matrice complexe, qu'elles ont-elles-mêmes fabriquée (Costerton, 2013). Les biofilms sont un groupe de micro-organismes dans lesquels les microbes produisent des EPS tels que (Tableau II) (Ramanathan *et al.*, 2021) :

**Tableau II** : Composants de biofilm (Ramanathan *et al.*, 2021).

Composants	Pourcentage
protéines	< 1-2 %
Polysaccharides	1-2 %
ADN	< 1 %
ARN	< 1 %
Eau	97 %

L'eau est la partie clé du biofilm, distribuée selon un schéma non homogène et principalement responsable du mouvement des nutriments à l'intérieur de la matrice du biofilm. La capacité de construire et de conserver une communauté de biofilm organisée dépend principalement des composants de la matrice EPS (**Ramanathan et al., 2021**).

La matrice EPS également appelée « maison des cellules du biofilm », se compose principalement de polysaccharides, de protéines, de lipides et d'ADN extracellulaire (eDNA) (**Ricardo et al., 2022**). Les canaux du biofilm permettent à l'eau, à l'air et aux nutriments d'atteindre toutes les parties de la structure. Ces composants peuvent varier considérablement entre les différentes espèces bactériennes. Les exopolysaccharides sont des polymères de sucre de haut poids moléculaire synthétisés de manière extracellulaire ou intracellulaire et sécrétés dans l'environnement extérieur. En microscopie électronique, ils ressemblent à de longs brins linéaires ou ramifiés qui sont attachés aux surfaces cellulaires et aident à adhérer à d'autres glucides, protéines, acides nucléiques et lipides. Les protéines extracellulaires sont un autre composant majeur de la matrice EPS, certaines protéines sont attachées aux surfaces cellulaires et aux polysaccharides pour aider à la formation et à la stabilisation du biofilm. Les ADN extracellulaires (eDNA) jouent un rôle important dans la formation des biofilms. L'ADN aide également à attacher les cellules bactériennes à la surface du substrat par interaction médiée par les récepteurs (**Chakraborty et al., 2018**).

## II.5. Régulation

Le Quorum-sensing est un système de communication entre les cellules bactériennes, par l'activation de signaux spécifiques, dans le but principal est de faciliter l'adaptation des bactéries aux conditions environnementales défavorables, y compris les densités de population bactérienne. Ce processus implique la synthèse, la détection et la réaction à la signalisation chimique extracellulaire (**Syeda et al., 2022**).

Le système QS implique deux facteurs principaux, l'autoinducteur(AI) et le récepteur, qui est basé sur la concentration de cellules de population. Les AI sont de petites molécules de signalisation diffusibles produites par les bactéries, qui sont détectées par récepteurs une fois qu'un seuil de concentration est atteint. Les bactéries Gram-négatives et positives sécrètent respectivement des N-acyl homosérine lactones (AHL) et des oligopeptides autoinducteurs (AI) comme molécules de signalisation, ainsi que AI-2. La liaison des IA à leurs récepteurs



apparentés active l'expression génique spécifique, notamment la formation de biofilms et la résistance aux ATB (Amankwah *et al.*, 2021).

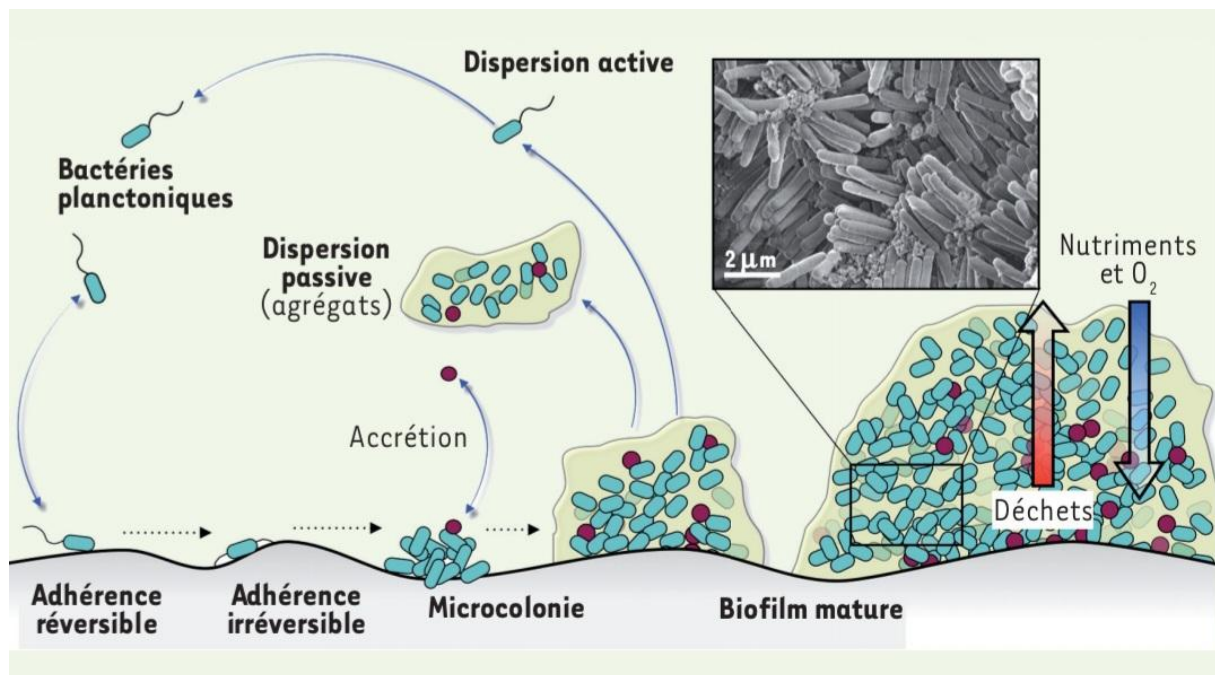
## II.6. Etapes de formation

La formation du biofilm est un processus microbien complexe impliquant différentes phases de développement (Figure 4), dont certaines sont spécifiques au type de bactérie impliquée (Ricardo *et al.*, 2022).

La formation des biofilms est généralement considérée comme un processus cyclique comprenant des étapes phénotypiquement distinctes. Malgré la diversité des espèces formant des biofilms et des architectures de biofilms, de nombreuses études utilisant une seule espèce ont révélé que la formation de biofilms coïncidait avec des stades de développement distincts et des caractéristiques générales, quelle que soit l'espèce (Kendra *et al.*, 2021).

Elle peut être classée en cinq étapes distinctes, qui comprennent :

- Le développement d'un film de conditionnement de surface.
- La fixation des cellules à une surface.
- La formation de micro colonies.
- La maturation et la différenciation de biofilm avec l'expression de polymères matriciels.
- La dispersion des cellules du biofilm.



**Figure 4** : Développement et structure d'un biofilm bactérien (Lebeaux et Ghigo, 2012).

**a. Développement d'un film de conditionnement de surface**

L'attachement bactérien à une surface vivante ou non vivante où commence l'étape initiale de la formation du biofilm avec la génération d'un film de conditionnement. Le film de conditionnement de surface est une surface complexe constituée de polysaccharides, de glycoprotéines et de composés humiques. Il sert de plate-forme pour l'adhérence à la surface des micro-organismes et est donc considéré comme une condition préalable à l'étape de fixation. Il joue un rôle dans la fourniture d'une source concentrée de nutriments et d'importants oligo-éléments. Dans l'environnement naturel, les MO n'adhèrent pas directement à un substrat, mais plutôt à un film de conditionnement qui est connu pour se former sur de nombreux substrats. En plus il modifie la nature physicochimique de la surface pour initier le processus (Amankwah *et al.*, 2021 ; Umar *et al.*, 2016).

**b. Fixation réversible et irréversible des cellules à une surface**

La formation d'un biofilm commence par la fixation de MO flottant librement sur une surface stable, les micro-organismes adhèrent à la surface par de faibles forces de van der Waals et des effets hydrophobes. L'étape d'attachement pourrait en outre être classée comme un processus en deux étapes : l'attachement réversible initiale l'attachement irréversible (Chakraborty *et al.*, 2018).

- **L'attachement réversible** : également connu sous le nom de phase d'amarrage est régi par certains paramètres physico-chimiques qui caractérisent l'association entre les deux surfaces en interaction de la cellule bactérienne et la surface de choix qui a été conditionnée à cet effet. L'amarrage est déterminé par l'addition nette de forces (les interactions hydrophobes et électrostatiques, les forces de van der Waals, la température...) produites lorsque l'organisme est amené près de la surface pour l'attachement, l'organisme étant propulsé de manière aléatoire ou par chimiotaxie et motilité (Oluwole, 2022).

- **L'attachement irréversible** : souvent appelé phase de verrouillage, et il est généralement médié moléculairement à l'aide d'adhésion produite par les cellules (Oluwole, 2022). L'adhésion irréversible se produit sous la forme d'une liaison permanente des micro-organismes à une surface. L'attachement se produit de manière réversible en raison de l'impact de forces hydrodynamiques ou répulsives ; cela peut également être le résultat d'une réponse à l'absence de disponibilité des nutriments. Les appendices cellulaires et extracellulaires jouent un rôle vital dans la fixation microbienne à la surface. Les appendices

communs souvent utilisés dans la fixation bactérienne aux surfaces des tissus végétaux et animaux comprennent les pili et les fimbriae, qui se composent de plusieurs appendices différents, et d'autres structures telles que les curli, les adhésines, les intimines (Umar, 2016).

