

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Mouloud MAMMERY de Tizi-Ouzou

Faculté des sciences Biologiques et Agronomiques

Département de Biochimie-Microbiologie



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

Activité anti-biofilm des extraits végétaux

Réalisé par :

M^{elle} KHELIFI drifa.

M^{elle} KOLIAI chahira.

Soutenues le 07 janvier 2021

Membre du jury :

Mr. HOUALI. K

Professeur

Président.

Mr. SEBBANE. H

M.A.A

Examinateur.

Mr. BARIZ. K

M.C.B

Promoteur.

Promotion : 2019- 2020

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à exprimé nos profonds et sincères remerciements à **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à Mr BARIZ karim pour avoir accepté d'être l'encadreur de notre mémoire de master ainsi que pour ses orientations qui nous ont permis de bien avancer dans notre travail.

Nous remercions aussi Mr HOUALI karim et Mr SEBBANE hilal d'avoir accepté de faire partie des membres du jury ainsi que pour leurs examinations et pour leurs évaluations critiques.

Nos sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont aussi à tous ceux qui nous ont prêté main forte pour la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous...

Dédicaces

Ce modeste travail est dédié spécialement à vous mes très chers parents ; vous qui avez tout donné pour m'assurer une bonne éducation, vous avez tout sacrifié pour que je réussisse dans mes études et dans ma vie, vous qui avez tout fait, pour juste, me voir heureuse.

Je ne suis point de tout éloquent pour exprimer ce que vous méritez, je vous dois mes humbles et profonds remerciements pour tout ce que vous n'avez cessés de me donner depuis ma naissance jusqu'à aujourd'hui et à toutes les valeurs que vous avez su m'inculquer ; vous êtes et vous serez à jamais ma plus grande fierté et la source de mon bonheur, que Dieu vous garde pour nous, je vous aime infiniment.

À mes chères sœurs : Hafida, Fahima, Bouba, Souad, Malika, Houria et Samira, et à mes frères Hacène et Hocine pour tout leurs amour, leurs attentions et l'aide qu'ils m'ont apporté ainsi que pour tout les bons moments qu'on a vécu tous ensemble.

Aux époux de mes sœurs: Arezki, Houcine, Hakim, Amar et Yacine ; et à tous mes neveux et nièces qui apportent toujours une touche de joie et de bonheur à notre famille.

À toi, mon très cher fiancé Yacine, je te remercie tant et plainnement pour ton soutien, ta patience, ta compréhension et pour tous tes précieux conciels, ainsi qu'à toute ma belle famille Manseur.

À ma meilleure amie et mon binôme Fari, avec qui j'ai passé les moments les plus beaux et les plus fous durant tous ces cinq ans, je te remercie pour ta bonté, ta confiance, ta sincérité et ton amitié qui conte tellement à mes yeux, Je te suis vraiment reconnaissante pour tous les efforts que tu as fourni pour la réalisation de ce travail malgré toutes les situations difficiles.

Merci du fond du cœur.

Chahira

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour

À mes chers parents, aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance .Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À mes chers frères, Farhat, Aghiles, Samir et Anis pour votre encouragement permanent, et votre soutien moral

À toutes mes amies surtout Amina, Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour exprimer mon affection et mes pensées, tu es pour moi une sœur sur qui je peux compter.

À mon cher binôme chahiratii, pour notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passé ensemble. Je te souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

À toute ma famille pour votre soutien tout au long de mon parcours universitaire, Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infallible.

Merci d'être toujours là pour moi.

Drifa

Table des matières

Liste des abréviations	I-II
Liste des figures.....	III
Liste des tableaux.....	IV
Introduction	1
 Chapitre I : Biofilms bactériens	
1. Historique.....	3
2. Définition	3
3. Composition	4
3.1. Les microorganismes.....	4
3.2. La matrice	4
4. Organisation	5
5. Les étapes de formation de biofilm	6
5.1. Mise en place d'un film conditionnant.....	7
5.2. Transport et déplacement	7
5.3. Phase d'adhésion	8
5.4. Multiplication des bactéries et maturation du biofilm :.....	9
5.5. Dispersion	9
6. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm.....	10
6.1. Caractéristiques de la surface	11
6.2. Caractéristiques du milieu	11
6.3. Propriétés des cellules	12
7. Régulation de la formation des biofilms : <i>quorum sensing</i>	13
7.1. Les molécules du <i>quorum sensing</i>	14

Table des matières

7.2. La signalisation QS chez les bactéries Gram-positifs.....	14
7.3. La signalisation QS chez les bactéries Gram-négatifs.....	15
8. Le quorum quenching	17
9. Rôle du biofilm dans la persistance bactérienne	18
9.1. Avantage métabolique	18
9.2. Protection vis-à-vis des agressions de l'environnement	19
10. Biofilms et antibiorésistances	19
11. Localisation des biofilms.....	20
11.1. Dans le milieu hospitalier.....	20
11.2. Dans l'industrie agro-alimentaire.....	22
11.3. Dans le recyclage et l'épuration	22
11.4. Autres domaines	23
12. Les techniques d'études des biofilms bactériens	23

Chapitre II : Plantes médicinales et leurs principes actifs

1. Les composés phénoliques	29
1.1. Définition.....	29
1.2. Classification des polyphénols	30
1.2.1. Formes les plus simples	30
1.2.1.1. Acide phénolique	30
1.2.1.2. Les flavonoïdes.....	32
1.2.2. Les formes complexes.....	32
1.2.2.1. Les tanins.....	32
1.2.2.2. Les lignines.....	33
2. Les alcaloïdes	34

Table des matières

3. Les huiles essentielles.....	35
---------------------------------	----

Chapitre III: Techniques d'extraction, d'identification et de séparation des principes actifs des plantes

1. Les techniques d'extraction conventionnelles.....	39
1.1. Extraction à froid ou macération	39
1.2. Décoction	Erreur ! Signet non défini.
1.3. L'hydrodistillation	40
1.4. La distillation par entrainement à la vapeur.....	41
2. Les techniques d'extraction modernes : «Chimie Verte»	42
2.1. Extraction par fluide supercritique.....	42
2.2. Extraction assistée par ultrasons	43
2.3. Extraction assistée par micro-ondes.....	44
3. Techniques d'identification et de séparation des principes actifs des plantes.....	42
3.1. Le criblage phytochimique	42
3.2. Méthodes de fractionnement et la purification des principes actifs.....	43
3.1.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	43
3.1.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)	44
3.1.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à une Spectrométrie de masse (GC-MS).....	43

Chapitre IV : Effets des extraits végétaux sur les biofilms bactériens

1. Les cibles d'action des extraits végétaux	52
1.1. Effets des extraits végétaux sur l'adhésion bactérienne initiale et sur le biofilm préformé.....	52
1.2. Blocage du système QS et la réduction de la synthèse des facteurs de virulences	57

Table des matières

1.3. Efficacité synergique des extraits végétaux sur la formation de biofilm	64
1.3.1. Combinaison « extrait végétal-antibiotique »	64
1.3.2. Combinaison « extrait végétal-extrait végétal ».....	71
1.3.3. Autres combinaisons.....	72
2. Les nano-porteurs : une nouvelle stratégie de lutte contre les biofilms	73
3. Le rôle du solvant dans l'inhibition du biofilm.....	Erreur ! Signet non défini.
3.1. L'influence de la sélectivité du solvant.....	Erreur ! Signet non défini.
3.2. La cytotoxicité d'un extrait végétal	Erreur ! Signet non défini.
4. Séparation des composants anti-biofilm bioactifs des plantes..	Erreur ! Signet non défini.
Conclusion.....	78
Références bibliographiques	80
Annexe	105

Liste des abreviations

ADNe : ADN extracellulaire.

AHL : Acyl homosérine lactone.

AI : Auto-inducteur.

AIP : Peptide auto-inducteur.

C4-HSL : N-butyryl-L-homosérine lactone.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CG-SM : Chromatographie gazeuse couplée à u spectrophotomètre de masse.

CHE : Composés des huiles essentiels.

CMEB : Concentration minimale d'éradication du biofilm.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

CMIB : Concentration minimale inhibitrice du biofilm.

DBM : ADNase de bactéries marines.

ECEH : *E.coli* enterohémorragique.

ECUP : *Echerichia coli* uropathogène.

EMMA : Extrait méthanolique de *Musa acuminata*.

EMSM : Extrait méthanolique de *Sapindus mukorossi*.

EPS : Exopolysaccharides.

ESEP : Extrait d'érable riche en phénols.

Gtf : Glucosyltransferase.

HATA : Huile d'arbre de thé australienne.

HE : Huiles essentielle.

HPLC : Chromatographie liquide haute performance.

HSC : Hydrophobicité de surface.

IQS : Inhibiteur du quorum sensing.

NP Ag : Nanoparticule d'argent.

NP CuO : Nanoparticule d'oxyde de cuivre.

Liste des abreviations

NP Cur : Nanoparticule de curcumine.

NP Cur-Ag : Nanoparticule de curcumine et d'argent combinés.

NP ZnO : Nanoparticule d'oxyde de zinc.

QQ : Quorum quenching.

QS : Quorum sensing.

SARM : *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicyline.

SV-BS : Screening virtuel basé sur la structure.

3-oxo-C12-HSL : N-(3-oxododecanonyl)-L-homosérine lactone.

Liste des figures

Figure 1: Micrographie électronique à balayage d'un biofilm	6
Figure 2: Représentation schématique du développement d'un biofilm bactérien	10
Figure 3: Paramètres impliqués dans l'adhésion bactérienne, la maturation et la structure	13
Figure 4: Le système QS arg chez <i>Staphylococcus aureus</i>	15
Figure 5: Mécanisme moléculaire du Quorum sensing chez <i>P. aeruginosa</i>	17
Figure 6: Schéma récapitulatif des mécanismes du QS bactérien et des différentes stratégies du QQ	18
Figure 7: Voies de contamination du cathéter	21
Figure 8: Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques	24
Figure 9: Biofilm ring test	25
Figure 10: Approches expérimentales de la formation du biofilm	26
Figure 11: Structure du noyau phénol	30
Figure 12: Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques	31
Figure 13: Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques	31
Figure 14: Squelette de base des flavonoïdes	32
Figure 15: Structure chimique d'un tanin condensé (proanthocyanidine)	33
Figure 16: Les trois principaux monolignols qui donnent naissance à la lignine	34
Figure 17: Structure chimique de quelques alcaloïdes	35
Figure 18: Molécule isoterpène	37
Figure 19: Procédé d'extraction par macération	39
Figure 20: Processus de décoction	40
Figure 21: Le procédé de l'hydrodistillation	40
Figure 22: Le procédé la distillation par entrainement à la vapeur	41
Figure 23: Extraction par Co2 supercritique	42
Figure 24: Extraction assistée par ultrasons	43
Figure 25: Extraction assistée par micro-ondes	44
Figure 26: Représentation schématique d'une HPLC	48
Figure 27: Chromatographie sur couche mince	49
Figure 28: Représentation scématique d'une GC-SM	50
Figure 29: Représentation d'une nanoparticule	107

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux constituant de la matrice du biofilm	5
Tableau 2: Les méthodes d'étude du biofilm les plus couramment utilisées en laboratoire.....	27
Tableau 3: Classification des tetpènes	37
Tableau 4: Résumé des différentes méthodes d'extraction des produits naturels	45
Tableau 5: Résumé des méthodes de criblage phitochimique.....	47

Introduction

Introduction

Pendant longtemps les bactéries ont été étudiées sous forme planctonique en culture liquide en tant que cellules libres, alors que paradoxalement dans la nature la majorité d'entre-elles, favorisent un mode de vie en communauté où se trouvent fixées sur un support plutôt que libre et isolées dans le milieu environnemental. Après l'attachement sur un support, les bactéries vont se mettre en place et développer une communauté organisée à laquelle William Costerton a donné le nom de « biofilm » (**Fillox et Vallet, 2003**).

Les biofilms colonisent des surfaces très variées et sont particulièrement connus pour leurs effets négatifs sur la santé publique et cause d'un large éventail d'infections chez l'homme, ainsi que leurs impacts écologiques et économiques considérable (**Chalvet de Rochemonte, 2009 ; Ouchar mahamati et al., 2013**).

Par ailleurs, la maîtrise des infections bactériennes devient complexe, vu la structure spécifique des biofilms qui fournit un haut niveau de résistance aux antibiotiques, aux désinfectants et aux détergents (**Closteron et al., 1999 ; Stewart et Closteron, 2001; Stewart et Franklin, 2008**). Par exemple, il a été rapporté que la concentration minimale d'antibiotiques nécessaire pour tuer les bactéries en biofilm est d'environ 100 à 1000 fois supérieure à celle observée pour leurs homologues planctoniques (**Stewart et Closteron, 2001**).

Les échecs thérapeutiques et les coûts de plus en plus élevés des traitements des infections dues aux bactéries résistantes, appellent à trouver d'autres alternatives de soins (**Toty et al., 2013**). De ce fait, l'utilisation de la phytothérapie est devenue une nécessité, et la recherche de nouvelles molécules possédant un pouvoir antibactérien et anti-biofilm est depuis quelques années très actives (**Atefbeibu, 2002**).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2003), environ 65 à 80% de la population mondiale à recours à la médecine traditionnelle pour se soigner, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne. De ce fait, les plantes médicinales offrent une solution de rechange aux médicaments. Les métabolismes des nutriments de ces plantes, produisent plusieurs métabolites secondaires, que l'homme utilise dans son arsenal thérapeutique. Il s'agit des principes actifs connus par leurs diverses activités biologiques, on distingue plusieurs catégories telles que les composés phénoliques, les huiles essentielles et les alcaloïdes.

Ces remèdes naturels sont bien souvent très efficaces avec moins d'effets secondaires reconnus que beaucoup de médicaments de synthèse, mais peuvent néanmoins être mortels ou toxiques pour l'organisme lorsqu'ils sont mal utilisés (**Duraffourd et al., 1997**).

Dans le premier chapitre de ce mémoire, on présentera la physiologie des biofilms, les milieux où ils sont fréquemment rencontrés ainsi que les différentes méthodes utilisées dans les laboratoires pour les étudier. Puis, on verra dans le deuxième chapitre, les généralités sur les principaux composés bioactifs trouvés dans les plantes médicinales. Par la suite, dans le

Introduction

troisième chapitre, on définira les méthodes les plus utilisées pour l'extraction et la purification des principes actifs des plantes médicinales ainsi que les différents critères de choix.

Enfin, dans le dernier chapitre, on présentera des études récentes qui ont évalué la capacité des extraits végétaux utilisés seuls ou en combinaison à inhiber la formation de biofilms bactériens ainsi que leurs pouvoirs d'éradiquer des biofilms préformés. On présentera également les cibles d'actions des extraits au sein des biofilms. Enfin, on parlera d'une nouvelle stratégie qui est très utilisée pour la lutte contre les biofilms.

Chapitre I

Biofilms bactériens

1. Historique

On attribue la découverte des biofilms à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723), qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés de micro-organismes à la surface des dents (**Donlan, 2002**). En 1933, lors d'expériences visant à observer la croissance d'algues sur des lames de verre placées dans un aquarium, Henrici observa, fixées sur ces lames, des communautés bactériennes. Il émit alors l'hypothèse que la plupart des bactéries vivantes en milieux aqueux sont organisées sous forme de communautés sessiles fixées à une surface, et non pas sous forme planctonique (**Henrici, 1933**).

Le concept de « biofilm » est né, mais le terme en lui même n'est pas encore utilisé. Claude E. Zobell (1904-1989), considéré comme le père de la microbiologie marine, démontra vers 1936 que les surfaces solides sont bénéfiques au développement des bactéries lors de leur conservation dans un milieu nutritif dilué. En 1943, il montra que de très faibles quantités de nutriments organiques s'adsorbent sur le verre et que cette concentration de matière organique favorise la formation de communautés bactériennes fixées sur les surfaces (**Costerton, 2004**).

En 1973, Characklis démontre que les matrices d'exopolymères des biofilms confèrent à ces derniers une résistance avérée contre l'action des désinfectants, notamment ceux à base de chlore (**Characklis, 1973**). Puis, en 1978, Costerton et son équipe proposèrent les premières 8 hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des micro-organismes. Ils proposèrent pour la première fois le terme de « biofilm », en suggérant que ce serait le mode de vie naturel adopté par la plupart des micro-organismes (**Costerton, 1978**).

Plus récemment, plusieurs techniques et outils technologiques, ont permis de découvrir des informations surprenantes sur ce mode de vie imposant ; à savoir, la microscopie à balayage, la microscopie confocale à balayage laser et les outils du génie génétique. Ces derniers sont par exemple applicables à l'étude des gènes impliqués dans l'adhésion et la formation de biofilm (**Donlan, 2002**).

2. Définition

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exo-polysaccharides adhésives et protectrice qu'ils secrètent. C'est une structure vivante en perpétuel remaniement. Il constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique libre et isolé dans l'environnement (**Costerton et al., 1999 ; Espinasse et al., 2010**) ce qui rend l'attachement sur une surface une « stratégie de survie » (**Filloux et Isabelle, 2003**).

Cette architecture complexe, est très variable d'un biofilm à l'autre selon les microorganismes qui le composent et les conditions environnementales (**Roux et Ghigo,**

2006), et peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes (**Behlau et Gilmore, 2008**).

3. Composition

Selon **Costerton (1999)**, Le biofilm est composé essentiellement de microorganismes et de la matrice qu'ils synthétisent, cette dernière représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée du biofilm bien que les microorganismes représentent 2 à 5 % de la matrice du biofilm selon l'espèce impliquée.

3.1. Les microorganismes

Un biofilm est composé de communautés complexes des bactéries au sein desquelles on peut trouver des multiples espèces attachées à différents matériels (**Akbas, 2015**), capables de survivre aux agressions extérieures (agents anti-infectieux, déshydratation,..) et de maintenir ainsi des formes viables. Ceci est rendu possible par la transformation de certaines cellules du biofilm en formes dormantes, avec des fonctions vitales ralenties, ce qui leur permet d'échapper à l'action de la plupart des agents anti-infectieux qui nécessitent pour être actifs des bactéries capables de se répliquer (**Aumeran et al., 2020**).

En effet, la plupart des biofilms sont souvent composés de différents types de microorganismes : bactéries, algues, protozoaires, mycètes, dans lequel chaque groupe exécute des fonctions métaboliques spécialisées (**Alnasouri, 2010**).

3.2. La matrice

La formation de la matrice est un processus dynamique qui dépend de la disponibilité nutritive, la synthèse et la sécrétion de matière extracellulaire. Cette matrice peut être constituée non seulement de polysaccharides, mais elle comprend aussi des protéines, des acides nucléiques, des agents tensioactifs, des lipides, des glycolipides et des cations (**Tremblay et al., 2014**). La composition et la quantité de « substances polymériques extracellulaires » produites par les bactéries varient en fonction du genre bactérien, de l'âge du biofilm et des facteurs environnementaux (**Donlan et Costerton, 2002**).

La matrice est un environnement dynamique dans lequel les cellules microbiennes sont organisées de manière à utiliser tous les éléments nutritifs disponibles. Elle exerce différents rôles :

- Elle représente un réservoir de nutriments nécessaires à la croissance bactérienne;
- L'interaction des divers substances polymériques extracellulaires à travers divers types de forces (Van der Waals, électrostatique et ponts hydrogènes), apporte des propriétés

cohésives qui maintiennent les bactéries au sein du biofilm connectées les unes aux autres (**Vanzieleghem et Delmée, 2020**);

- Sa forte hydratation, qui est due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogènes, permet à certains biofilms de lutter contre la dessiccation dans le milieu naturel ;
- Elle joue aussi un rôle majeur dans les propriétés de résistance aux biocides, en se liant directement aux agents antimicrobiens et en les empêchant de pénétrer au sein du biofilm (**Donlan et Costerton, 2002; Donlan, 2002**).

Tableau 1: Principaux constituant de la matrice du biofilm (**Sutherland, 2001**).

Composant	% dans la matrice
Eau	> 97%
Polysaccharides	1 – 2 %
Protéines	< 1 – 2 % (à compter les enzymes)
AND et ARN	< 1 – 2 % (cellules lysées)

4. Organisation

Dans la nature, environ 90 % des bactéries adoptent un mode de vie en biofilm (**Vanzieleghem et Delmée, 2020**). Ainsi, les bactéries qui existent sous formes planctonique, peuvent commencer à former un biofilm en quelques minutes en contact avec la plupart des surfaces (**Allison et al., 2000**). Les microorganismes sont organisés à l'intérieur de la matrice sous forme de micro-colonies ; ces dernières, au sein des biofilms, elles sont séparées par des canaux aqueux qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part d'acheminer l'oxygène et les nutriments dans les régions enfouies du biofilm, et d'autre part d'évacuer les déchets (**Branger et al., 2007**).

La croissance tridimensionnelle du biofilm et la présence d'une matrice extracellulaire qui réduit la diffusion au sein du biofilm conduisent à l'apparition de gradients d'oxygène dont la concentration décroît depuis la surface vers la base du biofilm, où les nutriments sont plus rares et où les déchets du métabolisme bactérien s'accumulent (**Lebeaux et Ghigo, 2012**). Ces gradients permettent d'expliquer la présence de zones de croissance différentes des micro-organismes du biofilm (**Courfort et al., 2007**). Cette hétérogénéité physico-

chimique s'accompagne d'une hétérogénéité métabolique, source de microenvironnements qui permet la coexistence organisée d'espèces bactériennes aux propriétés métaboliques différentes et souvent complémentaires (**Roux et Ghigo, 2006**). Ce qui permet de distinguer une couche la plus profonde du biofilm qui est constituée par les cellules qui se sont fixées en premier. Ces cellules sont petites, leur métabolisme est anaérobie et leur croissance est lente; et une couche superficielle du biofilm qui est constituée de grandes cellules en aérobiose et à croissance rapide. Entre ces deux couches, on trouve des cellules en microaérobiose (**Chalvet de Rochermonteix, 2009**). Enfin, la présence fréquente de microorganismes d'espèces différentes au sein d'un même biofilm constitue un niveau supplémentaire d'hétérogénéité biologique (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

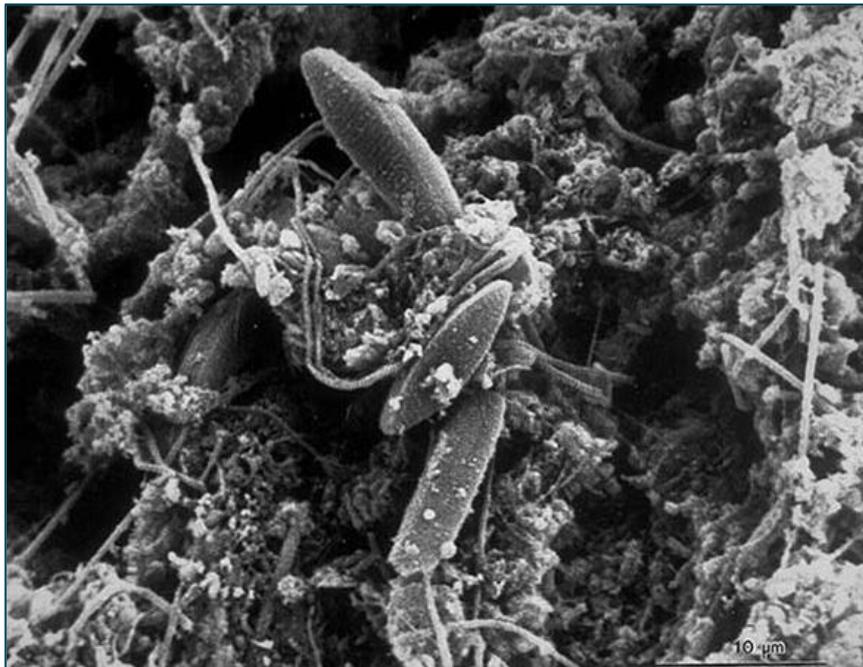


Figure 1: Micrographie électronique à balayage d'un biofilm.
(Donlan, 2002)

5. Les étapes de formation de biofilm

Les bactéries initient la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale, comme l'indisponibilité en oxygène ou en nutriments, mais aussi face à un traitement destructif. Cette variation des facteurs conduit à des biofilms différents les uns des autres (**Branger et al., 2007**). L'observation directe des biofilms par microscopie, ainsi que les nombreuses études génétiques réalisées sur les biofilms, ont conduit à un modèle de développement en cinq étapes (**Roux et Ghigo, 2006**) :

5.1. Mise en place d'un film conditionnant

La première étape est la formation du film primaire ou « film conditionnant ». Cette étape est rapide, elle a lieu quelques minutes après l'exposition d'une surface propre à un fluide contenant des micro-organismes. Avant qu'une surface ne soit exposée à un milieu liquide, elle est chargée soit négativement ou positivement. Après l'exposition au milieu, la surface acquiert des molécules de charges différentes. Elle adsorbe également des molécules de faible poids moléculaire, des molécules hydrophobes, des polysaccharides complexes, des glycoprotéines, des lipides, pouvant être utilisés par les bactéries. Ce film est qualifié de conditionnant car il peut modifier les propriétés de surface initiales du matériau ce qui a pour conséquence soit de prévenir l'approche des bactéries soit au contraire de créer un micro-environnement favorable à l'adhésion stable des bactéries (**Squinazi, 2013**).

Ces constituants qui se trouvent sur la surface vont servir de substrat aux microorganismes, mais il faut souligner que plus le film conditionnant est faible en nutriment plus il sera attractif pour les bactéries, car la limitation de substance du milieu est un paramètre clé dans l'initiation du phénomène d'adhésion (**Branger et al., 2007**).

5.2. Transport et déplacement

Après la formation du film conditionnant, il y aura le transport des microorganismes à proximité de la surface. Ces microorganismes proviennent soit du milieu environnant ou de la redistribution des cellules issues de la phase de distribution d'un biofilm situé à proximité (**Branger et al., 2007**). Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'osmolarité, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique de fluide (**Beloin et al., 2008**).

Lorsque les forces de cisaillement sont nulles ou faibles (en condition statique ou en écoulement laminaire), les micro-organismes peuvent s'approcher de la surface par différents mécanismes (**Characklis et al., 1990**):

- **Passif**, par un mouvement brownien menant à une sédimentation due à la force de gravité s'exerçant sur tous les corps (**Dickson et Daniels, 1991 ; Banks et Bryers, 1992**), ou par des mouvements de convection du milieu amenant physiquement les bactéries vers une surface ;
- **Actif**, par le déplacement des bactéries grâce à des appareils locomoteurs (pili, flagelles) vers des substances nutritives par chimiotaxie (**Davies, 2000**).

La mobilité flagellaire joue par ailleurs un rôle essentiel dans l'initiation de la plupart des biofilm, et peut aussi contribuer à l'adhésion cellulaire en augmentant la probabilité de contact entre la cellule et la surface (**Pratt et Kolter, 1998**).

5.3. Phase d'adhésion

Zobell (1943) a montré que l'adhésion est composée de deux étapes alternatives: l'adhésion réversible fait intervenir un processus physicochimique et constitue une étape non spécifique, et l'adhésion irréversible fait intervenir un phénomène biologique, qui est considéré comme une étape spécifique.

- **L'adhésion réversible**

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide (**Høiby et al., 2011**). La fraction des cellules atteignant la surface s'adsorbe de manière réversible et interagit avec le film conditionnant (**Garrett et al., 2008**). Elles s'y attachent par des interactions non spécifiques, électrostatiques et électrodynamiques et s'adhèrent plus facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire (**Beloin et al., 2008**).

Les micro-organismes non mobiles vont s'adhérer à la surface en utilisant les forces d'interactions ou en utilisant des éléments de leurs surfaces, tandis que ceux qui sont mobiles développent des facteurs d'adhésion impliquant des structures telles que les flagelles, pili ou protéines membranaires qui sont regroupées sous le terme d'adhésines (**Schembri et al., 2003**).

Dans cette phase d'adhésion, les bactéries peuvent être facilement éliminées, ce qui démontre que, irréversible, l'attachement est crucial dans le développement du biofilm (**Anand et al., 2014**).

- **Irréversible**

Cette seconde adhésion correspond à une fixation spécifique des micro-organismes sur un support. Cette adhésion stable est rendue possible grâce à la sécrétion de polymères extracellulaires qui vont former des ponts de fixation entre la cellule et la surface ou entre deux cellules. Selon le type de micro-organisme, les structures d'adhésion vont varier. Pour l'adhésion des bactéries Gram négative, seront impliqués les pili, les curli, les capsules et le glycocalix. Quant à l'adhésion des bactéries Gram positive ce sont les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix qui sont impliqués (**Van Houdt et al., 2005**).

Un certain nombre de cellules adsorbées de manière réversible restent immobilisées et deviennent irréversiblement adsorbées. Au fur et à mesure que les bactéries se multiplient leur adhésion devient plus solide et elles se différencient, en modifiant leur schéma d'expression génique de manière à favoriser leur survie (**Garrett et al., 2008 ; Philips et al., 2011**).

5.4. Multiplication des bactéries et maturation du biofilm :

Lorsque l'attachement des bactéries à la surface sera définitif, elles vont s'agréger entre elles et se diviser en utilisant les nutriments présents dans le film de conditionnement et l'environnement liquide. Ceci mène à la formation des micro-colonies qui s'élargissent et s'unissent pour former une couche cellulaire couvrant la surface (**Otto, 2013; Mogha et al., 2014 ; Goetz et al., 2016**). A partir d'une concentration suffisamment dense d'individus, les micro-colonies commencent à sécréter une matrice extracellulaires environnante (**Philips et al., 2011 ; Tremblay et al., 2014**). Ces substances jouent un rôle immense dans la protection des biofilms contre les agressions extérieures, qu'elles soient mécaniques, physiques, chimiques ou cellulaires ainsi que dans l'ancrage des cellules à la surface (**Mogha et al., 2014**).

La croissance exponentielle de biofilm se traduisant par une augmentation favorable de son épaisseur jusqu'à la formation d'un film hétérogène tridimensionnel (**Costerton et al., 1995**). Pendant cette étape on peut considérer que le biofilm est en équilibre dynamique entre l'accroissement de l'épaisseur par multiplication des bactéries déjà fixer et/ou par l'agrégation des bactéries encor libres dans le milieu aqueux suite à l'arrachement des bactéries dû aux mouvements des fluides environnants (**Branger et al., 2007**).

5.5. Dispersion

Lorsque la densité bactérienne sur une surface devient très élevée, des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant et retournent à l'état planctonique (**Kaplan, 2010**). Ce phénomène complexe dit de dispersion représente l'étape ultime de formation des biofilms et il est induit par des événements extérieurs tels que les perturbations mécaniques (e.g. force de cisaillement) (**Tremblay et al., 2014**) et l'appauvrissement en nutriments. Ces modifications sont perçues par les bactéries, ce qui entraîne l'activation de signaux intracellulaires et ultimement le décrochage d'une partie du biofilm. Plusieurs actions peuvent aussi conduire au détachement physique de bactéries tel que synthèse et sécrétion d'enzymes de dégradation de la matrice (nucléases, glycosidases, protéases), et la modification de surface des bactéries (détachement actif) (**Aumeran et al., 2020**).

Les bactéries peuvent se détacher du biofilm aussi de façon passive par érosion, abrasion et desquamation :

- **L'érosion** (détachement continu de cellules individuelles ou de petits agrégats): est le résultat des forces de cisaillement en milieu liquids;
- **L'abrasion** (la collision de particules): se réfère au détachement continu de cellules simples ou bien des petits groupes cellulaires et affecte la surface total du biofilm;

- **Desquamation** (détachement massif et rapide de quantités importantes de bactéries): correspond à la perte instantanée des grandes parties du biofilm, affectant non seulement le biofilm entier mais aussi la surface du biofilm (Mogha *et al.*, 2014).

Les agrégats érodés ou délabrés du biofilm sont susceptibles de conserver certaines caractéristiques du biofilm, telles que les propriétés de résistance aux antimicrobiens (Donlan, 2002) et seront aussi capables de coloniser d'autres surfaces voire de créer d'autres points infectieux, car les bactéries ainsi libérées sont particulièrement virulentes (Aumeran *et al.*, 2020), complétant ainsi le cycle, et la phase planctonique peut alors être assimilée à une phase de dispersion transitoire (Branger *et al.*, 2007).

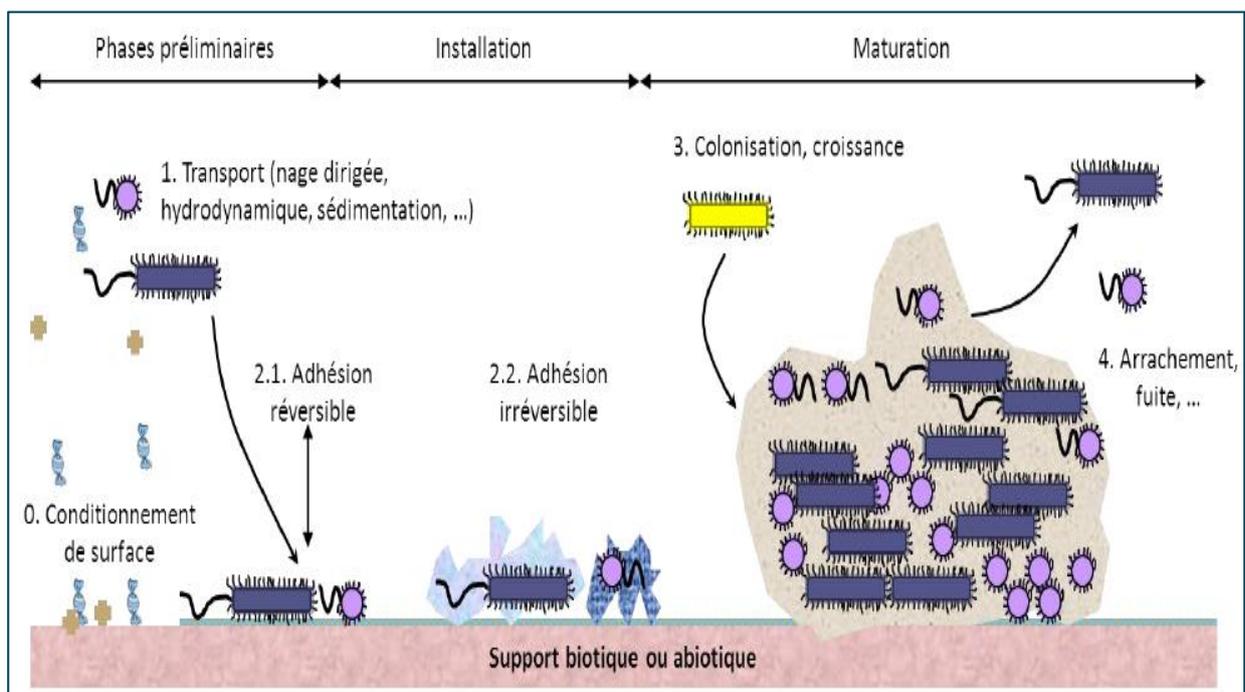


Figure 2: Représentation schématique du développement d'un biofilm bactérien. (Bridier *et al.*, 2011)

6. Facteurs favorisant la formation d'un biofilm

Le développement d'un biofilm est un processus séquentiel complexe qui fait intervenir de nombreux mécanismes physico-chimiques et biologiques. Ce développement est influencé par trois composants : la surface, le milieu, et les microorganismes ; ainsi que les interactions existantes entre ces composants (Branger *et al.*, 2007).

