

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
Partie 1 : Etude bibliographique	2
I. Les huiles essentielles:	2
1. Généralités :.....	2
2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :.....	3
2.1. Entraînement à la vapeur	3
2.2. Hydrodistillation.....	3
3. Domaines d'utilisation :	3
4. Mode d'action antibactérienne :.....	5
5. Monographie sur les deux plantes : <i>M.pulegium et L.nobilis</i> :	7
II. Généralités sur les biofilms :	10
1. Définition du biofilm :.....	10
2. Structure et composition :	10
2.1. Microcolonie :	10
2.2. Matrice d'exopolymères :.....	11
2.3. Hétérogénéité du biofilm.....	13
3. Développement des biofilms :.....	13
3.1. Dynamique de formation :.....	13
3.2 Facteurs influençant le développement du biofilm :	17
4. Régulation de la formation des biofilms :	19
4.1. Quorum sensing :.....	19
4.2. Régulation génétique par les cellules fixées :.....	22
4.3. Régulation de la formation des biofilms par le GMP-c :.....	23
4.4. Régulation de la formation des biofilms par l'acétyl phosphate et l'alarmone :	23
4.5. Autres mécanismes régulateurs de la formation de biofilms :.....	23
5. Résistance du biofilm aux contraintes environnementales :	24
6. Biofilm dans l'industrie alimentaire :.....	25
<i>Listeria monocytogenes</i> :.....	26
<i>Escherichia coli</i> :.....	27

<i>Staphylococcus aureus</i> :	28
Partie 2 : Matériel & méthodes	29
1. Activité antibactérienne :	29
1.1. Extraction des huiles essentielles :	29
1.2. Souches bactériennes et conditions de croissance :	29
1.3. Détermination de la CMI et de la CMB :	29
2. Activité anti-biofilm :	30
2.1. Préparation des cultures bactériennes :	30
2.2. Préparation du système permettant la formation du biofilm :	30
2.3. Préparation et nettoyage des pièces d'acier :	31
2.4. Adhésion des bactéries à la surface des morceaux d'acier inoxydables :	31
2.5. Traitement des pièces d'acier inoxydable à l'aide des huiles essentielles :	32
2.6. Dénombrement des cellules bactériennes adhérees :	34
2.7. Conception expérimentale et analyse statistique :	35
Partie 3 : Résultats & discussions	36
➤ Résultats :	36
1. Détermination des CMI et CMB :	36
2. Activité anti-biofilm :	37
2.1 Développement et désinfection du Biofilm de <i>S. aureus</i> :	37
2.2 Développement et désinfection du Biofilm d' <i>E. coli</i> :	40
2.3 Développement et désinfection du Biofilm de <i>L. monocytogenes</i> :	42
➤ Discussions :	45
Conclusion et perspectives :	48
Références bibliographiques :	49

Liste des figures :