### **c. Formation de micro colonies**

Une fois l'adhésion établie, les cellules bactériennes se divisent et se multiplient pour développer des grappes et des agrégats tridimensionnels (3D) appelés microcolonies. Les microcolonies se développent via la prolifération cellulaire pour synthétiser la matrice EPS pour l'adhésion aux surfaces, la cohésion entre les cellules, l'échaudage des cellules ensemble, le maintien de l'architecture 3D et la protection des microcolonies. Les microcolonies bactériennes consistent normalement en de nombreux types de microcommunautés qui se coordonnent les unes avec les autres pour l'échange de substrat, la dissémination des produits métaboliques et l'excrétion des produits finaux métaboliques (Amankwah *et al.*, 2021).

### **d. Maturation et la différenciation de la biofilm avec l'expression de polymères matriciels**

La formation de microcolonies à partir de cellules en couches et de petits amas, conduit à la génération d'un biofilm mince pour commencer la phase de maturation, avec la synthèse de la matrice EPS à partir des principaux composants structurels (polysaccharide, protéine, et ADNe), les grappes se développent en macrocolonies (grandes microcolonies) avec le déplacement de cellules du substrat pour former des canaux et des vides qui facilitent l'échange de nutriments et de déchets en infusant du liquide dans le biofilm (Amankwah, 2021). La Formation d'un biofilm mature avec une structure tridimensionnelle contenant des cellules emballées en grappes avec des canaux entre les grappes qui permettent le transport de l'eau et des nutriments et l'élimination des déchets (Smith, 2009).

### **e. Dispersion des cellules du biofilm**

Une fois l'épaisseur maximale atteinte, la dernière étape du développement du biofilm se produit, c'est ce qu'on appelle l'étape de dispersion et elle implique la libération de cellules planctoniques du biofilm. Ces cellules ont la capacité d'adhérer à de nouvelles surfaces et de reformer un biofilm. Les biofilms se dispersent en raison de plusieurs facteurs, tels que le manque de nutriments, une concurrence intense, une population dépassée, etc. La dispersion peut se produire dans tout le biofilm ou seulement dans une partie de celui-ci, plusieurs

enzymes aident au processus de dispersion (Chakraborty *et al.*, 2018 ; Tremblay *et al.*, 2014).

### II.7. Facteurs favorisant la formation de biofilm

Le processus de fixation peut être affecté par de nombreux facteurs interdépendants tels que :

- a. **Propriétés des surfaces** : texture, rugosité, présence d'aspérités, hydrophobicité et la présence préalable d'un film protéique recouvrant la surface.
- b. **Propriétés du milieu aqueux environnant** : vitesse du flux, présence d'un flux laminaire ou non, pH, température, cations (Ca, Na, Fe ...), le fer, les nutriments, sources de carbone disponibles, disponibilité du milieu en oxygène et la présence d'agents antimicrobiens.
- c. **Propriétés des cellules** : hydrophobicité de la surface des cellules, présence de fimbriae, de flagelles et rôles des exopolysaccharides (Grasteau, 2011)..

La capacité de construire et de conserver une communauté de biofilm organisée dépend principalement des composants de la matrice EPS. Il peut aider les bactéries à adhérer à de nombreuses surfaces et hôtes différents ; fournir une protection contre l'environnement et des réservoirs pour l'acquisition des nutriments. La composition de l'EPS change avec le type d'agents pathogènes, âge du biofilm et conditions environnementales (dessiccation, pH, oxygène, azote, température et disponibilité des nutriments). Il protège les microbes des composés antimicrobiens, des produits chimiques, de la dessiccation, des radiations et des conditions environnementales défavorables. L'ADN électronique de L'EPS qui augmente l'intégrité structurelle du biofilm, l'échange d'informations génétiques, l'apport de nutriments, la stabilité du biofilm et la résistance aux médicaments (Ramanathan *et al.*, 2021).

De bonnes conditions nutritives sont nécessaires aux étapes de formation du biofilm, alors que les phases de développement tardif sont possibles dans des conditions nutritives moins bonnes. Ainsi, le type de biofilm dépend des conditions nutritives, ce qui suggère une facilité de remodelage des biofilms (Grasteau, 2011).

### II.8. Résistance aux antibiotiques

Il est bien établi que les biofilms bactériens présentent une résistance accrue aux traitements antimicrobiens par rapport aux cellules individuelles cultivées en suspension. Cette résistance des bactéries au sein du biofilm a été largement observée et est attribuée à des propriétés variées du biofilm lui-même : réduction de la diffusion, réduction du taux de croissance en raison des changements physiologiques et la production d'enzymes dégradant

les substances antimicrobiennes. Les biofilms retrouvés dans des environnements naturels ou industriels sont résistants aux bactériophages, aux amibes ainsi qu'aux biocides utilisés dans les procédés industriels. Ils permettent aux bactéries pathogènes de résister à la réponse immunitaire de l'hôte. De plus, les bactéries d'un biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques et aux désinfectants que ces mêmes bactéries sous forme planctonique (**Tremblay *et al.*, 2014**). En fait, la résistance des antibiotiques est augmentée jusqu'à 1000 fois si les infections sont associées à des bactéries productrices du biofilm par rapport à leurs homologues planctoniques (**Chakraborty *et al.*, 2018**).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la plus grande résistance (certains auteurs préfèrent plutôt parler d'une tolérance) des biofilms aux agents antimicrobiens. Un de ces facteurs est la matrice polymérique qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens (**Tremblay *et al.*, 2014**).

Le polysaccharide forme le noyau de la matrice tandis que l'ADNe est impliqué dans le transfert horizontal de gènes. La maturation du biofilm par l'intermédiaire de molécules signale, provoque des changements structuraux, ainsi que de nombreux changements dans l'expression des gènes codant pour différents facteurs virulents. Ces changements comprennent la perte de motilité cellulaire par l'expression de phénotypes sans flagelles, la réduction de la synthèse de la protéase et de la phospholipase C, la diminution de la synthèse et libération de toxines, et production de polysaccharide rugueux et parfois muqueux pour mieux s'adapter à certaines conditions du microenvironnement du biofilm. Les changements morphologiques dans le biofilm permettent une adaptation métabolique dans des conditions aérobies et anaérobies qui se traduit par des microcolonies métaboliquement distinctes, dont la présence peut non seulement diminuer ou éliminer le temps nécessaire pour s'adapter aux nutriments et au stress en oxygène, mais également fournir un contexte métabolique important pour résister aux antimicrobiens présents au sein du microenvironnement (**Amankwah *et al.*, 2021**).

## II.9. Impacts

### II.9.1. Rôle positif

Les biofilms jouent un rôle écologique capital et contribuent très largement au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes en participant notamment au cycle du carbone, de l'eau.

- Ils contribuent à la production et à la dégradation de la matière organique, au recyclage de l'azote du soufre et de nombreux métaux. La coopération métabolique établie au sein du biofilm permet de réaliser ces réactions qui requièrent l'action concertée de bactéries ayant différentes capacités métaboliques.
- La flore commensale humaine peut être considérée comme un biofilm qui protège son hôte contre les attaques des bactéries pathogènes.
- Dans l'industrie, les biofilms servent au traitement des déchets par un mécanisme appelé « bioremédiation ». Les MO composant les biofilms peuvent en effet utiliser des matériaux polluants comme source de carbone et d'énergie.
- Les biofilms sont employés pour le traitement des eaux usées et les décharges pour dépolluer des sites contaminés et enfin pour mobiliser les métaux lourds d'un sol ou d'un déchet par le procédé de biolixiviation (**Roux, 2006**).

### II.9.2. Rôle négatif

Les biofilms bactériens sont un grave problème de santé mondiale en raison de leur capacité à tolérer les antibiotiques, les systèmes de défense de l'hôte et d'autres stress externes ; il contribue donc aux infections chroniques persistantes. En fait, 60 à 80 % des infections bactériennes humaines, y compris de nombreuses infections du sang et des voies urinaires sont causées par des biofilms bactériens (**Wang et al., 2020**).

Dans les industries agro-alimentaires, la persistance des contaminations microbiennes sur les surfaces industrielles est due à la formation de spores et de biofilms, presque toutes les branches de l'industrie alimentaire y compris le secteur des produits laitiers sont remises en cause par le problème de biofilms, auxquels ils causent de lourds problèmes économiques et sanitaires (**Malek, 2019**). La résistance des biofilms aux procédures de nettoyage-désinfection, largement documentée, est un problème crucial auquel se heurte l'industrie laitière (**Yuan et al., 2018**).

## II.10. Biofilms laitiers

L'augmentation de la demande mondiale de produits laitiers oblige les fabricants de produits laitiers à fabriquer des produits de haute qualité et à durée de conservation prolongée. L'industrie laitière est confrontée à des contraintes liées au maintien d'une qualité élevée et à la prévention des pertes dues à la détérioration microbienne (**Yuan *et al.*, 2018**).

En industrie laitière, la formation de biofilm peut avoir lieu dans les différents sites de la chaîne de transformation du lait avec une prévalence élevée au niveau des sites difficiles à nettoyer tels que les extrémités mortes, les joints, les valves, les creux, les crevasses. Le développement de biofilms sur les équipements laitiers est très rapide (8-12 h), le risque de transfert de ces bactéries au lait qui circule dans les lactoducs ou contamination croisée est grand. Les bactéries sporulées mésophiles et thermophiles peuvent contaminer les produits laitiers transformés qui peuvent alors ne pas respecter les spécifications relatives à la teneur en spores (**Malek, 2019**).