6.1. Caractéristiques de la surface

Les propriétés de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur :

- **La rugosité de la surface**

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des micro-colonies est importante (**Characklis, 1990**). Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités. Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses (**Donlan et Costerton, 2002**).

- **Les propriétés physico-chimiques de la surface**

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le téflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux (**Bendinger, 2003**).

- **Présence de films protéiques sur la surface**

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires, influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilms (**Nobbs, 2009**).

6.2. Caractéristiques du milieu

La formation et la dispersion d'un biofilm nécessitent des équipements enzymatiques précis et des entités structurales particulières, dont l'activation dépend de facteurs environnementaux clefs (**Donlan, 2002**).

- **La température**

Elle est importante car elle peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion (**Dumas, 2007**).

- **Le Ph**

Le ph du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa (**Hamadi et al., 2004**).

- **Sources de carbone disponibles**

Elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation (**Martinez, 2007**).

- **Concentrations en nutriments**

Dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique (**Spormann, 2008**).

- **Concentrations en certains cations**

L'augmentation de la concentration de plusieurs cations (sodium Na⁺, Calcium Ca²⁺, ion ferrique Fe³⁺) influence l'attachement de *Pseudomonas fluorescens* sur des surfaces en verre, en réduisant les forces répulsives s'exerçant entre les bactéries chargées négativement et la surface de verre (**Fletcher, 1988**).

- **Hydrodynamique du fluide**

Selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide (**Donlan, 2002**).

6.3. Propriétés des cellules

L'hydrophobicité de la surface cellulaire, la présence de fimbriae et de flagelles et la production d'exopolysaccharides (EPS), influencent tous le taux et l'étendue de la fixation des cellules microbiennes. L'hydrophobicité de la surface cellulaire est importante dans l'adhésion car les interactions hydrophobes ont tendance à augmenter avec une nature non polaire croissante d'une ou des deux surfaces impliquées (c'est-à-dire la surface des cellules microbiennes et la surface du substrat). Les polymères apolaires situés à la surface des cellules comme les fimbriae, certaines protéines, et les acides mycoliques (composants de certaines bactéries Gram positives), semblent s'attacher de façon prédominante à des surfaces hydrophobes. Les EPS et les lipopolysaccharides sont plus importants dans les mécanismes d'attachement à des surfaces hydrophiles (**Donlan, 2002**).

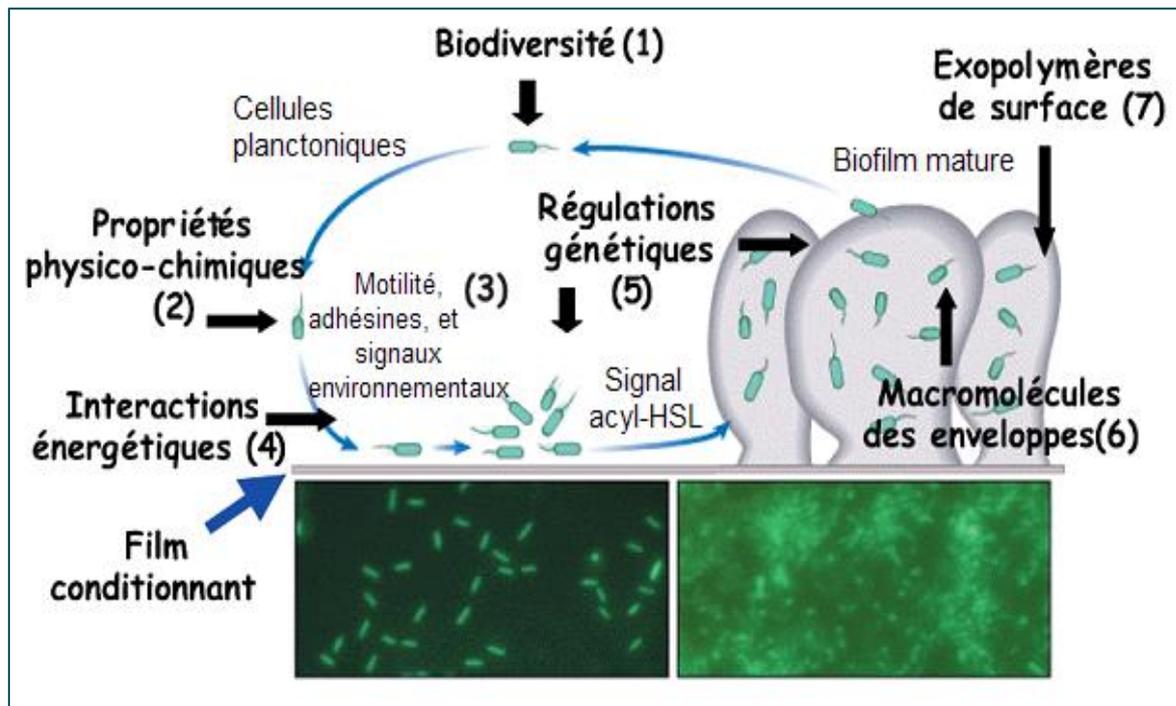


Figure 3: Paramètres impliqués dans l'adhésion bactérienne, la maturation et la structure (Haras, 2005)

7. Régulation de la formation des biofilms : *quorum sensing*

En 1970, *Vibrio fischeri* (anciennement appelé *Photobacterium fischeri*), a fait l'objet d'observations à propos de la régulation de la bioluminescence émise par ces bactéries : la fabrication de photons est en effet induite uniquement à partir de la phase exponentielle de croissance des bactéries et non dans une culture fraîchement inoculée lorsque la densité cellulaire est faible. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse d'une auto-induction pour la régulation de ce processus et ils ont nommé auto-inducteur (AI), la molécule régulatrice qui s'accumule dans le milieu. Le terme de « quorum » a par la suite été introduit pour décrire l'idée d'un nombre minimal de bactéries nécessaire au déclenchement de comportements de groupe.

Au début du XXI^e siècle, le quorum sensing (QS) a été identifié chez de nombreuses bactéries à Gram positif et négatif comme un mode de communication et de perception fondé sur la production de petites molécules, qui peuvent diffuser à travers la membrane ou être transportés à l'extérieur de la cellule (Mion *et al.*, 2019). Le QS est donc un mécanisme de contrôle des processus ayant lieu au sein des cellules, matérialisés par des signaux de cellules à cellules, et dépendant de la quantité de cellules présentes : on parle de mécanismes de perception de densité cellulaire (Costerton, 1999).

Chez les bactéries Gram négatif, il implique la sécrétion de petites molécules dérivées d'acides gras, alors que chez les bactéries Gram positif, il est basé sur la production de dérivés peptidiques. Le QS est à l'origine de l'expression de plusieurs types de gènes en l'occurrence les gènes codant pour l'émission de la bioluminescence, la sporulation, la compétence, la production d'antibiotique, la sécrétion de facteurs de virulences, la production de pigments et la formation de biofilm (Aye, 2015).

7.1. Les molécules du *quorum sensing*

Il existe une grande diversité de molécules de communication entre bactéries. Les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus* spp, *Clostridium* spp, *Enterococcus* spp) utilisent souvent des peptides cycliques d'environ 7 à 11 acides aminés. Ces peptides sont transportés hors de la cellule bactérienne puis sont perçus par le senseur membranaire des autres bactéries (senseur à histidine kinase). La fixation du peptide au senseur entraîne l'activation d'un régulateur de réponse (par exemple sa phosphorylation) activant l'expression des gènes du QS.

Chez les bactéries à Gram négatif, différentes molécules sont utilisées, les plus communes étant les acyl homosérine lactones (AHL), dont les tailles (de 4 à 18 atomes de carbone) et les modifications de la chaîne acyl varient selon les bactéries. Les AHL diffusent librement à travers la membrane bactérienne et la réponse au QS est déclenchée par leur fixation dans la cellule à un régulateur de transcription de type LuxR qui, ainsi activé, induit l'expression des gènes du QS. D'autres molécules sont impliquées dans le QS des bactéries à Gram négatif et sont spécifiques de chaque espèce bactérienne. Un autre AI est utilisé par les bactéries à Gram positif et négatif, le diester AI-2 qui est utilisé par un large spectre de bactéries, il est considéré comme une molécule signal inter-espèces (Mion et al., 2019).

7.2. La signalisation QS chez les bactéries Gram-positifs

Le système de détection de QS chez les bactéries Gram positif comme chez *Staphylococcus aureus* se produit par le biais du régulateur de gène accessoire (agr) (Yarwood J.M et al., 2004 ; Novick et Geisinger, 2008; Periasamy et al., 2011). Agr fonctionne pour augmenter l'expression de certains facteurs de virulence sécrétés par *S. aureus* et diminuer certaines protéines de surface cellulaire (Novick et Geisinger, 2008). Il est prouvé que agr contribue à *S. aureus* pathogénicité dans plusieurs types d'infection, y compris les abcès sous-cutanés, l'endocardite et l'arthrite.

Au niveau moléculaire, le locus agr contient les promoteurs P2 et P3 qui codent respectivement pour les transcrits ARNII et ARNIII (Yarwood J.M et al., 2004 ; Novick et Geisinger, 2008). Les opérons P2 et P3 codent pour différentes protéines qui ont des rôles individuels dans la détection agr. L'opéron P2 code le transcrit ARNII qui code pour agrB, agrD, agrC et agrA. Ces quatre produits constituent le système de signalisation proprement dit [Figure 4]. L'opéron P3 code le transcrit d'ARNIII qui produit un seul produit génique,

une toxine appelée delta-hémolysine mais qui augmente la transcription de plusieurs facteurs de virulence.

AgrD et AgrB forment un système de régulation à deux composants pour produire un peptide auto-inducteur (AIP). AgrD code pour la pro-AIP et la protéine transmembranaire AgrB transforme le pro-AIP en AIP, le transportant vers l'espace cellulaire externe. L'AIP continuera à s'accumuler dans l'environnement externe au-delà de la membrane cellulaire, se liant éventuellement à AgrC, une kinase intégrée dans la membrane. La kinase AgrC phosphoryle le régulateur AgrA, qui est alors responsable de l'auto-induction du locus agr en se liant aux promoteurs P2 et P3 et en relançant le cycle (Novick et Geisinge, 2008).

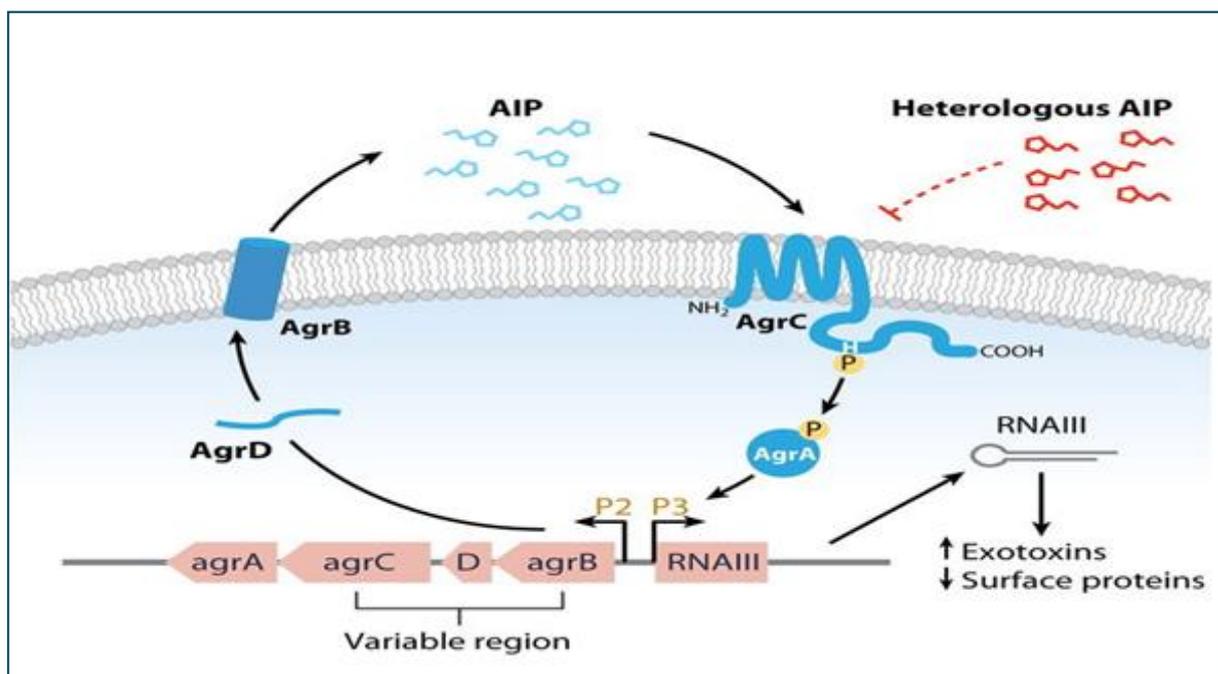


Figure 4: Le système QS arg chez *Staphylococcus aureus*.

(Novick et Geisinge, 2008)

7.3. La signalisation QS chez les bactéries Gram-négatifs

Le système QS, a été retrouvé aussi chez les Gram négatif comme *P. aeruginosa* qui est largement étudié sur différents modèles expérimentaux. Chez *P. aeruginosa*, deux systèmes de QS ont été découverts, le système *las* et le système *rhl*, contrôlant à deux la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la virulence.

Le système *las* comprend le gène *lasR* codant pour la protéine régulatrice LasR et le gène *lasI* codant pour une enzyme, auto-inducteur synthase, LasI nécessaire à la synthèse d'un type d'AHL : *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homosérine lactone (3-oxo-C12-HSL).

Lorsque la concentration en 3-oxo-C12-HSL atteint un seuil critique, témoin d'une concentration bactérienne élevée, une molécule d'AHL se lie à deux protéines LasR pour constituer un complexe activateur de la transcription de plusieurs gènes. Cette activation est déclenchée de manière synchrone dans toute la population bactérienne à la jonction entre la phase de croissance exponentielle et le début de la phase stationnaire. Les gènes activés par ce système comme indiqué comprennent:

- *lasB* , *lasA* , *aprA* codant respectivement pour deux élastases, et pour une protéase alcaline contribuant chacune à la destruction des tissus pulmonaires;
- *toxA* , codant pour une exotoxine ADP-ribosylante;
- *xcpR* et *xcpP*, codant pour des protéines de la machinerie de sécrétion de type II nécessaires à l'exportation de ces facteurs hors de la bactérie;
- Et *lasI*, permettant une augmentation rapide de la synthèse de 3-oxo-C12-HSL et donc une amplification du signal par auto-induction.

Le deuxième système *rhl* fonctionne selon le même schéma et comprend le gène *rhlR*, codant pour la protéine régulatrice RhlR et le gène *rhlI*, codant pour une enzyme auto-inducteur synthase, RhlI nécessaire à la synthèse d'un second type d'AHL : *N*-butyryl-L-homosérine lactone (C4- HSL). Le complexe RhlR-C4-HSL contrôle l'expression de l'opéron *rhlAB* nécessaire à la production de rhamnolipide, et l'expression d'une série de gènes dont *lasB*, *lasA*, *aprA*, et *rhlI*.

Malgré la similitude structurale entre couples activateurs/inducteurs (LasR/LasI et RhlR/RhlI) des deux systèmes, aucun des composants d'un système ne peut remplacer ceux de l'autre. Cependant, il existe des interactions entre ces deux systèmes. Le complexe LasR-3-oxo-C12-HSL active la transcription de *rhlR* et *rhlI*. De plus, les 3-oxo-C12-HSL peuvent entrer en compétition avec les C4-HSL pour le site de liaison à RhlI et pourraient ainsi agir comme un antagonisme du système *rhl*. Il existe donc une hiérarchie entre ces deux systèmes avec le système *las* qui régule positivement le système *rhl* (**Ruimy et Andremont, 2004**).

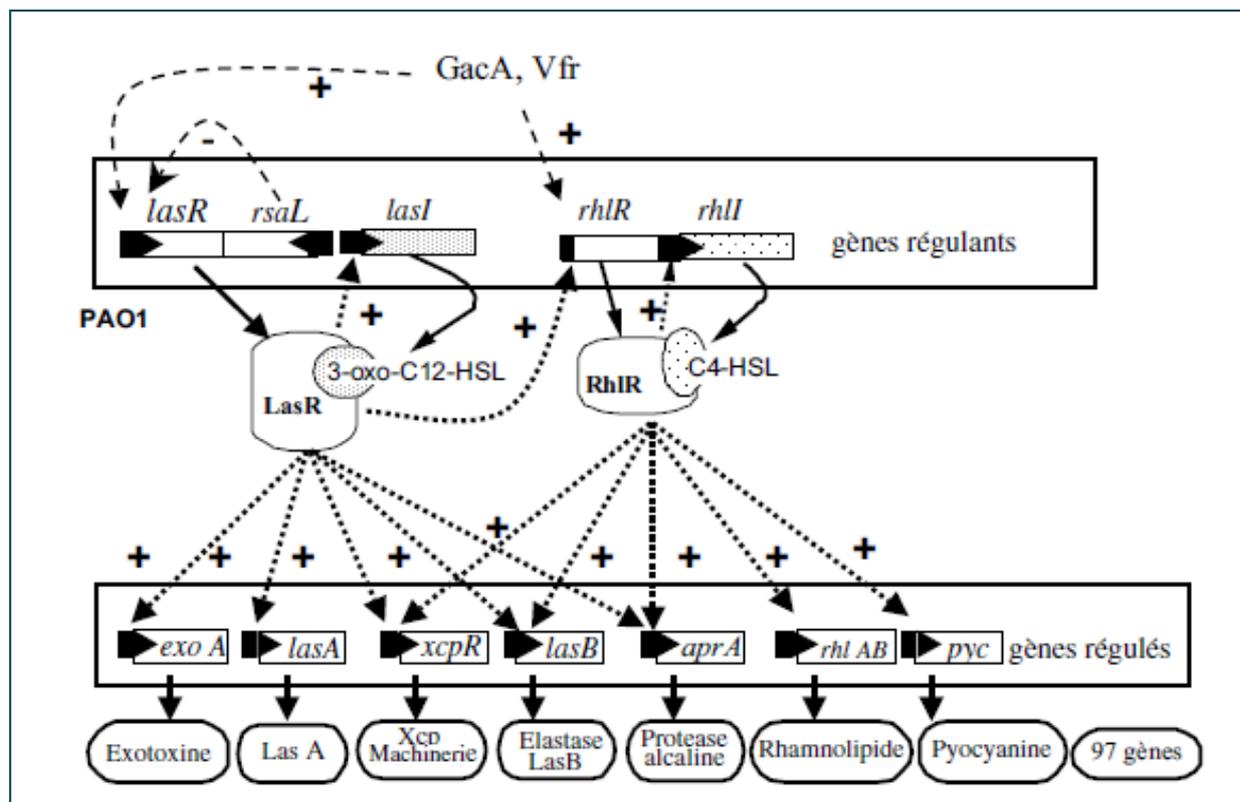


Figure 5: Mécanisme moléculaire du Quorum sensing chez *P. aeruginosa*.

(Ruimy et Andremont, 2004)

8. Le quorum quenching

L'altération des mécanismes du QS peut aboutir à d'importantes modifications phénotypiques des micro-organismes du biofilm, par exemple une sensibilité augmentée à des antibiotiques ou à des antiseptiques, ou encore des anomalies dans le cycle de développement du biofilm, surtout lors des étapes de formation et de dispersion (Irie, 2008). Suite à cela, différentes stratégies ont donc été développées pour inhiber ces comportements régulés par le QS en bloquant la communication entre les bactéries. Cette méthode d'inhibition du QS est appelée « quorum quenching » (QQ). La composante principale du QS étant la production et la détection de molécules signal, le QQ peut interférer de différentes manières avec ce système, soit au niveau intracellulaire, soit au niveau extracellulaire.

L'utilisation de molécules inhibitrices, nommées inhibiteurs du QS (IQS), mimant les AI, permet ainsi d'intervenir au niveau des cellules bactériennes pour inhiber la production ou la perception des AI. D'autres stratégies ciblent directement les molécules de communication sécrétées dans l'environnement avant qu'elles n'atteignent leur cible. Le QQ présente l'avantage de ne pas affecter la croissance des bactéries, contrairement aux

antibiotiques, ce qui minimise nettement la pression de sélection et devrait limiter l'apparition de résistance (Mion *et al.*, 2019).

Les molécules IQSs peuvent être soit naturelles, sécrétées par des organismes vivants tels que les bactéries, les champignons, les algues, les éponges ainsi que les plantes et les animaux, soit chimiquement synthétisées (Aye, 2015). Le QQ représente donc une approche idéale pour la prévention et le traitement des infections bactériennes et pourrait constituer une alternative élégante aux antibiotiques (Mion *et al.*, 2019).

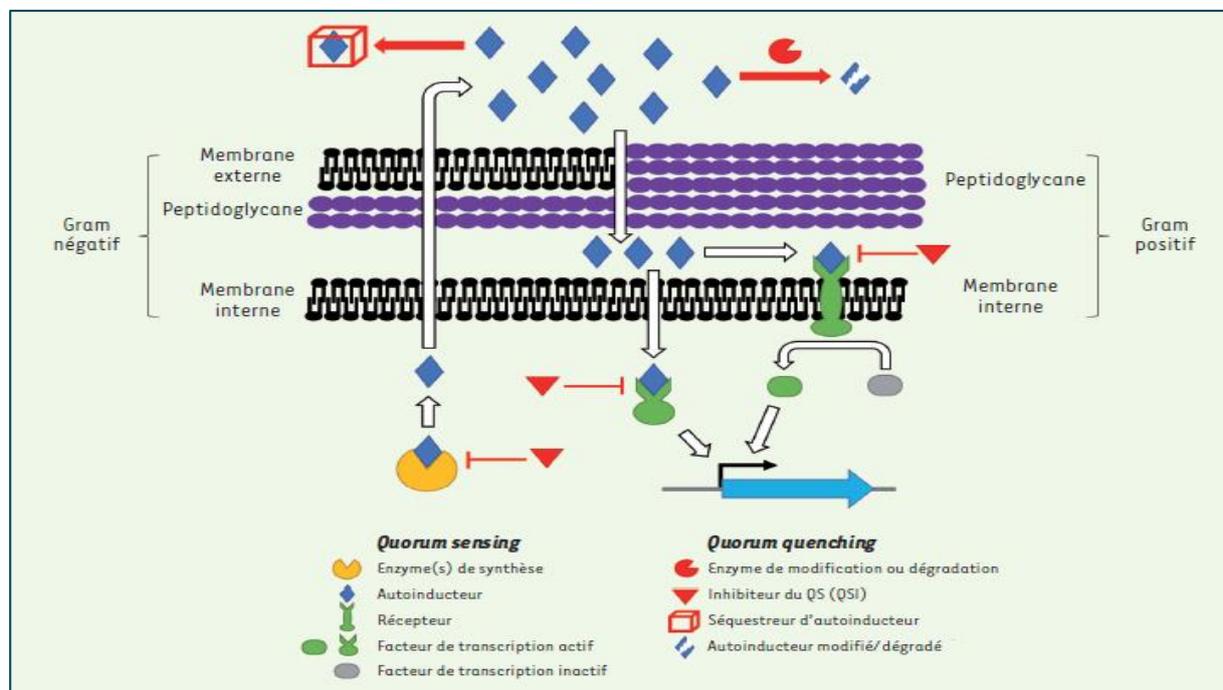


Figure 6: Schéma récapitulatif des mécanismes du QS bactérien et des différentes stratégies du QQ.

(Mion *et al.*, 2019)

9. Rôle du biofilm dans la persistance bactérienne

Le biofilm permet aux cellules qui le constitue d'acquérir plusieurs avantages leur assurant une persistance et une croissance meilleure afin de pouvoir se répartir dans des différents environnements.

9.1. Avantage métabolique

La croissance bactérienne en biofilm permet l'acquisition d'avantages métaboliques par l'action synergique des différentes espèces bactériennes. L'organisation structurée en communauté des biofilms permet l'optimisation des mécanismes de capture des nutriments et

ainsi la réalisation d'économies énergétiques. Ainsi l'organisation architecturale complexe des biofilms permet aux micro-organismes de coopérer pour dégrader certains nutriments complexes. Un nutriment donné peut avoir des effets directs ou indirects sur l'environnement du biofilm. Il peut constituer une source d'énergie, une source d'azote ou une source de carbone pour un ou plusieurs micro-organismes dans le milieu (**Sutherland, 2001 ; Branda et al., 2001**).

9.2. Protection vis-à-vis des agressions de l'environnement

La tolérance du biofilm aux agressions extérieures est une de ses caractéristiques les plus remarquables. Par rapport à des bactéries cultivées en milieu liquide, on observe une survie des biofilms bactériens à des doses d'antibiotiques très élevée ainsi qu'une résistance aux ultraviolets, métaux lourds, acides, et aux changements d'hydratation et de salinité.

Un autre mécanisme joue un rôle majeur dans la tolérance du biofilm aux antibiotiques : la présence de bactéries en dormance appelées persistantes, elles représentent moins de 1 % de la population originale et leur génome est identique à celui des autres bactéries et ont la capacité de se protéger du système immunitaire (leucocytes et anticorps) et de survivre à un traitement antibiotique (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

On peut souligner aussi la sécrétion d'une matrice exopolymérique constituant une gangue stabilisatrice et protectrice, par exemple la couche la plus externe de cette matrice se déshydrate afin de former une interface sèche et d'empêcher une dessiccation plus marquée (**Sutherland, 2001**). Aussi, la présence de zones peu ou pas oxygénées dans les couches profondes du biofilm peut également contribuer à la résistance à certains biocides qui peuvent être inactivés dans ces conditions ou qui sont peu efficaces sur les bactéries métaboliquement peu actives (**Spormann, 2008**). L'ensemble de ces caractéristiques suggère que le biofilm constitue un mode de vie favorable pour les bactéries, au point de constituer, pour certaines espèces bactériennes, un mode de vie par défaut (**Roux et Ghigo, 2006**).

10. Biofilms et antibiorésistance

L'antibiorésistance développée par les biofilms bactériens pose de sérieux problèmes en matière de santé publique, puisqu'elle rend difficile le traitement des infections. L'antibiorésistance d'une bactérie vivant sous forme de biofilm est 10 à 1000 fois plus élevée qu'une bactérie de la même espèce vivant sous forme planctonique. La résistance naturelle ou résistance intrinsèque est une caractéristique propre à une espèce bactérienne et partagée par toutes les souches de cette espèce. Elle peut être due à la présence d'un gène chromosomique commun à toutes les bactéries de l'espèce. Pour chaque classe d'antibiotique, il existe des

espèces bactériennes pour lesquelles l'antibiotique est inactif par défaut de cible ou d'accès à la cible (**Ghada, 2018**).

L'expression de facteurs induits de résistance à un antibiotique, qui viennent compléter l'action des facteurs de résistance innés, est stimulée par l'exposition d'une population de bactéries à cet antibiotique, qui constitue un stress important pour ces dernières. Au sein d'un biofilm exposé à un antibiotique se crée un gradient, qui décroît quand on approche des couches profondes du biofilm. Ce gradient entraîne l'expression différentielle de facteurs de résistance, selon l'endroit où l'on se trouve dans le biofilm (**Lewis, 2008**).

En plus de cette exposition du biofilm aux antibiotiques, la privation en oxygène et en nutriments entraîne une forte diminution de l'activité métabolique bactérienne. Ce qui rend les bactéries situées dans les couches profondes du biofilm, moins sensibles à l'action des agents antimicrobiens (**Costerton, 1999 ; Donlan et Costerton, 2002**). Par contre, les cellules superficielles à haut métabolisme et à divisions rapides seront détruites par les antibiotiques qui auront réussi à franchir la matrice.

La résistance des bactéries des biofilms dans des conditions de basses concentrations en oxygène peut s'expliquer par le fait que certains antibiotiques ne sont pas actifs en absence d'oxygène (**Zabinski, 1995**). D'autre part, certains groupes de gènes sont activés par de basses concentrations en oxygène, et sont à l'origine de modifications phénotypiques permettant une résistance accrue aux agents antimicrobiens (**Drenkard, 2003**).

11. Localisation des biofilms

Les biofilms sont présents dans toutes les niches écologiques et colonisent des surfaces très diverses et constituent le mode de vie privilégié des bactéries dans la nature, alors que la phase planctonique ne serait qu'un passage permettant la dissémination vers de nouvelles surfaces (**Roux et Ghigo, 2006**).

11.1. Dans le milieu hospitalier

Plus de 75% des infections de l'Homme serait liées à la présence de microorganismes sous forme de biofilm à la surface des tissus ou de dispositifs médicaux. Ce sont des infections spécifiques (ostéo-infections, otites,...) ou liées aux soins, souvent secondaires à l'utilisation de matériels invasifs (sondes urinaires, sondes trachéales, cathéters,...), à la surface desquels se forment des biofilms. Des bactéries peuvent se détacher ponctuellement et coloniser d'autres surfaces ou pénétrer plus en aval dans l'organisme. La répétition de ces décharges conduit à des formes infectieuses chroniques, particulièrement difficiles à diagnostiquer et à traiter (**Aumeran et al., 2020**).

Les infections liées à des biofilms touchent majoritairement les personnes légèrement ou fortement immunodéprimés ; et vu les symptômes qui surgissent de façon récurrente, elles contribuent de manière très importante aux infections nosocomiales (**Roux et Ghigo, 2006**). Telles que les parodontites, les infections sur matériel médical, les pneumonies chez les patients atteints de mucoviscidose, les infections chroniques du tractus urinaire, les otites moyennes chroniques, les prostatites chroniques (**Dolan et Costerton, 2002**). Aussi, dans le cas du biofilm oral, ou certains microorganismes ont le potentiel de causer des dommages aux tissus minéralisés ou des infections dans les tissus mous. En insérant des corps étrangers comme des restaurations dentaires, de nouvelles niches apparaissent pour les microorganismes, favorisant l'accumulation de biofilm à potentiel pathologique. Le port de prothèses amovibles induit aussi des changements environnementaux locaux, en particulier les personnes âgées dépendantes, qui ne gardent pas leurs prothèses suffisamment propres, ce qui entraîne une stomatite de la prothèse (**Didi et al., 2019**). Vu la résistance élevée aux agents antibactériens (antibiotiques et désinfectants), même chez un individu immunocompétent, la réaction immunitaire ne permet pas de détruire la communauté bactérienne au sein du biofilm (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

Les principales bactéries incriminées proviennent des microbiotes propres aux patients ou de son environnement comme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Roux et Ghigo, 2006**).

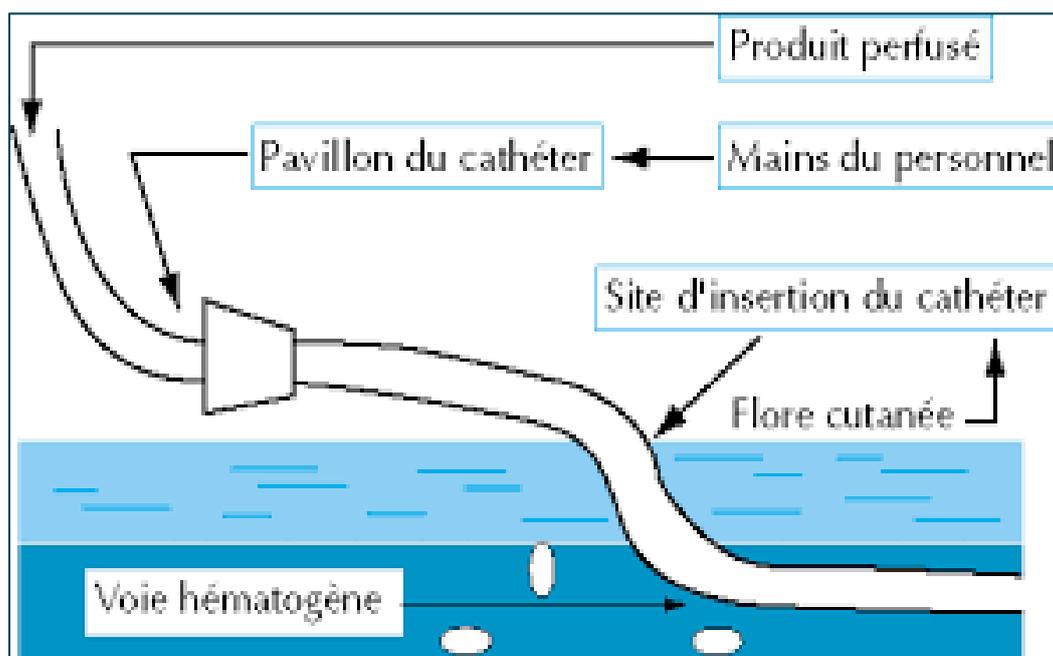


Figure 7: Voies de contamination du cathéter.

11.2. Dans l'industrie agro-alimentaire

Les biofilms sont la source de nombreux problèmes dans l'industrie agro-alimentaire, en termes d'hygiène et d'altération des qualités organoleptiques des produits alimentaires. Ils sont présents dans tous les secteurs: laiteries, brasseries, meuneries, sucreries, salaisonneries, etc. (**Jeyasekaran et al., 2000**). Des biofilms peuvent aussi se développer dans les réseaux d'alimentation en eau potable et dans les systèmes de climatisation. La présence de biofilms dans les canalisations peut être à l'origine de la détérioration de la qualité organoleptique et microbiologique de l'eau (**Paquin et al., 1992**).