Figure 1: Sites et mécanismes dans la cellule bactérienne considérée comme sites d'action pour les composants des HE	6
Figure 2: <i>Mentha pulegium</i>	8
Figure 3: <i>Laurier noble</i>	9
Figure 4: Structure de microcolonies	11
Figure 5: Composition moyenne de biofilms de réseaux d'eaux usées	11
Figure 6: Composition de substances polymériques extracellulaires de 4 souches.....	12
Figure 7: Développement de biofilm.....	14
Figure 8 : Formules de molécules de communication.....	20
Figure 9: Voie de synthèse des AHL et AI-2 à partir de SAM	21
Figure 10: Système utilisé pour la formation des biofilms.....	31
Figure 11: Incubation des béciers à 37°C avec une agitation de 150 tr / min	32
Figure 12: Traitement des pièces d'acier par une solution désinfectante.....	33
Figure 13: Grattage de la pièce d'acier par un écouvillon	34
Figure 14: Effet antibactérien des HE sur un biofilm de <i>S. aureus</i> obtenu après 5 h de culture.	37
Figure 15: Effet antibactérien des HE sur un biofilm de <i>S. aureus</i> obtenu après 24 h de culture.	38
Figure 16: Effet antibactérien des HE sur un biofilm de <i>S. aureus</i> obtenu après 240 h de culture.	39
Figure 17: Effet antibactérien des HE sur un biofilm de <i>E. coli</i> obtenu après 5 h de culture.....	40
Figure 18: Effet antibactérien des HE sur un biofilm de <i>E. coli</i> obtenu après 24 h de culture.....	40
Figure 19 : Effet antibactérien des HE sur un biofilm de <i>E. coli</i> obtenu après 240 h de culture.	41
Figure 20: Effet antibactérien des HE sur un biofilm de <i>Listeria monocytogenes</i> , obtenu après 5 h de culture.....	42
Figure 21: Effet antibactérien des HE sur un biofilm de <i>Listeria monocytogenes</i> , obtenu après 24 h de culture.....	43
Figure 22: Effet antibactérien des HE sur un biofilm de <i>Listeria monocytogenes</i> , obtenu après 240 h de culture.	43

Liste des abréviations :

AHL ou AHSL: les Acyl HomoSerine Lactone

AI-2 : furanone

CECT : Collection espagnole de culture type

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI: Concentration minimale inhibitrice

E.P.T: Eau peptonée tamponnée

EPS : Exopolysaccharides

ERBGB : Equipe de recherche en Biotechnologie et Génie des Biomolécules

H.E : Huile essentielle

L. nobilis : *Laurus nobilis*

L1: solution désinfectante contenant l'huile essentielle *Laurus nobilis* à une concentration minimale inhibitrice

L2: solution désinfectante contenant l'huile essentielle *Laurus nobilis* à double CMI

M. pulegium : *Mentha pulegium*

M1: solution désinfectante contenant l'huile essentielle *Mentha pulegium* à une concentration minimale inhibitrice

M2: solution désinfectante contenant l'huile essentielle *Mentha pulegium* à double CMI

SAM: S-Adenosyl Methionine

INTRODUCTION

L'essentiel des connaissances en microbiologie est basé sur les études réalisées en milieu liquide où les bactéries ont un mode de vie planctonique. Pourtant, dans la plupart des écosystèmes, les bactéries s'associent à des surfaces solides vivant ainsi à l'état sessile. Ce mode de vie permet à la population microbienne de se développer en colonisant un environnement particulier. L'évaluation d'un agent antibactérien nécessite donc une étude qui prend en considération ces différences physiologiques et métaboliques, et qui s'applique aussi bien sur les bactéries planctoniques que sur les bactéries adhérentes à un support solide. En effet, les bactéries fixées présentent des caractères physiologiques différents de celles vivantes à l'état planctonique tel que le temps de génération, du fait que les gènes impliqués ne sont pas les mêmes (Costerton et *al.*, 1995a).

Cette communauté structurée d'agents pathogènes, encapsulée dans une matrice, est bien protégée contre les agents antibactériens et rend la prolifération des microorganismes difficile à contrôler dans la chaîne alimentaire. Jusqu'à maintenant, en plus d'une bonne hygiène, une réglementation stricte de la sécurité alimentaire et des méthodes de traitement adéquates, ont été suffisantes pour limiter l'incidence de la maladie mortelle. Cependant, l'émergence de souches bactériennes résistantes et les préoccupations des consommateurs concernant l'utilisation de désinfectants chimiques, exercent de plus en plus des pressions sur l'industrie alimentaire afin de trouver des substituts naturels aux agents synthétiques. Les bactéricides alternatifs doivent être sûrs pour les consommateurs, mais aussi sans danger pour l'environnement (Davidson, 1997). Ces agents antibactériens proviennent souvent du règne végétal (Burt, 2004; Bakkali et *al.*, 2008). De nombreuses études ont été menées sur le potentiel antimicrobien des extraits des plantes et des huiles essentielles (Smith-Palmer et *al.*, 1998) et il est bien établi que des nombreuses huiles essentielles ont la capacité de lutter contre les souches pathogènes. Ceci nous a amené à nous pencher sur l'étude de l'activité antibactérienne et anti-biofilm des deux huiles essentielles *Mentha pulegium* et *Laurus nobilis* vis-à-vis trois bactéries qui causent des problèmes hygiéniques dans l'industrie alimentaire: *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *E. coli*. Ce sujet nous a semblé d'autant plus intéressant que la flore marocaine est extrêmement riche en plantes aromatiques riches en huiles essentielles (Bellakhdar, 1978).