### II.10.1. Bactéries thermophiles

Ce sont des bactéries formées d'espèces qui se développent de façon optimale à 50-55 °C sur l'acier inoxydable. Leurs biofilms sont caractérisés par une grande diversité structurale pouvant influencer les procédures de nettoyage utilisées dans les laiteries, et sont également désignés sous le terme de biofilm du process parce qu'ils se forment dans des conditions qui ne leur permettent pas de former des microcolonies et des structures en multi-couches. Le stockage et le transport du lait cru à basse température favorisent la croissance de bactéries psychrotrophes et la production d'enzymes thermostables qui constituent de grandes menaces pour la qualité et la durée de conservation des produits laitiers (**Malek, 2019**).

### II.10.2. Bactéries psychrotrophes

Ce sont des organismes omniprésents qui ont la capacité de croître à 7 °C ou moins, quelle que soit leur température de croissance optimale plus élevée, ces bactéries représentent généralement moins de 10 % de la microflore totale du lait cru mais deviennent invariablement prédominantes lors du transport et du stockage prolongé du lait cru à basse température (**Yuan *et al.*, 2018**).

### III. Huiles essentielles

#### III.1. Historique

Les Huiles essentielles (HEs), connues et utilisées depuis l'Antiquité, étaient initialement obtenues par macérât de plantes aromatiques dans des huiles végétales en Egypte et en Chine.

La découverte du papyrus « Ebers » datant du XVI<sup>e</sup> siècle avant notre ère, a permis de découvrir différentes formulations à base d'HE utilisées en thérapeutique ou dans la vie de tous les jours. Ces différents remèdes étaient utilisés pour leurs multiples propriétés, en particulier leurs propriétés antimicrobiennes. C'est à partir du XVIII<sup>e</sup> siècle, avec l'avènement de la Chimie Moderne (découverte du chlore, de l'iode...), et la promotion de l'asepsie (utilisation de l'eau de Javel...) pour la prévention du risque infectieux, que l'utilisation des HE s'est réduite ; jusqu'à tomber en désuétude au cours du XX<sup>e</sup> siècle, du moins dans les pays « occidentaux », suite à la découverte et l'essor rapide des antibiotiques. Cependant, depuis plusieurs années, l'engouement du grand public pour les Médecines « Douces » et « naturelles » s'est considérablement accru : homéopathie, phytothérapie, gemmothérapie... L'aromathérapie (ou thérapeutique par les HEs) n'a pas échappé à ce regain d'intérêt ; en effet, l'étude et l'utilisation des HEs a non seulement suscité l'intérêt du grand public, mais aussi celui des scientifiques. Ainsi, si nous effectuons une recherche d'articles scientifiques avec les mots clés « essential oils as antimicrobial agents », sur la base de données la plus couramment et fréquemment utilisée par les chercheurs (*i.e.* « PubM. Au-delà d'un aspect chiffré, il est très intéressant de constater que le nombre d'articles scientifiques publiés sur ce thème a très nettement augmenté à partir des années 2000 (Fontanay *et al.*, 2015).

#### III. 2. Définition

Les huiles essentielles, le terme « huile » vient de leur propriété de se solubiliser dans les graisses, alors que le terme « essentielle » désigne l'odeur dégagée par la plante productrice (Bouyahya *et al.*, 2016). Les HEs sont également appelées huiles volatiles ou étherées, ce sont des mélanges complexes obtenues à partir de matériel végétal (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) (Nehme *et al.*, 2021).



### III.3. Composition chimique

Les HEs sont de nature très complexe car elles sont composées d'un mélange de plus de 50 composants à des concentrations assez différentes (Sundaresan *et al.*, 2019), leurs composants sont chimiquement classés selon quatre conditions :

- Origine biosynthétique primaire ;
- Taille ou nombre d'atomes de carbone ;
- Le squelette parent ou « squelette » ;
- Le caractère de l'oxydation par des atomes électronégatifs, c'est-à-dire d'autres atomes plus gros que le carbone, tels que l'oxygène, l'azote ou le soufre (Nicholas *et al.*, 2022).

Chimiquement, les HEs appartiennent principalement à deux classes de composés : les terpènes et les phénylpropanoïdes. La famille des terpènes est prédominante, et les phénylpropanoïdes lorsqu'ils apparaissent sont responsables de l'odeur et du goût caractéristiques (Sousa *et al.*, 2022).

#### III.3.1. Groupe des terpènes

Les terpènes sont les métabolites secondaires des plantes ayant un squelette carboné d'unités d'isoprène dans leur structure (Tableau III). La voie de l'acide mévalonique dans le cytoplasme des cellules végétales entraîne la formation de terpènes. Les terpénoïdes sont générés par différentes modifications biochimiques telles que le réarrangement et l'oxydation des terpènes. Ces modifications biochimiques forment des terpénoïdes de dérivés oxygénés de terpènes comme les acides, les alcools, les cétones, les aldéhydes, les esters et les éthers (Wani *et al.*, 2020).

Tableau III : Différents terpènes (Sundaresan *et al.*, 2019).

Terpènes	Composants
Hémiterpènes	1 unité isoprène ; 5 carbones
Monoterpènes	2 unités isoprènes ; 10 carbones
Sesquiterpènes	3 unités isoprènes ; 15 carbones
Diterpènes	4 unités isoprènes ; 20 carbones
Triterpènes	6 unités isoprènes ; 30 carbones
Tétraterpènes	8 unités isoprènes ; 40 carbones

### III.3.2 Composés des phénylpropanoïdes

Les composés phénoliques (phénylpropanoïdes) sont biométabolisés à partir de deux précurseurs essentiels (acides aminés aromatiques). Ces composés phénoliques sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle (Bouyahya *et al.*, 2017).

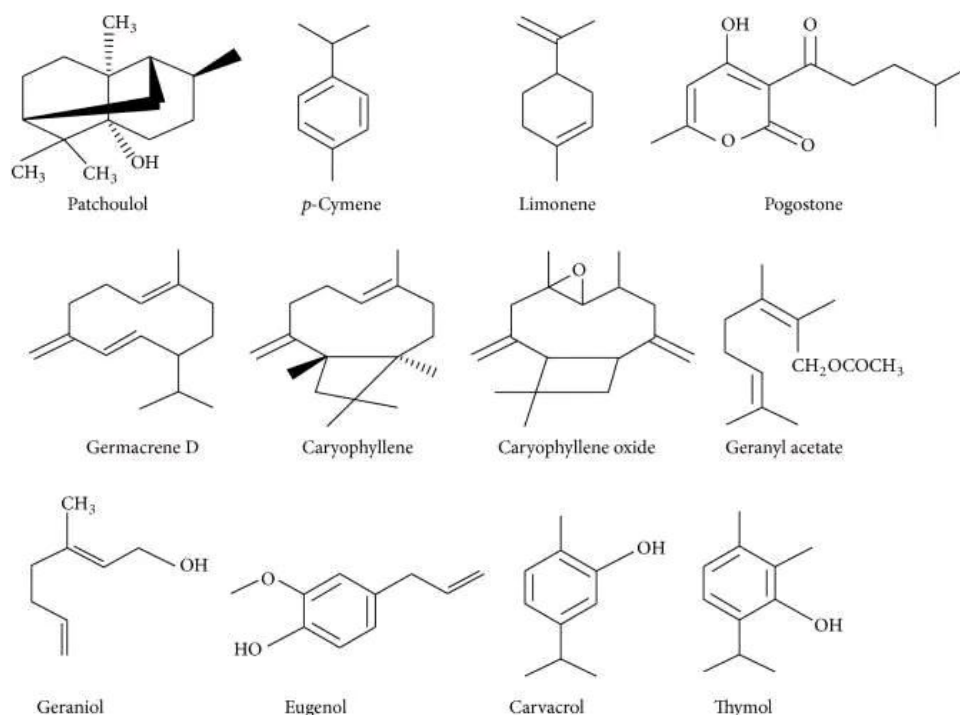


Figure 5 : Structures de certains composés chimiques importants des huiles essentielles (Swamy *et al.*, 2016).

### III.3. Méthodes d'extraction

#### III.3.1. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode la plus ancienne et la plus simple pour extraire les HE (Sousa *et al.*, 2022). L'extraction est effectuée durant trois heures, durée nécessaire à l'épuisement de la matière première (environ 90%) en huile essentielle. Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique, la chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique (Bendali *et al.*, 2019).

#### III.3.2. Distillation à la vapeur

Distillation à la vapeur est la méthode la plus couramment utilisée pour produire des huiles essentielles sur une base commerciale (Lopes *et al.*, 2020). La distillation est la technique traditionnelle de détachement des substances volatiles de la matière végétale pour extraire des huiles essentielles. Lorsque les plantes aromatiques sont soumises à la vapeur ou à l'eau bouillante lors de la distillation, leurs huiles essentielles sont libérées par évaporation (Pandey *et al.*, 2022), l'échantillon est placé dans une colonne dont la partie inférieure est reliée à un ballon d'eau sous chauffage. La partie supérieure est reliée à un condenseur, où la vapeur produite traverse l'échantillon, emmenant les huiles essentielles vers le condenseur. Ce processus provoque la condensation du mélange eau-huile, et ce mélange peut être séparé par extraction liquide-liquide (Sousa *et al.*, 2022).

#### III.3.3. Extraction par solvant

Le solvant choisi, en plus d'être autorisé, devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène. Sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet (Boukhatem *et al.*, 2019). Industriellement, l'étape d'extraction par solvant est généralement réalisée dans des extracteurs à contre-courant utilisant de grandes quantités d'hexane (Chemat *et al.*, 2017).