De plus, le contact des communautés microbiennes avec la surface des produits alimentaires augmente la probabilité que les cellules adhèrent de manière irréversible et restent même dans les surfaces après l'assainissement. C'est l'une des principales raisons de la formation de biofilm sur les surfaces en contact avec les aliments. Par exemple en industrie laitière, les biofilms microbiens sont la principale source de contamination du lait et des produits laitiers. L'un des groupes les plus communs d'organismes formant des biofilms sur les équipements laitiers est la flore bactérienne aérobie sporulée thermophile. La persistance de ce groupe de contaminants bactériens dans l'environnement laitier, est attribuée à la résistance de leurs biofilms aux agents chimiques du nettoyage / désinfection (**Benkhaldi, 2017**).

Les biofilms peuvent aussi se révéler très utiles dans le domaine agroalimentaire comme dans la production d'éthanol dans des réacteurs disposés verticalement et dans lesquels des levures *Saccharomyces cerevisiae* sont immobilisées sous forme de biofilm (**Todd et Gerald, 2001**), et également dans la production du vinaigre (acide acétique). De plus l'utilisation de certains microorganismes en forme de biofilm dans les réacteurs à lit fixe a été proposée pour la dégradation des mycotoxines par voie biologique (**Alnasouri et al., 2007**).

11.3. Dans le recyclage et l'épuration

Le plus souvent inoffensifs, les biofilms jouent un rôle écologique capital et contribuent très largement au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes. D'ailleurs, depuis de nombreuses années, le traitement de nos eaux usées s'effectue grâce à l'utilisation empirique de l'activité épuratrice des biofilms bactériens. 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 les biofilms servent au traitement des déchets par un mécanisme appelé bioremédiation (**Roux et Ghigo, 2006**).

11.4. Autres domaines

Les biofilms posent également des problèmes dans de nombreux secteurs industriels. Dans l'industrie pétrolière par exemple, la colonisation des systèmes d'injection d'eau peut entraîner une acidification du pétrole qui devient alors inutilisable. La formation de biofilms est rencontrée aussi sur les coques des navires, appelée phénomène de « biofouling », conduit à une augmentation des forces de friction, une diminution de la vitesse des bateaux et des surcoûts énergétiques considérables (**Roux et Ghigo, 2006**).

12. Les techniques d'études des biofilms bactériens

Différentes méthodes ont été utilisées pour qualifier et quantifier les biofilms sur des surfaces abiotiques. Ces différentes méthodes peuvent être classées en fonction de la technique de base utilisée. Il s'agit des techniques de quantification effectuées en microplaques et des méthodes d'observation microscopiques. La majeure partie de ces méthodes se réalisent soit à partir d'indicateurs colorimétriques, soit à partir de marqueurs fluorescents.

Le principe étant de quantifier de manière indirecte les biofilms formés par les organismes, en utilisant des colorants, le plus connu et le plus utilisé est le cristal violet qui permet de colorer les cellules chargées négativement aussi bien que les polysaccharides de la matrice (**Amaya et al., 2012 ; Li et al., 2003**). Il existe notamment le bleu 1,9 diméthylméthylène (BDMM) qui se lie préférentiellement aux polysaccharides de la matrice du biofilm (**Toté et al., 2008**), ainsi que la résazurine qui permet de quantifier le nombre réel de cellules viables dans un biofilm et d'avoir des informations sur son activité (**Punithavathy et al., 2012**). Pour toutes ces techniques, la mesure d'absorbance des colorants utilisés se fait par spectrophotométrie et permet d'obtenir une information quantitative.

Une technique similaire de quantification des biofilms en microplaque est basée sur l'utilisation de fluorochromes. Elle consiste à marquer soit les cellules du biofilm, soit leurs acides nucléiques en l'occurrence l'ADN par des fluorochromes et à lire l'intensité de fluorescence des cellules à partir d'un lecteur de microplaques. Les fluorochromes les plus souvent utilisés sont le Syto61, le Syto9 et le DAPI. Elle permet aussi d'évaluer la quantité de bactéries présentes sur la surface. Des observations microscopiques doivent cependant venir en complément des marquages aux fluorochromes afin de renseigner sur la structure des biofilms (comme le cas de l'étude génétique des biofilm par PCR) (**Aye, 2015**).

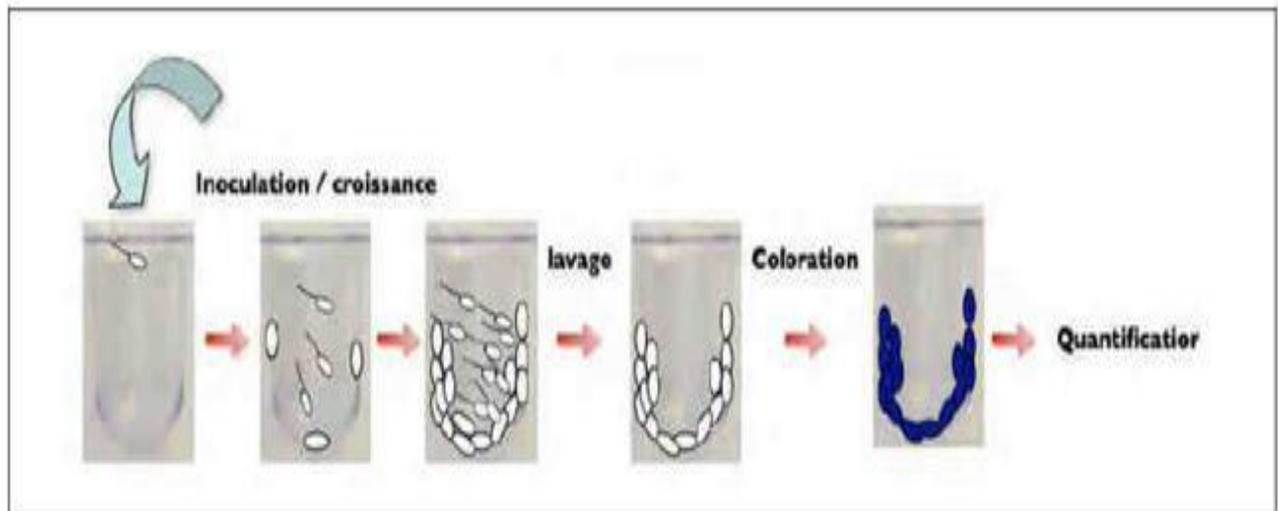


Figure 8: Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques.

(Laurent, 2011)

Il existe aussi une autre technique de quantification de biofilm aussi en microplaque, mais qui est basée, non pas sur l'utilisation des fluorochromes ou d'indicateurs colorimétrique, mais sur la mobilité de microbilles magnétiques au sein de la matrice des biofilms. Elle est connue sous le nom de Biofilm Ring Test.

Cette technique ne nécessite aucune étape de lavage ou de coloration, son principe repose sur la mesure de la mobilité de microbilles magnétiques ajoutées à une culture bactérienne au fond des puits d'une microplaque. Après différents temps d'incubation, les puits sont soumis à une aimantation puis les microplaques sont scannées avec un lecteur développé par Biofilm Control. En absence de biofilm, les microbilles sous l'influence du champ magnétique migrent au centre du puits et forment un spot foncé. S'il y a formation d'un biofilm, les microbilles sont piégées dans la matrice extracellulaire et ne peuvent pas migrer au centre du puits lors de l'aimantation. Il n'y a donc pas de formation de spot au centre du puits [Figure 09] (Aye, 2015).

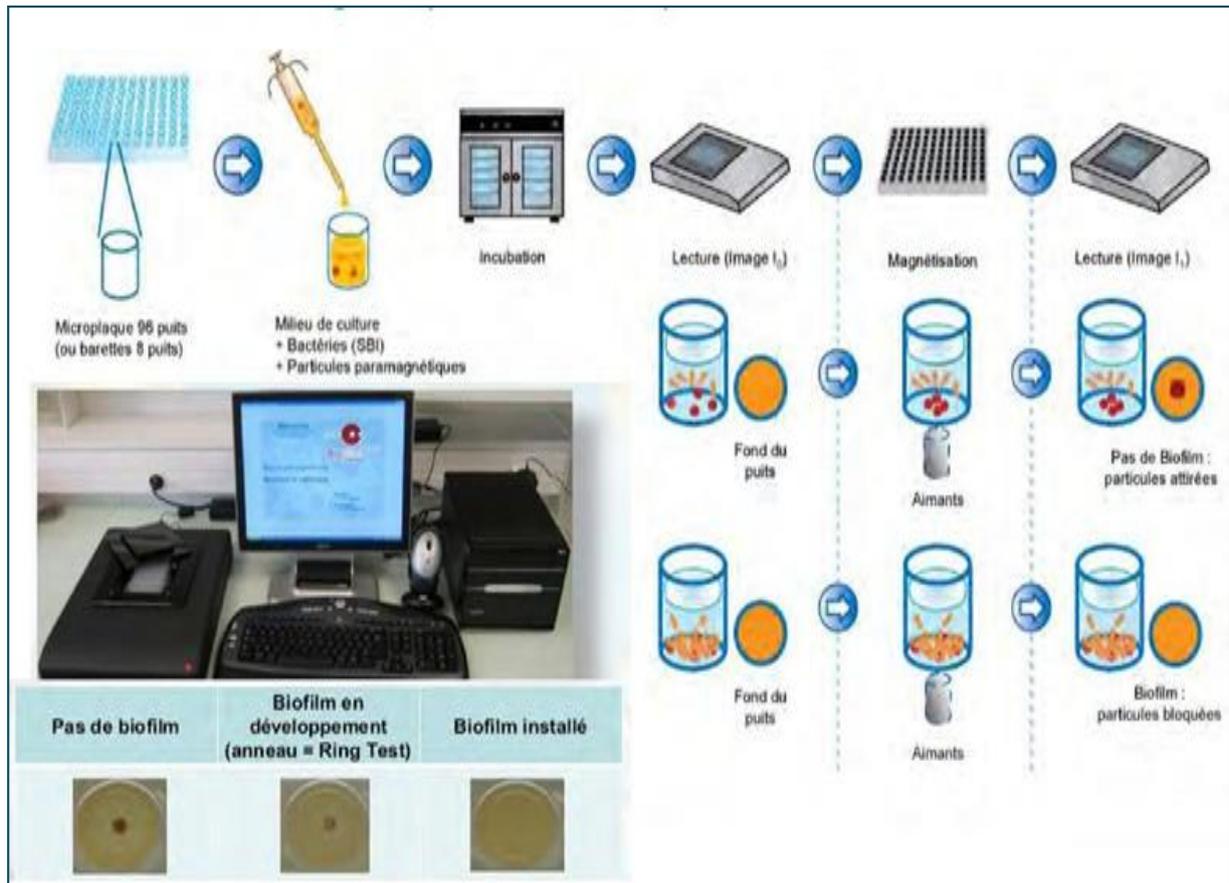


Figure 9: Biofilm ring test.

D'autres techniques ont été développées et qui ont permis d'élucider mieux l'environnement naturel des biofilms. C'est le cas de la méthode microfluidique à haut débit qui permet de réaliser des tests sur des bactéries dans les conditions physiologiques d'écoulement, autrement dit, ce système intègre les forces de cisaillements et de très petits volumes pour fournir des modèles biologiques qui ressemblent à des conditions *in vivo*. Cette technique utilise un dispositif contenant une plaque qui permet d'étudier jusqu'à 96 biofilms simultanément, de plus les forces de cisaillements peuvent être réglées pour mieux contrôler la formation du biofilm.

Le même principe est retrouvé chez une autre technique qui est la méthode de quantification en culture continue en flow-cell ; à l'inverse de la méthode microfluidique qui est un système fermé, cette technique permet un apport continu en nutriment et un relargage de déchets métaboliques (Trembley *et al.*, 2015).

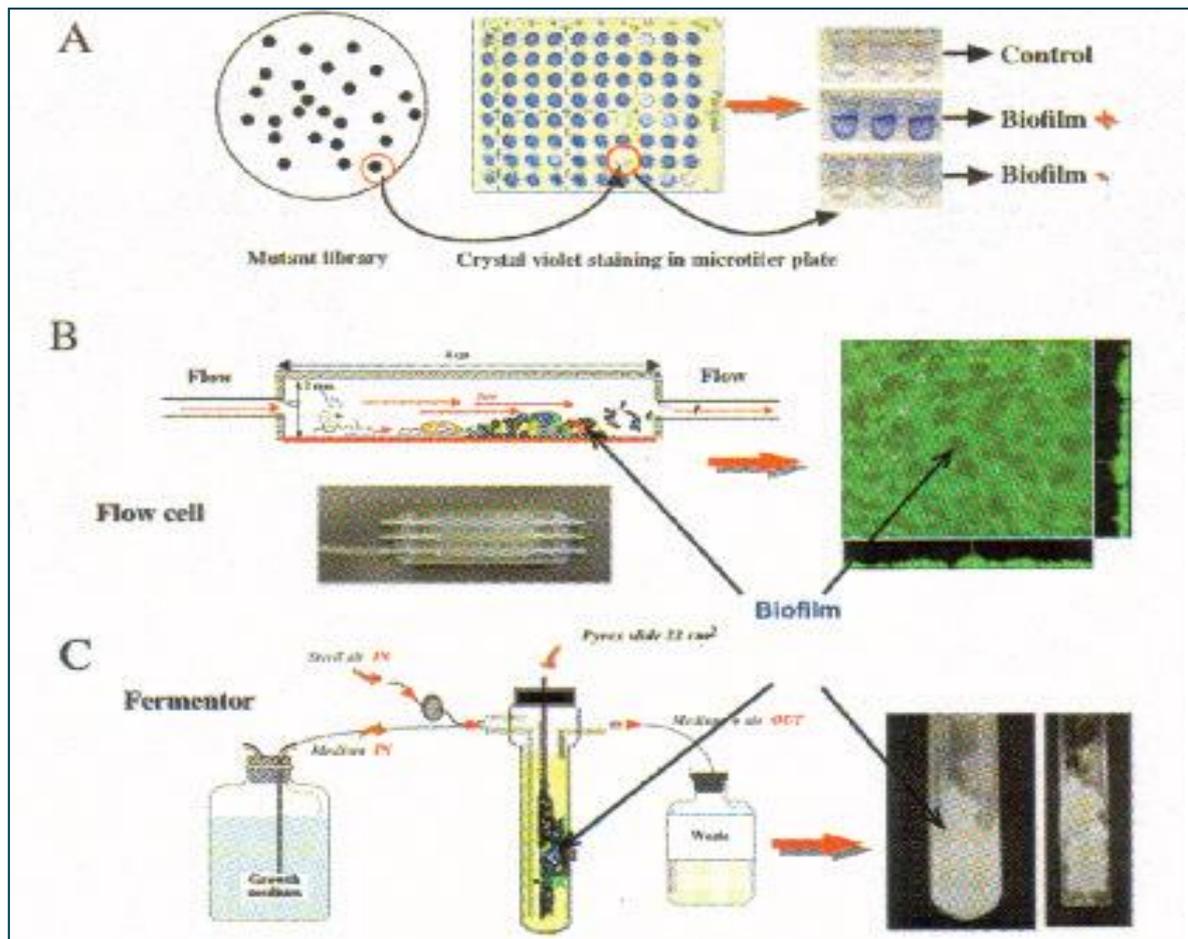


Figure 10: Approches expérimentales de la formation du biofilm. A : modèle de culture en plaque de microtitration suivie de coloration au violet de gentiane. B et C : culture continue en flox-cell (B) ou microfermenteurs (C) (Roux et Ghigo, 2006).

Les résultats qui pourraient être obtenus par ces techniques précédemment citées, peuvent être complétées en utilisant les techniques microscopiques qui permettent une analyse directe et détaillée des biofilms qui varie en fonction du type de microscope utilisé. En effet, les microscopes électroniques à transmission et à balayage permettent une étude morphologique à savoir la répartition spatiale ainsi que la structure du biofilm, tandis que la microscopie à épifluorescence et à balayage laser confocal permet en plus, la quantification des bactéries dans les biofilms au préalable marquées par des fluorochromes ou des marqueurs colorimétriques (Aye, 2015).

Dans l'ensemble, chaque approche a des avantages et des limites différents [Tableau 02], et par conséquent, l'utilisation d'une combinaison est la meilleure approche pour minimiser les erreurs et maximiser la quantité d'informations obtenues à partir de ces structures complexes.

Tableau 2: Les méthodes d'étude du biofilm les plus couramment utilisées en laboratoire.

Méthodes d'étude du biofilm	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients
Microplaques 96 puits	Interface solide liquide; Évaluation quantitative de la formation de biofilms par mesure de sa densité optique	Simple d'utilisation ; Rapide ; Criblage haut débit ; Compatible avec lecteur de plaques	Condition statique : pas de forces de cisaillement ; Aucun ajout de milieu frais
Biofilm ring test	Interface solide liquide; Évaluation quantitative de la formation de biofilms par mesure de la capacité du biofilm à immobiliser des billes magnétiques	Simple d'utilisation; Rapide; Criblage haut débit; Absence d'étapes de lavage et coloration	Condition statique : pas de forces de cisaillement ; Aucun ajout de milieu frais
Tubes de plastique ou de verre	Interface air liquide; Évaluation qualitative de la formation de biofilm	Condition dynamique (agitation) ; Observation de pellicules	Non quantitatif
Flow cell	Étude de la formation de biofilm à l'interface solide liquide sous l'action de forces de cisaillement; Gros volumes	Condition dynamique ; Observable directement par microscopie	Forces de cisaillement ; Nombre de chambres limité ; Risque de contamination élevé
Microfluidique	Étude de la formation de biofilms à l'interface solide liquide sous l'action de forces de cisaillement	Criblage haut débit; Micro volumes; Forces de cisaillement contrôlées; Observable directement par microscopie	Coût élevé de l'appareil; Personnel expérimenté requis

Chapitre II

Plantes médicinales et leurs principes actifs

Depuis toujours, les plantes médicinales ont été utilisées pour prévenir ou traiter diverses maladies. Selon des études pharmacologiques plus de 1200 plantes utilisées à travers le monde, en médecine traditionnelle, pour leurs activités biologiques (**Bisht et al., 2010**).

La phytothérapie (du grec, Phytos : végétal et Therapein : soigner), est l'art de soigner par les plantes (**Morel, 2008**). Selon l'O.M.S, la phytothérapie est considérée comme une médecine traditionnelle et encore massivement employée dans certains pays, dont, les pays en voie de développement. C'est le plus souvent une médecine non conventionnelle du fait de l'absence d'études cliniques (**Clément, 2005**).

Les plantes médicinales sont donc des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Kanter et al., 2006**). Chaque plante est composée de milliers de substances actives, présentes en quantité variable. Ces principes actifs isolés ne sont pas d'une grande efficacité, mais lorsqu'ils sont prélevés avec d'autres substances de la plante, ils révèlent leur aspect pharmacologique (**Cieur et Carillon, 2012**). On parle alors de synergie, car contrairement aux médicaments allopathiques qui ne sont composés que d'un seul principe actif, les médicaments phyto-thérapeutique utilisent l'ensemble des constituants de la plante (**Donald, 2000**). Ces végétaux auraient des effets curatifs et préventifs chez leurs utilisateurs (**Simon, 2001**), et représentent une source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires pour la synthèse des médicaments (**Sofowora, 2010**).

Les métabolites secondaires des végétaux peuvent être définis comme des molécules qui n'exercent aucune fonction directe aux niveaux des activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction...), mais peuvent jouer différents rôles pour sa survie (rôle de résistance) (**Guerrah et Segueni, 2015**). Elles se trouvent dans toutes les parties de la plante, mais de manière inégale. Et tous les principes actifs d'une même plante n'ont pas les mêmes propriétés, et chez certaines plantes, seule une partie peut être utilisée. (**Sebai et Boudali, 2012**).

Leurs synthèses sont stimulées par plusieurs facteurs extérieurs comme les changements nutritionnels, climatiques, les infections répétées. Ces substances sont classées selon leurs groupements fonctionnels en plusieurs groupes chimiques : les composés phénoliques, les alcaloïdes les huiles essentiels.

1. Les composés phénoliques

1.1. Définition

Classiquement considérés comme des métabolites secondaires, les composés phénoliques ou polyphénols sont présents chez tous les végétaux supérieurs. Ils correspondent à une très large gamme de structures chimiques et sont caractérisés par une

répartition qualitative et quantitative très inégale selon les espèces considérées mais aussi les organes, les tissus et les stades physiologiques (Macheix, 1996).

Le terme phénol englobe approximativement 10 000 composés naturels identifiés (Druzyńska et al., 2007). L'élément structural fondamental qui caractérise les composés phénoliques est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester, hétéroside (Bruneton, 2009).

Les composés phénoliques sont en effet des éléments importants des qualités sensorielles (odeur, astringence...) et nutritionnelles des végétaux que consomme l'Homme, et leur intervention dans la santé est maintenant reconnue dans des domaines variés (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

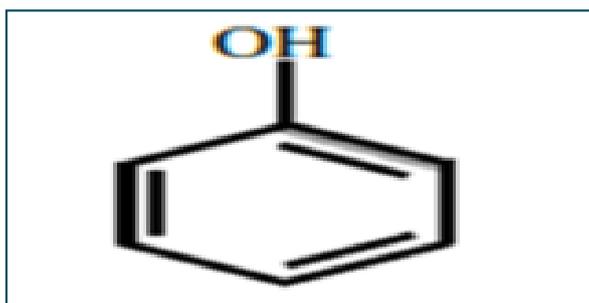


Figure 11: Structure du noyau phénol.
(Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

1.2. Classification des polyphénols

Elle est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (D'Archivio et al., 2007).

1.1.1. Formes les plus simples

1.1.1.1. Acide phénolique

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique, ils sont représentés par deux sous classes : dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique (Bruneton, 2008).

- Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque

Ils sont représentés par sept formules, ayant en commun la structure C₆-C₁ (**Balasundram et al., 2005**). Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon, dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruit frais (**Manach et al., 2004**).

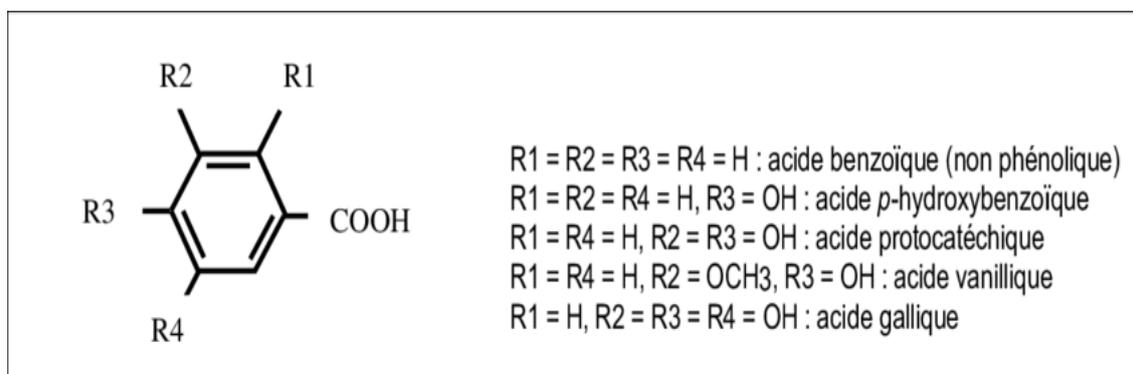


Figure 12: Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques.

(**D'Archivio et al., 2007**)

- Dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Ce sont des composés aromatiques à neufs carbones (C₆-C₃). Quatre acides ont une distribution très large (acide *p*-coumarique, acide caféique, acide férulique, acide sinapique), les autres (acide 2-coumarique) sont peu fréquents (**Bruneton, 1999**). Ces acides se trouvent rarement à l'état libre, ils sont souvent estérifiés (**Skerget et al., 2005**).

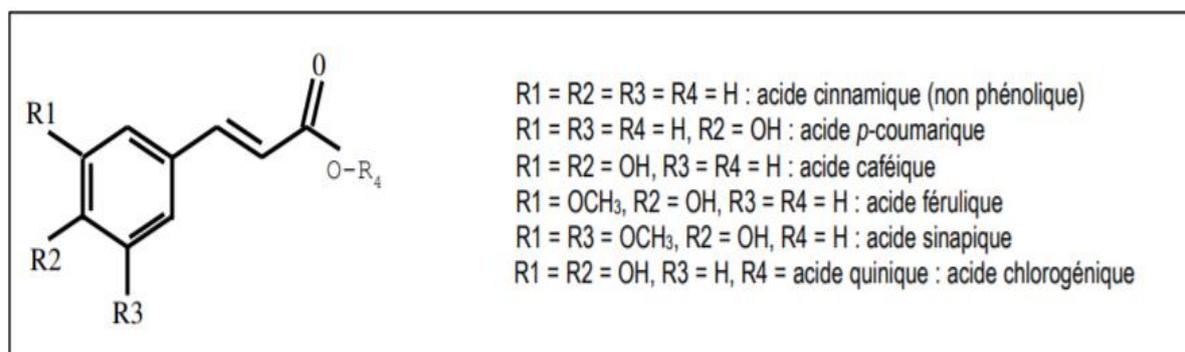


Figure 13: Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques.

(**Chira et al., 2008**)

1.1.1.2. Les flavonoïdes

Sont des composés possédant un squelette de structure générale en C₁₅ (C₆-C₃-C₆) (Ghedira, 2005). Il comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes constituées de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane. Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défenses contre les rayonnements UV, les herbivores et les défenses microbiennes (Micol, 2005).

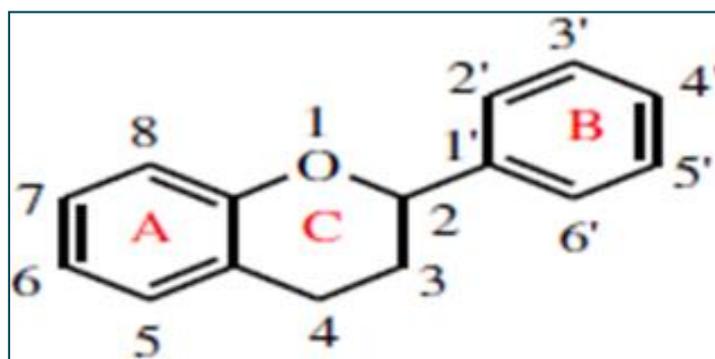


Figure 14: Squelette de base des flavonoïdes.

(Ghedira, 2005)

1.1.2. Les formes complexes

Ces composés résultent généralement de la condensation de certaines des formes simples précédemment évoqués. Dans tout les cas, les formes condensées sont particulièrement difficiles à étudier, et dans la plus part des cas, on est obligé de les dégrader chimiquement ou enzymatiquement avant de pouvoir les analyser (Macheix *et al.*, 2005).

1.1.2.1. Les tanins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible; Très répandus dans le règne végétal, sont particulièrement abondants chez les conifères et sont trouvés dans toute les parties de la plante: l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines (Scalbert, 1991).

D'un point de vue biochimique, les tannins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Da (Brunet, 2008). Leur structure chimique est particulièrement variable, mais comporte toujours une partie poly phénolique (Paolini et Dorchies, 2003).

Selon la nature des assemblages moléculaires, les tannins sont classés en deux groupes : Les tannins hydrolysables et les tannins condensés.

- **Les tanins hydrolysables**

Tanins hydrolysables sont des oligo ou des polyesters d'un sucre et d'un nombre variable d'acide phénol. Le sucre est très généralement le D-glucose et l'acide phénol est soit l'acide gallique dans le cas des gallotanins soit l'acide éllagique dans le cas des tanins classiquement dénommés éllagitanins (**Bruneton, 2009**).

- **Les tanins condensés**

Ils se différencient fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Il s'agit des polymères flavaniques constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. (**Bruneton, 2009**).

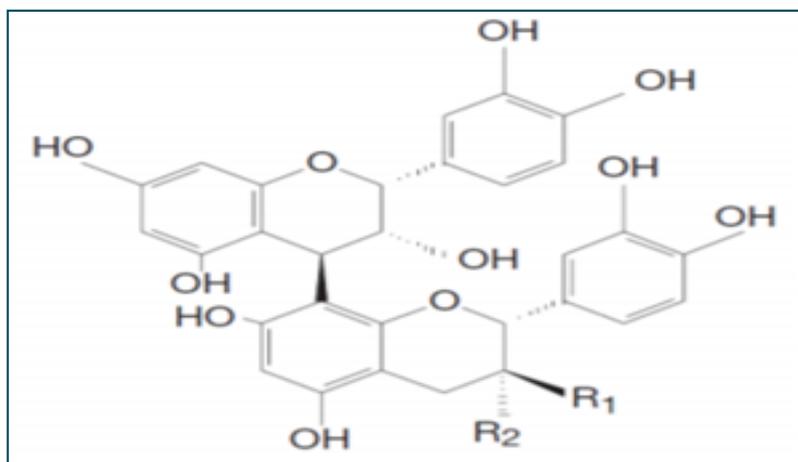


Figure 15: Structure chimique d'un tanin condensé (proanthocyanidine).

(**Derbel et Ghedira, 2005**)

1.1.2.2. Les lignines

La lignine est une macromolécule tridimensionnelle hydrophobe des hauts poids moléculaires, faisant partie des polyphénols, et qui est produite par toutes les plantes vasculaires ligneuses et herbacées. Elle est le troisième polymère naturel le plus abondant. Dans la paroi cellulaire végétale, la lignine remplit les espaces entre la cellulose et les hémicelluloses, et agit comme une résine qui unit l'ensemble de la lignocellulose (biomasse lignocellulosique) (**Assad, 2005**).

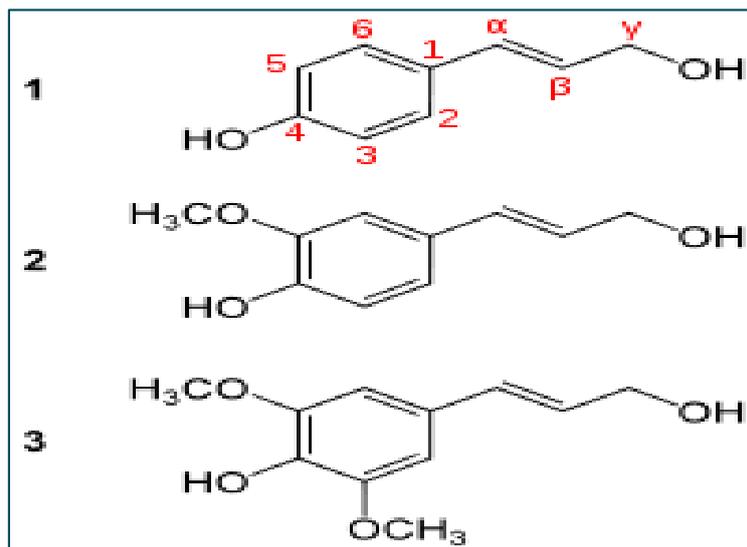


Figure 16: Les trois principaux monolignols qui donnent naissance à la lignine: 1 alcool p-coumarique ; 2 alcool coniférique ; 3 alcool sinapylique.

2. Les alcaloïdes

Ce sont des substances organiques azotées, à propriétés basiques ou amers et ayant des propriétés thérapeutiques ou toxiques. La plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool et ont un goût amer et certains sont fortement toxiques.

Les alcaloïdes forment un groupe hétérogène du point de vue de leur structure, de leurs propriétés et de leurs effets biologiques. Ils agissent directement sur le système nerveux avec des effets sur la conscience et la motricité. L'action sur le système nerveux peut aller jusqu'à une action antispasmodique, et mydriatique, anesthésique locale ou analgésique et narcotique (**Bruneton, 1999**).

La plupart des alcaloïdes sont dérivés d'acides aminés tels que le tryptophane, L'ornithine, la lysine, l'asparate, la phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines et couplées à d'autres squelettes carbonés (**Cyril, 2001**).

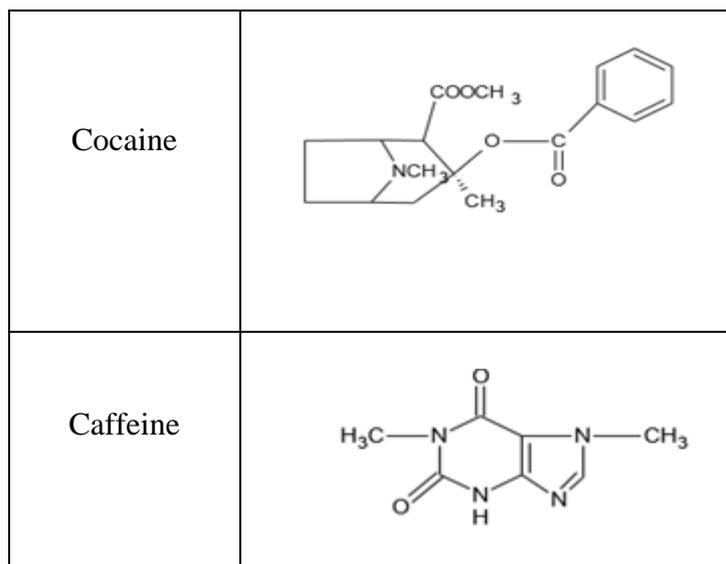


Figure 17: Structure chimique de quelques alcaloïdes.

3. Les huiles essentielles

Afin de définir les huiles essentielles (HEs), il faut d'abord passer par la définition des « essences végétale » : L'essence est élaborée dans les tissus de la plante aromatique via le processus de la photosynthèse. Au fur et à mesure que s'élaborent les essences par le biais de cellules sécrétrices, elles sont stockées au sein des tissus des plantes aromatiques dans des micropoches. Lorsque nous distillons ces plantes, la vapeur d'eau (ou n'importe quel procédé d'extraction) fait éclater les micropoches à essences et la part la plus volatile de celles-ci est extraite (**Huete, 2012**).

L'huile essentielle est donc le résultat de la transformation de l'essence lors de la distillation d'une plante aromatique. L'huile essentielle est un liquide de couleurs différentes (selon la plante), constituant des mélanges naturels, variables et complexes de métabolites secondaires volatiles, aromatiques et parfumantes (**Benabdkader, 2012**). Elle est isolée par divers procédés physiques et mécaniques à partir de feuilles (lavande, citronnelle, romarin), de graines (muscade, aneth), de bourgeons, de fleurs (jasmin, rose)... etc (**Toure, 2015**).

Aujourd'hui les HEs sont omniprésentes, dans des domaines aussi divers que la parfumerie, la cosmétique, l'agroalimentaire mais aussi dans la recherche pharmaceutique (**Fernandez et Chemat, 2017**).