Partie 1 : Etude bibliographique

I. Les huiles essentielles:

1. Généralités :

Les huiles essentielles sont des substances odorantes concentrées. Le terme "huile essentielle" a été inventé au 16^{ième} siècle par le médecin suisse Parascelsus von Hohenheim pour désigner le composé actif d'un remède naturel. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums (Burt, 2004).

Les huiles essentielles sont extraites soit des feuilles, des graines, des écorces, des racines ou d'autres structures spécialisées. Une huile essentielle est un mélange complexe de plusieurs composés d'arômes volatils qui appartiennent aux différentes classes de la chimie organique : phénols (ex : carvacrol), hydrocarbures (composés terpéniques comme le limonène), alcools (ex : linalol), aldéhydes (ex : cinnamaldéhyde), cétone (ex : menthone), esters (ex : acétate de linalyle) et éthers. La plupart de ces composés sont dotées de propriétés antimicrobiennes, mais ce sont les composés volatils majeurs qui présentent les propriétés antimicrobiennes les plus importantes, et en particulier les phénols, les alcools et les aldéhydes: carvacrol (origan, sarriette), eugénol (feuille de cannelle de Ceylan, clou de girofle), linalool (coriandre), cynamaldéhyde (cannelle de Chine), thymol (thym)... La composition des huiles essentielles d'une même espèce varie selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte, la partie de la plante utilisée, l'exposition ou non au soleil... (Oussalah et *al.*, 2007). Par conséquent, leurs propriétés antimicrobiennes varient également. Il est donc important de sélectionner une huile essentielle standardisée dont les composants actifs sont clairement identifiés et quantifiés.

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large puisqu'elles inhibent aussi bien la croissance des bactéries que celles des moisissures et des levures. Elles agissent en empêchant la multiplication des bactéries, leur sporulation et la synthèse de leurs toxines. Pour les levures, elles agissent sur la biomasse et la production des pseudomycélium alors qu'elles inhibent la germination des spores, l'élongation du mycélium, la sporulation et la production de toxines chez les moisissures (Oussalah et *al.*, 2007).

2. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles mais la plus utilisée est l'entraînement à la vapeur et l'hydrodistillation à partir de la plante fraîche ou sèche.

2.1. Entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'un des procédés d'extraction ou de séparation de certaines substances organiques les plus anciens, apporté par les Arabes au IX^e siècle. Cette opération s'accomplit dans un alambic. Le but est d'entraîner avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique. La vapeur, chargée de l'essence de la matière première distillée, se condense dans le serpentín de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase de décantation pour les huiles essentielles). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile surnageante (ou huile essentielle). La partie contenant les composés hydrosolubles est appelée eau de distillation (ou hydrolat). On recueille alors un mélange de composition défini de ces deux produits (Romdhane et *al.*, 2001).

2.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique.

L'extraction proprement dite, appelée hydrodiffusion conduisant au relargage des composés volatils dans le milieu aqueux sous l'action physique qu'exerce le gonflement de la matière végétale (phénomènes d'absorption d'eau ou osmotiques) via la pression interne, et de l'action chimique exercée par l'eau (Romdhane et *al.*, 2001).