#### III.3.4. Pressage à froid

Les huiles essentielles sont éliminées mécaniquement par pression à froid, où les glandes sébacées sont brisées et les huiles volatiles sont libérées. Dans ce processus, une émulsion aqueuse est formée, où l'huile présente peut être obtenue par centrifugation, décantation ou distillation fractionnée (Sousa *et al.*, 2022). La technique est réservée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les péricarpes d'agrumes en déchirant ces dernières par un traitement mécanique (Boukhatem *et al.*, 2019).

#### III.3.5. Extraction par fluide supercritiques

L'extraction par fluide supercritique est une technique efficace, écologique et propre pour isoler les HEs (Chemat *et al.*, 2017). Elle est relativement récente basée sur le pouvoir solvant accru des fluides au-dessus de leur point critique (Sousa *et al.*, 2022). Dans des conditions de température et de pression où le solvant se trouve dans un état intermédiaire aux phases liquide et gazeuse et présente des propriétés physico-chimiques différentes, notamment un pouvoir de solvatation accru (Boukhatem *et al.*, 2019). La majorité des études se sont concentrées sur l'utilisation du CO<sub>2</sub> car il est non toxique, ininflammable bon marché, facilement éliminé après extraction et doté d'un fort pouvoir solvant pour les molécules non polaires (Chemat *et al.*, 2017).

#### III.3.6. Extraction assistée par micro-ondes

Cette procédure, qui suit un principe très simple, consiste en la distillation sèche d'une matrice végétale fraîche à l'aide d'un micro-onde sans utiliser d'eau ou tout autre solvant organique (Pandey *et al.*, 2022), l'emploi des micro-ondes constitue, par ailleurs, une méthode d'extraction à part entière en plein développement. A titre d'exemple, La SFME (Solvent Free Microwave Extraction) est une combinaison originale des techniques de chauffage par micro-ondes et de distillation sèche (Boukhatem *et al.*, 2019). L'échantillon est placé dans un réacteur à micro-ondes sans aucun solvant, où l'énergie électromagnétique qui est convertie en chaleur augmente la température interne des cellules d'échantillon en raison de l'évaporation de l'humidité présente. La pression interne augmente les glandes se rompent et l'huile essentielle est libérée (Sousa *et al.*, 2022).

### III.3.7. Extraction assistée par ultrasons

L'énergie ultrasonore permet l'intensification de l'extraction des HEs. Par conséquent, elle est généralement combinée avec d'autres techniques d'extraction afin d'accélérer le processus d'extraction et d'augmenter la vitesse de transfert de masse (**Sousa *et al.*, 2022**). Pour garantir la sécurité, la durabilité, des méthodes économiques et plus écologiques, la conception d'une extraction à grande échelle efficace assistée par ultrasons nécessite une intensification des processus et une réduction de la consommation d'énergie, c'est une méthode propre qui évite l'utilisation d'une grande quantité de solvants et de récipients d'extraction volumineux (**Chemat *et al.*, 2017**).

### III.4. Conservation des huiles essentielles

Conserver les huiles dans de bonnes conditions permet donc de maintenir leur qualité nutritionnelle, en garantissant une teneur en acides gras insaturés et la préservation des vitamines, ainsi que leur qualité sensorielle, en retardant l'apparition des composés volatils responsables de la note rance et premiers signes perceptibles d'une dégradation de l'huile. Ainsi, limiter l'exposition à la lumière, à la chaleur ou réduire la disponibilité de l'oxygène en intertant les huiles sous azote s'avèrent être des moyens efficaces pour lutter contre leur oxydation. S'y ajoute une protection par les antioxydants dont certains, endogènes aux matières premières dont sont issues les huiles, seraient source d'une stabilisation renforcée s'ils étaient mieux valorisés (**Cuvelier et Maillard, 2012**).

### III.5. Activités biologiques

Les huiles essentielles présentent une puissance remarquable d'avoir une large gamme activités biologiques (**Wani *et al.*, 2020**) :

#### III.5.1. Activité antioxydante

Le potentiel antioxydant des HEs dépend principalement de leurs compositions chimiques. Les métabolites phénoliques et autres métabolites secondaires se lient avec des doubles liaisons, ce qui est responsable de l'activité antioxydante substantielle des HEs (**Sundaresan *et al.*, 2019**), des études ont également montré que la carvacrol, un composé phénolique présent dans plusieurs huiles essentielles, peut protéger efficacement les cellules et les tissus des dommages oxydatifs, ce qui en fait un puissant antioxydant (**Oubih *et al.*, 2023**).

### III.5.2. Activité anti-inflammatoire

La plupart des constituants chimiques des huiles essentielles sont des terpénoïdes, caractérisés par un faible poids moléculaire qui permet un transport facile à travers les membranes cellulaires pour induire différentes activités biologiques, notamment des effets anti-inflammatoires et antioxydants. En ce qui concerne ses propriétés anti-inflammatoires, il a été démontré que le carvacrol module l'activité de divers médiateurs inflammatoires tels que la production de cytokines pro-inflammatoires et l'expression de molécules d'adhésion (Oubihi *et al.*, 2023).

### III.5.3. Activité antimicrobienne

Les huiles essentielles possèdent un fort potentiel en tant qu'agents antimicrobiens (Wani *et al.*, 2020), en raison de leur nature hydrophobe, les HEs se déplacent de manière significative à travers les lipides des membranes cellulaires des bactéries, perturbent les structures de la paroi cellulaire et les rendent plus perméables. Ce changement de perméabilité membranaire entraîne la fuite d'ions et d'autres matériaux cellulaires, entraînant la mort cellulaire (Sundaresan *et al.*, 2019).

### III.5.5. Activité antivirale

D'après une étude de la littérature, il a été bien documenté que les huiles essentielles possèdent une forte action antivirale contre plusieurs virus à ADN et à ARN, Plusieurs constituants des huiles essentielles comme les phénylpropanes, les sesquiterpènes et les triterpènes, ont été approuvés pour leur forte activité antivirale contre les rhinovirus et les virus de l'herpès (Wani *et al.*, 2020).

### III.5.6. Activité antifongique

Les infections fongiques ont été considérées comme un véritable problème de santé publique, en particulier chez les patients dont le système immunitaire est affaibli, l'émergence de souches résistantes aux antifongiques actuels associées à la modification du spectre clinique des pathogènes et à la sur utilisation des antifongiques conventionnels a encouragé la recherche de produits naturels alternatifs tels que les extraits organiques et les HEs de plantes médicinales (Benoutman *et al.*, 2022).

### III.6. Mécanismes d'action

Le mécanisme d'action antimicrobien varie selon le type d'HEs ou la souche du micro-organisme utilisé. Les bactéries Gram-négatives ont une épaisse couche de lipopolysaccharide qui réduit la sensibilité des micro-organismes aux HEs, mais les bactéries Gram-positives seront dépourvues de ce lipopolysaccharide. Par conséquent, les HEs peuvent facilement pénétrer dans les bactéries gram-positives par rapport aux bactéries gram-négatives. Grâce à la présence d'acide lipotéichoïque, l'entrée des HEs dans les cellules microbiennes à Gram positif est facilitée (**Arya et al., 2022**).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles est lié essentiellement à la structure de la paroi et à la perméabilité membranaire des bactéries. Les HEs peuvent affecter à la fois l'enveloppe externe de la cellule et le cytoplasme. En raison de leur nature lipophile, les huiles essentielles sont facilement pénétrables à travers les membranes cellulaires bactériennes. (**Swamy et al., 2016**), ce qui entraîne : l'augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaire ; l'acidification de l'intérieure de la bactérie, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure ; la destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (**Boutabia et al., 2016**).

Les différents composants des HEs peuvent agir sur les protéines présentes dans les bactéries et peuvent affecter la division cellulaire (**Bouyahya et al., 2017**). Les HEs ont été démontré pour inhiber la synthèse et l'expression des molécules de signalisation impliquées dans le processus de communication intercellulaire telles que les autoinducteurs, les enzymes de synthèse, et les récepteurs de signalisation. Cette inhibition du quorum sensing (QS) peut empêcher la formation de biofilms et réduire la virulence des microorganismes pathogènes. L'action des HEs sur le QS des bactéries pourrait contribuer à la prévention des infections bactériennes et à la réduction de la résistance aux ATB en inhibant la formation de biofilms et en augmentant la sensibilité aux ATB (**Maurya et al., 2021**).

### III.7. Domaines d'application

En raison de problèmes de sécurité liés à l'utilisation de composés synthétiques, les HEs extraites de plantes aromatiques et médicinales ont reçu plus d'attention en tant que produit naturel avec de nombreuses applications dans différents domaines (**Benoutman *et al.*, 2022**), y compris l'industrie alimentaire pour rehausser le goût des aliments, et la conservation grâce aux effets antimicrobiens, antioxydants de certains de leurs constituants (**Benyoussef *et al.*, 2015**). Les huiles essentielles sont utilisées comme arômes, dans des lotions ou des shampooings comme parfums et pour le rajeunissement de la peau et des cheveux, comme parfums, dans des bougies, des savons, des liquides qui stérilisent, et en aromathérapie conventionnelle ou médicale (**Sharmeen *et al.*, 2021**). Les HEs sont apparues comme une alternative végétale naturelle pour protéger les produits agricoles des ravageurs. L'utilisation des HE s'est intensifiée, principalement dans les jardins les maisons, pour la lutte antiparasitaire, importants en raison de leur effet toxique (pesticide) (**Sousa *et al.*, 2022**). Les HEs suscitent un intérêt considérable de la part des scientifiques en raison de leur utilisation dans le traitement de certaines maladies infectieuses pour lesquelles les antibiotiques de synthèse deviennent de moins en moins actifs. Pour tenter de trouver de nouveaux traitements aux maladies actuelles (cancer, asthme, alzheimer, etc..), la communauté scientifique s'est récemment intéressée aux constituants des huiles essentielles grâce au nombre plus important de composés volatiles, comme les sesuiterpènes qui ont montré des activités pharmacologiques remarquables contre les maladies, en particulier le cancer, de plus les HEs sont utilisées comme agents antimicrobiens, antioxydants et bioactifs naturels contre de nombreux agents pathogènes (**Ben Hassine *et al.*, 2021**).