Les teneurs en huiles essentielles sont généralement très faibles, il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle (**Makhlouf, 2002**). Les HEs peuvent

avoir plusieurs effets « utiles » pour la plante : repousser ou au contraire attirer les insectes pour favoriser la pollinisation, comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, permettant de conserver l'humidité des plantes désertiques, par protection contre la flore microbienne infectieuse, action répulsive sur les prédateurs par goût et effets défavorables (Hellal, 2011).

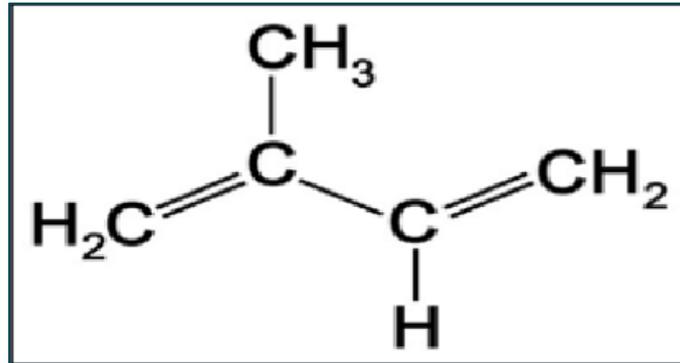
Toutes les huiles essentielles sont volatiles et odorantes. Elles sont peu solubles dans l'eau, solubles dans les huiles végétales, dans les alcools et dans la plupart des solvants organiques (El-Azrak, 2017).

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne ; elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des antiseptiques et désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre. Elles ont aussi une double action contre les microbes : elles peuvent les tuer (effet bactéricide) et elles en arrêtent la prolifération (effet bactériostatique). L'effet des composés quantitativement minoritaires n'est parfois pas négligeable (Bouaine, 2017).

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HEs sur les bactéries, comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électrons et la coagulation du contenu protéique des cellules (Laib, 2012).

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et éminemment variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquents comme l'alcool cinnamique. Elles peuvent également renfermer divers produits issus de processus dégradatifs mettant en jeu des constituants non volatils comme les acides, alcools, aldéhydes, esters...etc) (Lanseur, 2017).

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structures soit cyclique soit chaîne ouverte : leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont x : est variable en fonction de degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc), la molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 (Maurizid et Herz, 1988). Ils sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique. Et ils sont formés du couplage de plusieurs unités isopréniques.

**Figure 18:** Molécule isoprène**Tableau 3:** Classification des terpènes (Bezzaz, 2014)

Terpènes	Formule chimique
Monoterpène	C ₁₀ H ₁₆
Sesquiterpène	C ₁₅ H ₂₄
Diterpène	C ₂₀ H ₃₂
Triterpène	C ₃₀ H ₄₈
Tetraterpène	C ₄₀ H ₆₄
Polyterpène	(C ₅ H ₈) _n

Chapitre III

Techniques d'extraction, d'identification et de séparation des principes actifs des plantes

L'extraction est une technique qui consiste à séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de ses ou de leurs propriétés chimiques ou physiques. Il existe ainsi plusieurs façons d'extraire les principes actifs d'une plante (Kalla, 2012).

1. Les techniques d'extraction conventionnelles

1.1. Extraction à froid ou macération

La macération est une extraction solide-liquide dans lequel le composé bioactif (soluté) à l'intérieur de la matière végétale est extrait par un solvant spécifique pendant une période de temps bien déterminée. L'efficacité du processus est déterminée par deux facteurs principaux la solubilité et la diffusion. La macération est le choix le plus fréquent des chercheurs vu la simplicité de la mise en place du système d'extraction. L'inconvénient de la macération est la longue durée d'extraction réduite toutefois par agitation (Cheek et al., 2014).

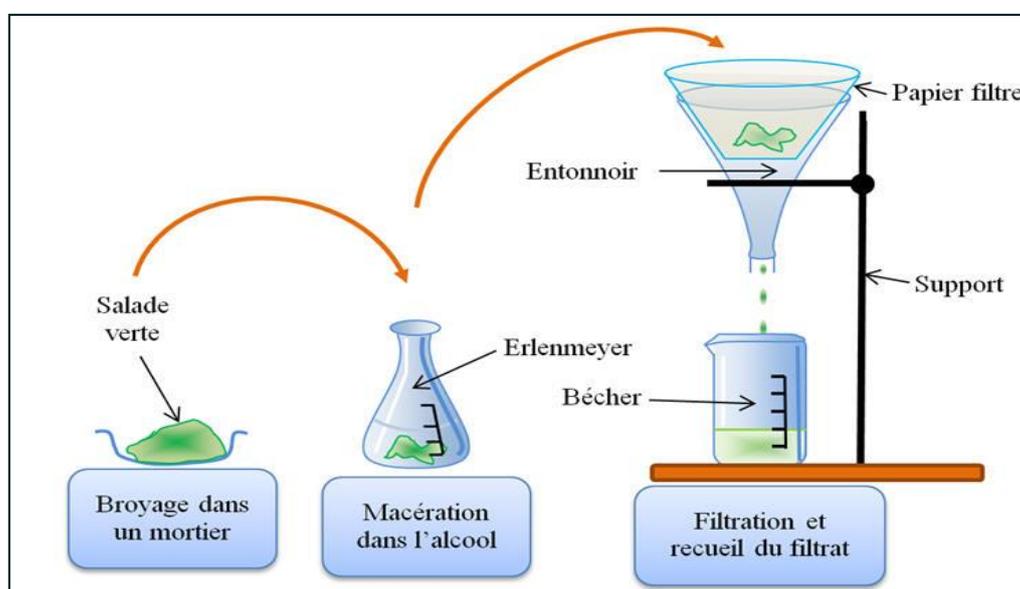


Figure 19: Procédé d'extraction par macération.

1.2. Décoction

Elle consiste à porter le mélange poudre solvant à ébullition au bain marie. Ce procédé présente l'avantage d'en extraire le maximum de principes actifs, mais les molécules thermolabiles risquent de se détériorer à cause de la chaleur. Cette technique se passe en ces étapes : ébullition, filtration et centrifugation (Chavane et al., 2001).

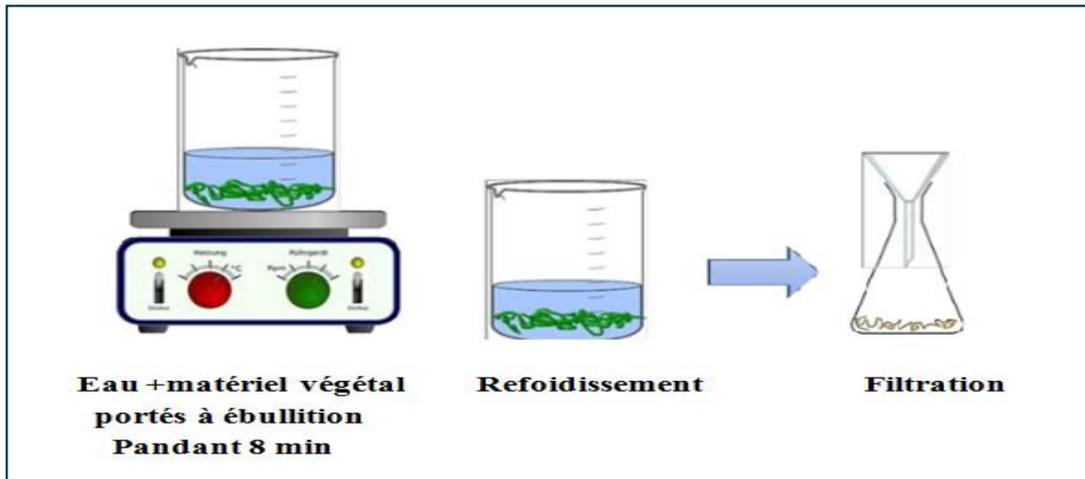


Figure 20: Processus de décoction

1.3. L'hydrodistillation

L'hydrodistillation est l'un des procédés le plus anciens. Il repose sur le fait que la plupart des matières odorantes peuvent être entraînées à la vapeur d'eau. Le procédé consiste à immerger le matériel végétal dans un bain d'eau, le mélange hétérogène est bouilli, et l'huile essentielle est volatilisée puis condensée [Figure 19]. Etant donné que ses principaux composés volatils sont insolubles dans l'eau, l'HE peut être séparé par décantation après refroidissement dans un séparateur de phases. C'est une méthode simple et ne nécessite pas un appareillage coûteux (Penche, 2010).

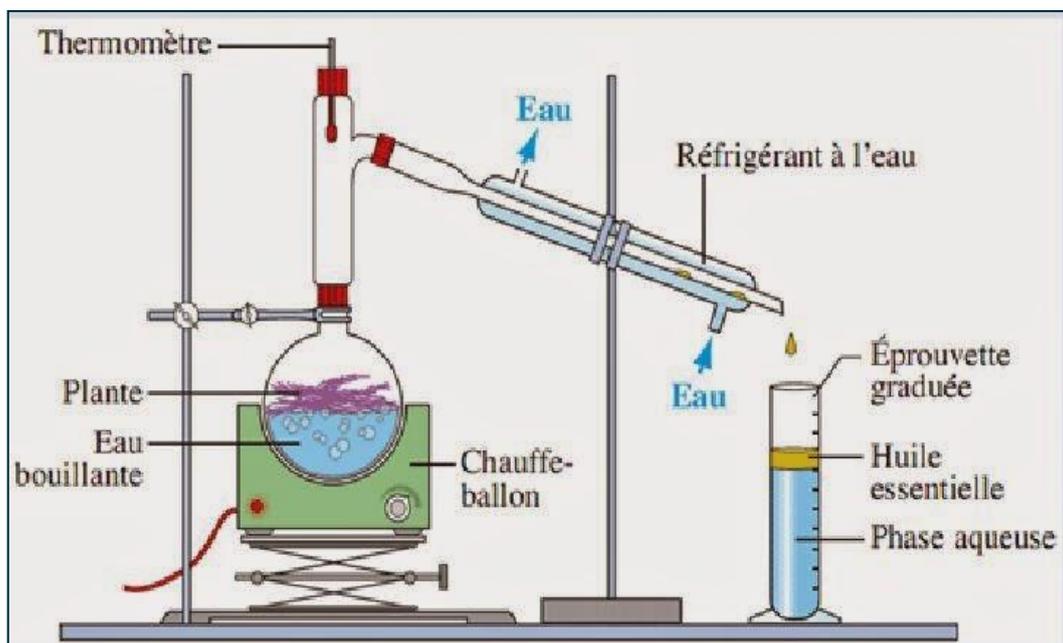


Figure 21: Le procédé de l'hydrodistillation.

1.4. La distillation par entrainement à la vapeur

Elle consiste en une séparation des constituants d'un mélange de deux ou plusieurs composants en fonction de leur température de passage à l'état gazeux, la production, dans ce cas, des HEs se passe par deux étapes:

- La diffusion de l'huile de l'intérieur des tissus vers la surface du matériel végétal;
- Evaporation et entrainement de l'huile à la vapeur d'eau (**Mebarka, 2008**). L'entrainement à la vapeur d'eau est une variante plus récente de distillation, dans laquelle il n'y a pas de contact direct entre la matière végétale et l'eau (**Lucchesi, 2005**).

Le matériel végétal est placé sur une grille perforée à travers laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entrainées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'huile essentielle en minimisant les altérations hydrolytiques (**Moderres et Aichouni, 2018**).

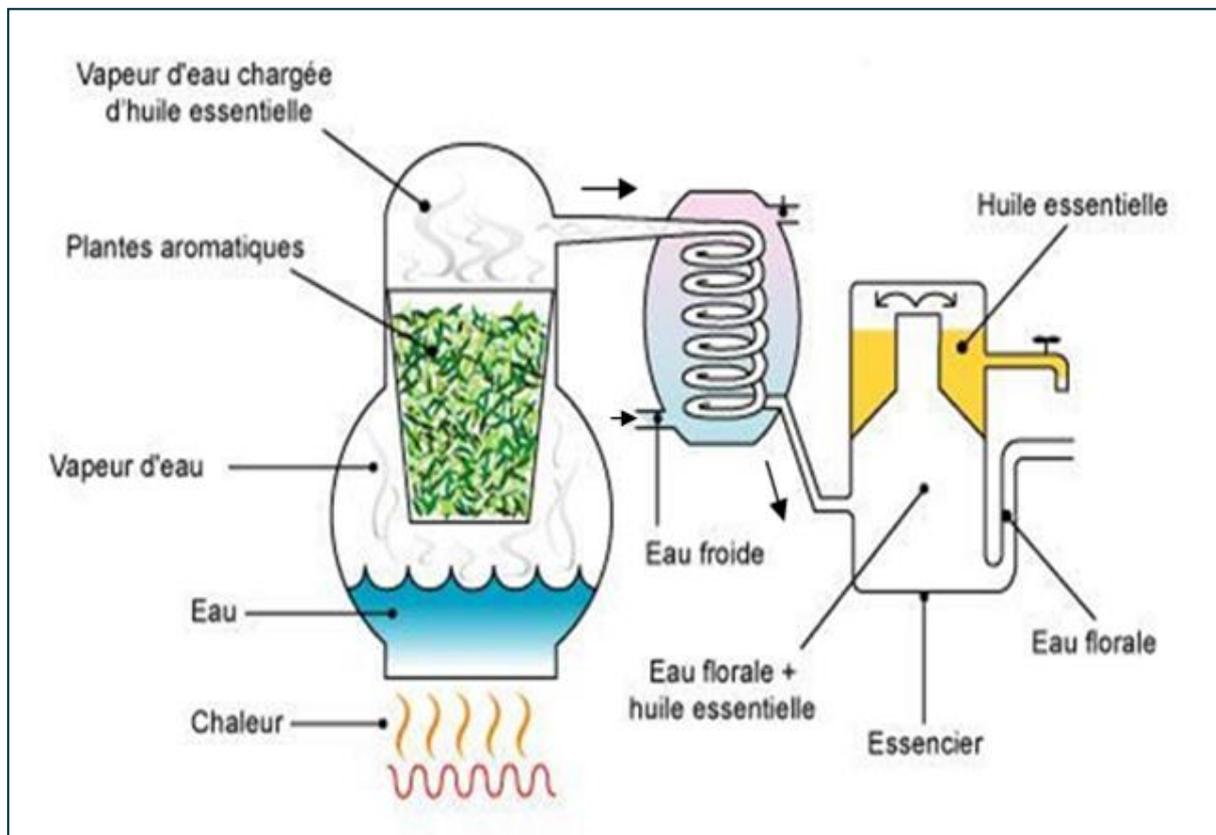


Figure 22: Le procédé la distillation par entrainement à la vapeur.

2. Les techniques d'extraction modernes : «Chimie Verte»

La plupart des solvants organiques utilisés jouent un rôle transitoire en facilitant le processus d'extraction. Cependant, certains d'entre eux peuvent être un sérieux danger sur les organismes vivants ou sur l'environnement. Pour cela, la réduction des substances toxiques est devenue une nécessité.

L'idée de « chimie verte » ou « chimie durable » est alors fondée vers les années 90, afin de mettre en œuvre des principes pour réduire et éliminer l'usage ou la génération de substances néfastes pour l'environnement, par de nouveaux procédés chimiques et des voies de synthèses propres, c'est-à-dire respectueuses de l'environnement.

Parmi les techniques non conventionnelles ou écologiques empruntées par la chimie verte les plus utilisées sont: l'extraction par fluides supercritiques, par micro-ondes et l'extraction par ultrasons (**Benzeggouta, 2015**).

2.1. Extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique est une technique d'extraction verte utilisée pour l'extraction d'une grande variété de molécules bioactives. L'extraction par fluide supercritique présentant les avantages d'être rapide et économique des solvants. L'état supercritique se produit lorsque la température et la pression du fluide sont élevées au-dessus de son point critique. Le dioxyde de carbone est le solvant le plus utilisé dans l'extraction par fluide supercritique (**Ligor et al., 2018**).

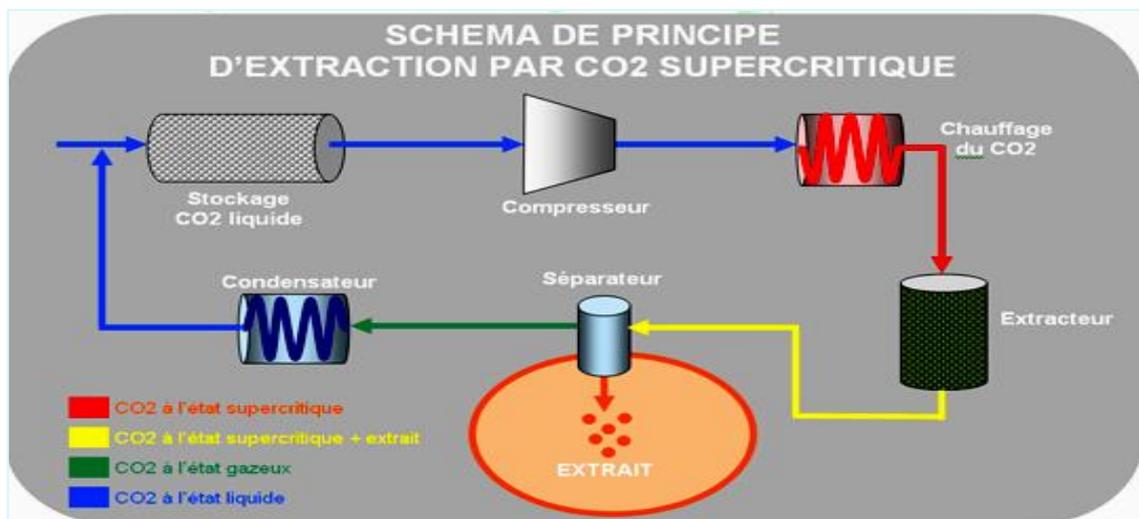


Figure 23: Extraction par Co2 supercritique.

Dans ce procédé, la plante est introduite dans l'extracteur, puis le CO₂ est acheminé vers l'extracteur après avoir été comprimé sous plusieurs dizaines de bars et chauffé de 30°C à 40 °C maximum. Le liquide présent dans l'extracteur se charge ainsi en composé extrait, puis il est détendu ce qui permet au CO₂ de retrouver alors une forme gazeuse pour lui procurer la capacité de se séparer de l'extrait à proprement dit ; cette opération a lieu dans un séparateur. Enfin, l'extrait est récupéré par décantation alors que le CO₂ est recyclé par condensation pour être stocké de nouveau sous forme liquide.

2.2. Extraction assistée par ultrasons

L'extraction assistée par ultrasons consiste à traiter sous ultrasons un solide, sec ou humide, en contact avec un solvant. Le phénomène consiste à créer des bulles de cavitation dans le solvant permettant de dénaturer la paroi de la cellule végétale. Les ultrasons permettent d'accélérer l'extraction et de réduire le ratio solvant/soluté ce qui conduit à un meilleur rendement d'extraction des composés bioactifs (Cheok et al., 2014).

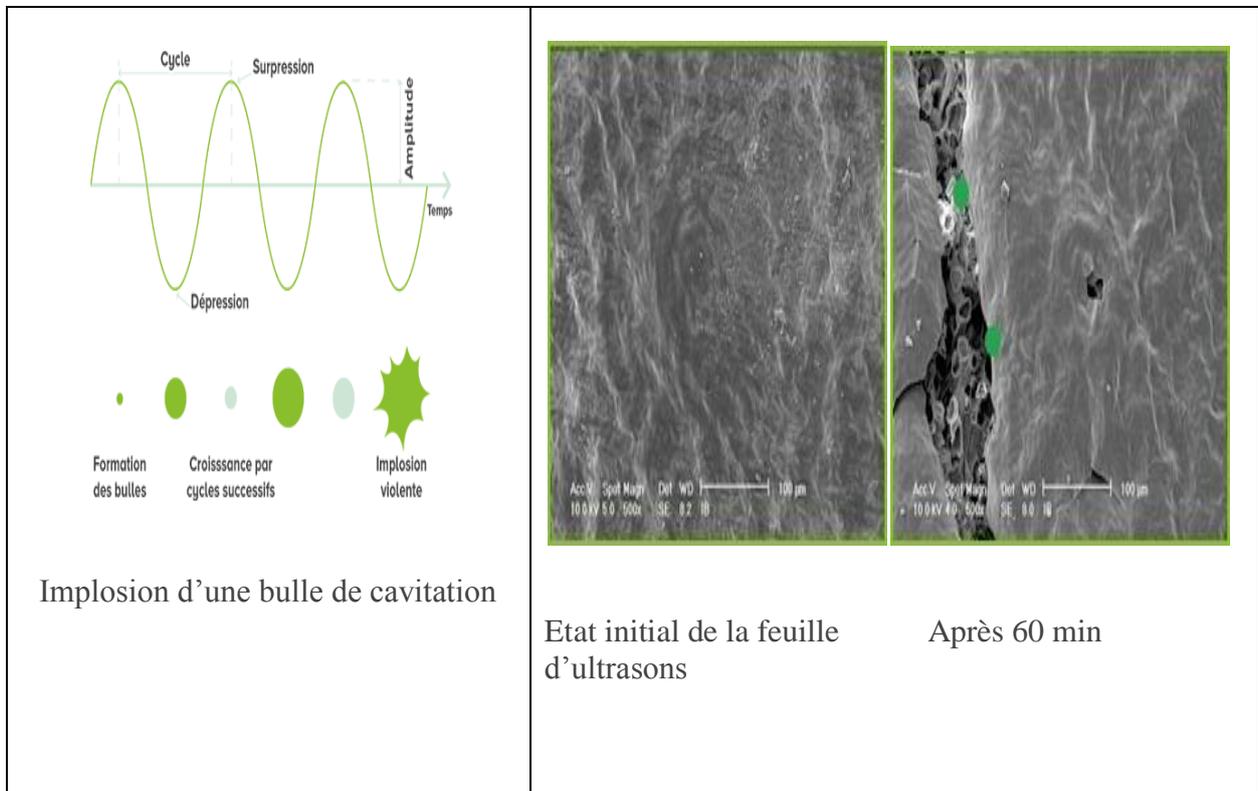


Figure 24: Extraction assistée par ultrasons.

2.3. Extraction assistée par micro-ondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques non ionisantes, ils sont capables de pénétrer dans les biomatériaux et de générer de la chaleur en interagissant avec les molécules polaires comme l'eau. L'interaction entre les micro-ondes et les molécules polaires conduit à un surchauffage interne et une perturbation de la structure cellulaire facilitant la diffusion du composé bioactif à partir de la matrice végétale (Cheok *et al.*, 2014 ; Takeuchi *et al.*, 2009).

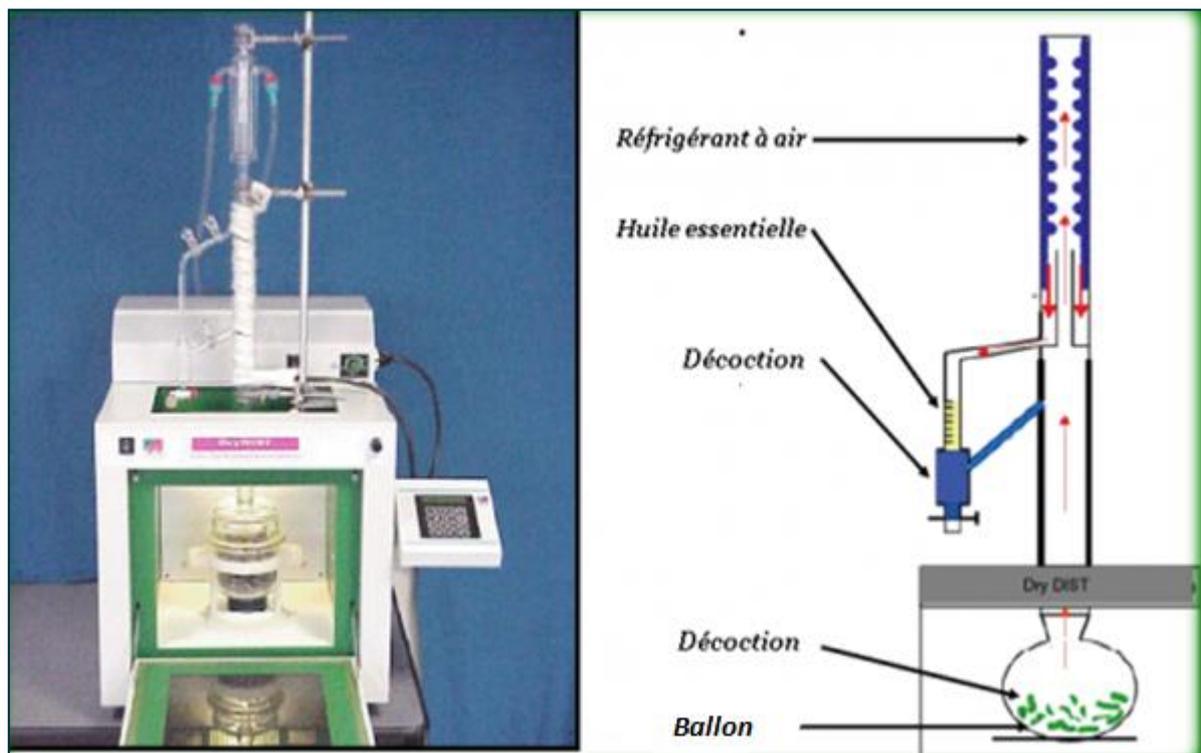


Figure 25: Extraction assistée par micro-ondes.

Tableau 4: Résumé des différentes méthodes d'extraction des produits naturels
(Zhang, 2018)

Méthode	Solvant	Température	Pression	Temps	Volume de solvant organique consommé	Polarité des produits naturels extraits
Macération	Eau, solvants aqueux et non aqueux	Température ambiante	Atmosphérique	Longue	Grand	Dépend du solvant d'extraction
Décoction	Eau	Sous la chaleur	Atmosphérique	Modérer	Aucun	Composés polaires
Extraction de fluide supercritique	Fluide supercritique (généralement S-CO ₂), parfois avec modificateur	Près de la température ambiante	Haute	Court	Aucun ou petit	Composés polaires non polaires à modérés
Extraction assistée par ultrasons	Eau, solvants aqueux et non aqueux	Température ambiante ou sous chaleur	Atmosphérique	Court	Modérer	Dépend du solvant d'extraction
Extraction assistée par microondes	Eau, solvants aqueux et non aqueux	Température ambiante	Atmosphérique	Court	Aucun ou modéré	Dépend du solvant d'extraction
Hydro-distillation et distillation à la vapeur	Eau	Sous la chaleur	Atmosphérique	Longue	Aucun	Huile essentielle (généralement non polaire)

3. Techniques d'identification et de séparation des principes actifs des plantes

Bien que de nombreux extraits d'herbes aient déjà démontré des effets anti-biofilm, les molécules ou composants bioactifs sont encore inconnus et doivent être soumis à un certain nombre de recherches analytiques afin d'obtenir plus d'informations sur leurs propriétés.

Au cours des dernières décennies, les techniques d'identification et de séparation des composants bioactifs comme le criblage phytochimique, la séparation chromatographique (chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse GC-SM, chromatographique liquide à haute perfection HPLC), ont été largement examinées agissant comme agents anti-biofilm à partir de plantes, jetant des bases solides pour l'excavation de nouvelles molécules pour le contrôle du biofilm et l'infection bactérienne.

3.1. Le criblage phytochimique

Le criblage phytochimique est un test qualitatif préliminaire réalisé pour détecter la présence de métabolites secondaires ou un groupe de substances contenues dans un extrait végétal en y exécutant des réactions chimiques qui peuvent être basées sur production de changements colorimétriques, une fluorescence ou des précipités d'une couleur spécifique [Tableau 5] (GonzálezMera et al., 2019).

Tableau 5: Résumé des méthodes de criblage phitochimique (González Mera *et al.*, 2019).

Métabolites secondaires	Nom du test	Réactif	Résultat positif
Phénols	Test du chlorure ferrique	Solution de chlorure ferrique	Formation de couleur noir bleuâtre
Flavonoïdes	Teste de réactif alcalin	Solution d'hydroxyde de sodium	Couleur jaune intense qui devient incolore après l'ajout d'acide dilué
	Test d'acétate de plomb	Acétate de plomb	Précipité jaune
Tanins	Test de gélatine	Solution de gélatine à 1%	Précipité blanc
Alcaloïdes	Test de Dragendorff	Solution d'iodure de potassium et de bismuth	Précipité rouge orangé
	Test e de Wagner	Solution d'iodure de potassium	Précipité brun rougeâtre
	Test de Mayer	Solution d'iodure mercurique de potassium	Précipité blanc
	Test de Hager	Solution ferrique saturée	Précipité jaune
Diterpènes	Test d'acétate de cuivre	Solution d'acétate de cuivre	Formation de la couleur vert émeraude

Étant donné que chaque classe de principes actifs est liée à des activités biologiques spécifiques, sur la base des résultats obtenus lors du criblage phytochimique préliminaire, il est possible d'orienter les recherches ultérieures pour déterminer l'activité biologique des principes actifs impliqués ayant un effet positif sur la destruction des biofilms (GonzálezMera *et al.*, 2019).

3.2. Méthodes de fractionnement et de purification des principes actifs

Le fractionnement est un processus de séparation d'extraits de plantes en différentes fractions. Le processus se poursuit jusqu'à ce que le composé pur soit isolé. Lorsque plusieurs solvants sont nécessaires pour le fractionnement, ils doivent être ajoutés selon l'ordre de polarité croissante. Les techniques de fractionnement sont généralement obtenues grâce à l'application de divers techniques chromatographiques (Abdullahi, 2020).

3.2.1. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une technique séparative utilisée en analyse quantitative et qualitative. Cette technique a de nombreuses applications et est couramment utilisée en biochimie et en chimie analytique. Mais c'est aussi un outil crucial pour évaluer la qualité de plantes utilisés pour leurs propriétés médicinales. Sa popularité résulte de sa séparation pratique d'une large gamme de types d'échantillons d'une puissance de résolution exceptionnelle. Elle est utilisée pour purifier les produits synthétiques ou naturels, caractériser des métabolites et le dosage des ingrédients actifs d'un mélange.

Pour cela l'échantillon à analyser est associé à un solvant puis traverse sous pression une colonne contenant un gel qui est la phase stationnaire, qui a la propriété de retenir les molécules qui le traversent. En fonction de l'affinité qu'il y'a entre les composés de l'échantillon à analyser et la phase stationnaire, ces composés seront retenus plus ou moins longtemps dans la colonne avant d'en sortir et d'être mesurés. Un détecteur suit en continu le liquide à la sortie de la colonne afin de détecter la présence des composés. Différents types de détecteurs peuvent être utilisés, le plus courant étant un spectrophotomètre UV-visible, qui mesure l'absorption de la lumière par le produit. Une bonne chromatographie fera sortir les composés les un après les autres avec assez d'espace entre eux pour qu'ils soient bien repérables. En traçant dans le temps les résultats du détecteur à la sortie de la colonne, on obtient ainsi un graphique sur lequel apparaissent différents pics représentant chacun un composé donné et renseigne sur la concentration des composés présents dans le mélange. L'ensemble des pics constituent ainsi un « empreinte digitale » du produit analysé (Bensakhria, 2016).

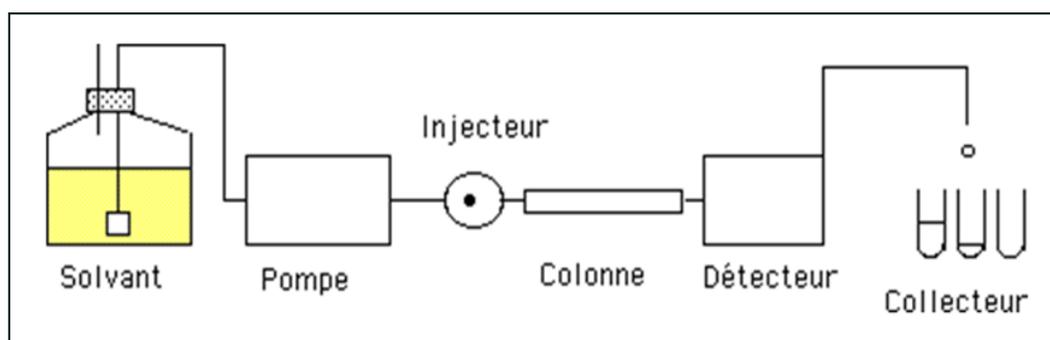


Figure 26: Représentation schématique d'une HPLC

3.2.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette technique implique l'utilisation d'un mécanisme d'adsorption pour séparer un composé d'un mélange. La séparation est basée sur l'interaction entre les composés dans un mélange et la phase stationnaire. Il est applicable dans la séparation de composés de bas poids moléculaire. La phase stationnaire est généralement une suspension de gel de silice versée dans une plaque de verre pour produire une épaisseur de 1,5 mm. Ensuite, l'extrait est injecté dans la partie inférieure de la plaque et il l'es laissé se répandre, et les substances qui s'y trouvent migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et celle du solvant. L'avantage majeur de la CCM, est qu'elle peut fournir des images lumineuses et des images de fluorescence, qui est un paramètre visuel de plus que les chromatogrammes, et également donner différents niveaux de profils (Abdullahi, 2020).