3. Domaines d'utilisation :

- Phytothérapie :

L'aromathérapie est une branche de la phytothérapie qui utilise les H.E. pour traiter un certain nombre de maladies. Le terme aromathérapie vient du chimiste Français René-Maurice Gattefosse, qui a utilisé l'H.E. de lavande pendant la première guerre mondiale pour soigner des blessures et des infections. Selon lui, la lavande était plus appropriée pour traiter les infections que plusieurs antiseptiques utilisés à cette époque. Cette spécialité intéresse de plus en plus des médecins et des pharmaciens qui ont publié un nombre important d'ouvrages d'aromathérapie (Roulier, 1992). Les H.E. sont largement utilisées pour traiter certaines

maladies internes et externes (infections d'origine bactérienne ou virale, troubles humoraux ou nerveux). En médecine dentaire, plusieurs H.E. ont donné des résultats cliniques très satisfaisants dans la désinfection de la pulpe dentaire, ainsi que dans le traitement et la prévention des caries (Kato et *al.*, 1990). La listerine qui est une solution constituée d'HE de thymol et d'eucalyptol possède une grande activité bactéricide sur les micro-organismes de la salive et de la plaque dentaire (Roulier, 1992). Les huiles essentielles de thym et de romarin ont été utilisées pour soulager la fatigue, les maux de tête, les douleurs musculaires et quelques problèmes respiratoires. Malheureusement, ces prescriptions ne possèdent pas de bases scientifiques rigoureuses car elles sont souvent tirées de pratiques et de traditions (Valnet, 1974).

Des études ont montré que le géranjol a une action sur les cellules cancéreuses du colon (Carnesecchi et *al.*, 2001), en plus de l'activité anti-inflammatoire, récemment mise en évidence (Siani et *al.*, 1999).

- Utilisation en aéro-ionisation :

Dans les locaux, on peut aseptiser l'atmosphère avec un ionisateur d'huiles essentielles. Il se forme ainsi des aérosols vrais aromatiques, ionisées, créant de l'oxygène naissant ionique, fortement bactéricide, tout en contribuant à dépolluer l'atmosphère (Taldykin, 1979).

Elles servent dans la fabrication du " paragerm ", solution volatile à base d'essences naturelles (citron, lilas) à activité bactéricide, acaricide et fongistatique qui s'est révélée sans aucune toxicité pour l'homme aux doses utilisées (Mallea, 1979).

- Parfumerie et cosmétologie :

L'utilisation des HE dans les crèmes et les gels permet de préserver ces cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et antioxydante, tout en leur assurant leur odeur agréable (Maruzzella, 1962; Roulier, 1992)

- Industrie alimentaire :

En industrie alimentaire, on cherche toujours à avoir une conservation saine et de longue durée pour les produits consommés ainsi qu'une meilleure qualité organoleptique. Une nouvelle technique pour réduire la prolifération des micro-organismes réside dans l'utilisation des H.E. (Lachowicz et *al.*, 1998; Lis-balchin et *al.*, 1998). Les plantes aromatiques et leur H.E. sont utilisées dans la conservation des denrées alimentaires. Parmi le groupe diversifié des constituants chimiques des H.E. (Hammer et *al.*, 1999), le carvacrol, qui exerce une action antimicrobienne bien distinguée, est additionné à différents produits alimentaires en industrie agro-alimentaire (Fenaroli, 1995). Ils y sont rajoutées pour rehausser le goût et pour empêcher le développement des contaminants alimentaires (Busta et foegeding, 1980 ;

Hitokoto et *al.*, 1980). Plusieurs travaux ont montré que les H.E. de thym, d'origan, de cannelle et d'autres plantes aromatiques ont un effet inhibiteur sur la croissance et la toxigenèse de plusieurs bactéries et champignons responsables de toxi-infections alimentaires (Beraoud et *al.*, 1991 ; Beuchat, 1976)

- Pouvoir antimicrobien des H.E. :