## I. Matériel

### I.1. Matériel biologique

#### I.1.1. Huiles essentielles étudiées

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de trois huiles essentielles qui sont le Thym, l'origan et le clou de girofle (achetés à la pharmacie), extraits à partir des plantes du même nom *Thymus vulgaris L.*, *Origanum vulgare L. sp.* et *Syzygium aromaticum L.* (Figure 6 et tableau IV).



Figure 6 : Photographie des huiles essentielles étudiées.

**Tableau IV** : Classification botanique des plantes aromatiques étudiées.

Huiles essentielles	Nom scientifique	Classification	Références
<b>Thym</b>	<i>Thymus vulgaris</i>	Règne : Plantae Famille : Lamiacées genre : <i>Thymus</i> Espèce : <i>thymus vulgaris</i>	<b>Shashank et al, 2021</b>
<b>Origan</b>	<i>Origanum vulgare</i>	Règne : Plantae Famille : Lamiacées Genre : <i>origanum</i> Espèces : <i>origan vulgare</i>	<b>Adelina Lonbrea et al, 2020</b>
<b>Clou de girofle</b>	<i>Syzygium aromaticum</i>	Règne : Plantae Division : Magnoliophyta Classe : Magnoliopsida Ordre : Myrtales Famille : Myrtaceae Sous famille : Myrtoideae Genre : <i>Syzygiae</i> Espèce : <i>Syzygium aromaticum.</i>	<b>Gloria Aderonke Otunola, 2021</b>

**I.1.2. Souches bactériennes testées**

Afin d'évaluer l'effet des huiles essentielles étudiées sur l'inhibition de la formation de biofilm, quatre souches responsables des mammites sont testées (tableau V).

**Tableau V** : Souches bactériennes testées.

Souche	Gram	Référence
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	ATCC 433300
<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif	ATCC 25922
<i>Klepsiela pneumoniae</i>	Gram négatif	Souche de laboratoire de Microbiologie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif	ATCC 6633

## II. Méthodes

### II.1. Etude de la formation des biofilms

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

Les souches ont été cultivées sur milieu BHI additionné de rouge Congo (0,8 g) et du saccharose (36 g). Elles ont ensuite été incubées pendant 24h à 37 °C et une nuit à température ambiante. La production de colonies noires rugueuses par des souches productrices a été utilisée pour les différencier des souches non productrices (colonies lisses rouges) (Poliana *et al.*, 2012).

#### II.1.2. Production d'exopolysaccharide (Evaluation 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). Tout d'abord, cultiver des souches pendant 24h à 37 °C dans 30 mL du bouillon Muller-Hinton (MH) additionné de 1 % (w/v) de glucose (Poliana *et al.*, 2012). Eliminer les cellules bactériennes par centrifugation (4000×g pendant 10 minutes, 20 °C) (le surnageant est récupéré). Ensuite, ajouter deux volumes (60 mL) de 95 % de l'éthanol froid et mettre le mélange homogène directement au réfrigérateur 4 °C, après 24h, récupérer les précipités d'EPS par centrifugation (2000×g, 15 min, 4 °C), puis se débarrasser du surnageant et laver le culot avec l'eau distillée. Par la suite, sécher les culots à 60 °C jusqu'à atteindre un poids constant. Finalement, déterminer la quantité d'EPS produite par les souches après avoir mesuré le poids sec (Albuquerque *et al.*, 2018).

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

Les quatre souches *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sont cultivées dans le milieu MH gélosé (Annexe 1) dans une étuve à 37 °C/24 h 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 10<sup>8</sup> 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  $\mu\text{L}$  de chaque suspension bactérienne ( $10^8$  UFC/mL) et 50  $\mu\text{L}$  de différentes concentrations des huiles essentielles testées ont été ajoutées aux puits de microplaques stériles à 96 puits déjà remplis de 100  $\mu\text{L}$  de bouillon Mueller Hinton (MH).

Après agitation pendant 15 min, les plaques sont incubées à 37 °C/18 h à 24 h. Les biofilms formés sur la surface des puits subissent deux lavages avec du Tampon phosphate salin (PBS) (10 mM, pH 7,2), pour fixer les cellules adhérentes, 200  $\mu\text{L}$  d'éthanol 96 % sont ajoutés puis laisser au repos pendant 15 minutes les puits ont été séchés 60 ° C. Les biofilms ont été colorés avec du cristal violet à 1 % pendant 30 minutes, après deux rinçages avec le PBS, 200  $\mu\text{L}$  d'éthanol 96 % sont ajoutés. Dans un lecteur de microplaques, l'absorbance du biofilm adhérent a été mesurée à 630 nm. Ces souches ont été classées en quatre catégories. En considérant Ac comme l'absorbance du contrôle (milieu MH inoculé avec la souche cible), les valeurs d'absorbance suivants ont été utilisées pour signaler la production de biofilm (**Stepanović *et al.*, 2000**).

- $A < AC$  : pas de production de biofilm.
- $2 AC > A > AC$  : faible production de biofilm.
- $4 AC > A > 2 AC$  : moyenne production de biofilm.
- $A > 4 AC$  : forte production de biofilm.

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

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

1. Pour ce deuxième test, les surnageant 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  $\mu\text{L}$  de la suspension bactérienne ont été ajoutés à 9 mL d'eau physiologique. Enfin, un

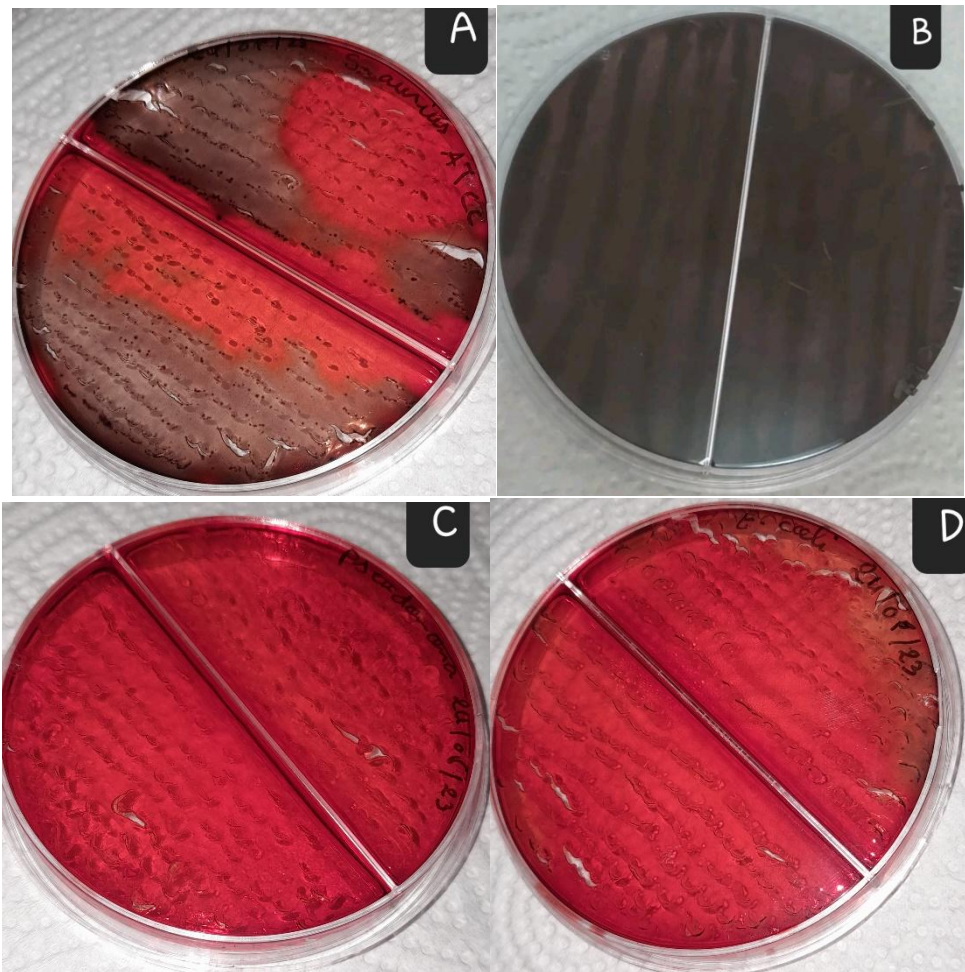
dénombrement en surface a été réalisé en prélevant 100  $\mu$ L de ce mélange et les ensemencés sur des boites de Pétri contenant la gélose au sang.

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  $\mu$ 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  $\mu$ L de PBS avant d'extraire le colorant avec 200  $\mu$ 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

### 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 7 et décrits dans le tableau VI.



**Figure 7** : Production d'exopolysaccharides par les souches *S. aureus* (A), *K. pneumoniae* (B), *Pseudomonas* (C), *E. coli* (D).