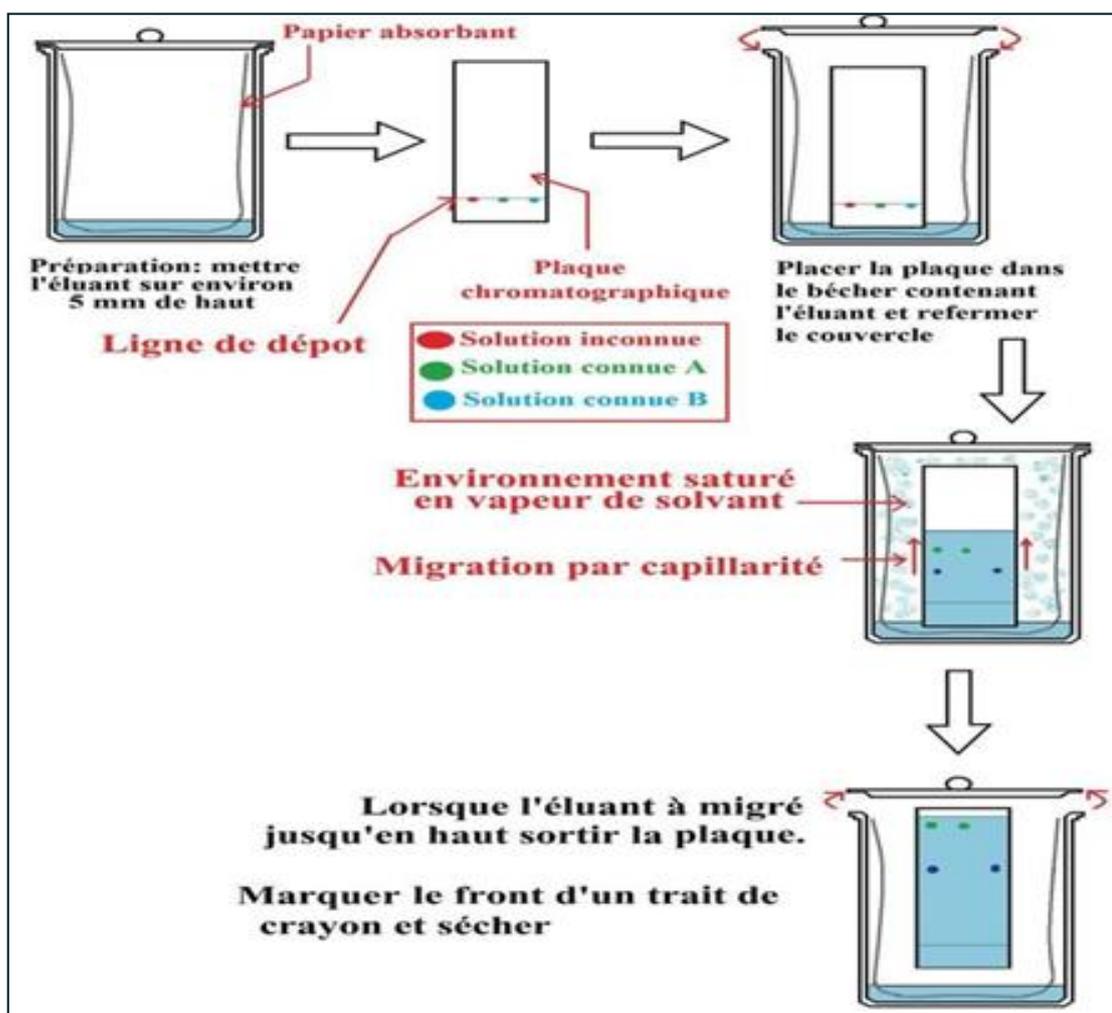


Figure 27: Chromatographie sur couche mince

3.2.3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à une Spectrométrie de masse (GC-MS)

La CG-SM est une méthode qui permet d'analyser des molécules petites et volatiles telles que les alcools, les molécules aromatique, et les molécules simples comme les acides gras, les hormones...etc. En effet, la CG-SM combine deux techniques pour former une seule méthode d'analyse des mélanges de produits chimiques organiques. La chromatographie en phase gazeuse sépare les composants d'un mélange, elle s'applique sur des composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Et la spectrométrie de masse caractérise chacun des composants individuellement par la mesure de leur masse et identifier ainsi leurs structures. La combinaison des deux techniques permet des évaluations à la fois qualitatives et quantitatives d'un échantillon contenant un certain nombre de composés organiques (Medirios, 2018).

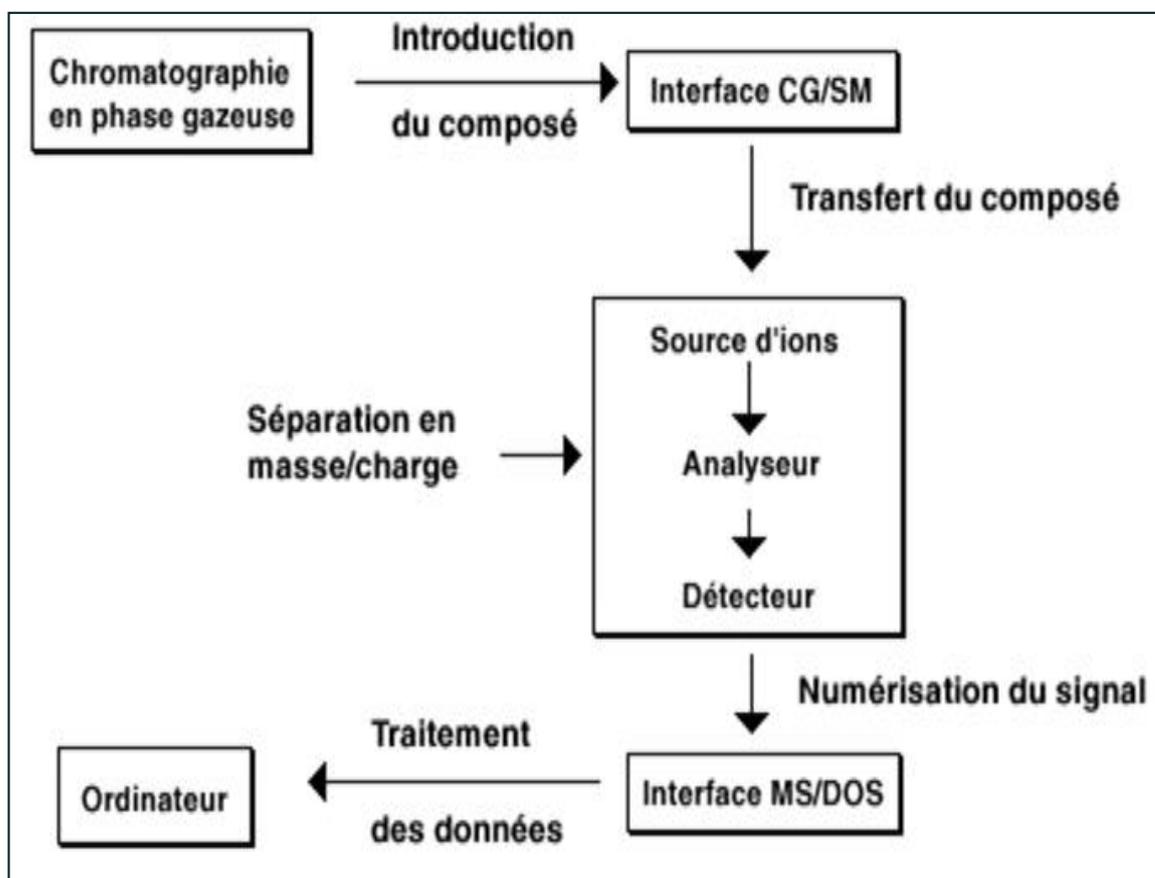


Figure 28: Représentation schématique d'une GC-MS

Chapitre IV

**Effets des extraits
végétaux sur les
biofilms bactériens**

Comme il est déjà connu, de nombreuses espèces de genres bactériens comme *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Salmonella* etc. provoquent des infections difficiles à traiter en raison de leur capacité à former des biofilms.

En effet les biofilms représentent deux tiers de toutes les infections bactériennes humaines et deviennent plus néfastes lorsqu'ils développent une capacité à résister à divers antibiotiques ou désinfectants, ce qui rend leur élimination très difficile, car jusqu'à présent, aucun agent anti-biofilm pour les maladies infectieuses n'a encore été approuvé par la Food and Drug Administration américaine.

Cependant, plusieurs efforts axés sur la recherche des produits naturels sont une voie d'investigation prometteuse et plusieurs agents anti-biofilm naturels ont été systématiquement étudiés dans des essais cliniques et sont même reconnus comme une ressource utile pouvant servir de pistes pour la découverte de nouvelles substances anti-biofilm avec de nouveaux mécanismes d'action possibles.

1. Les cibles d'action des extraits végétaux

1.1. Effets sur l'adhésion et les biofilm préformé

Les extraits actifs de plantes peuvent être prometteurs pour la réduction des surfaces de colonisation. L'excellente capacité des extraits végétaux à interférer avec l'étape initiale de formation du biofilm bactériens peut être attribuée à l'interférence avec les forces qui favorisent le dépôt et adhérence des bactéries aux surfaces telles que les brownien, la sédimentation, Van der Waals et les forces d'interactions électrostatiques.

De plus, étant donné que certaines molécules organiques et inorganiques et d'autres nutriments sont importants pour la croissance cellulaire et donc l'adhésion cellulaire, il est possible que les extraits de plantes inhibent leur disponibilité (**Ibukun et al., 2019**).

Sur ce contexte, plusieurs études ont évalué la capacité d'extraits de plantes à empêcher leur formation par l'inhibition de la synthèse des différents appendices membranaires (fimbriae, pilis, curlis...) qui permettent la fixation des bactéries aux surfaces biotiques ou abiotique. Seuls les extraits de plantes ayant une activité anti-attachement ont été inclus.

Kim SW et al., 2016 a rapporté que les extraits de plantes médicinales de *Cocculus trilobus* et *Coptis chinensis* pourraient bloquer l'adhésion des bactéries aux surfaces recouvertes de fibronectine. Ils ont exercé des effets anti-adhésine au stade d'adhésion de la formation de biofilm en supprimant l'activité d'une enzyme membranaire appelée sortase qui

a catalysé l'ancrage covalent des protéines de surface au peptidoglycane dans les bactéries Gram-positive.

La fraction d'acétate d'éthyle et la fraction d'eau de ces deux plantes ont été criblées et la fraction d'acétate d'éthyle de *C. trilobus a* présenté une activité la plus élevée pour supprimer l'adhésine bactérienne en ciblant la sortase.

Dans une autre étude, l'extrait de *Ginkgo biloba* a été aussi testée, et les resultants ont montrés qu'il a pu inhiber de manière significative la formation de biofilm d'*Escherichia coli* O157: H7 sur les surfaces des membranes en verre, en polystyrène et en nylon à 100 µg / ml, sans affecter la croissance bactérienne. Les mécanismes des effets inhibiteurs ont révélé que l'acide ginkgolique réprimait les gènes de curli et les gènes de prophage dans *E. coli* O157: H7, qui étaient en ligne avec une production réduite de fimbriae et des réductions de biofilm (Lee et al., 2014).

En outre, Lee et al., 2011 a testé la capacité de la phlorétine, qui est un antioxydant abondante dans les pommes, à réduire l'attachement des bactéries aux surfaces. Ils ont constaté qu'il réduisait considérablement la formation de biofilm et la production de fimbria dans la souche *E. coli* O157: H7 sans affecter la croissance des cellules planctoniques. La phlorétine a également empêché la fixation d'*E. Coli* O157: H7 aux cellules épithéliales du côlon humain et supprimé la réponse inflammatoire induite par le facteur de nécrose tumorale alpha.

Le potentiel de ces extraits à interférer avec les biofilms préformés est aussi très étudié, vu que cette étape peut être considérée comme une seconde phase d'adhésion pour les bactéries planctoniques à celles déjà présentes. Ainsi plusieurs études ont révélés des résultats intéressants sur des biofilm préformés de 24 et 48 h.

Enterococcus faecalis est un formateur de biofilm courant généralement impliqué dans les infections des voies urinaires, les infections des plaies et les infections dentaires. Dans une étude, Lee et Tan, 2015 a testés l'efficacité anti-biofilms des extraits d'*Eugenia umtamvunensis* et de *Syzygium masukuense*, et il ont constatés qu'ils avaient une bonne activité contre le biofilm d'*E. Faecalis* 24 h tandis que *Syzygium gerrardii* avait une excellente activité contre les biofilms de 24 h et 48 h. D'après ces résultats, Il existe donc un potentiel de développement de produits à base de plantes à partir de ces extraits comme bains de bouche pour les soins bucco-dentaires, ainsi que pour des applications topiques pour traiter les plaies dans les soins médicaux et vétérinaires.

Dans une étude connexe, l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* avait une bonne activité contre les biofilms *S. aureus* 24 h et 48 h associés à la mammite dans l'industrie laitière (Pe et al., 2015). *Syzygium gerrardii* peut être un bon candidat pour le développement

de produits anti-staphylococciques qui peuvent trouver une application comme désinfectant pour nettoyer les surfaces. En outre, il peut contenir des composés actifs qui peuvent former un modèle pour le développement de médicaments puissants pour traiter les infections staphylococciques chez les humains et les animaux.

Certains rapports ont également noté qu'il est moins difficile d'inhiber l'attachement cellulaire que de se débarrasser du biofilm établi (Sandasi et al., 2011). Cela confirme que les agents pathogènes sont plus capables de résister à l'action des antimicrobiens lorsqu'ils existent dans les biofilms et que leurs infections peuvent persister sur différentes surfaces biotiques et abiotiques.

Sur ce contexte, Ibukun M et al., 2019 a étudié le potentiel d'extraits bruts de feuilles d'acétone de neuf espèces végétales du genre *Eugenia* et *Syzygium* appartenant à la famille des Myrtacées à empêcher la formation ou à détruire les biofilms bactériens préformés. Ces extraits ont été testés sur six agents pathogènes Gram-positifs et Gram-négatifs.

En premier temps, il a été constaté que l'inhibition de la formation de biofilm par les extraits bruts d'acétone avait divers degrés d'activité sur la prévention de l'attachement du biofilm et les résultats étaient comme suivants:

Quatre des extraits avaient une bonne prévention de la fixation du biofilm contre *E. coli* (supérieur à 50%), trois extraits avaient une inhibition inférieure à 50%. Pour *P. aeruginosa* tous les extraits de plantes de l'espèce *Eugenia* ont empêché l'attachement avec des valeurs supérieures à 50%, les mêmes résultats sont obtenus pour *B. cereus* bien que *E. natalitia* et *S. masukuense* aient des valeurs inférieures à 50%. Enfin, six et sept des neuf extraits de plantes évalués ont empêché l'attachement cellulaire de *E. faecalis* et de *S. aureus* respectivement.

Dans cette première étape de l'étude, certains des extraits de plantes utilisés ont au contraire favorisés l'attachement des bactéries testées aux surfaces, ce qui augmente la possibilité de former les biofilms. C'est le cas de l'extrait bruts d'acétone *E. woodii* qui a vivement améliorait la croissance du biofilm chez *E. coli* et *E. faecalis*; les extraits de *S. masukuense* et de *S. espèce A* n'ont pas empêché la fixation *S. aureus* bien que ces deux plantes aient de bonnes concentration minimale inhibitrice (CMI); de plus, aucune espèce de *Syzygium* n'a inhibé l'attachement cellulaire *P. aeruginosa* mais a plutôt été un facteur favorable pour former un biofilm.

En second temps, les extraits de plantes avec de bonnes propriétés anti-attachement cellulaire ont été utilisés pour voir leurs effets positifs sur la prévention ou la réduction du développement ultérieur du biofilm dans les biofilms préformés de 24 et 48 h.

Sur les sept extraits de plantes évalués, trois (*E. natalitia*, *E. zeyheri* et *S. masukuense*) avaient des pourcentages d'inhibition du biofilm d' *E. Coli* après 24h étaient supérieurs à 50% ainsi que pour *Salmonella Typhimurium* avec les extraits d'acétates de *E. natalitia*, *E. zeyheri*, *S. masukuense* et *S. gerrardii*.

L'activité antibiofilm contre *S. aureus* après 24 h montre que les extraits de *E. umtamvunensis*, *S. legatii* et *S. gerrardii* avaient des inhibitions supérieures à 50% et dans l'activité contre *B. cereus*, de toutes les plantes étudiées, *S. masukuense* avait une certaine activité tandis qu'aucun des extraits végétaux n'a pu détruire le biofilm de *P. aeruginosa*.

Après 48 h, les extraits d' *E. Umtamvunensis* avaient une faible activité antibiofilm sur le biofilm d' *E. Coli* (28%) tandis que *S. masukuense* et *S. espèces A* ont empêché le développement du biofilm de plus de 50% et les extraits restants ont montré une amélioration du biofilm. *Syzygium gerrardii* n'était pas actif contre le biofilm *B. cereus* mais avait une bonne activité contre le biofilm de *S. aureus*, les mêmes résultats sont obtenus avec les extraits *E. umtamvunensis*, *E. zeyheri*, *S. masukuense* et *S. espèces A* sur le biofilm *S. Typhimurium*.

Les extraits actifs de plantes utilisées dans cette étude peuvent être très intéressants pour la réduction des surfaces de colonisation de divers épithéliaux du corps, empêchant ainsi les infections. Cela montre que les espèces *Eugenia* et *Syzygium* possèdent des composés avec une activité anti-biofilm prometteuse.

Cosa et al., 2020 a testés l'effet anti-adhésion (fixation initiale) des différents extraits organiques de *Calpurnia aurea* ainsi que leurs effets sur les biofilms préformés de *P. aeruginosa* ATCC 9721.

Les extraits d'acétone de *C. aurea* ont montré une promotion d'adhérence avec d'autres extraits de plantes, réduisant la production de biofilm jusqu'à $\pm 42\%$. L'éradication du biofilm en pourcentage négatif observée avec des extraits d'acétone suggère une stimulation provenant de la présence des métabolites secondaires utilisés comme nutriments pour la croissance et la formation du biofilm. Le pourcentage d'inhibition le plus élevé contre *P. aeruginosa* ATCC 9721 était dans le test d'inhibition de l'attachement initial à $\pm 20\%$ pour l'extrait éthanolique de *C. aurea*. L'inhibition du biofilm préformé par les trois *C. aurea* s'est avérée plus puissante, avec jusqu'à 60% de réduction du biofilm par rapport à l'attachement initial.

De nombreuses bactéries infectieuses formatrices de biofilms peuvent échapper aux actions des extraits organiques des plantes et peuvent même être comme des facteurs qui permettent de booster leurs capacités de former les biofilms et faire apparaître certaines résistances aux antibiotiques. Cependant, la question qui se pose c'est si les HEs, autant

qu'extraits végétaux, sont capables de tuer des bactéries pathogènes dans des biofilms déjà formés telles que *S.aureus*, *P.aeruginosa* et *E.coli* provoquent souvent des infections nosocomiales en raison de leur résistance intrinsèque et de leur capacité d'adaptation.

Dans une étude comparative *in vitro*, l'huile de cassia et l'antibiotique peptidique colistine (utilisé pour lutter contre les infections respiratoires) ont été testés pour leur capacité à tuer *P.aeruginosa* dans des biofilms. Les expériences ont révélé que l'huile de cassia à des concentrations de 0,2 à 0,4% était suffisante pour tuer la grande majorité des *P.aeruginosa* en biofilm. En revanche, la CMI de la colistine (3 µg / mL) n'était pas efficace contre les cellules du Biofilm, et ce n'est qu'à une concentration > 100 µg / mL que la colistine a tué les bactéries à l'intérieur du biofilm (**Kavanaugh et Ribbeck, 2012**).

Dans un modèle murin, des brûlures au troisième degré ont été infectées par *P.aeruginosa*, *S.aureus* (*S.aureus* résistante à la méthicyline ou SARM); 24 h après l'inoculation bactérienne, les plaies ont été traitées localement avec de l'huile d'origan à une concentration de 10 mg / mL pendant 3 jours consécutifs. Les concentrations bactériennes ont été réduites sans endommager la peau des animaux.

Parallèlement à ces études, des observations de microscopie électronique à transmission et de microscopie électronique à balayage ont montré que l'huile d'origan est capable de tuer les bactéries des biofilms et de modifier leurs structures. D'un grand intérêt pratique et thérapeutique était l'observation qu'avec l'huile d'origan à doses sublétales, plus de 20 passages n'ont pas conduit à une résistance bactérienne. Cette observation est d'un grand intérêt car il est devenu connu ces dernières années que divers HEs dans les sous concentrations minimales inhibitrices (sous-CMI) peuvent en effet conduire à des adaptations physiologiques temporaires chez les bactéries, ce qui peut nuire à l'effet thérapeutique de ces huiles à court terme (**Melo et al., 2015**).

L'étape d'adhésion des bactéries aux surfaces représente un grave problème et peut être considérée comme le déterminant de l'uro-virulence responsable de la persistance durable des bactéries dans le tractus génito-urinaire.

Lagha et al., 2019 a publié sa recherche sur les activités anti-biofilms potentielles des HEs du *Zingiber officinale*, *Origanium majorana*, *Rosmarinus officinalis*, *Juniperus communis* et *Thymus zygis* contre *E. coli* qui représente environ 85% des infections urinaires acquises dans la communauté et 50% des infections urinaires acquises à l'hôpital. La majorité des bactéries formant des biofilms ont été isolées à partir d'échantillons de femmes adultes.

L'activité anti-biofilm des HEs a démontré que *O. majorana* avait un effet sur 50% des isolats avec un pourcentage d'inhibition allant de 14,94% à 88,21%, *T.zygis* présentait une activité sur 63,63% des isolats avec un pourcentage de inhibition variant de 17,81% à 85,81%, et *R. officinalis* a montré un effet anti-biofilm sur 86,36% des isolats avec un

pourcentage d'inhibition allant de 28,84% à 94,75%. Ainsi, L'HE de *R. officinalis* l'activité d'inhibition du biofilm la plus élevée contre *E. coli*, suivie par *T. zygis* et *O. majorana*.

Dans les infections urinaires, des facteurs tels que l'âge, le sexe, l'immunosuppression et les instruments urologiques peuvent influencer sur la prévalence des infections urinaires (Iqbal et al., 2010). Selon Daoud et Afif au Liban et Kumar et al., 2006 en Inde, la prévalence des infections urinaires chez les femmes est principalement due à des facteurs anatomiques et physiques.

L'inhibition du biofilm d'*E. Coli* trouvée dans cette étude suggère que l'ajout d'HE avant la formation du biofilm peut contribuer à éliminer les cellules planctoniques et en outre convertir la surface abiotique pour qu'elle soit moins sensible à l'adhésion cellulaire. Le prétraitement de la surface avec des extraits végétaux produit un film défavorable qui favorise le détachement, réduisant ainsi l'adhérence de la surface (Sandasi et al., 2007).

Selon Romling et Balsalobre, 2012 le biofilm entrave nettement le traitement des infections urinaires en protégeant les bactéries encapsulées à la fois de la réponse immunitaire de l'hôte et de la thérapie antimicrobienne. Cela peut expliquer la prévalence et la persistance des infections urinaires à *E. coli* dans les hôpitaux.

Plusieurs rapports ont montré que les HEs pourraient se diffuser à travers la matrice polysaccharidique du biofilm mature et le déstabiliser en raison de fortes activités antimicrobiennes intrinsèques. De plus, l'activité anti-adhérente s'explique par l'altération des protéines de surface bactériennes en raison de leurs interactions avec les huiles. Cela inhibera la phase de fixation initiale à la surface abiotique (Nostro et al., 2007).

Ces résultats soutiennent l'application médicale de ces huiles pour la prévention et / ou le traitement de certaines infections et maladies.

1.2. Blocage du système QS et la réduction de la synthèse des facteurs de virulence

Les composés phytochimiques des plantes médicinales (les phénols, les flavonoïdes, les quinones, les alcaloïdes, les terpénoïdes) jouent un rôle clé contre la pathogénicité microbienne et se sont avérés impliqués dans l'inhibition des molécules de QS ainsi que du biofilm. Chez *P. aeruginosa* par exemple les molécules du QS telles que les AHL, stimule la libération de virulence et de toxine.

Par conséquent, le système QS peut être une cible pour bloquer ces facteurs de virulence, altérant ainsi la formation de biofilm microbien. Ceci est accompli en inactivant l'enzyme de signalisation, en limitant la molécule signal, en introduisant une molécule qui

bloque le récepteur, ou en dégradant la molécule signal elle-même sans tuer les bactéries. Ce principe permet de développer des phytomolécules qui vont permettre d'introduire non seulement un nouveau mode d'action et une éventuelle validation pour l'utilisation traditionnelle des plantes, mais aussi une direction thérapeutique potentiellement nouvelle pour le traitement des infections bactériennes.

Sur ce contexte, **Akhter et Fraidoon** a publié en **2019** les résultats de leurs travaux sur l'effets des extraits de bile de *Quercus infectoria* sur la production des facteurs de virulence du biofilm de *P.aeruginosa* résistant aux médicaments multiples récupérés à partir de brûlures, ainsi que l'expression des gènes codant pour le QS et l'exotoxine A extracellulaires en utilisant différents solvants: acétate d'éthyle, n-butanol, éthanol.

Les résultats de cette étude, montrent une réduction significative du biofilm chez l'agent pathogène étudié lorsqu'il était traité avec des concentrations sous-inhibitrice CSI de 2,5, 1,10 mg /ml pour l'acétate d'éthyle, l'éthanol et les extraits aqueux, respectivement ainsi qu'une diminution significative dans l'activité protéase et dans l'excrétion de pyocyanine.

L'impact sur ces différents facteurs de virulence régulés par QS suggère que les composés de *Quercus infectoria* affectent les gènes régulateurs *lasI*, *lasR*, *rhII* et *rhIR* au niveau de l'expression. Pour cela la RT-PCR en temps réel a été utilisée pour surveiller l'expression de ces gènes, et il a été constaté que cette expression était significativement diminuée dans les extraits de cellules traitées, tandis que la croissance bactérienne n'était pas affectée. La diminution la plus significative a été observée dans la fraction d'acétate d'éthyle, tandis que l'extrait aqueux des biles a complètement bloqué l'expression de tous les gènes testés. La régulation à la baisse observée des gènes et des molécules signal combinées avec un impact sur les facteurs de virulence montre des effets à large spectre sur les réseaux QS.

Des résultats similaires ont été obtenus avec la quercétine, un polyphénol végétal qui existe dans de nombreux fruits, légumes et céréales. Il a été rapporté qu'il inhibait de manière significative la formation de biofilm et la production de facteurs de virulence, y compris la pyocyanine, la protéase et l'élastase (**Krishnan et al., 2012 ; Vasavi et al., 2016**).

Une étude plus approfondie des changements transcriptionnels associés à QS a révélé que les niveaux d'expression de *LasI*, *LasR*, *RhII* et *RhIR* impliqués dans la signalisation QS étaient significativement réduits (**Ouyang et al., 2016**). La quercétine semble être un inhibiteur efficace de la formation de biofilm et des facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*.

Dans une autre étude, **Persson et al., 2005** a constaté que les extraits d'ail présentaient des effets inhibiteurs sur la formation de biofilm contre isolats bactériens cliniques. Aussi, une conception rationnelle et un criblage biologique de tous les composés de l'ail ont

également été réalisés, aboutissant à l'identification d'un puissant inhibiteur de QS : *N*-(heptylsulfanylacétyl)-L-homosérine lactone. Il a été démontré que ce composant interrompt la signalisation QS en inhibant de manière compétitive les régulateurs transcriptionnels LuxR et LasR.

En outre, **Zhou et al., 2018** a aussi constatés que l'hordénine a réduit efficacement les facteurs de virulence et l'expression génique liée à la QS de *P. aeruginosa* PAO1. Il est indiqué que le potentiel anti-QS de l'hordénine agit aussi comme un inhibiteur compétitif pour les molécules de signalisation et un nouvel agent basé sur le QS pour se défendre contre les pathogènes d'origine alimentaire.

Les résultats de **Bjarnsholt et al., 2005** semblent être très intéressants, car ils n'ont pas observé qu'une inhibition de la formation du biofilm en utilisant l'extrait d'ail, mais aussi une sensibilité *Pseudomonas aeruginosa* à la tobramycine, à la poussée respiratoire et à la phagocytose par les leucocytes polymorphonucléaires dans un modèle d'infection pulmonaire de souris. Ce qui pourrait donner des solutions pour empêcher le développement de l'antibio-résistance et donc la formation de biofilm.

En plus des résultats positifs obtenus en utilisant les extraits organiques de différentes plantes médicinales, les HES de ces plantes représentent aussi des excellentes alternatives thérapeutiques et sont très utilisés lors de la quête aux agents anti-biofilm. Les études *in vitro* publiées à ce jour et les données *in vivo* limitées montrent que les HES actifs et certains de leurs ingrédients sont capables d'interférer avec l'expression des gènes qui sont directement ou indirectement responsables de la formation de biofilms, de facteurs de transmission du signal bactérien régulé par QS et la synthèse des facteurs de virulence (**Han et Parker, 2017**).

Dans un test *in vitro* approfondi, 21 HES différentes ont été étudiés pour leurs activités anti-QS dans *Chlostridium violaceum* CVO26 et *Chlostridium violaceum* ATCC 12472 à des sous-CMI. Sur les 21 HES testés dans un essai de diffusion sur gélose, seules les huiles de clou de girofle, de cannelle, de lavande et de menthe poivrée ont montré une inhibition significative de la production de violacéine. L'huile de girofle était de loin, l'HE la plus efficace dans le système de test utilisé. Afin d'exclure la possibilité que l'inhibition observée de la formation de la violacéine ne soit pas causée par un simple effet antimicrobien des HES testés, l'effet inhibiteur de l'huile de girofle a également été étudié dans une approche de test quantitative utilisant *C. violaceum* ATCC 12472. Sa propriété d'inhibition de la violacéine était dose-dépendante. Par rapport au témoin non traité, l'huile de clou de girofle a inhibé la production de violacéine dans les bactéries traitées de 48, 58, 78,40 et 92,30% aux sous-CMI (CMI pour l'huile de girofle: 0,20%) de 0,04, 0,08, 0,12 et 0,16%, respectivement.

Cette découverte garantit que, jusqu'à une concentration de 0,12%, la réduction mesurable de la formation de violacéine chez les bactéries n'est pas due aux propriétés antimicrobiennes de l'huile de girofle, mais à son activité anti-QS. Ce n'est que dans la

concentration plus élevée de 0,16% que la réduction observée de la formation de violacéine était non seulement due à l'activité anti-QS de l'huile de clou de girofle, mais également en raison de ses propriétés toxiques (antibactériennes) (**Khan et al., 2009**).

Dans une autre étude *in vitro*, l'huile de clou de girofle, l'huile de menthe poivrée (avec 36,8% de menthol) et le menthol ont été utilisés dans les sous-CMI pour réduire la formation de biofilm dans *P.aeruginosa* PAO1 (**Husainet al., 2015**). Afin de garantir les mêmes résultats que l'étude précédente, qui est l'inhibition du système QS, la réduction de divers facteurs de virulence (élastase, protéases, pyocyanine, chitinase) dans les sous-CMI a également été déterminée. Par rapport aux témoins correspondants, les deux HEs ainsi que le menthol étaient capables d'inhiber, dans les sous-CMI, la formation de biofilm régulée par QS d'une manière dépendante de la concentration sans inhiber la croissance des souches d'essai. En outre, tous les composés d'essai ont fortement inhibé la production de facteurs de virulence, la production d'EPS et la motilité en essaim. En outre, il a pu être démontré que la production de violacéine dans CV CVO26 était réduite au maximum par l'huile de clou de girofle (à 0,12%), l'huile de menthe poivrée (à 0,1%) et le menthol (à 400 µg / mL) dans les sous-CMI sans réduire les cellules bactériennes croissance.

Des résultats d'une étude similaire ont démontré que l'huile de clou de girofle (à 1,6%) était capable de réduire de manière significative la production d'AHL natif jusqu'à 56% dans les cellules *P.aeruginosa* PAO1 (**Husain et al., 2013**). Ce résultat est une découverte intéressante car il est connu de la littérature que les souches de PA défectueuses dans la production de la molécule d'autoinducteur 3-oxo-C12-HSL sont limitées dans leur capacité pour former des biofilms pleinement établis (**Lee et Zhang, 2015**).

En outre, dans les expériences de simulation d'amarrage moléculaire *in silico*, le menthol s'est avéré très bien adapté au site de liaison AHL du facteur de transcription LasR. Pris ensemble, les données des études *in vitro* et de l'analyse *in silico* du menthol et du LasR indiquent que la production de facteurs de virulence a été considérablement inhibée par l'huile de girofle, l'huile de menthe poivrée et le menthol en interférant avec l'AHL- Cycle de signalisation QS et inhibition du système de régulation LasR / RhIR (activité anti-QS) (**Husainet al., 2015**).

Il est connu dans la littérature que la production des facteurs de virulence pyocynine, élastase, chitinase et protéases totales chez *P.aeruginosa* est sous le contrôle des protéines régulatrices de la transcription LasR / RhIR. En ce qui concerne la formation du biofilm, on peut supposer une corrélation directe entre le système QS et la formation du biofilm par interférence des substances à tester avec le circuit de signalisation AHL-QS et de manière plus indirecte par la réduction des composants essentiels tels que les EPS et la motilité en essaim (**Rasamiravaka et al., 2015**).

E.coli entérohémorragique O157: H7 (ECEH) est une bactérie intestinale redoutée dans le monde entier qui, entre autres, peut provoquer une colite hémorragique associée à une

diarrhée sanglante. Dans une étude *in vitro*, l'huile de laurier (avec 62% d'eugénol), l'huile de clou de girofle (avec 77% d'eugénol) et l'huile de piment (avec 71% d'eugénol) ainsi que l'eugénol, un constituant important de ces huiles, ont été testés pour leur activité anti-biofilm.

La formation de biofilm a été inhibée par les trois HE et l'eugénol (concentrations d'essai: 0,001, 0,002, 0,005, 0,01%) à des concentrations de 0,005% (CMI des substances d'essai: > 0,1%) à 99,7% par rapport au témoin. L'effet des HEs et de l'eugénol sur la formation du biofilm était dose-dépendante. Jusqu'à la concentration d'essai de 0,005%, les cellules planctoniques n'ont pas été inhibées dans leur croissance. Ce n'est qu'à partir d'une concentration de 0,01% que la vitalité des bactéries a été réduite de 20%. Ainsi, on peut supposer que l'activité anti-biofilm des composés à tester se situe dans la plage de concentration de 0,001 à 0,005% est dû à une activité anti-QS et non à la toxicité de ces substances.

D'après ces résultats, l'eugénol, qui a été très utilisé dans plusieurs études, paraît être un constituant très actif sur l'inhibition du système QS est qui peut donc être une meilleure alternative thérapeutique pour la lutte contre les biofilms (Kim et al., 2016).

Une étude récente, qui cette fois ci, ciblée plutôt la sécrétion de facteurs de virulence, a été faite sur l'huile d'arbre à thé australienne (HATA) pour tester son activité anti-biofilm dans *S.aureus* ATCC 29213. Le point le plus intéressant du travail était la question de savoir si le HATA influence le profil d'expression génique (analyse du transcriptome) des cellules bactériennes véhiculées par le biofilm.