Les vertus antimicrobiennes des H.E. sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles (Hala et *al.*, 2000) et des applications sans bases scientifiques précises. On note l'étude faite par Chamberland en 1887 de l'activité antimicrobienne des essences de cannelle, d'origan et de girofle (Beylier-Maurel, 1976), et qu'en 1919 Gatte Fosse a montré que le bacille de Koch était détruit en 5 minutes par une émulsion à 1% d'huile de pin. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche portent sur les propriétés antimicrobiennes des H.E. des plantes aromatiques (Dorman et Deans, 2000; Cox et *al.*, 2000; Flamini, 1999).

In-vitro, l'effet microbicide de certaines H.E. a même été trouvé supérieur à celui des antibiotiques (Valnet, 1978). De plus, elles ont un champ d'action très large. Plusieurs travaux montrent que les H.E. et leurs composés majoritaires (Carson et Riley, 1995) ont un effet antimicrobien vis-à-vis des bactéries Gram négatif et Gram positif (Karaman et *al.*, 2001 ; Lis-Balchin et *al.*, 2001). L'activité antifongique et antibactérienne des HE et de leurs constituants est décrite par plusieurs études récentes (Conner, 1993 ; Dorman et Deans, 2000 ; Inyoue et *al.*, 2001).

4. Mode d'action antibactérienne :

Bien que les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles et leurs composants ont été examinés dans le passé (Koedam, 1977a, b; Shelef, 1983; Nychas, 1995), le mécanisme d'action n'a pas été étudié en détail (Lambert et *al.*, 2001). Considérant le grand nombre de différents groupes de composés chimiques présents dans les H.E. il est fort probable que leur activité antibactérienne n'est pas attribuable à un mécanisme spécifique, mais qu'il y'a plusieurs cibles dans la cellule (Skandamis et *al.*, 2001; Carson et *al.*, 2002). Les mécanismes ou les emplacements considérés comme sites d'action pour les composants des H.E. sont indiqués sur la figure 1. Tous ces mécanismes ont des objectifs distincts, certains sont touchés à la suite d'un autre mécanisme visé. Une caractéristique importante des H.E. et de leurs composants, est leur caractère hydrophobe, ce qui leur permet de répartir dans les lipides de la

membrane cellulaire des bactéries et des mitochondries, perturbant les structures et les rendant plus perméables (Knobloch et *al.*, 1986; Sikkema et *al.*, 1994). Fuite d'ions et du contenu des cellules peuvent alors se produire (Oosterhaven et *al.*, 1995; Gustafson et *al.*, 1998; Lambert et *al.*, 2001; Skandamis et *al.*, 2001; Carson et *al.*, 2002; Ultee et *al.*, 2002). Si une légère quantité de fuite à partir de cellules bactériennes peuvent être tolérées sans perte de viabilité, une perte progressive du contenu de la cellule où la sortie de molécules et d'ions conduira à sa mort (Denyer et Hugo, 1991a). Il existe certaines preuves provenant d'études sur l'action de l'huile d'arbre à thé sur *E. coli* que la mort cellulaire peut se produire avant la lyse (Gustafson et *al.*, 1998).