**Tableau VI** : Résultats de l'évaluation qualitative.

Souches	Résultats
<i>Staphylococcus aureus</i>	Des colonies noires plus que des colonies rouges.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Peu de colonies noires par rapport aux rouges.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Des colonies rouges sur toute la surface de la boîte.
<i>Escherichia coli</i>	Des colonies rouges plus que des colonies noires.

D'après la figure 6 et le tableau VI, un noircissement des colonies sur les boîtes de Pétriensemencées par les souches *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* été observé, ceci indique la production d'exopolysaccharides par ces souches. Tandis que les boîtes de Pétriensemencées 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 VII.

Tableau VII : Résultats de l'évaluation quantitative.

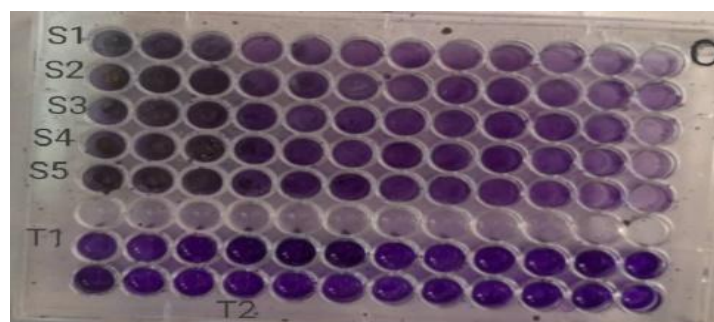
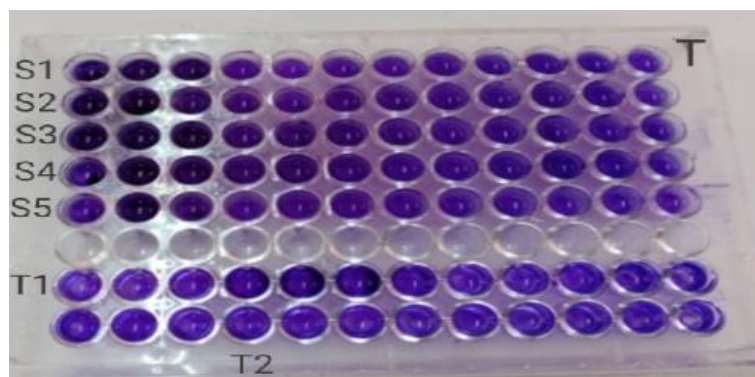
Souches	Poids (mg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	15,9 ± 2,12
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11 ± 1,41
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pas de production
<i>Escherichia coli</i>	28,9 ± 2,69

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 ce sont avéré capables de produire des EPS à des quantités plus ou moins variables selon l'espèce selon l'ordre décroissant suivant : *S. aureus*, *E. coli*, et *K. pneumoniae*. Le résultat obtenu pour l'espèce *P. aeruginosa* confirme sans incapacité à produire des EPS.

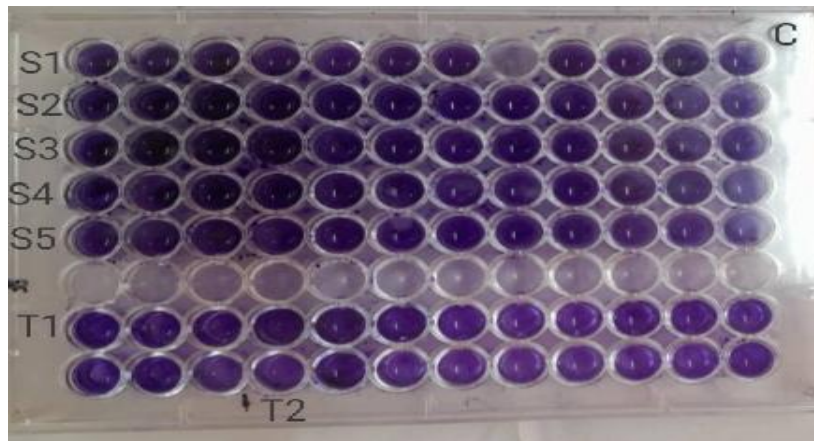
**I.3. Résultats des tests d'inhibition de la formation de biofilm**

**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 8). Les résultats de la mesure des absorbances (630 nm) sont récapitulés dans le tableau VII.



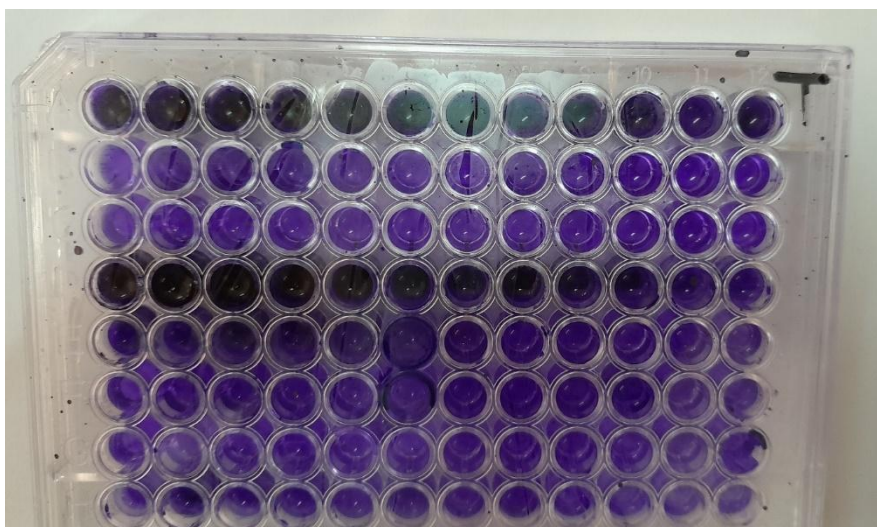




**Figure 8 :** Aspect des microplaques des trois huiles (thym, clou de girofle, origan) sur les souches : *E. coli* (A), *S. aureus* (C), *K. pneumoniae* (D).

La figure 7 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 8) a été utilisée cette fois ci pour étudier l'effet inhibiteur de l'HE de thym, à de plus faibles concentrations, sur la formation du biofilm de *Klebsiella sp.*



**Figure 9 :** Aspect de la microplaque de l'HE du thym contre *Klebsiella sp.*

La figure 9 montre la biomasse formée par *Klebsiella sp.* Dans les puits témoins (milieu inoculé par cette souche) et les puits traités par l'HE de thym. 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 1,648. Alors que les valeurs des absorbances des puits traités par l'HE du thym étaient relativement faibles aux dilutions 1/32, 1/64 et 1/128 ( $A = 0,818 ; 0,766 ; 0,69$ , respectivement). Ce ci 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 thym vis-à-vis *Klebsiella sp* et *S. aureus*, 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 eu cv peut surestimer le nombre de bactéries adhérentes.

Les résultats présentés dans les figures 10 et 11 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.

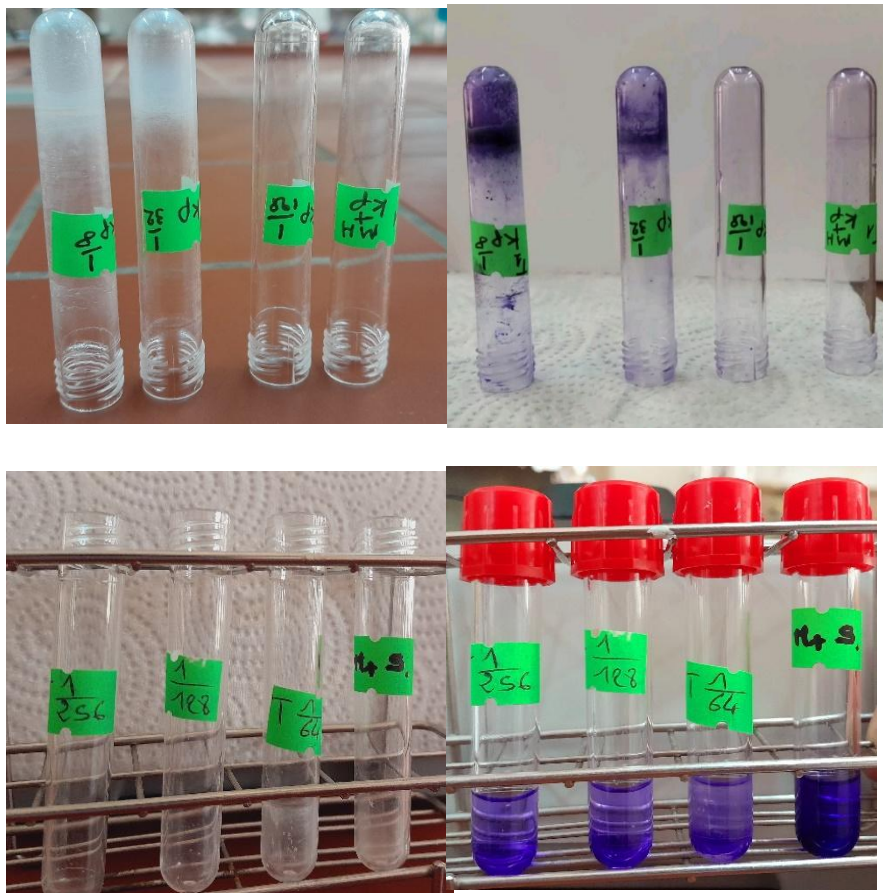


Figure 10 : Effet de l'HE du thym sur l'inhibition de la formation de biofilm de *Klebsiella sp* et *S. aureus*