Pour répondre à la question, le séquençage de l'ARN ainsi que les méthodes RT-PCRq en temps réel ont été utilisés. L'analyse du transcriptome permet une vaste cartographie des gènes impliqués dans la régulation des processus physiologiques et physiopathologiques des cellules. Dans ce cas, les auteurs sont rendu compte de l'évaluation des gènes différentiellement exprimés (expression génique différentielle) dans les cellules du biofilm *S.aureus* à une concentration de HATA de 1 mg / mL (0,5 × la concentration minimale d'inhibition du biofilm) et un temps d'incubation de 60 min.

Par rapport au groupe témoin non traité, l'expression génique dans les cellules de biofilm traitées par HATA a été modifiée par un total de 304 gènes, avec 104 gènes régulés à la baisse et 200 gènes régulés à la hausse. Les résultats ont été discutés principalement en ce qui concerne les gènes qui peuvent être liés à la formation de biofilm. Par exemple, le gène du facteur de virulence *sarA* code pour la protéine de liaison à l'ADN SarA. SarA est une protéine régulatrice de la transcription cytoplasmique qui active l'opéron *agr* et indépendamment du système QS, contrôle l'expression de nombreux gènes de virulence dans les cellules *S.aureus* qui sont impliquées dans la formation du biofilm, comme certains gènes d'adhésion à la matrice (par exemple, *fnbA*, codant pour la fibronectine- liaison à la protéine A). Dans le présent travail, *sarA* a été régulée à la baisse.

La régulation négative de *sarA* et la forte réduction de la masse de biofilm subséquente dans *S.aureus* suggèrent que les composants individuels des HEs peuvent directement interférer avec la régulation des gènes. Jusqu'à présent, le mécanisme d'action est inconnu (Zhao et al., 2018).

Les activités anti-QS et anti-virulence des composés utilisés dans les expériences précédentes, sont testés à des concentrations minimales et été pour la plupart sans activité inhibitrice de la vitalité bactérienne. Les auteurs ont conclu à partir de ces observations que les activités anti-virulence des substances d'essai reposaient principalement sur leurs effets physiologiques (non antibactériens) et non sur leurs activités toxiques pour les cellules (antibactériennes) il ne peut être totalement exclu qu'en plus des effets physiologiques, des effets toxiques cellulaires des substances puissent également se produire, comme décrit par (Reichling et al., 2002).

Outre que le blocage du système QS ainsi que les différents facteurs de virulences qu'il lui sont liés, l'inhibition de la synthèse des constituants polymériques, qui sont aussi considérés comme facteurs de virulence médiés par le QS, ainsi que les différents éléments constituant la matrice, et aussi une cible intéressante pour l'irradiation ou la prévention de la formation des biofilms.

Sur ce, une étude a évalué l'efficacité l'extrait méthanolique de *Sapindus mukorossi* (EMSM) sur la synthèse des molécules adhésives autoproduites essentielles à la formation de la matrice qui permettent de garder les cellules bactériennes noyées dans la matière visqueuse extracellulaire et fournir ainsi une stabilité au biofilm. Ces extraits ont été testés sur les *S. aureus* SARM. Les résultats ont montré que la réduction dépendait de la concentration de l'EPS et une réduction d'hydrophobicité jusqu'à 50% ce qui pourrait être responsable de la réduction de l'adhérence aux surfaces. Un autre facteur intéressant est que les cellules SARM ont toujours semblé être dispersées lors de la comparaison avec les cellules témoins agrégées. Ce fait a conduit l'étude à étudier le modèle d'auto-agrégation du SARM pendant 24 h en présence d'EMSM par essai de décantation en tube à essai. Les résultats ont révélé que l'EMSM altérait la capacité d'agrégation du SARM.

La quantification de l'ADN extracellulaire (ADNe) a démontré la réduction considérable de l'ADNe lors du traitement par EMSE. L'examen de l'autolyse et de la synthèse de l'ADNe en présence a démontré que les cellules traitées par EMSE étaient résistantes à l'autolyse. En outre, afin de découvrir l'effet d'EMSM sur l'expression du gène de virulence, une analyse PCRq a été effectuée. Les résultats ont révélé que le traitement EMSM réduisait l'expression des gènes impliqués dans la production d'AIP. *fnbA*, *fnbB* et *cna* sont des protéines d'adhésion qui interagissent avec les composants de la matrice extracellulaire de l'hôte et sont impliquées dans la colonisation de l'hôte. Une expression réduite de ces gènes est responsable de l'activité antibiofilm d'EMSM. *AtlA* est l'autolysine responsable de la

synthèse de l'ADNe et de la diminution de l'expression de l' *atIA* est en ligne avec l'inhibition de l'autolyse et de la synthèse de l'ADNe par EMSM.

Dans l'ensemble, on a pu observer que le traitement EMSM altérait la synthèse d'éléments adhésifs tels que la matrice, les polysaccharides et l'ADNe. Une diminution de l'expression de ces facteurs d'adhésion pourrait être le mécanisme d'action sous-jacent de l'activité anti-biofilm d'EMSM (Selvaraj et al., 2020).

Vijayakumar et al., 2019 a évaluée le potentiel anti-biofilm et anti-virulence médié par QS de l'extrait au méthanol *Musa acuminata* (EMMA) et de ses métabolites bioactifs contre *Pseudomonas aeruginosa*. En outre, les phénomènes liés au biofilm tels que les protéines de biofilm total, les EPS de formation de microcolonies et les productions d'hydrophobicité de surface cellulaire (HSC) ont également été examinés pour soutenir le potentiel anti-biofilm de l'EMMA. Les résultats ont montré que l'EMMA a inhibé de manière significative la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* à une concentration de 400 µg ml⁻¹, ce qui a également inhibé la production de protéines de biofilm, l'adhérence du biofilm, les productions d'EPS et de HSC au niveau de 79%, 82% et 77% respectivement. En outre, le potentiel anti-virulence a été confirmé par de nombreux tests d'inhibition de la virulence. L'extrait inhibait la production de virulence médiée par QS telle que la production de protéase, de protéase LasA, d'élastase LasB, de pyocyanine, d'alginate et de rhamnolipide au niveau de 77%, 75%, 68%, 80%, 78% et 69% respectivement. Les résultats de l'analyse PCRq ont confirmé la régulation à la baisse de l'expression des gènes de virulence régulés par QS lors du traitement avec l'EMMA.

Une autre étude qui a pour but d'identifier les herbes traditionnelles chinoises qui pourraient inhiber la formation de biofilm de *P.aeruginosa*, a utilisée l'extrait de *Herba patriniae* et ils ont constaté qu'il diminuait la production d'EPS par *P. aeruginosa* et favorisé sa motilité en essaimage car une motilité accrue peut réduire l'adhérence et permettre aux bactéries de s'échapper activement de la matrice du biofilm pour devenir des bactéries planctoniques, ce qui détruit le biofilm formé (Zhou et al., 2011).

Les glucosyltransférases (Gtf) sont des enzymes sécrétées par *S. mutans* pour synthétiser des EPS avec du saccharose. Liu Y et al., 2017 a exploré l'effet des extraits de feuilles de *B. crassifolia* (L.) sur le biofilm de *Streptococcus mutans*. Les extraits de feuilles ont montré des effets inhibiteurs en diminuant la viabilité des bactéries empêchant ainsi la formation ou la maturation de biofilm. L'extrait pourrait aussi diminuer la propriété d'adhérence de *S. mutans* en inhibant Gtfs pour synthétiser EPS. De plus, la quantité réduite d'EPS et l'inhibition des Gtfs étaient positivement corrélées aux concentrations des échantillons d'essai. Les extraits ont présenté des effets inhibiteurs significatifs sur les EPS insolubles dans l'eau. Ces données suggèrent que les extraits de feuilles de *Bergenia crassifolia* pourraient diminuer l'adhésion et la viabilité de *S. mutans* et empêcher ainsi la formation ou la maturation de biofilm. Les extraits pouvaient effectivement diminuer la

quantité d'EPS hydrosolubles, ce qui restreindrait la source de glucides métabolisables pour la formation de biofilm. De plus, les effets inhibiteurs des extraits de feuilles de *B. crassifolia* sur les glucanes insolubles dans l'eau étaient plus puissants que sur les glucanes solubles dans l'eau.

Husain et al., 2015 a évalué l'extrait de graines de *Trigonella foenum-graecum* sur les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* PAO1, PAF79 tels que l'élastase LasB, la protéase, la pyocyanine, la chitinase, la motilité de l'essaimage, et la production d'EPS.

Il a été bien rapporté que le QS dépendant de l'AHL joue un rôle majeur dans la formation d'un biofilm avec une architecture complexe de type sauvage chez de nombreuses bactéries. Dans cette étude, l'extrait de *T. foenum-graceum* a inhibé considérablement la biomasse du biofilm de manière dose-dépendante sans affecter la croissance bactérienne dans les deux souches de *P. aeruginosa*. L'image au microscope électronique à balayage et à la lumière présentait une architecture désintégrée et réduisait le nombre de microcolonies pendant la formation du biofilm des bactéries pathogènes testées. Par conséquent, il est envisagé que le traitement d'agents pathogènes bactériens avec les extraits aboutisse à la formation de biofilms faibles éventuellement en réduisant l'adhérence de surface et la formation ultérieure de microcolonies.

Les facteurs étroitement associés à la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* comme la motilité d'essaimage et la production d'EPS ont également été évalués dans cette étude. Puisque la production d'EPS et la motilité en essaim sont sous le contrôle de QS, une interférence avec QS entraînerait une production réduite d'EPS et une motilité en essaim. Dans cette étude, la quantité totale d'EPS produite et la motilité ont été réduites lorsque les agents pathogènes bactériens (PAO1 et PAF79) ont été traités avec des sous-CMI d'extrait de *T. foenum-graceum*. Les extraits végétaux réduisent de manière significative la réduction de l'EPS ce qui réduira éventuellement le niveau de résistance du pathogène en mode sessile.

2. Efficacité synergique des extraits végétaux sur la formation de biofilm

2.1. Combinaison « extrait végétal-antibiotique »

Le mécanisme d'action des antibiotiques peut être résumé comme l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, la liaison à la membrane cellulaire, l'inhibition de la synthèse des protéines. Malheureusement, cela a pris fin en raison de l'émergence rapide de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries par la sur-utilisation des antibiotiques dans les industries médicales et agricoles, mettant en danger la santé du patient. Ce qui a mené donc à une réduction radicale dans la découverte de nouveaux antibiotiques.

Ces dernières années, les composés issus de ressources naturelles ont de plus en plus mis l'accent sur les effets synergiques avec les antibiotiques traditionnels (**Zhang et al., 2019**). Cette forme d'activité synergique a pour but d'empêcher l'émergence de bactéries résistantes et pour réduire les effets secondaires en raison de l'utilisation d'une concentration d'antibiotiques plus faible (**Ocampo et al., 2014**).

Le principal mécanisme d'action synergique est l'inhibition de la formation de biofilm ou d'endommager la membrane mis en place de cellule bactérienne ; les agents antibiofilm disperseront les biofilms bactériens, tandis que les antibiotiques élimineront la population bactérienne (**Petrova et Sauer, 2012**), et cela par l'effet multicible de ces combinaisons qui affectent non seulement une seule cible, mais plusieurs telles que les substrats, les enzymes, les récepteurs, les protéines de transport, les canaux ioniques ou les anticorps (**Zhang et al., 2019**). De nombreux exemples de réussite ont confirmé la faisabilité des combinaisons entre produits naturels et antibiotiques pour améliorer l'efficacité antibiofilm.

Das et al., 2016 a étudié un composé de flavone vitexine, un groupe polyphénolique de composés phytochimiques isolé à partir de plantes de l'espèce vitex et ayant des propriétés potentiel antibiofilm contre *Pseudomonas aeruginosa* en association avec l'azithromycine et la gentamicine. Pour cela, plusieurs tests ont été réalisés à savoir : la détermination de la concentration d'inhibition de biofilm (CMIB) de la vitexine, de l'azithromycine et la gentamicine, le taux des protéines totales du biofilm, la quantification de l'EPS de la matrice du biofilm et les phénomènes médiés par le QS tels que la motilité d'essaimage, l'activité de la protéase dégradant l'azocaséine, la production de pyoverdine et de pyocyanine, l'activité LasA et LasB des bactéries.

Les résultats ont montré que la vitexine, avec une CMIB $> 3570 \mu\text{g} / \text{ml}$, exerçait une atténuation modérée du biofilm contre le micro-organisme où une réduction maximale (56%) de la formation de biofilm a été trouvée à une dose de $110 \mu\text{g} / \text{ml}$. L'activité antibiofilm de la vitexine a augmenté de manière significative en association avec l'azithromycine (CMIB $> 2950 \mu\text{g} / \text{ml}$) ou la gentamicine ($> 1490 \mu\text{g} / \text{ml}$), où une réduction synergique maximale (83,44%) a été observée.

Le test des protéines totales du biofilm a montré que les échantillons traités à la vitexine avaient significativement moins de protéines extraites par rapport au contrôle non traité. La combinaison de l'azithromycine et de la gentamicine séparément avec la vitexine a conduit à une atténuation significative de la protéine totale du biofilm. Cette atténuation accrue peut être considérée comme de nature synergique car $110 \mu\text{g} / \text{ml}$ de vitexine, avec $13,75 \mu\text{g} / \text{ml}$ d'azithromycine a montré une réduction de 84,94%, tandis qu'avec $2,5 \mu\text{g} / \text{ml}$ la gentamicine a montré une réduction de 95,1% de la protéine totale du biofilm. En outre les images de *P. aeruginosa* observé au microscope fluorescent ont montré une diminution significative de la fixation des cellules formant un biofilm.

Lors de l'extraction et de la quantification de l'EPS, il a été constaté que la vitexine atténuait significativement la formation d'EPS de *P. aeruginosa* où une atténuation maximale de 40% était observée à une concentration de 110 µg / ml. Ce degré d'atténuation était synergiquement et significativement augmenté par l'association avec l'azithromycine (65,6%) et la gentamicine (82,4%). Ces résultats indiquent que la vitexine à son niveau sous-CMI a présenté une activité d'atténuation modérée du biofilm qui a encore augmenté de manière synergique en combinaison avec l'azithromycine ou la gentamicine.

Les résultats ont également montrés que les cellules traitées à la vitexine à une concentration de 110 µg / ml montre une réduction modérée. En outre, une dose de 110 µg / ml de vitexine en association avec l'azithromycine ou la gentamicine a considérablement réduit la motilité de l'essaimage. De plus, la vitexine a exécuté une atténuation modérée de la production de protéase bactérienne par *P. aeruginosa* et l'azithromycine et la gentamicine ont réduit de manière synergique la motilité en association avec la vitexine. Lors du traitement avec la vitexine, il a été observé qu'une concentration de 110 µg / ml montre une atténuation modérée de la pyoverdine et de la pyocyanine. L'azithromycine et la gentamicine exécutent séparément une atténuation synergique de la sécrétion de pyoverdine et de pyocyanine lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec la vitexine. Dans ce cas, la gentamicine exécute un effet synergique maximal.

À la lumière des résultats prometteurs obtenus à partir du test protéolytique total, nous avons en outre évalué l'effet de la vitexine seule et en combinaison dans l'inhibition de l'activité protéase LasA de *P. aeruginosa*. Lors du traitement par la vitexine seule, nous avons observé une inhibition maximale de 39,04% et en association, une réduction significative de l'activité de la protéase LasA a été observée. Parmi les effets synergiques, la combinaison de vitexine et de gentamicine a montré une meilleure atténuation (88,33%) que la combinaison de vitexine et d'azithromycine (69,93%). Une diminution significative de l'activité élastase LasB a été observée dans le surnageant de culture de *P.aeruginosa* après traitement par la vitexine seule (37,54%) et en association avec l'azithromycine (69,23%) ou la gentamicine (87,63%). En accord avec l'activité de protéase LasA, ici également une combinaison de 110 µg / ml de vitexine et de 2,5 µg / ml de gentamicine a montré une réduction synergique maximale de l'activité d'élastase LasB.

Le même principe de recherche est aussi retrouvé dans une autre étude en utilisant la rutine, un groupe de flavonoïdes riche en vitamine P de phytochimie avec des propriétés antimicrobiennes a été isolée des pelures de *Citrus sinensis* par chromatographie sur colonne et chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour étudier son potentiel anti-biofilm contre *Pseudomonas aeruginosa*, en combinaison avec l'antibiotique conventionnel gentamicine.

Les résultats ont montré que la rutine présentait une CMI à 800 µg / ml contre la bactérie. Son potentiel anti-biofilm a été examiné par coloration au cristal violet, analyse de protéines, études microscopiques et quantification des EPS en utilisant plusieurs doses sous-CMI. L'inhibition de la formation de biofilm a été renforcée de manière synergique lorsque la bactérie a été traitée avec de la rutine (200 µg / ml) et la gentamicine (2,5 µg / ml). La production d'EPS était responsable de l'adhérence et de la maturation des biofilms, qui étaient également significativement réduites dans la souche testée. Les résultats de l'étude confirment que la rutine peut être potentiellement utilisée comme inhibiteur d'adhérence pour le traitement des infections à *P. aeruginosa* (Murugesan et al., 2018).

L'activité synergique d'extraits de plantes (grenade / romarin) avec différent type d'antibiotiques pipéracilline (PRL), ceftazidime (CDZ), imipénème (IPM), gentamycine (GN) ou lévofloxacine (LEV) a été évaluée contre la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.

La masse de biofilm d'isolats de producteurs de biofilm puissants a été significativement réduite après 24 h de traitement avec des extraits de grenade et de romarin seuls et en association avec des antibiotiques (PRL, CDZ, IPM, GN ou LEV) au niveau de la CMI. L'éradication du biofilm de l'extrait de romarin était relativement élevée (intervalle de 53,1 à 73,7%) par rapport à l'activité d'éradication (intervalle de 41,2 à 71,5%) de l'extrait de grenade. En outre, la combinaison des deux extraits a augmenté de manière significative l'éradication du biofilm dans la plage de 76,5 à 85,4%. De plus, l'activité d'éradication des deux combinaisons d'extraits de plantes / antibiotiques était significativement élevée (intervalle de 76,5 à 99,6%) par rapport aux autres traitements de la présente étude.

Les différences entre les extraits de romarin et de grenade dans l'éradication des biofilms peuvent être expliquées par les différences dans leurs teneurs en polyphénols, leurs concentrations, et mode d'action. L'augmentation significative de l'éradication du biofilm de la combinaison d'extraits de plantes par rapport à chaque extrait de plante unique qui pourrait probablement être attribuée à l'interaction synergique entre les deux extraits. L'interaction synergique des deux combinaisons extraits / antibiotiques avait été prouvée dans cette étude, et cela pourrait expliquer l'augmentation significative de l'éradication du biofilm de ces combinaisons par rapport aux extraits de plantes seuls et en combinaison.

L'analyse phytochimique qui a révélé que le pyrogallol, le catéchol, l'acide gallique, ellagique, rosmarinique et l'acide benzoïque étaient les composés phénoliques les plus abondants identifiés dans les extraits de grenade et de romarin. Le pyrogallol a présenté une interaction synergique avec les antibiotiques aminosides et quinolones contre les bactéries Gram-positives; cependant, ces combinaisons ont montré une interaction indifférente contre les bactéries à Gram négatif, en particulier *P. aeruginosa*. On rapporte que le catéchol endommage la membrane cytoplasmique et provoque une perturbation directe des bicouches lipidiques et une altération de la fonction de barrière, ce qui conduit à une pénétration accrue

des antibiotiques et à une diminution de leurs CMI. L'effet synergique des deux extraits avec des antibiotiques était probablement dû à la présence d'acides gallique, benzoïque et rosmarinique, qui diminuent les constituants bactériens (protéines, acides nucléiques et ions inorganiques tels que le potassium ou le phosphate) en augmentant la perméabilité de la bactérie membrane cytoplasmique.

De plus, l'activité d'inhibition du biofilm de ces extraits est due à leur inhibition de la motilité de nage qui a conduit à une réduction des cellules bactériennes se fixant aux surfaces, donc diminution de l'humidité de la colonie et de la couche polymère supplémentaire ainsi que des signaux de détection de quorum. En outre, la formation de biofilm pourrait être diminuée par la suppression de la motilité des contractions, qui est nécessaire pour la fixation des cellules bactériennes et l'extension du biofilm vers une nouvelle surface, ainsi que par l'assemblage monocouche de cellules de *P. aeruginosa* en micro-colonies ce qui a conduit à une réduction de la capacité du biofilm car cette motilité est essentielle pour le développement et la maturation du biofilm.

En outre, les activités d'éradication de ces combinaisons contre les biofilms ont été soutenues par les images de microscope électronique après 24 h de traitement de biofilm mature avec le niveau de CMI de la combinaison grenade / romarin / CDZ. Ces images ont montré une densité élevée de cellules de bacilles compactées dans certaines zones du biofilm témoin (non traité), et la plupart de ces cellules de bacilles étaient incorporées dans une matrice polymère extracellulaire; cependant, le biofilm traité a été complètement détruit et retiré de la surface du couvercle de la lame de verre, et la plupart des cellules bactériennes ont été éliminées.

Ces combinaisons perturbent les biofilms de *P. aeruginosa* en bloquant les différentes motilités bactériennes, en détruisant l'architecture des biofilms et en augmentant l'efficacité des antibiotiques en diminuant leurs niveaux de CMI. De plus, la résistance du biofilm aux antimicrobiens est multiforme, y compris la pénétration réduite de l'agent dans les biofilms en raison de la présence de matrice extracellulaire, de l'hétérogénéité du biofilm et des phénotypes spécifiques du biofilm tels que l'expression de la pompe d'efflux et des cellules persistantes. Et donc, ces combinaisons augmentent l'efficacité des antibiotiques tout en diminuant leurs niveaux de CMI.

Un facteur généralement perçu comme jouant un rôle dans la résistance aux antibiotiques est l'incapacité de l'antibiotique à pénétrer dans les biofilms, réduisant ainsi l'antibiotique disponible pour interagir avec les bactéries du biofilm. Étant donné que les huiles essentielles peuvent pénétrer et endommager les biofilms, certaines études ont exploré la combinaison de médicaments synthétiques avec des huiles essentielles dans le but d'évaluer et d'améliorer l'efficacité anti-biofilm (Abu El-Wafa et al., 2020).

Dans une autre étude, l'activité anti-biofilm de quatre composants principaux des huiles essentielles (thymol (Thy), eugénol (Eug), berbérine (Ber) et cinnamaldéhyde (Cin)) ont été

évaluées contre deux agents pathogènes d'origine alimentaire, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* Typhimurium, seul ou en association avec l'antibiotique streptomycine.

Les résultats ont montré que les combinaisons synergiques entre Cin ou Ta avec streptomycine avaient les plus fortes activités anti-biofilm contre *L. monocytogenes* que les composants individuels. Ces combinaisons synergiques pourraient également entraîner une réduction des bactéries vivantes, par rapport à celle du témoin. En outre, des images de microscopie en fluorescence ont mis en évidence que l'architecture des biofilms de *L. monocytogenes* exposés aux combinaisons synergiques présentait très peu d'agrégats cellulaires dispersés, dans lesquels il y avait beaucoup moins de cellules viables qu'exposées aux composants individuels, ces résultats peuvent être considérés comme l'effet des composants des huiles essentielles. Les combinaisons synergiques ont également démontré une activité anti-biofilm plus élevée envers *S. Typhimurium*. Évidemment, les combinaisons synergiques streptomycine et Cin, streptomycine et Eug ont eu un effet prononcé sur la diminution de la masse du biofilm et des bactéries vivantes que le traitement à la streptomycine, Cin ou Eug seul. Ces résultats ont également été mis en évidence par la visualisation de biofilms par microscopie électronique à balayage, dans laquelle l'architecture des biofilms de *S. typhimurium* exposés à ces combinaisons synergiques pendant 24 h présentait moins d'agrégats de cellules dispersés par rapport à ceux des réactifs individuels.

Les résultats de l'analyse par immunofluorescence. *Listeria monocytogenes* ou *S. typhimurium* exposé à la streptomycine seule a présenté une faible fluorescence verte. En revanche, une fluorescence verte a été observée dans les biofilms formés par ces deux bactéries après traitement avec la combinaison de composants d'huiles essentielles avec de la streptomycine (Thy et streptomycine, Cin et streptomycine, Eug et streptomycine). Ces découvertes montrent clairement que les huiles essentielles facilitent l'accès de la streptomycine dans les biofilms formés par ces deux bactéries (Liu et al., 2015).

Maisuria et al., 2020 a étudié l'activité anti-biofilm d'un extrait de sirop d'érable riche en phénol (ESEP) et de son constituant phénolique le catéchol contre les biofilms formés par *E. coli*, *P. aeruginosa* et *Proteus mirabilis*. ESEP a également été testé pour des interactions synergiques avec des antibiotiques contre les biofilms des bactéries sélectionnées.

L'ESEP seul a montré une inhibition significative de la formation de biofilm en monoculture de toutes les souches testées. La ESEP en association avec la ciprofloxacine (à des concentrations sublétales) a eu des effets inhibiteurs significatifs sur la formation de biofilm pour *E. coli* CFT073 (~70% d'inhibition à 6,25 mg ml⁻¹), *Proteus mirabilis* HI4320 (70% d'inhibition à 12,5 mg ml⁻¹), *P. aeruginosa* PAO1 (83% d'inhibition à 12,5 mg ml⁻¹) et *P. aeruginosa* PA14 (~ 54% d'inhibition à 12,5 mg ml⁻¹). Le catéchol avec et sans

ciprofloxacine (tous deux à des concentrations sublétales) a manifesté des effets inhibiteurs significatifs sur la formation de biofilm pour les quatre souches testées.

Les biofilms se sont formés en présence de ciprofloxacine uniquement, il y avait une augmentation marginale de la formation de biofilm pour *P. mirabilis* HI4320 et *P. aeruginosa* PAO1. Cette augmentation a été diminuée par l'association de ciprofloxacine avec ESEP ou catéchol. Pour analyser l'applicabilité de l'ESEP pour éradiquer le biofilm des surfaces de biomatériaux, un test de biofilm *in vitro* a été réalisé à l'aide de disques de silicone. Les données sur la propriété d'éradication du biofilm d'ESEP en association avec la ciprofloxacine par les récupérations de cellules viables à partir des disques de silicone après exposition à différentes combinaisons d'ESEP et de ciprofloxacine ont été évaluées. L'ESEP seul n'a pas montré d'éradication significative du biofilm en monoculture sur des disques de silicone pour aucune des souches testées, tandis que l'ESEP en combinaison avec une concentration sublétale de ciprofloxacine avait un effet d'éradication du biofilm significatif, avec une interaction synergique à des concentrations plus élevées de ciprofloxacine.

L'ESEP et le catéchol ont augmenté la sensibilité des biofilms bactériens aux antibiotiques. ESEP s'est avéré augmenter la perméabilité de la membrane externe de toutes les souches bactériennes et inhiber efficacement l'activité de la pompe d'efflux. En outre, l'analyse du transcriptome a révélé qu'ESEP réprimait de manière significative les gènes de résistance à plusieurs médicaments ainsi que les gènes associés à la motilité, l'adhésion, la formation de biofilm et la virulence.

Pour explorer la base génétique de la synergie de l'activité anti-biofilm observée entre ESEP et les antibiotiques, une analyse transcriptionnelle a été réalisée en utilisant RT-PCRq pour observer l'expression différentielle des gènes associés à différentes fonctions des quatre souches étudiées. Les résultats indiquent qu'ESEP, à des concentrations sublétales, réprimait l'expression de gènes associés à la motilité bactérienne, la virulence, résistance aux médicaments, adhésion et formation de biofilm pour chacune des quatre souches bactériennes. L'analyse transcriptionnelle confirme les tendances observées avec le test du biofilm (c.-à-d. Que l'inhibition du biofilm en présence de ESEP est corrélée à la régulation à la baisse des gènes associés au biofilm) et les tests de synergie antibiotique (à savoir, la régulation à la baisse de plusieurs gènes de résistance aux médicaments est en corrélation avec une sensibilité accrue aux antibiotiques en présence du ESEP). ESEP a été utilisé à des concentrations sublétales pour cette expérience et n'affecte pas la croissance bactérienne de l'une quelconque des quatre souches. Ceci est important, car les conditions qui affectent la croissance peuvent inhiber l'expression des gènes. Sur la base de ces résultats, on peut conclure que les différences observées dans l'expression des gènes étaient dues à la présence d'ESEP et non à l'inhibition de la croissance par cet extrait.

L'interaction synergique entre les extraits et les antibiotiques de différents types, quels que soient leurs mécanismes d'action, a suggéré que ce n'est pas seulement un composé qui

est responsable de l'effet synergique observé mais que chacun des composés identifiés contribue à cet effet entraînant un pléiotrope effets des deux extraits. Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature antérieure, qui a remarqué que les combinaisons d'extraits de plantes avec des antibiotiques appartenant à différentes familles montrent une synergie contre les isolats cliniques de bactéries Gram-positives et négatives, réduisant significativement la CMI de tous les antibiotiques testés (Stefanović *et al.*, 2011 ; Braga, 2011). Par conséquent, ces combinaisons peuvent être utilisées pour élargir le spectre antimicrobien, empêcher l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques et réduire la toxicité, car une concentration plus faible de ces antibiotiques peut être utilisée (Miklasińska-Majdanik *et al.*, 2018 ; Sanhueza *et al.*, 2017).

2.2. Combinaison « extrait végétal-extrait végétal »

En plus de la combinaison entre les extraits végétaux et les antibiotiques, l'association entre les différents extraits donne aussi des résultats promoteurs sur l'inhibition de la formation des biofilms par l'interaction des différents composés bioactifs qui les constituent.

Bernal-Mercado *et al.*, 2018 a montré que le mélange de composés phénoliques (l'acides catéchine, protocatéchuique et vanillique) était plus efficace pour prévenir l'adhésion cellulaire et éradiquer les biofilms préformés d' *E.Coli* uropathogène (ECUP) que les composés uniques.

Les concentrations minimales de composés phénoliques pour empêcher l'adhésion ECUP et la formation de biofilm (CMIB) étaient respectivement de 11,03 mM et 7,13 mM d'acides protocatéchuique et vanillique, alors qu'aucune CMIB de catéchine n'a été trouvé. Cependant, des combinaisons de 1,62 mM d'acide protocatéchuique, 0,74 mM d'acide vanillique et 0,05 mM de catéchine ont montré un effet synergique agissant comme CMIB. Par contre, pour éradiquer les CMEB biofilms étaient de 25,95 et 23,78 mM, respectivement. De plus, la combinaison de 3. 20 mM d'acide protocatéchuique, 2,97 mM d'acide vanillique et 1,72 mM de catéchine ont éradiqué les biofilms préformés.

Le mécanisme synergique possible proposé dans cette étude est que l'acide vanillique et l'acide protocatéchuique interagissent avec la couche lipidique de la membrane bactérienne, affectant son intégrité structurelle ou sa fonctionnalité et, par conséquent, affectent l'adhésion bactérienne. Cela pourrait faciliter l'entrée de la catéchine, et ce composé peut interagir avec d'autres molécules telles que des enzymes dans le cytoplasme, affectant le métabolisme bactérien. L'action simultanée de ces deux mécanismes pourrait être responsable de l'effet antibactérien synergique observé qui inhibe la densité cellulaire dans la formation du biofilm. Cependant, les acides vanillique et protocatéchuique étaient efficaces pour éliminer les cellules viables des biofilms préformés 24 h d'ECUP sur des surfaces; tandis que la catéchine semblait perturber la biomasse du biofilm. De plus, les composés phénoliques peuvent aussi interférer avec la communication cellule-cellule par divers mécanismes, tels que l'inhibition

de la synthèse de molécules signal ou de récepteurs, qui à son tour affecte la synthèse des substances extracellulaires polymères et le développement du biofilm.

2.3. Autres combinaisons

Les nanoparticules d'argent (NP Ag) ont été développées en tant qu'agent anti-biofilm pour le traitement des infections associées à l'utilisation de ventilation mécanique, telles que l'intubation endotrachéales. Pendant ce temps, la curcumine, un extrait de plantes phénolique, a montré des propriétés anti-biofilm naturelles grâce à l'inhibition des systèmes de détection du QS bactérien.

Loo C-Y et al., 2016 a étudié les interactions synergiques des NP Ag et des nanoparticules de curcumine (NPCur) contre les biofilms formés par *P. aeruginosa* et *S. aureus*. La combinaison d'NP Ag et NP Cur- (appelés NPCur-Ag) à 1) à 100 µg / mL a perturbé 50% des biofilms bactériens établis. Cependant, une augmentation supplémentaire de la concentration de NP Cur-Ag n'a pas réussi à éliminer efficacement les biofilms. La microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie confocale à balayage laser ont révélé que la thérapie combinée (NP Cur-Ag) était la plus efficace pour éradiquer le biofilm préformé par rapport à la thérapie monodrogue. Ces agents sont également non toxiques pour les cellules épithéliales bronchiques humaines saines, ce qui les permet de les considérer comme les agents thérapeutiques alternatifs pour diminuer les effets secondaires des médicaments classiquement utilisés.

Dans une autre étude intéressante, **Banu et al., 2017** ont étudié le potentiel anti-biofilm d'une HE d'une espèce de *Cinnamomum* sous- explorée à savoir, *Cinnamomum tamala*, utilisée en synergie avec une DNase (DNaseI) disponible dans le commerce et une DNase (DBM) isolée à partir d'une bactérie marine contre les biofilms de *P. aeruginosa*. Les résultats ont montré qu'une différence a été observée dans la réduction des biofilms jeunes et préformés traités avec la combinaison d'HE et de DNases par rapport aux HE et aux DNases traités individuellement. L'effet synergisé de l'HE et de la DNaseI a montré une inhibition de 70% contre les biofilms mûrs de *P. aeruginosa*. L'HE de *C. tamala* a également montré un potentiel inhibiteur de détection de quorum car il pourrait inhiber le comportement de motilité en essaim de *P. aeruginosa* mais elle n'a montré que 58% d'inhibition lorsqu'il est utilisé individuellement, ainsi qu'une inhibition de 65% pour les DNases seules. Cela montre que les HE ont une pénétration limitée dans les biofilms et que lorsque l'échafaudage du biofilm qui comprend l'ADNe est desserré en raison de la dégradation de l'ADNe par l'action des DNases, il améliore l'action des HE.

3. Les nano-porteurs : une nouvelle stratégie de lutte contre les biofilms

Le caractère lipophile des HEs et des composés d'huile essentielle (CHE) limite sévèrement leur utilisation expérimentale ou thérapeutique, par exemple, en raison de leur faible capacité de pénétration dans les habitats biologiques et non biologiques aqueux (par exemple, matrice de biofilm, exsudation de plaies). Au cours des deux dernières décennies, cette limitation a été surmontée en développant des systèmes de nano-délivrance de médicaments tels que des nanocapsules polymères, des nanoparticules, des liposomes et certains autres systèmes de nano-porteurs.

Dans ce contexte, il est postulé que les HEs nano-encapsulés et les substances huileuses uniques pourraient représenter un système de nano-délivrance optimal pour lutter contre les bactéries vivant dans le milieu de biofilm aqueux ou dans d'autres environnements biologiques aqueux. Les systèmes de nano-porteurs qui contiennent des HEs sont conçus de manière à rendre toute la formulation galénique soluble dans l'eau et, par exemple, à permettre aux nano-porteurs de pénétrer facilement dans les canaux et les endroits remplis d'eau du biofilm.

Les HEs nano-encapsulés sont protégés contre les influences oxydantes et l'évaporation. En raison de la solubilité accrue dans l'eau, non seulement un transport de masse ciblé, mais également une libération ciblée et contrôlée de l'HE actif ou du composé huileux individuel sur le site d'action est possible (Bilia et al., 2014).

Au cours des 10 dernières années, de nombreuses publications sur différents systèmes de nano-porteurs avec des HEs encapsulés sont apparues. Ce domaine de recherche, qui est d'une importance croissante, pourrait permettre le développement de systèmes de nano-délivrance spéciaux chargés d'HE en tant que nouveaux agents anti-infectieux pour lutter contre les bactéries à l'intérieur des biofilms matures et pour prévenir formation de biofilm sur des surfaces biologiques et non biologiques.

Une étude récente a été faite sur les infections des bactéries formant un biofilm telles que les germes *E.coli*, *P.aeruginosa* et SARM qui sont particulièrement problématiques chez les patients immunodéprimés ainsi que chez les patients présentant des plaies mal cicatrisées, des cathéters urinaires, des cathéters intraveineux ou des prothèses articulaires en utilisant les systèmes de nano-délivrance spéciaux chargés d'HE.

Les résultats ont révélés que le mélange d'huile de menthe poivrée et d'acide cinnamique, deux huiles chargées dans des nano-capsules de silice (taille moyenne: 1000 nm), a pénétré relativement facilement dans la matrice du biofilm et y a tué les bactéries (*E.coli*, *P.aeruginosa* et SARM). Il a été montré que l'activité antimicrobienne des HE nano-encapsulés augmentait par rapport aux huiles non encapsulées. Cette augmentation significative de l'activité du véhicule de délivrance par rapport au témoin a été expliquée par une biodisponibilité plus élevée des HEs nano-encapsulés dans les canaux aqueux et la

caverne peuplés de bactéries. La biodisponibilité plus élevée des HES dans le biofilm était possible parce que le pH de la matrice du biofilm a changé (à un pH plus acide), ce qui a dissous la structure des capsules et libéré l'HE près des bactéries (**Duncan et al., 2015**).

Dans une expérience similaire, (**Dohare et al., 2014**), l'huile d'eucalyptus a été incorporée dans des nanoparticules de silice (taille moyenne: 1000 nm; concentration d'huile: 50 $\mu\text{L} / \text{mL}$) et testée contre des biofilms *E.coli* sur des surfaces en verre. Le résultat du test a montré une réduction de 81% de la formation de biofilm par l'huile d'eucalyptus encapsulée, contrairement à l'expérience témoin non traitée. Les nanoparticules encapsulées dans l'huile étaient également significativement plus actives que l'huile d'eucalyptus (50 $\mu\text{L} / \text{mL}$) testées dans un essai de diffusion en puits d'agar. Dans ce cas, la réduction du biofilm n'a atteint qu'une valeur d'environ 62%. Un contrôle au microscope optique a révélé que la matrice de biofilm complexe était complètement détruite et que seules quelques bactéries étaient reconnaissables sur l'image.

Cui et al., 2016 a étudié l'activité anti-biofilm de l'huile de cannelle encapsulée dans des liposomes contre des souches de SARM formant des biofilms sur différentes surfaces telles que la gaze, les tissus non tissés, la membrane en nylon et l'acier inoxydable. Les changements morphologiques dans la matrice du biofilm après le traitement avec de l'huile de cannelle encapsulée dans des liposomes ont été suivis en utilisant des méthodes microscopiques modernes (par exemple, microscopie électronique à balayage). Il a été rapporté que l'huile de cannelle encapsulée dans des liposomes éradiquait les biofilms établis sur différentes surfaces à une concentration de 1 mg / mL.

Aussi, l'influence des nanoparticules HATA sur l'adhésion des cellules *P.aeruginosa* aux cellules épithéliales buccales a été étudiée par **Comin et al., 2016**. Il a été montré que les nanoparticules HATA réduisaient significativement l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales buccales d'environ 70% et inhibaient la motilité des cellules bactériennes d'environ 63%, toutes deux à une concentration de nanoparticules HATA de 0,78%. De plus, les nanoparticules chargées d'huile ont également inhibé la formation de biofilm d'environ 40% à la concentration d'huile de 12,5%, ce qui est intéressant pour le développement des soins bucco-dentaires efficaces.

Une étude similaire a été réalisée par **Balaure et al., 2017**, en incorporant divers HES (huile d'eucalyptus, huile d'orange, huile de cannelle) dans un système nano-porteur constitué de nanosystèmes mésoporeux SiO_2 . Tout d'abord, les données physiques et chimiques (morphologie, porosité, composition chimique, capacité de charge) des systèmes de nano-délivrance conçus ont été bien caractérisées puis testées dans des sous-CMI pour leurs activités d'inhibition du biofilm en utilisant des souches *S.aureus* et *P.aeruginosa* cliniquement pertinentes. Les résultats ont révélés que dans une concentration de nanoparticules d'HE de 0,62 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (et plus), la formation de biofilm des deux bactéries a été significativement inhibée par tous les composés d'essai.

Les HE bioactifs nano-encapsulés pourraient représenter une approche faisable et efficace pour combattre les bactéries à l'intérieur des biofilms. Un tel système de délivrance de médicament peut apporter plusieurs avantages : il modulerait la libération de médicament, augmenterait la stabilité physique des HEs actifs / composés huileux individuels, les protégerait des interactions avec l'environnement, diminuerait leur volatilité, augmenterait leur bioactivité, réduirait la toxicité et améliorerait l'observance du patient.

Les études présentées précédemment, montrent que les HEs nano-encapsulés combinent idéalement les propriétés spéciales des systèmes de nano-porteurs avec l'activité antibactérienne des HE. Ainsi, les systèmes nano-porteurs chargés en HEs sont donc des agents antimicrobiens intéressants pour éradiquer les biofilms sur les cathéters, prothèses et autres dispositifs médicaux et pour la prise en charge des plaies aiguës et chroniques (**Anjum et al., 2017**).

En outre, des combinaisons d'HEs ou de CHE individuels et aussi d'antibiotiques encapsulés dans des systèmes de nano-porteurs peuvent être un autre moyen de lutter avec succès contre les bactéries associées aux biofilms et de surmonter la résistance aux antibiotiques existante.

Comme il est connu, les bactéries pathogènes associées aux biofilms sont un problème sérieux non seulement en médecine mais aussi dans l'industrie alimentaire. Par exemple, la formation de biofilms sur les aliments et les emballages alimentaires peut entraîner une détérioration des aliments et des maladies d'origine alimentaire. Par conséquent, il n'est pas surprenant que ces dernières années, les HE ou les CHE uniques conditionnés dans des nanoparticules soient également discutés dans l'industrie alimentaire comme agents actifs possibles pour lutter contre les bactéries formant des biofilms (**Ribeiro-Santos et al., 2017**).

En plus des HEs, les extraits organiques sont aussi utilisés en nanoparticules pour la lutte contre les biofilms, en association avec différents composés chimiques. Par exemple, une étude, l'extrait de feuille de *Veronica multifida* et l'acétate de zinc dihydraté ont été utilisés pour synthétiser des nanoparticules d'oxyde de zinc (NP ZnO). L'activité antibiofilm des NP ZnO a été réalisée contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* ATCC 29213. Les NP ZnO ont montré des activités antibiofilms efficaces contre les microorganismes testés ; et les résultats ont montré que les NP ZnO produits de manière écologique et rentable pouvaient être utilisés comme matériaux de revêtement et dans un large éventail d'applications industrielles, telles que les industries pharmaceutiques et les cosmétiques (**Şahin Doğan et Kocabaş, 2020**).

De plus, dans une étude similaire, **Erci et al., 2020** a cherché à synthétiser des nanoparticules d'oxyde de cuivre (NP CuO) médiées par un extrait végétal de manière écologique et à révéler leurs activités biologiques potentielles. La synthèse des NP CuO a été faite en utilisant différentes concentrations d'extrait aqueux de feuilles de *Thymbra spicata* à 80 ° C pour obtenir des Ts1NP CuO et Ts2NP CuO. Les NP CuO ont démontré une bonne activité d'inhibition contre la formation de biofilm de *S. aureus*. En outre, les résultats ont

montré que la plus petite taille des NP CuO provoquait une cytotoxicité plus élevée sur les cellules fibroblastes de souris L929. Les NP CuO tels que synthétisés présentent un potentiel anti-biofilm contre *S. aureus*, ce qui indique qu'ils peuvent être des candidats intéressants à utiliser dans de futures applications thérapeutiques.

Conclusion

Conclusion

Les biofilms sont identifiés comme présentant une résistance accrue aux antibiotiques et aux agents antimicrobiens, ce qui représente un fardeau gênant pour les soins de santé humaine, et le traitement des infections associées aux biofilms est actuellement un défi complexe.

Ainsi, les ressources naturelles offrent une énorme bibliothèque pour le criblage d'agents anti-biofilm. Les plantes et les aliments naturels ont fait l'objet de recherches de plus en plus axées sur leurs effets bénéfiques pour la santé ces dernières années. Jusqu'à présent, une série de recherche a étudié les effets inhibiteurs des produits naturels sur la formation et le développement du biofilm bactérien, suggérant leur potentiel en tant qu'agents alternatifs pour les infections bactériennes.

Selon les résultats des différentes études précitées dans ce mémoire, la plupart des agents anti-biofilm naturels ont montré des données précliniques encourageantes pour l'efficacité anti-biofilm dans diverses espèces bactériennes. Leur mécanisme de régulation potentiel était principalement dû à la suppression de chaque étape de formation de biofilm ou d'inhibition du réseau QS.

De plus, le criblage d'agents anti-biofilm par séparation chromatographique et d'autres techniques au cours des deux dernières décennies a ouvert la voie à l'isolement de composants efficaces. Cependant, de nombreuses études sur les extraits d'origine végétale ayant une activité anti-biofilm n'identifient pas les structures moléculaires des molécules bioactives, ce qui indique que d'autres études doivent être effectuées. De plus, il est encourageant de constater que des recherches sur la thérapie anti-infectieuse à base d'agents anti-biofilm naturels sont en cours pour les essais cliniques.

***Références
Bibliographiques***

A

1. **Abdullahi R.A., Mainul H. 2020.** Préparation des plantes médicinales: Procédures de base d'extraction et de fractionnement à des fins expérimentales. 12(1), pp 1-10.
2. **Abu El-Wafa W.M., Ahmed R.H., Ramadan M.A. 2020.** Effets synergiques d'extraits de grenade et de romarin en combinaison avec des antibiotiques contre la résistance aux antibiotiques et la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz.J Microbiol.* 51, pp 1079-1092.
3. **Acroute A., Chemli R., Chreif I., Hammami M. 2001.** Analyse de l'huile essentielle d'*Artemisia Campestris* L. *Wil. Online Libr.* pp16-5.
4. **Adnan M., Patel M., Deshpande S., Alreshidi M., Siddiqui A.J., Mandadi Narsimha Reddy., Noumi Emira., Vincenzo De Feo. 2020.** Effet de l'extrait d'*Adiantum philippense* sur la formation du biofilm, l'adhésion avec ses activités antibactériennes contre les agents pathogènes d'origine alimentaire et la caractérisation des métabolites bioactifs: une approche *in vitro-in silico*.
5. **Adrews J.M. 2001.** Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob Chemother.* 48 (1), pp 5-16.
6. **Akbas, M.Y. 2015.** Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. pp 383-394.
7. **Akhter Ahmed A., Fraidoon Abdulqadir S. 2019.** Les extraits de bile de *Quercus infectoria* réduisent la production de facteurs de virulence contrôlés par le quorum sensing et la formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* récupéré de brûlures. *Méd compl et alternative BMC.*19, pp 177.
8. **Allison D G., Gilbert P., Lappin-Scott H M., Wilson M. 2000.** Comprendre le biofilm et ses enjeux. onelife-biofilmfree / biofilm-education.
9. **Alnnasouri M., Rondags E., Fick M. 2007.** Dégradation des mycotoxines par voie biologiques. Rapport Master2 recherche. ENSAIA. INPL Nancy- France.
10. **Alnnasouri, M. 2010.** Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France *Appl. Environ. Microbiol.* 52, pp 1242-1246.
11. **Anand S., Singh D., Avadhanula M., Marka S. 2014.** Development and Control of Bacterial Biofilms on Dairy Processing Membranes. *Compre. Revi in Food. Science and FoodSafety.* 13, pp 18-33.

Références bibliographiques

12. **Anderson GG., O'Toole GA. 2008.** Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, pp 85-105.
13. **Cortial A. 2015.** Nouvelles applications des nanoparticules organiques : de la vectorisation d'un mélange d'actifs à travers la peau jusqu'au développement d'un test diagnostique in vitro de l'allergie aux parfums. *Ingénierie biomédicale.* Université Claude Bernard - Lyon I, Français.
14. **Anjum S., Singh S., Benedicte L., Roger P., Panigrahi M., Gupta B. 2017.** Stratégies de biomodification pour le développement de cathéters urinaires antimicrobiens: aperçu et avancées . *Glob Chall.*
15. **As A., Ee E., Moodley N., Lj M., Naidoo V., Jn E. 2012.** L'activité antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et la cytotoxicité de différentes fractions de quatre espèces de *Bauhinia* sud-africaines utilisées traditionnellement pour traiter la diarrhée. *J Ethnopharmacol.*143(3), pp 826–39.
16. **Assad M., 2005.** Fractinement des complexes lignine-polyphénols polysaccharides issus de différentes biomasses lignocellulosique par extraction BI-VIS et séparation chromatographique. Thèse de doctorat. Toulouse.science des agro ressources.
17. **Atefibeibu E.S.I. 2002.** Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne de *Acacia Nilotica* Var *Adansonii*. Thèse de doctorat. Université Cheikh Anta Diop. Dakar, Sénégal. pp 37
18. **Aumeran C., Balestrino D., Forestier C. 2020.** Biofilms bactériens et santé. *Encyclopédie de l'environnement.* pp 1-7.
19. **Aye A M. 2015.** Mise en évidence du système de communication "Quorum Sensing" impliquant les AHLs chez des bactéries marines isolées de la Méditerranée. Thèse de doctorat en aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Microbiologie / Biochimie. Université de Toulon. France.

B

20. **Baba-Aïssa F. 2000.** Encyclopédie des Plantes Utiles, Flore d'Algérie et du Maghreb, Substances Végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. EDAS. Algérie.
21. **Balasundram N., Sundram K., et Samman S. 2005.** Phenolic compound in plants and agro-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry.* 99, pp 191-203.

Références bibliographiques

22. **Balaure PC., Boarca B., Popescu RC., Savu D., Trusca R., Vasile BŞ., Grumezescu AM., Holban AM., Bolocan A., Andronescu E. 2017.** Nanostructures de silice mésoporeuses bioactives aux propriétés anti-microbiennes et anti-biofilm . Int J Pharm. 531, pp 35-46.
23. **Banks KM., Bryers JD. 1992.** Deposition of bacterial cells onto glass and biofilm surfaces. Biofouling. 6, pp 81–86.
24. **Banu S.F., Rubini D., Rakshita S., Chandrasekar K., Murugan R., Wilson A., Gowrishankar S., Pandian S. K., Nithyanand P. 2017.** Propriétés antivirulentes de l'huile essentielle de *Cinnamomum tamala* sous- explorée et ses effets synergiques avec la DNase contre les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* - Une étude *in vitro*.
25. **Behlau I., Gilmore M.S. 2008.** Microbial biofilms in ophthalmology and infectious diseases. Arch Ophthalmol. 126, pp 1572-1581.
26. **Beloin C., Roux A., Ghigo J.M. 2008.** Escherichia coli biofilms. Curr Top Microbiol Immunol. 322, pp 249-289.
27. **Benabdelkader T. 2012.** Biodiversité, bioactivité et biosynthèse des composés terpéniques volatils des Lavandes Ailées, *Lavandula stoechas* Sensu Lato, un complexe d'espèces méditerranéennes d'intérêt pharmacologique. Thèse de doctorat en biologie et écophysiologie végétale. Ecole normale supérieure. Kouba. Alger.
28. **Bendinger B., Rijnaarts H.H.M., Altendorrf K et al. 1993.** Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. Appl. Environ. Microbiol. 59, pp 3973-3977.
29. **Benkhaldi. 2017.** Activité antimicrobienne des extraits végétaux application à l'inhibition de biofilm des bacilles thermophiles d'origine laitière. mémoire de master en Biologie Option : Microbiologie Appliquée. UNIVERSITE de TLEMCEM Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers : p1.
30. **Bensakhiria A. 2016.** Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). *Analytical Toxicology*.
31. **Benyahia Y. 2016.** Activité antimicrobienne des composés phénoliques Application à l'inhibition de biofilm des bacilles thermophiles d'origine laitière. Microbiologie Appliquée. UNIVERSITE de TLEMCEM Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univer. pp 24.

Références bibliographiques

32. **Benzeggouta N. 2015.** Evaluation des Effets Biologiques des Extraits Aqueux de Plantes Médicinales Seules et Combinées. Diplôme de Doctorat en Sciences : Pharmaco-Chimie. Université Mentouri-Constantine.
33. **Bernal-Mercado A.T., Vazquez-Armenta F.J., Tapia-Rodriguez M.R., Islas Osuna M.A., Mata-Haro V., Gonzalez-Aguilar G.A., Lopez-Zavala A.A., Ayala-Zavala J.F. 2018.** Comparaison de l'utilisation unique et combinée des acides catéchine, protocoles et vanilliques comme agents antioxydants et antibactériens contre *Escherichia Coli* uropathogène aux niveaux planctonique et de biofilm. *Molecules*. 23 (11).
34. **Bezzaz N. 2014.** Détermination structurale des métabolites secondaires et extractions des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia*. Magistère en chimie organique. Faculté des sciences. Université de Msila.
35. **Bilia AR., Cuccione C., Isacchi B., Righeschi C., Firenzuoli F., Bergonzi MC. 2014.** Huiles essentielles chargées en nanosystèmes: une stratégie en développement pour une approche thérapeutique réussie. *Compl. Evid. Based Alternat. Med.* pp 651-593.
36. **Bisht K., Wagner K.H., Bulmer A.C. 2010.** Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto-and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology*. 278(1), pp 88-100.
37. **Bjarnsholt T., Jensen P.O., Rasmussen T.B., Christophersen L., Calum H., Hentzer M., Hougen H.P., Rygaard J., Moser C., Eberl L., Hoiby N., Givskov M. 2005.** Garlic bloque la détection du quorum et favorise l'élimination rapide des infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiologie*. 151, pp 387-380.
38. **Bouaine A. 2017.** Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites des deux plantes aromatiques et médicinales: Lentisque et Myrte. Master, Faculté des sciences et techniques, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Fès. pp 44.
39. **Braga L.K.A. 2011.** Potentialisation de l'activité antibiotique in vitro par *Ocimum gratissimum* L. *African J Pharm Pharmacol*. 5 (19).
40. **Branda S.S., Gonzalez- Pastor J.E., Ben- Yehuda S et al. 2001.** Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98, pp 11621- 11626.
41. **Branger A., Richer M-M., Roustel S. 2007.** *microbiochimie et alimentation*. Ed educagri. pp 131-140.
42. **Brian M.L. 1995.** The isolation of aromatic materials from plant products. R.J. Reynolds Tobacco Company. Winston- Salem (USA). pp 57-148.

43. **Bridier A., Le Coq D., Dubois-Brissonnet F., Thomas V., Aymerich S., Briandet R. 2011.** The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. PLoS One. 6, pp 1.
44. **Brown R. 1866.** A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. In The miscellaneous botanical works of Robert Brown. Eds. Bennett J. Hardwicke R. London.
45. **Brunet. 2008.** Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants. En vue de l'obtention du Doctorat, spécialité : Pathologie et Nutrition. Université De Toulouse. pp 246.
46. **Bruneton J. 1999.** Composés phénoliques, Shikimates, acétate. In: «Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales». Ed. Tec et Doc – Lavoisier. pp 233-447.
47. **Bruneton J. 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition. Ed. TEC et DOC. Paris.
48. **Bruneton J. 2008. Acides phénols.** In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. Ed: Tec & Doc. Lavoisier. Paris. Pp 198-260.
49. **Bruneton J. 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc Lavoisier (ed.). Paris. pp 1243.

C

50. **Calsamoglia S., Busquet M., Cardozop W., Castillejos L., Ferret A. 2007.** Essential oils for modifying rumen fermentation. 90, pp 2580-2595.
51. **Chaintreau A., Joulain D., Marin C., Schmidt C.O., Vey M. 2003.** Quantification of fragrance compound suspected to cause skin réactions. J Agric. Food. Chem. 51, pp 398 -403.
52. **Chalvet de Rochermonteix A. 2009.** Les Biofilms et peaux. Thèse pour obtention de Doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil. Paris Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort. pp147.
53. **Characklis W.G. 1973.** Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. Water Res. 7, pp 1249-1258.

Références bibliographiques

54. **Characklis W.G., Marshall K.C. 1990.** Biofilms. pp 341-394.
55. **Characklis W.G., Turakhia M.H., Zilver N. 1990.** Transport and interfacial transfer phenomena. In Biofilms, Eds Characklis WG and Marshall KC. Wiley. New-York. pp 316–340.
56. **Chavane U.D., Shahidi F., Naczk M. 2001.** Extraction of condensed tanins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L) as affected by different solvans. *J of Food and Chem.* 75, pp 509-512.
57. **Cheok C.Y., Salman H.A.K., Sulaiman R. 2014.** Extraction and quantification of saponins: A rev. *Food Res Interna.* 59, pp 16-40.
58. **Chira K., Such J., Saucher C., Teissedre L. 2008.** Les polyphénols du raisin. *Ed. Springer.* 6, pp 75-82.
59. **Cieur C., Carillon A. 2012.** La plante médicinale – notion de totum – implication en phytothérapie clinique intégrative. Ph., Société internationale de médecine endobiogénique et de physiologie intégrative.
60. **Clément R. P. 2005.** Aux racines de la phytothérapie : entre tradition et modernité (1ère partie) À Législation. 4, pp 171-5.
61. **Clutterbuck AL., Woods E.J. et al. 2007.** Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol.* 121 (1-2), pp 1-17.
62. **Comin V.M., Lopes L.Q., Quatrin P.M., de Souza M.E., Bonez P.C., Pintos F.G., Raffin R.P., Vaucher Rde.A., Martinez D.S., Santos R.C. 2016.** Influence des nanoparticules d'huile de *Melaleuca alternifolia* sur les aspects du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* . *Microb Pathog.* 93, pp 120-125.
63. **Cosa S., Rakoma J.R., Yusuf A.A., Tshikalange T.E. 2020.** Les extraits de *Calpurnia aurea* (Aiton) Benth réduisent les facteurs de virulence contrôlés par détection de quorum chez *Pseudomonas aeruginosa*. 25 (10), pp 2283.
64. **Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., Lappin-Scott, H. M. 1995.** Microbial biofilms. *Annual Rev in Microbiol.* 49(1), pp 711-745.
65. **Costerton J.W. 1999.** Introduction to biofilm. *Inter J Antimicrobial Agents.* 11, pp 217-721.
66. **Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K.J. 1978.** How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, pp 86-95.

67. **Costerton J.W., Stewart P.S et al. 1999.** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284, pp 1318-1322.
68. **Costerton JW. 2004.** A short history of the development of the biofilm concept. *Methods of studying biofilms*. Ghannoum M & O'Toole GA Editors. Microbial biofilms. ASM Press.
69. **Courfort C., Derlon N., Ochoa-Chaves J., Liné A., Paul E. 2007.** Cohesion and detachment in biofilm systems for different electron acceptor and donors. *Water Sci and Tech*. 55, pp 421-428.
70. **Cui H., Li W., Li C., Vittayapadung S, Li L. 2016.** Liposome contenant de l'huile de cannelle avec une activité antibactérienne contre le biofilm de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline . *Biofouling*. 32, pp 215-225.

D

71. **D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R., Giovannini C., Masella R. 2007.** Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dell'Istituto-Superiore-di-Sanità*. 43(4), pp 348-361.
72. **Daoud Z., Afif C. 2009.** *Escherichia coli* isolé des infections des voies urinaires de patients libanais. épidémiologie et profils de résistance. *Chemother. Res. Prat*. 2011, pp 218-431.
73. **Das M., Sandhu P., Gupta P et al. 2016.** Atténuation de la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* par Vitexin: Une étude combinatoire avec l'azithromycine et la gentamicine. *Sci Rep*. 6, 23347.
74. **Davies G., Eds Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M. 2000.** Physiological events in biofilm formation. In *Community Structure and Co-operation in Biofilms*. Society for General Microbiology Symposia. pp 37-52.
75. **De La Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Fernández L., Rew H. 2013.** Développement de biofilm bactérien En tant qu'adaptation multicellulaire: résistance aux antibiotiques et nouvelles stratégies thérapeutiques. *Curr Opin Microbiol*. 16 (5), pp 580–9.
76. **Derbel S., Ghedira K. 2005.** Phytothérapie et nutrition: Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*. 1, pp 28-34.

77. **Didi W., Hassaine H., Gaouar S. 2019.** Activité antibactérienne des extraits de bâtonnets à mâcher algériens sur biofilm de prothèse buccale. *J Int Oral Health*. 11, pp 260-7.
78. **Dohare S., Dubey S.D., Kalia M., Verma P., Pandey H., Singh N.K, Agarwal V. 2014.** L'activité anti-biofilm des nanoparticules de silice encapsulées dans l'huile d' *Eucalyptus globulus* contre le biofilm d' *E. Coli* . *IJPSR*. 5, pp 5013-5018.
79. **Donald P. 2000.** Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Briskin. American Society of Plant Physiologists.
80. **Donlan R.M. 2002.** Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8 (9), pp 881-890.
81. **Donlan R.M., Costerton J.W. 2002.** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiological Reviews*. 15, pp 167-193.
82. **Drenkard E. 2003.** Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5, pp 1213-1219.
83. **Druzyńska B., Stepniewska A., Wolosiak R. 2007.** The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 6, pp 27-36.
84. **Ducrot C., Fric D., Lalmanach A.C., Monnet V., Sanders P., Schouler C. 2017.** Perspectives d'alternatives thérapeutiques antimicrobiennes aux antibiotiques en élevage. *INRA Productions Animales*. 30 (1), pp 77-88.
85. **Dumas C. 2007.** Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. pp 306.
86. **Duncan B., Li X., Landis R.F., Kim S.T., Gupta A., Wang L.S., Ramanathan R., Tang R., Boerth J.A., Rotello V.M. 2015.** Capsules stabilisées aux nanoparticules pour le traitement des biofilms bactériens . *ASC Nano*. 9, pp 7775-7782.
87. **Duraffourd C., Lapraz J.C., Chemli R. 1997.** La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris.

E

88. **El-Azrak H. 2017.** Extraction et distillation d'une plante aromatique et médicinale : *Rosmarinus officinalis*. Master, département des sciences de la vie, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès. pp 33 p.
89. **Erci F., Cakir-Koc R., Yontem M., Torlak E. 2020.** Synthèse de nanoparticules d'oxyde de cuivre biologiquement actives en tant que nouveaux agents antibactériens-antibiofilm prometteurs. *Bioch préparative et biotech.* pp 1-11.
90. **Espinasse F., Page B., Cottard-Bouille B. 2010.** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Rev Francophone des Laboratoires.* pp 51-63.

F

91. **Fernandez X., Chemat F. 2017.** La chimie des huiles essentielles. Tradition et innovation. Edition Vuibert. pp 288.
92. **Filloux A., Vallet I. 2003.** Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne, *Med/Sci.* 19, pp 77-83.
93. **Fletcher M. 1988.** Attachment of *Pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium- substratum separation distance. *J. Bacteriol.* 170, pp 2027-2030.

G

94. **Garret TR. 2008.** Bacterial adhésion and biofilm on surface. *Sci direct.*
95. **Ghada N., Ousadou D. 2018.** Etude préliminaire d'une plante médicinale saharienne «*Pulicaria crispa* » : phytochimie, activité antimicrobienne et inhibitrice de biofilm. *Memoir ce fin d'études en Microbiologie Appliquée.* Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou.
96. **Ghedira K. 2005.** Les flavonoïdes: structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie.* 04, pp 162-169.
97. **Goetz C., Dufour S., Archambault M., Malouin F., Jacques M. 2016.** Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intramammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique. *Revue Méd. Vét.* 167, pp 7-8, pp 215-229.

98. **Goetz C., Dufour S., Archambault M., Malouin F., Jacques M. 2016.** Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intramammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique. pp 215-229.
99. **Goller C.C., Romeo T. 2008.** Environmental influences on biofilm development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, pp 37- 66.
100. **GonzálezMera I.F., Falconí D.E.G., Córdova V.M. 2019.** Métabolites secondaires dans les plantes: classes principales, analyse phytochimique et activités pharmacologiques. *Revistabionatura*.
101. **Guerrah M., Segueni M. 2015.** Contribution à l'étude biochimique de quelques plantes médicinales dans le Sahara Septentrional algérien. Mémoire de master. Biochimie appliquée. El-oued. Université Echahid Hamma Lakhdar. Algérie. pp 10.

H

102. **Haiying Cui Cuixia Ma Lin Lin. 2016.** Efficacité antibactérienne synergique du plasma azoté froid et de l'huile de girofle contre les biofilms d'*Escherichia coli* O157: H7 sur laitue. *Sciencedirect*. pp 8-16.
103. **Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. 2004.** Bacterial biofilms : from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2(2), pp 95-108.
104. **Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrouki M., Kouider N. 2004.** Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology.* 54, pp 213-225.
105. **Han X., Parker TL. 2017.** Les huiles essentielles modulent de manière diversifiée l'expression génique à l'échelle du génome dans les fibroblastes dermiques humains . *Méd Cogent*.
106. **Haras D. 2005.** Biofilms et altérations des matériaux: de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques* 93, pp 27-41.
107. **Hassiotis C.N. 2010.** Chemical compounds and essential oil release through decomposition process from *Lavandula stoechas* in Mediterranean region. 38(4), pp 463-864.

108. **Hellal Z. 2011.** Contribution a l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. application sur la Sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de magister en biologie, Département des sciences biologiques, Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. pp 120.
109. **Henrici AT. 1933.** Studies of Freshwater Bacteria: A Direct Microscopic Technique.
110. **Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. and Bjarnsholt, T. 2011.** The clinical impact of bacterial biofilms. *Intern J of Oral Sci.* 3(2), pp 55-65.
111. **Huete A. 2012.** Huiles essentielles pour tous les jours. Editions Artémis. pp 223.
112. **Husain F.M., Ahmad I., Asif M., Tahseen Q. 2013.** Influence de l'huile de girofle sur certaines fonctions régulées par quorum-sensing et biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila*. *J Biosci.* 38, pp 835-844.
113. **Husain F.M., Ahmad I., Khan MS., Ahmad E., Tahseen Q., Khan MS., Alshabib NA. 2015.** Les sous-CMI de l'huile essentielle de *Mentha piperita* et du menthol inhibent la détection de quorum médiée par AHL et le biofilm des bactéries Gram-négatives. *Front Microbiol.* 6, pp 420.
114. **Husain F.M., Ahmad I., Shahnawaz Khan M., Al-Shabib N.A. 2015.** L'extrait de *Trigonella foenum-graceum* (graine) interfère avec les traits régulés par Quorum Sensing et la formation de biofilm dans les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila*.

I

115. **Ibukun M., Abimbola O., Folorunso O., Jacobus N., Lyndy J. 2019.** Activité antibactérienne et antibiofilm d'extraits de feuilles d'acétone de neuf espèces d'*Eugenia* et *Syzygium* (Myrtaceae) sud-africaines sous-étudiées et leurs indices de sélectivité. *Méd complémentaire et alternative BMC.* 19, pp 141 .
116. **Iqbal T., Naqvi R., Akhter SF. 2010.** Fréquence de l'infection des voies urinaires chez les receveurs de transplantation rénale et effet sur la fonction du greffon. *J. Pak. Med.* 10, pp 826–829.
117. **Irie Y., Parsek MR. 2008.** Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, pp 67- 84.
118. **Iserin P. 2002.** Encyclopédie des plantes médicinales (Identification, préparation soins) .éd. Larousse. pp 335.

119. **ISO/TS 27687:2008.** Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects — Nanoparticle, nanofibre and nanoplate.
120. **Jeyasekaran G. 2000.** A Report on Diagnostics in Fish Diseases. Geelong Australia: Australian Animal Health Laboratory Commonwealth Scientific and Industrial Res Org. pp 42.

J

121. **Jn E. 2004.** Quantification de la bioactivité des extraits de plantes lors du criblage et du fractionnement guidé par bioessai. *Phytomédecine*. 11 (4), pp 370-1.
122. **Jp D., Ao A., Lj M., Jn E. 2016.** Activité antimycobactérienne contre différents agents pathogènes et indice de sélectivité de quatorze plantes médicinales utilisées en Afrique australe pour traiter la tuberculose et les affections respiratoires. *S Afr J Bot*. 102, pp 70–4.