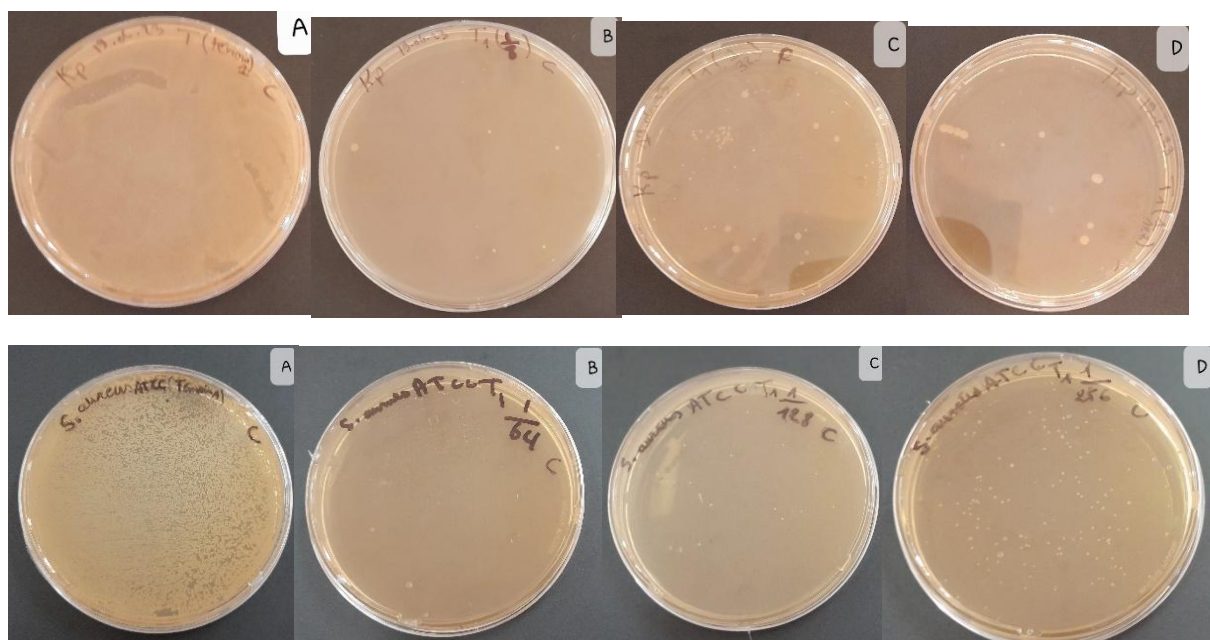


Figure 11 : Résultats du dénombrement de *Klebsiella sp* et *S. aureus* après traitement par l'HE du thym.

Les quantifications de cellules planctoniques adhérees 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 boites de Pétri témoin (milieu inoculé par les souches) ont montré une forte charge bactérienne contrairement aux boitesensemencées à partir des tubes traités avec l'HE, où des UFC les plus faibles voire inexistantes ont été observées lorsque les souches *Klebsiella sp* et *S. aureus*. Ont été cultivées en présences de l'HE du thym à des concentrations croissantes allant de 1/64 à 1/256. Cette absence de colonie indique la capacité de l'HE du thym à inhiber la formation du biofilm.

### 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. L'objectif de ce présent travail est l'évaluation de l'effet antibiofilm de trois huiles essentielles: thym, origan et clou de girofle *vis-à-vis* de cinq souches bactériennes à savoir *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, et *S. aureus*.

La méthode au rouge Congo (évaluation qualitative) ainsi que l'évaluation quantitative ont révélé que les souches *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *E. coli* sont capables 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. L'HE de thym a une forte activité antibiofilm *vis-à-vis* les deux souches *K. pneumoniae* et *S. aureus*.

Le dénombrement sur boîte a démontré que les souches *K. pneumoniae* et *S. aureus* sont formatrices de biofilm et qui a été inhibé par *Thymus vulgaris L.* Cela indique l'efficacité de cette huile essentielle 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

**Abdullahi, U. F., Igwenagu, E., Mu'azu, A., Aliyu, S., & Umar, M. I. (2016).** Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine. *Veterinary world*, 9(1), 12.

**Alexandra Grasteau. (2011).** Sélection de mutations affectant la formation de biofilm chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Mémoire du grade de maîtres ès sciences (M.Sc) en sciences vétérinaires option microbiologie. Université de Montréal p 32.

**Amankwah, S., Abdella, K., & Kassa, T. (2021).** Bacterial biofilm destruction: A focused review on the recent use of phage-based strategies with other antibiofilm agents. *Nanotechnology, Science and Applications*, 161-177.

**Aporn Sattayakhom, Sineewanlaya Wichit, et Phanit Koomhin (2023).** The Effects of Essential Oils on the Nervous System: A Scoping Review. *Molecules*, 28(9), 3771.

**Arya Nair, Rashmi Mallya, Vasanti Suvarna, Tabassum Asif Khan, Munira Momin, and Abdelwahab Omri (2022)** Nanoparticles—Attractive Carriers of Antimicrobial Essential Oils. *Antibiotics*, 11(1), 108.

**Asma, S. T., Imre, K., Morar, A., Herman, V., Acaroz, U., Mukhtar, H., ... & Gerlach, R. (2022).** An overview of biofilm formation—combating strategies and mechanisms of action of antibiofilm agents. *Life*, 12(8), 1110.

**Banos, G., Bramis, G., Bush, S. J., Clark, E. L., McCulloch, M. E., Smith, J., ... & Psifidi, A. (2017).** The genomic architecture of mastitis resistance in dairy sheep. *BMC genomics*, 18, 1-18.

**Bendali, A., Oulebsir, C., Djamel, E. H., & Djazouli, Z. E (2019).** Impact de la formulation sur le potentiel antifongique de l'huile essentielle du *bigaradier citrus aurantium* L.

**Ben Hassine, D., Kammoun El Euch, S., Rahmani, R., Ghazouani, N., Kane, R., Abderrabba, M., & Bouajila, J. (2021).** Clove buds essential oil: The impact of grinding on the chemical composition and its biological activities involved in consumer's health security. *BioMed Research International*, 2021, 1-11.

**Benoutman, Amina., Erbiai, El Hadi., Edderdaki, Fatima Zahra., Cherif, El Khalil., Saidi, R., Lamrani, Z., ... & Maouni, A. (2022).** Phytochemical Composition, Antioxidant and Antifungal Activity of *Thymus capitatus*, a Medicinal Plant Collected from Northern Morocco. *Antibiotics*, 11, 681.

**Bessah, R., & Benyoussef, E. H. (2015).** La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Journal of Renewable Energies*, 18(3), 513-528.

- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019).** Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & oil science and technology*, 2(2), 49-55.
- Boukhatem, M. N., Ferhat, A., & KA, A. (2019).** Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles : revue de littérature. *Une*, 3(4), 1653-1659.
- Boutabia, L., Telailia, S., Bouguetof, I., Guenadil, F., & Chefrou, A. (2016).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. de la région de Hammamet (Tébessa-Algérie). *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85, 174-189.
- Bouyahya, A. J. Abrini . y. Bakri. N. Dakka. (2016).** Essential oils as anticancer agents: news on mode of action. *Phytothérapie*, 1-14.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... & Dakka, N. (2017).** Resistance to antibiotics and mechanisms of action of essential oils against bacteria. *Phytothérapie*, 1-11.
- Chakraborty, S., Dutta, T. K., De, A., Das, M., & Ghosh, S. (2018).** Impact of bacterial biofilm in veterinary medicine: an overview. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 7(4), 3228-3239.
- 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.
- Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020).** Epidemiology and classification of mastitis. *Animals*, 10(12), 2212.
- Costerton, J. W., Raoult, D., & Cutler, S. J. (2013).** The polymicrobial nature of biofilm infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(2), 107-112.
- Cooper, S., Huntley, S. J., Crump, R., Lovatt, F., & Green, L. E. (2016).** A cross-sectional study of 329 farms in England to identify risk factors for ovine clinical mastitis. *Preventive Veterinary Medicine*, 125, 89-98.
- Cuvelier, M. E., & Maillard, M. N. (2012).** Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids*, 19(2), 125-132.
- David Lebeaux, Jean.-Marc. Ghigo. (2012).** Aux biofilms. *Médecine/sciences*, 28, 727-39.
- 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 and antimicrobial proteins*, 10, 704-716.



**Descoteaux, L., & Roy, J. P. (2004).** La mammite clinique : stratégies d'intervention. In *Symposium sur les bovins laitiers*.

**El-Sayed, A., & Kamel, M. (2021).** Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Tropical animal health and production*, 53, 1-16.

**Espínola-Docio, B., Costa-Romero, M., Díaz-Gómez, N. M., & Paricio-Talayero, J. M. (2016).** Mastitis: Puesta al día. *Archivos argentinos de pediatría*, 114(6), 576-584.

**Fontanay, S., Mougenot, M. E., & Duval, R. E. (2015).** Évaluation des activités antibactériennes des huiles essentielles et/ou de leurs composants majoritaires. *Hegel*, 5(2), 109-118.

**Funari, R., & Shen, A. Q. (2022).** Detection and characterization of bacterial biofilms and biofilm-based sensors. *ACS sensors*, 7(2), 347-357.

**Girma, A., & Tamir, D. (2022).** Prevalence of bovine mastitis and its associated risk factors among dairy cows in Ethiopia during 2005–2022: a systematic review and meta-analysis. *Veterinary Medicine International*.