K

123. **Kalla A. 2012.** Etude et valorisation des principes actifs de quelques plantes du sud de l'Algérie *Pituranthos scoparius*, *Rantherium adressium* et *Traganum nudatum*. Thèse de doctorat en science. Faculté des sciences exactes, département de chimie. Université Mentouri. Constpntine.
124. **Kanter M., Coskun O., Uysal H. 2006.** The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Arch. Toxicol*. 80 (4), pp 217-224.
125. **Kaplan J.B. 2010.** Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*. 89, pp 205-218.
126. **Kavanaugh NL., Ribbeck K. 2012.** Des huiles essentielles antimicrobiennes sélectionnées éradiquent *Pseudomonas* spp. et les biofilms de *Staphylococcus aureus* . *Appl Environ Microbiol*. 78, pp 4057-4061.
127. **Khan M.S.A., Zahin M., Hasan S., Husain F.M., Ahmad I. 2009.** Inhibition des fonctions bactériennes régulées par quorum sensing par les huiles essentielles végétales avec une référence particulière à l'huile de girofle . *Lett Appl Microbiol*. 49, pp 354-360.
128. **Khan Alam., Syeda Moh F., Arfat Yameen M., Elshikh M.S., Alkoufeidy R.M., Abd El-Zaher M., Bhasme P., Alshammari M.K., Alkubaisi N., Abbasi A.M., Tatheer Alam N. 2020.** Activité anti-biofilm d'extraits végétaux contre les agents pathogènes infectieux - *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Références bibliographiques

129. **Khenaka K. 2011.** Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Diplôme de Magister. Université Mentouri Constantine.
130. **Kim S.W., Chang I.M., Oh K.B. 2002.** Inhibition de la protéine de surface bactérienne ancrant la transpeptidase sortase par les plantes médicinales. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66, pp 2751–4.
131. **Kim Y.G., Lee J.H., Gwon G., Kim S.I., Park J.G., Lee J. 2016.** Les huiles essentielles et les eugénols inhibent la formation de biofilm et la virulence d' *Escherichia coli* O157: H7 . *Sci Rep.*
132. **Kraft K., Hobbs C. 2004.** Pocket Guide to Herbal Medicine. Thieme. Stuttgart. New York. pp16.
133. **Krishnan T., Yin W.F., Chan K.G. 2012.** Inhibition de la production de facteur de virulence contrôlé par quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 par l' extrait de bourgeon de girofle Ayurveda (*Syzygium aromaticum*). *Capteurs (Bâle).* 12, pp 4016–30.
134. **Kuete V., Krusche B., Youns M., Voukeng I., Fankam A.G., Tankeo S., Lacmata S., Effertth T. 2011.** Cytotoxicité de certaines épices camerounaises et extraits de plantes médicinales sélectionnées. *J Ethnopharmacol.*134 (3), pp 803–12.
135. **Kumar M., Lakshmi V., Rajagopalan R. 2006.** Occurrence de β -lactamases à spectre étendu parmi *Enterobacteriaceae* spp. isolé dans un institut de soins tertiaires. *J. Med. Microbiol.* 24, pp 208-211.

L

136. **Lagha R., Ben Abdallah F., AL-Sarhan B.O., Al-Sodany Y. 2019.** Activité antibactérienne et inhibitrice du biofilm des huiles essentielles de plantes médicinales contre *Escherichia coli* isolée de patients UTI.
137. **Laib I. 2012.** Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : Application aux moisissures des légumes secs. *Nature & Technologie.* pp 52.
138. **Lanseur R. 2017.** Evaluation in-vitro des activités anti-oxydante et anti-inflammatoire des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* et *Rosmarinus officinalis* seules et en combinaison. Master. département de biologie. Université Abderrahmane Mira. Bejaia. pp 69.

139. **Laurent F. 2011.** Biofilm bacterien. Université de Médecine de Lyon.
140. **Lebeaux D., Ghigo J. 2012.** Management of biofilm-associated infections: What can we expect from recent research on biofilm lifestyles. *Med sci.* 28, pp 8-9. pp 727-73.
141. **Lee J., Zhang L. 2015.** Le réseau de détection de quorum hiérarchique dans *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell.* 6, pp 26-41
142. **Lee J.H., Kim Y.G., Ryu S.Y., Cho M.H., Lee J. 2014.** Les acides Ginkgolic et l'extrait de *Ginkgo biloba* inhibent la formation de biofilm d' *Escherichia coli* O157: H7 et de *Staphylococcus aureus* . *Int J Food Microbiol.* 174, pp 47–55.
143. **Lee J.H., Regmi S.C., Kim J.A., Cho M.H., Yun H., Lee C.S., Lee J. 2011.** La phlorétine flavonoïde de pomme inhibe la formation de biofilm d' *Escherichia coli* O157: H7 et améliore l'inflammation du côlon chez le rat. *Infect Immun.* 79, pp 4819–27.
144. **Lee P., Tan K.S. 2015.** Effets de l'épigallocatechine gallate contre le biofilm et la virulence d' *Enterococcus Faecalis* . *Arch Oral Biol.* 60 (3), pp 393–9.
145. **Lewis K. 2008.** Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, pp 107- 131
146. **Ligor M., Ratiu I.A., Kielbasa A., AL-Suod H., Buszewski B. 2018.** Extraction approaches used for the determination of biologically active compounds (cyclitols, polyphenols and saponins) isolated from plant material. *Electrophoresis.*
147. **Lin M., Lin Y. et Lan C. 2014.** Test de concentration minimale inhibitrice (CMI) pour *Acinetobacter baumannii*. *Bio-protocole.*
148. **Lin Y.-H., Xu J.-L., Hu J., Wang L.-H., Ong S. L., Leadbetter J. R., Zhang L.-H. 2003.** Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Mol Microb.* 47(3), pp 849-860.
149. **Liu Y., Xu Y., Song Q., Wang F., Sun L., Liu L., Yang X., Yi J., Bao Y., Ma H., Huang H., Yu C., Huang Y., Wu Y., Li Y. 2017.** Activités anti-biofilm des feuilles de *Bergenia crassifolia* contre *Streptococcus mutans*. *Microbiol avant.* 8, pp 1738.
150. **Liu Q., Niu H., Zhang W., Mu H., Soleil C., Duan J. 2015.** Synergie entre le thymol, l'eugénol, la berbérine, le cinnamaldéhyde et la streptomycine contre les agents pathogènes d'origine alimentaire planctoniques et associés au biofilm.

151. **Loo C-Y., Rohanizadeh R., Young P.M et al. 2016.** Combinaison de nanoparticules d'argent et de nanoparticules de curcumine pour des activités anti-biofilm améliorées. *Journal de chimie agricole et alimentaire. American Chem Soc.*
152. **Lu M., Dai T., Murray C.K., Wu M.X. 2018.** Propriété bactéricide de l'huile d'origan contre les isolats cliniques multirésistants . *Microbiol avant.* 9, pp 2329.
153. **Lucchesi M.E. 2005.** Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat. Université de La Réunion. pp 72.

M

154. **Macheix J.J. 1996.** Les composés phénoliques des végétaux:quelles perspectives à la fin du XXème siècle. *Acta Botanica Gallica.* 143(6), pp 473-479.
155. **Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. 2005.** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires.
156. **Mah T.L., O'Toole G.A. 2001.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9, pp 34- 39
157. **Maisuria V.B., Hosseinidoust Z., Tufenkji N. 2020.** L'extrait polyphénolique du sirop d'érable augmente la sensibilité aux antibiotiques et réduit la formation de biofilm de bactéries pathogènes.
158. **Maisuria V.B., Hosseinidoust Z., Tufenkji N. 2020.** L'extrait polyphénolique du sirop d'érable augmente la sensibilité aux antibiotiques et réduit la formation de biofilm de bactéries pathogènes. *MJ Pettinari.*
159. **Makhlouf H. 2002.** Les huiles essentielles de romarin et de clou de girofle : approche analytique et activité antioxydante sur une huile alimentaire. Mémoire ingénieur. I.N.A. Alger. pp 82.
160. **Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. 2004.** Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition.* 79, pp 727-747.
161. **Martinez L.R., Casadevall A. 2007.** *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbone source and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. *Appl and Env Microb.* pp 4592- 4601.

Références bibliographiques

162. **Maurice N. 1997.** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle. Ed. Tec et Doc, Paris. France. pp 12-14.
163. **Maurizid .B., Werner Herz. 1988.** Phytochemistry. 27(6), pp 1871-1872.
164. **Mebarka L. 2008.** Contribution à l'étude de la composition chimique et de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Tinguarra sicula* (L.) Parl. et de *Filipendula hexapetala* Gibb. Diplôme de magister en Biologie et Physiologie Végétale. Université Ferhat Abbas-Setif.
165. **Medirios P.M. 2018.** Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Encyclopedia of Geochemistry. Encyclopedia of Earth Science Series.
166. **Melo A.D.B., Amaral A.F., Schaefer G., Luciano F.B., De Andrade C., Costa L.B., Rostagno M.H. 2015.** Effet antimicrobien contre différentes souches bactériennes et adaptation bactérienne aux huiles essentielles utilisées comme additifs alimentaires . Can J. Vet Res. 79, pp 285-289.
167. **Micol V., Caturia N., Perez-Fons L., Mas V., Perez L., Estepa A. 2005.** The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia Rhadovirus (VHSV). Antiviral Res. 66(12), pp 9-136.
168. **Miklasińska-Majdanik M., Kępa M., Wojtyczka R., Idzik D., Wąsik T. 2018.** Les composés phénoliques diminuent la résistance aux antibiotiques des souches cliniques de *Staphylococcus aureus*. Int J. Environ Res Public Health. 15(10), pp 2321.
169. **Mion S., Rémy B., Plener L., É Chabrière., Daudé D. 2019.** *Quorum sensing* et *quorum Quenching* Comment bloquer la communication des bactéries pour inhiber leur virulence. *méd/sci.* 35, pp 31-8.
170. **Mogha K. V., Shah, N. P., Prajapati, J. B., & Chaudhari, A. R. 2014.** Biofilm a threat to dairy industry. Indian J. Dairy Sci.
171. **Morel J.M. 2008.** Traité pratique de phytothérapie: remèdes d'hier pour médecine de demain. Paris. Grancher.
172. **Murugesan S.D., Ramar T., Periasamy S., Sridhar A., Srinivasan S., Ramasamy T. 2018.** Effet combiné d'une rutine flavonoïde naturelle de *Citrus sinensis* et d'un antibiotique conventionnel gentamicine sur la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*.

N

173. **Nobbs A.H., Lamont R.J. and Jenkinson H. 2009.** Streptococcus adherence and colonization. *Microb and Mole Bio Rev.* 73(3), pp 407-505.
174. **Nostro A., Roccaro A.S, Bisignano G., Marino A., Cannatelli M.A, Pizzimenti F.C, Cioni P.L, Procopio F., Blanco AR. 2007.** Effets de l'origan, du carvacrol et du thymol sur les biofilms de *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*. *J. Med. Microbiol.* 56, pp 519-523.
175. **Novick R.P., Geisinger E. 2008.** Quorum sensing in *Staphylococci*. *Annu Rev Genet.* 42, pp 541-564.

O

176. **Ocampo P.S., Lazar V., Papp B., Arnoldini M., Abel zur Wiesch P., Busa-Fekete R., et al. 2014.** L'antagonisme entre les antibiotiques bactériostatiques et bactéricides est répandu. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, pp 4573–4582.
177. **Otto M. 2013.** Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual rev. Med.* 64, 175- 188.
178. **Ouchar mahamat O., Tidjani A., Savadogo A., Abakabir mahamat A., Somda M.K., Traore A.S. 2013.** Isolement et caractérisation des bactéries productrices des biofilms issues des produits alimentaires. *Microbiol. Ind. San et Environn.* 7(2), pp 187-210.
179. **Ouyang J., Sun F., Feng W., Sun Y., Qiu X., Xiong L., Liu Y., Chen Y. 2016.** La quercétine est un inhibiteur efficace de la détection de quorum, de la formation de biofilm et des facteurs de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl Microbiol.* 120, pp 966–74.

P

180. **Paolini V., Dorchie P.H. 2003.** Effet des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro intestinales chez le mouton et la chèvre. *Alter. Agri.*
181. **Paquin J.L., Block J.C., Haudidier K., Hartemann P., Colin F., Miazga J., Levi Y. 1992.** Effet du chlore sur la colonisation bactérienne d'un réseau expérimental de distribution d'eau. *J. Water Sci.* 5(3), pp 399-414.

182. **Pe B., Ncc S., Ecr B., Fernandes A., Jp A., Doyama J., Jl G., Mv S., Fitzgerald-Hughes D., Vlm R. 2015.** Effet des huiles essentielles de *Syzygium Aromaticum* et *Cinnamomum Zeylanicum* et de leurs principaux composants sur la production de biofilm en Souches de *Staphylococcus aureus* isolées à partir de lait de vaches atteintes de mammite. *J. Dairy Sci.* 98 (9), pp 5899–904.
183. **Penchev P.I. 2010.** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat en : Génie des Procédés et de l'Environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse. pp 9-17-19.
184. **Periasamy S., Joo H., Duong A.C., Bach T.L., Tan V.Y., Chatterjee S.S., Cheung G.Y., Otto M. 2011.** Comment *Staphylococcus aureus* les biofilms développent leur structure caractéristique. *PNAS.* 109, pp 1281-1286.
185. **Persson T., Hansen T.H., Rasmussen T.B., Skinderso M.E., Givskov M., Nielsen J. 2005.** Conception et synthèse rationnelles de nouveaux inhibiteurs de détection de quorum dérivés d'homosérine lactones acylées et de produits naturels à base d'ail. *Org Biomol Chem.* 3, pp 253–62.
186. **Petrova O.E., Sauer K. 2012.** La dispersion par *Pseudomonas aeruginosa* nécessite une modification post-traductionnelle inhabituelle de BdlA. *Proc Natl Acad Sci US A.* 109 (41).
187. **Philips P.L., Wolcott R.D., Fletcher J., Schultz G.S. 2011.** Biofilms made easy. 1(3), pp 1-6.
188. **Pratt L.A., Kolter R. 1998.** Genetic analysis of *Escherichia Coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microb.* 30, pp 285-293.
189. **Punithavathy P. M., Nalina K., Menon T. 2012.** Antifungal susceptibility testing of *Candida tropicalis* biofilm against fluconazole using calorimetric indicator resazurin. *Indian J. path and microb.* 55(1), pp 72-74.

R

190. **Rasamiravaka T., Vandeputte O.M., Pottier L., Huet J., Rabemanantsoa C., Kiendrebeogo M., Andriantsimahavandy A., Rasamindrakotroka A., Stévigny C., Duez P., El Jaziri M. 2015.** *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation et persistance, ainsi que la production de quorum sensing facteurs de virulence dépendants, sont perturbés par un ester coumarate triterpénoïde isolé de *Dalbergia trichocarpa*, une légumineuse tropicale. *PLoS One.* pp 10.

191. **Reichling J., Harkenthal M., Geiss H.K., Hoppe-Tichy T., Saller R. 2002.** Enquêtes microscopiques et biochimiques électroniques sur les effets antibactériens de l'huile d'arbre à thé australienne contre *Staphylococcus aureus*. *Curr Top Phytochem.* 5, pp 77-84.
192. **Ribeiro-Santos R., Andrade M, Sanches-Silva A. 2017.** Application d'huiles essentielles encapsulées comme agents antimicrobiens dans les emballages alimentaires . *Curr Opin Food Sci.* 14, pp 78-84.
193. **Romling U., Balsalobre C. 2012.** Infections à biofilm, leur résilience à la thérapie et stratégies de traitement innovantes. *J. Intern. Med.* 272, pp 541-561.
194. **Roux A., Ghigo J. 2006.** Bacterial biofilms, *Académie-vétérinaire- de France.* 159(3), pp 261-268.
195. **Ruimy R., Andremont A. 2004.** Quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa* : mécanisme moléculaire, impact clinique, et inhibition. Elsevier SAS. pp 176–184.

S

196. **Şahin Doğan S., Kocabaş A. 2020.** Synthèse verte de nanoparticules de ZnO avec *Veronica multifida* et leur activité antibiofilm. *Tox humaine et expérimentale.* 39 (3), pp 319-327.
197. **Sahreen S., Khan MR., Khan RA. 2010.** Évaluation des activités antioxydantes de divers extraits dissolvants de fruits d'*opaca* de *Carissa*. *Food Chem.* 122 (4), pp1205-1211.
198. **Sandasi M., Leonard C., Van Vuuren S., Viljoen A. 2011.** La menthe poivrée (*Mentha Piperita*) inhibe les biofilms microbiens *In Vitro*. *S Afr J Bot.* 77 (1), pp 80–5.
199. **Sandasi M., Leonard CM, Viljoen AM. 2007.** L'effet de cinq composants communs d'huiles essentielles sur les biofilms de *Listeria monocytogenes*. *Contrôle des aliments.* 19, pp 1070-1075.
200. **Sanhueza L., Melo R., Montero R., Maisey K., Mendoza L., Wilkens M. 2017.** Interactions synergiques entre les composés phénoliques identifiés dans l'extrait de marc de raisin avec des antibiotiques de différentes classes contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. *Agbor G. éd. PLoS One.* 12 (2).
201. **Sarni-Manchado P., Cheynier V. 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier. pp 02-11.

Références bibliographiques

202. **Scalbert A. 1991.** Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30, pp 3875-3883.
203. **Schembri MA., Kjaergaard K., Klemm P. 2003.** Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microb.* 48, pp 253-267.
204. **Sebai M., Boudali M. 2012.** La phytothérapie entre la confiance et la méfiance. Mémoire professionnel. Institut de formation paramédical CHETTIA. pp 9.
205. **Selvaraj A., Valliammai A., Premika M., Priya A., Bhaskar J.P., Krishnan V., S. K Pandian. 2020.** *Sapindus mukorossi* Gaertn. et son métabolite bioactif, l'acide oléique, empêche la méthicilline *Staphylococcus aureus* formation de biofilm en régulant à la baisse l'expression des gènes d'adhésion.
206. **Simon Y. 2001.** Mills, Evidence for the clinician - a pragmatic framework for phytotherapy, *The European Phytojournal – ESCOP*. Issue 2.
207. **Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Hras A.R., Simonic M., Knez Z. 2005.** Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *J. Food Chem.* 89, pp 191- 198.
208. **Sofowora A. 1993.** Medicinal plants and traditional medicine in Africa. 2 Spectrum Books Limited. Ibadan. Nigeria. pp 289.
209. **Spormann A.M. 2008.** Physiology of microbes in biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, pp 17- 36.
210. **Squinazi F. 2013.** Biofilm & Matériaux : des réseaux intérieurs de distribution de l'eau. pp 4-10.
211. **Stefanović O.D., Stanković M.S., Čomić L.R. 2011.** Efficacité antibactérienne in vitro des extraits de *Clinopodium vulgare* L. et leur interaction synergique avec les antibiotiques.
212. **Stewart P.S., Costerton J.W. 2001.** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* 358, pp 135–138.
213. **Stewart P.S., Franklin M. J. 2008.** Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, pp 199–210.
214. **Sutherland I.W. 2001.** The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microb.* 9, pp 222-227.

T

215. **Takeuchi T., Pereira C., Braga M., Marostica M., Leal P., Meireles M. 2009.** Low-pressure solvent extraction (solid–liquid extraction, microwave assisted, and ultrasound assisted) from condimentary plants. Extracting bioactive compound for food products. pp 137- 218.
216. **Tankeshwar A. 2020.** Antibiotic Resistance. Bacteriology. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC).
217. **Todd B.R., Gerald R.F. 2001.** Bakers' Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation. *Sci.* 291(5505), pp 878 – 88.
218. **Tomlin K.L., Malott R.J et al. 2005.** Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 5208-5218. *infections. Sci.* 284, pp 1318-1322
219. **Toté K., Berghe D.V., Maes L. & Cos P. 2008.** A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Letters in Applied Microb.* 46(2), pp 249-254.
220. **Totya A.A., Guessennd N., Bachi C., Kra A.M et al. 2013.** Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.* 82, pp 12-21.
221. **Toure D. 2015.** Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Thèse de doctorat. Université Félix Houphouët- Boigny du Cote d'Ivoire.
222. **Tremblay Y.D., Hathroubi S., Jacques M. 2014.** Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian J. Vet Res.* 78(2), pp 110-116.
223. **Trembley D.N.J., Vogeleeer P., Jacques M., Harel J. 2015.** High-Throughput Microfluidic Method To Study Biofilm formation and host-pathogen interactios in pathogenic *Eschirichia coli*. *American Society For Microb.*

V

224. **Van Houdt R., Michiels C. 2005.** Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microb.* 156, pp 626-633.
225. **Vanzielegem T., Delmée M. 2020.** Les biofilm en milieu hospitalier : quels sont les enjeux pour l'hygiène hospitalière. *Nosoinfo.*

226. **Vasavi H.S., Arun A.B., Rekha P.D. 2016.** Activité anti-quorum de détection de la fraction riche en flavonoïdes de *Centella asiatica* L. contre *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Microbiol Immunol Infect.* 49, pp 8-15.
227. **Vijayakumar K., Ramanathan T. 2019.** *Musa acuminata* et son métabolite bioactif 5-Hydroxyméthylfurfural atténuent le biofilm médié par quorum sensing (*las* et *rhl*) et la production de virulence du pathogène nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro*.

W

228. **Weigand I., Hilpert K., Hancock R. 2008.** Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibacterial substances. *Nat Protocol.* 3, pp 163-175.

Y

229. **Yakhlef G. 2010.** Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus Vulgaris* L. et *Laurus nobilis*. Mémoire de magister en Biochimie Appliquée. université el hadj lakhdar. Batna. pp 2-3.
230. **Yarwood J.M., Bartels D.J., Volper E.M., Greenberg E.P. 2004.** Quorum sensing dans les biofilms de *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 186, pp 1838-1850.

Z

231. **Zabinski R.A., Walker K.J., Larsson A.J et al. 1995.** Effects of aerobic and anaerobic environments on antistaphylococcal activities of five fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, pp 507-512.
232. **Zhang Q., Lin L., Ye W. 2018.** Techniques d'extraction et d'isolement des produits naturels: un examen complet. *Chin Med.* 13, pp 20.
233. **Zhang X., Wang L., Mu H., Wang D., Yu Y. 2018.** Effets antibactériens synergiques des métabolites de *Buddleja albiflora* avec des antibiotiques contre *Listeria monocytogenes*.
234. **Zhang X., Wang L., Mu, H., Wang D., Yu Y. 2019.** Effets antibactériens synergiques des métabolites de *Buddleja albiflora* avec des antibiotiques contre *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* 68, pp 38-47.

Références bibliographiques

235. **Zhao X., Liu Z., Meng R., Shi C., Chen X., Bu X., Guo N. 2018.** Phénotype et profilage du transcriptome basé sur l'ARN-seq des biofilms de *Staphylococcus aureus* en réponse à l'huile de théier . Microb Pathog. 123, pp 304-313.
236. **Zhou J.W, Hou B, Liu G.Y, Jiang H, Sun B, Wang Z.N, Shi R.F, Xu Y, Wang R, Jia A.Q. 2018.** Atténuation du biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* par l'hordénine: une étude combinatoire avec des antibiotiques aminosides. Appl Microbiol Biotechnol. 102, pp 9745–58.
237. **Zhou J.W, Luo H.Z, Jiang H, Jian T.K, Chen Z.Q, Jia A.Q. 2018.** Hordénine: un nouvel inhibiteur de détection de quorum et un agent antibiofilm contre *Pseudomonas aeruginosa*. J. Agric Food Chem. 66, pp 1620–8.
238. **Zhou Y.M., Shao L., Li J.A., et al. 2011.** Un modèle de criblage efficace et novateur pour évaluer la bioactivité d'extraits contre des pseudomonas earuginosa multirésistantes à l'aide de caenorhabditis elegans. Biosci biotechno bioch. 75(9), pp 1746-1751.
239. **Zobell C.E. 1943.** The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol. 46, pp 39.

Sites web :

- 240.<http://biochimej.univangers.fr/Page2/COURS/8ModuleL1CSG/4ConfBioPhysique/3PresHTMLbioPHYS/2Figures/5SpectroMasse/1SpectroMasse.htm>
- 241.<http://cletpe.e-monsite.com/pages/i-b-methodes-d-extraction-des-principes-actifs.html>
- 242.<http://directindustry.fr>
- 243.<http://faculty.ccbcmd>
244. <http://tpe-huile-essentielle2013.e-monsite.com/pages/i-1/extraction-par-micro-ondes/>
- 245.http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2011-mai/desc
- 246.<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/chromato/A4.html>
247. https://docplayer.fr/docs-images/42/11491786/images/page_9.jpg
- 248.<https://dorossinet.blogspot.com/2016/11/extraction-separation-et-identification.html>
- 249.<https://emerypharma.com/biology/minimum-inhibitory-concentration>

Références bibliographiques

250. <https://les-colorants-jaunes-des-bonbons-21.webself.net/i-extraction-et-identification-des-colorants>
251. <https://www.arkopharma.com/fr-FR/ultraextract-au-service-de-la-gamme-arkofluides>
252. https://www.jle.com/fr/revues/mtp/edocs/infections_nosocomiales_neonatales.
253. https://www.jle.com/fr/revues/mtp/edocs/infections_nosocomiales_neonatales
254. <https://www.laprovenceenbouteille.com/qui-sommes-nous/la-distillation>
255. <https://www.maxicours.com/se/cours/realiser-une-chromatographie-sur-couche-mince>
256. <https://www.qlaboratories.com/minimum-inhibitory-mic-and-minimum-bactericidal-concentration-mbc-evaluations-as-rd-tools>
257. https://www.researchgate.net/figure/Structure-de-lunite-isoprenique-C-5-H-8-Solene-2012_fig7_317319035
258. <https://www.semanticscholar.org/paper/Etude-de-la-composition-chimique-et-du-potentiel-de-Matou-Bercion/5a71433c7c560f27ef1fff8b1be8d096c58b8255/figure/2>

Annexe

Annexe 01 :

La CMI est la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien qui peut inhiber la croissance visible d'un micro-organisme après une nuit d' incubation (Lin et al, 2014). Les CMI sont utilisées pour déterminer la sensibilité des bactéries aux agents antimicrobiens et aussi pour évaluer l'efficacité antimicrobienne de divers composés en mesurant l'effet de la diminution des concentrations d'antimicrobien (antibiotique / antiseptique) sur une période définie en termes d'inhibition de la croissance de la population microbienne (Weigand et al, 2008).

La détermination de la CMI peut se faire en bouillon (milieu liquide) ou sur gélose (milieu solide). Pour la dilution du bouillon, la CMI est souvent déterminée en microplaque à 96 puits ; les bactéries sont inoculées dans un milieu de croissance liquide en présence de différentes concentrations d'un agent antimicrobien. Pour la dilution de l'agar, implique l'incorporation de différentes concentrations de la substance antimicrobienne dans le milieu d'agar nutritif suivi de l'application d'un nombre normalisé de cellules à la surface de la gélose (Weigand et al, 2008). Les tests de sensibilité sont généralement effectués à l'aide d'organismes qui contribuent à un processus infectieux justifiant une chimiothérapie antimicrobienne.

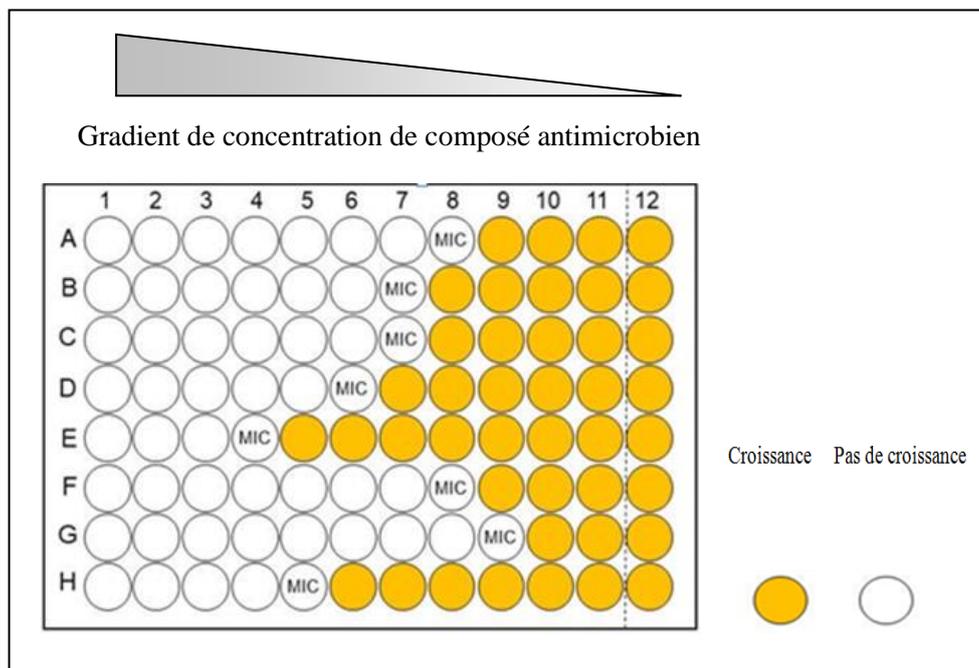


Figure : Interpretation des résultats de CMI en plaque de microtitration à 96 puits

Annexe 02 :

Le rendement en huile essentielle est le poids d'huile extraite et le poids du matériel végétal utilisé (**Akroute, 2001**). Le rendement est exprimé en (%) et calculé par la formule suivante :

$$R = (P_h / P_v) \times 100$$

R= rendement en huile essentielle en (%) ;

Ph= poids de huile en g ;

P_v= poids du matériel végétal en g.

Le rendement peut aussi être calculé pour un extrait organique ou aqueux comme suite :

$$R = (\text{poids de l'extrait obtenu} / \text{poids de la matière végétale totale}) \times 100$$

Annexe 03 :

Une nanoparticule est définie comme étant un nano-objet dont le diamètre nominal est inférieur à 100 nm environ (**ISO, 2008**). Le passage des principes actifs (molécules chimiques, médiateurs, métabolites...) à l'intérieur des cellules se fait par l'action de pores de taille nanométrique. Ainsi, les NPs peuvent aisément franchir les membranes biologiques facilitant ainsi le transport des principes actifs jusqu'à leur cible.

Dans le domaine de la Santé, les NPs sont utilisées en tant que vecteurs de principes actifs pour le traitement de pathologies et peuvent ainsi apporter d'une manière spécifique les substances actives dans les tissus à traiter en évitant les effets indésirables du principe actif sur le reste de l'organisme et en favorisant les passages transmembranaires et / ou intracellulaires (**Angèle, 2015**).

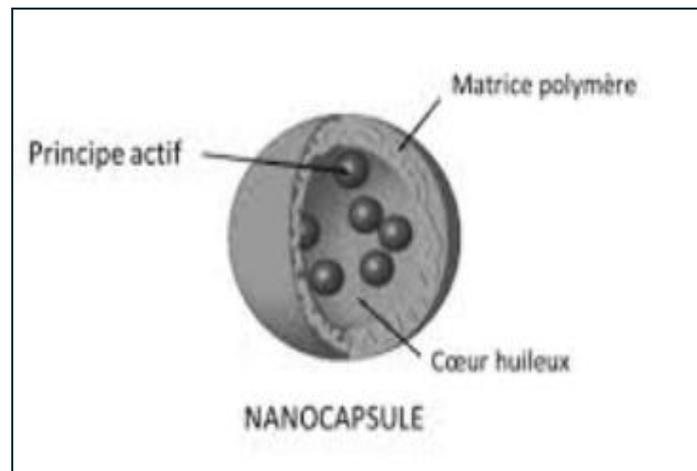


Figure 29: Représentation d'une nanoparticule

Annexe 04 :

La synergie est définie comme l'activité de deux agents anti-infectieux ou plus administrés ensemble qui est supérieure à la somme des activités si les agents avaient été administrés séparément (**Mandel et al., 2015**).

Résumé :

Les biofilms sont admis comme le mode de vie normal et majoritaire des microorganismes responsables de nombreuses infections bactériennes qui sont du à leurs architecture complexe qui procure protection et persistance aux miroorganismes qui les constitues ; ce qui leurs permet aussi de coloniser de differentes surface aussi bien dans l'industrie agroalimentaire, dans l'environnement hospitalier et dans tous les milieux qui sont propices à leurs developpent.

L'éradication des biofilms dans ce cas pose de sérieux problèmes car si les traitements aux antibiotiques et aux agents désinfectants classiques sont efficaces sur les bactéries planctoniques, ils révèlent parfois une efficacité quasiment nulle sur les biofilms.

Cependant les preuves expérimentales s'accumulent pour trouver des alternatifs en utilisant diffrents extraits à bases de plantres pour prévenir ou traiter les infections associées aux biofilms, tout en minimisant les effets secondaire (comme l'antibioresistance) qui peuvent apparaitre lors de l'utilisation de ces produits synthétiques.

Mots clés : Biofilms, extraits végétaux.

Abstract:

Biofilms are accepted as the normal way of life and the majority of microorganisms responsible for lot of bacterial infections which are due to their complex architecture which provides protection and persistence to the miroorganisms which constitute them; which also allows them to colonize from different surfaces as well in the food industry, in the hospital environment and in all the environments that are conducive to their development.

The eradication of biofilms in this case poses serious problems because while treatments with antibiotics and conventional disinfecting agents are effective on planktonic bacteria, they sometimes show almost zero effectiveness on biofilms. However, experimental evidence is accumulating to find alternatives using different plant extracts to prevent or treat infections associated with biofilms, while minimizing side effects (such as antibiotic resistance) that can occur when using these synthetic products.

Keywords: Biofilms, plant extracts.

ملخص:

يتم قبول الأغشية الحيوية كطريقة طبيعية للحياة لمعظم الكائنات الحية الدقيقة المسؤولة عن العديد من الالتهابات البكتيرية والتي ترجع إلى بنيتها المعقدة التي توفر الحماية والمثابرة للكائنات الحية التي تشكلها ؛ الذي يسمح لها أيضا باستعمار العديد من الأسطح المختلفة، وكذلك في مصانع المواد الغذائية، في بيئة المستشفى وفي جميع البيئات التي تساعد على تنميتها. يطرح القضاء على الأغشية الحيوية في هذه الحالة مشاكل خطيرة لأنه في حين أن العلاجات بالمضادات الحيوية وعوامل التطهير التقليدية فعالة على بكتيريا العوالق، فإنها في بعض الأحيان لا تظهر فعالية تقريبا على الأغشية الحيوية.

مع ذلك، فإن الأدلة التجريبية تتراكم لإيجاد بدائل باستخدام المستخلصات النباتية المختلفة لمنع العدوى أو علاج الامراض المرتبطة بنمو الأغشية الحيوية، مع التقليل من الآثار الجانبية (مثل مقاومة المضادات الحيوية) التي يمكن أن تحدث عند استخدام هذه المنتجات الاصطناعية.

الكلمات المفتاحية: أغشية حيوية، مستخلصات نباتية.