**Goulart, D. B., & Mellata, M. (2022).** Escherichia coli mastitis in dairy cattle: etiology, diagnosis, and treatment challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13, 928346.

**Hanzen C. (2009).** Physiologie de la glande mammaire et du trayon de la vache laitière. Université de Liège.

[http://www.therioruminant.ulg.ac.be/notes/200809/R20\\_Glde\\_mamm\\_production\\_2009\\_PWP.pdf](http://www.therioruminant.ulg.ac.be/notes/200809/R20_Glde_mamm_production_2009_PWP.pdf), consulté le 10 janvier 2017.

**Jaswal, S., Jena, M. K., Anand, V., Jaswal, A., Kancharla, S., Kolli, P., ... & Mohanty, A. K. (2022).** Critical Review on Physiological and Molecular Features during Bovine Mammary Gland Development: Recent Advances. *Cells*, 11(20), 3325.

**Jugreet B. Sharmeen, Fawzi M. Mahomoodally, Gokhan Zengin, et Filippo Maggi. (2021).** Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. *Molecules*, 26(3), 666.

**Kabelitz, T., Aubry, E., van Vorst, K., Amon, T., & Fulde, M. (2021).** The role of Streptococcus spp. in bovine mastitis. *Microorganisms*, 9(7), 1497.

**Kendra, P. E. (2021).** Insecticidal and attractant activities of Magnolia citrata leaf essential oil against two major pests from Diptera: Aedes aegypti (Culicidae) and Ceratitis capitata (Tephritidae). *Molecules*, 26(8), 2311.

**Kumar Pandey, V., Shams, R., Singh, R., Dar, A. H., Pandiselvam, R., Rusu, A. V., & Trif, M. (2022).** A comprehensive review on clove (Caryophyllus aromaticus L.) essential oil

and its significance in the formulation of edible coatings for potential food applications. *Frontiers in Nutrition*, 9, 987674.

**Laurent Delorme MD (2012).** Biofilms : Nouvelle approche dans la guérison des plaies.

**Lombrea, A., Antal, D., Ardelean, F., Avram, S., Pavel, I. Z., Vlaia, L., ... & Danciu, C. (2020).** A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. essential oil. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(24), 9653.

**Lopes, T. S., Fontoura, P. S., Oliveira, A., Rizzo, F. A., Silveira, S., & Streck, A. F. (2020).** Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. *Research in veterinary science*, 131, 186-193.

**Malek, Fadila. (2019).** Bactéries sporulées et biofilms : un problème récurrent dans les lignes de production de lait reconstitué ou recombiné pasteurisé. *Canadian journal of microbiology*, 65(6), 405-420.

**Maurya, A, Prasad, J, das, S, K. Dwivedy (2021).** Essential oils and their application in food safety. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 653420.

**Melo, P. D. C., Ferreira, L. M., Nader Filho, A., Zafalon, L. F., Vicente, H. I. G., & Souza, V. D. (2013).** Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 119-124.

**Merritt, J. H., Kadouri, D. E., & O'Toole, G. A. (2005).** Current protocols in microbiology. *Growing and Analyzing Static Biofilms*. John Wiley & Sons.

**Nehme, R., Andrés, S., Pereira, R. B., Ben Jemaa, M., Bouhallab, S., Ceciliani, F., ... & Pereira, D. M. (2021).** Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality. *Antioxidants* 2021, 10, 330.

**Nesse, L. L., Osland, A. M., & Vestby, L. K. (2023).** The Role of Biofilms in the Pathogenesis of Animal Bacterial Infections. *Microorganisms*, 11(3), 608.

**Osungunna, M. O. (2022).** Biofilm: formation and natural products' approach to control—A review. *African Journal of Infectious Diseases*, 16(2), 59-71.

**Otunola, G. A. (2022).** Culinary spices in food and medicine: an overview of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. And LM Perry [Myrtaceae]. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 793200.

**Ouali, F. A., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D., ... & Drider, D. (2014).** Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International journal of food microbiology*, 191, 116-124.

**Oubihi, A., Ballaoui, F. Z., Imtara, H., Jaber, H., Ettouil, A., Haida, S., ... & Guessous, Z. (2023).** Phytochemical Compounds, Acute Toxicity, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of *Thymus leptobotrys* Murb Essential Oil. *Molecules*, 28(3), 1355.

**Panda, S. K., Buroni, S., Swain, S. S., Bonacorsi, A., da Fonseca Amorim, E. A., Kulshrestha, M., ... & Tiwari, V. (2022).** Recent advances to combat ESKAPE pathogens with special reference to essential oils. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1029098.

**Paramasivam, R., Gopal, D. R., Dhandapani, R., Subbarayalu, R., Elangovan, M. P., Prabhu, B., ... & Muthupandian, S. (2023).** Is AMR in Dairy Products a Threat to Human Health? An Updated Review on the Origin, Prevention, Treatment, and Economic Impacts of Subclinical Mastitis. *Infection and Drug Resistance*, 155-178.

**Patil, S. M., Ramu, R., Shirahatti, P. S., Shivamallu, C., & Amachawadi, R. G. (2021).** A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. *Heliyon*, 7(5).

**Rémy, D (2010).** Les mammites. france agricole *Éditions*.

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

**Sadrovoge, N J., Padilla-Gondalez, Guillermo F., et Phumthum, Methee. (2022).** Fundamental chemistry of essential oils and volatile organic compounds, methods of analysis and authentication. *Plants*, 11(6), 789.

**Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. B., Iqbal Yattoo, M., Patel, S. K., ... & Chaicumpa, W. (2021).** Advances in therapeutic and managemental approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 41(1), 107-136.

**Smith, J., Fratamico, P. M., & Uhlich, G. (2009).** Molecular mechanisms involved in biofilm formation by food-associated bacteria. In *Biofilms in the food and beverage industries* (pp. 42-98). *Woodhead Publishing*.

**Sousa, V. I., Parente, J. F., Marques, J. F., Forte, M. A., & Tavares, C. J. (2022).** Microencapsulation of essential oils: A review. *Polymers*, 14(9), 1730.

**Srinivasan, R., Santhakumari, S., Poonguzhali, P., Geetha, M., Dyavaiah, M., & Xiangmin, L. (2021).** Bacterial biofilm inhibition: A focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections. *Frontiers in Microbiology*, 12, 676458.

**Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000).** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, 40(2), 175-179.

**Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016).** Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2016.

**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.

**Vikou, R., Gbangboche, A. B. (2019).** Les Mammites infectieuses, Obstacles à l'amélioration de la santé Animale et à la production de lait et du fromage.

**Wang, C. P. Reardon, Nicholas Rad, Stephen Thorpe, Adrian Evans, Marjan Van Der Woude and Thomas F. Krauss (2020).** Attachment and antibiotic response of early-stage biofilms studied using resonant hyperspectral imaging. *npj Biofilms and Microbiomes*, 6(1), 57.

**Wani, Yadav, Kanchan, Khursheed, Aadil., & Rather, Manzor. Ahmad. (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.

**Yuan, L., Sadiq, F. A., Liu, T. J., Li, Y., Gu, J. S., Yang, H. Y., & He, G. Q. (2018).** Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 19(8), 630.

**Zubair, M., Shahzad, S., Hussain, A., Pradhan, R. A., Arshad, M., & Ullah, A. (2022).** Current trends in the utilization of essential oils for polysaccharide-and protein-derived food packaging materials. *Polymers*, 14(6), 1146.

## **Annexe I : Composition des milieux de culture utilisés**

### **Bouillon Muller Hinton 1% glucose**

- 21 g bouillon Muller Hinton
- 10 g glucose
- 1 L d'eau distillée
- pH  $7,3 \pm 0,2$

### **Gélose de Muller Hinton**

- 38 g MH
- 1000 mL d'eau distillé
- pH  $7,3 \pm 0,2$

### **Gélose de BHI**

- 0,8 g rouge Congo.
- 36 g saccharose.
- 14 g agar.
- 37 g poudre BHIB.
- 1 L d'eau distillée
- pH  $7,4 \pm 0,2$

### **Gélose Chapman**

- 111 g liofilchem
- 1 L d'eau distillée
- pH  $7,4 \pm 0,2$

## Annexe II : Préparation des solutions

### Eau physiologique

- 9 g NaCl
- 1 L d'eau distillée
- pH  $7,2 \pm 0,2$

### Tampon PBS

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,42 g  $K_2HPO_4$
- 0,24 g  $KH_2PO_4$
- pH  $7,2 \pm 0,2$

## 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* et *P. aeruginosa*. 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 thym, à de plus faibles concentrations, sur la formation du biofilm de *K. pneumoniae*. Les faibles valeurs des absorbances des puits traités par l'HEs du thym aux dilutions 1/32, 1/64 et 1/128 ( $A = 0,818 ; 0,766 ; 0,69$ , 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 thym.

**Mots clés :** biofilm, thym, exopolysaccharides, huile essentielle, *K. pneumoniae*.

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the ability of three essential oils (thyme, oregano and clove) to inhibit biofilm formation by *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* 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 high in HE-treated wells, at high concentrations. Another microplate was used this time to study the inhibitory effect of thyme EO, at lower concentrations, on *K. pneumoniae* biofilm formation. The low absorbance values of wells treated with thyme EO at dilutions of 1/32, 1/64 and 1/128 ( $A = 0.818; 0.766; 0.69$ , 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 thyme EO-treated wells.

**Key words:** biofilm, thyme, exopolysaccharides, essential oil, *K. pneumoniae*