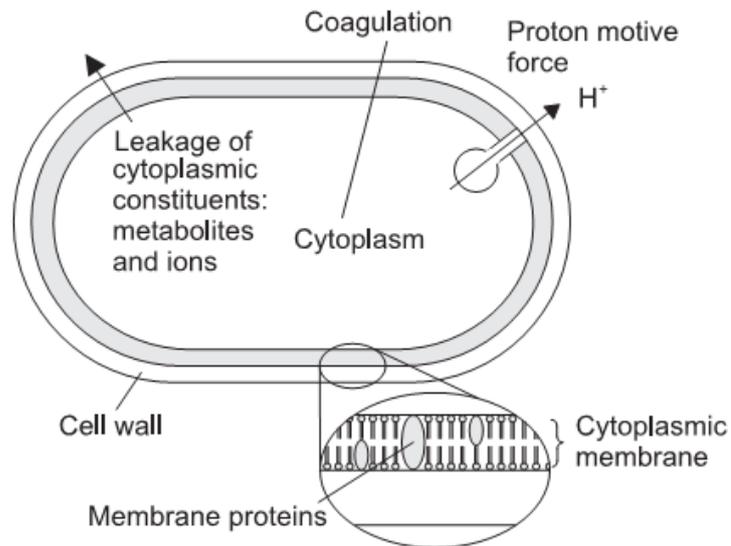


Figure 1 : Sites et mécanismes dans la cellule bactérienne considérée comme sites d'action pour les composants des HE (Burt, 2004)

En règle générale, les HE qui possèdent une forte activité antibactérienne contre les agents pathogènes d'origine alimentaire contiennent un pourcentage élevé de composés phénoliques tels que le carvacrol, l'eugénol (2-méthoxy-4-(prope-2-enyl) phénol) et le thymol (Farag et *al.*, 1989; Cosentino et *al.*, 1999; Dorman et Deans, 2000; Lambert et *al.*, 2001). Il semble raisonnable que leur mécanisme d'action serait donc similaire à d'autres composés phénoliques, ce qui est généralement considéré comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, perturbation de la force motrice des protons et du flux d'électrons, le transport actif et la coagulation du contenu des cellules (Denyer et Hugo, 1991b; Sikkema et *al.*, 1995; Davidson, 1997).

La structure chimique des composants individuels influe sur leur mode d'action précis et de l'activité antibactérienne (Dorman et Deans, 2000). L'importance de la présence du groupe hydroxyle en composés phénoliques tels que le carvacrol et du thymol a été confirmée (Dorman et Deans, 2000; Ultee et *al.*, 2002.). La position relative du groupe hydroxyle sur le noyau phénolique ne semble pas fortement influencer le degré de l'activité antibactérienne. L'importance de l'anneau phénolique lui-même (électrons déstabilisé) est démontrée par le manque d'activité du menthol par rapport au carvacrol (Ultee et *al.*, 2002).

5. Monographie sur les deux plantes : *M.pulegium* et *L.nobilis* :

- *Mentha pulegium* , فليو

La famille des Lamiaceae contient une large variété de plantes aromatiques principalement dans les pays tempérés. Parmi cet éventail des plantes riches à huiles essentielles, le genre *Mentha*, comprend 20 espèces qui se propagent partout dans le monde. *Mentha pulegium* est l'une des espèces *Mentha* connue sous le nom de menthe pouliot, elle fait partie des espèces endémiques d'Europe, Afrique du Nord et en Asie Mineure et du proche Orient. Elle a été traditionnellement utilisée comme antiseptique (Chalchat, 2000), pour traitement du rhume, la sinusite, le choléra, intoxication alimentaire, la bronchite et la tuberculose ... (Zargari, 1990).

Le Maroc est doté d'une riche source de médicaments dont les plantes aromatiques. Beaucoup n'ont pas été encore étudiées pour leurs constituants chimiques et biologiques potentiels. *Mentha pulegium* est une plante qui pousse spontanément au Maroc, ce qui fait d'elle une source potentielle des huiles essentielles (Derwich et *al.*, 2010b).



Figure 2 : *Mentha pulegium* (Duboc, 2008)

- Nom scientifique : *Mentha pulegium*
- Synonyme du nom scientifique : *Pulegium vulgare* Miller
- Classification : Labiées, Dicotylédones
- Nom commun : menthe Pouliot
- Synonyme(s) du nom commun : pouliot, herbe aux puces, herbe de Saint Laurent, frétillet
- Type biologique : Vivace à rhizomes
- Description de la semence : 0,3-0,5 x 0,6-0,8 mm.
- Couleur : Rousse.
- Forme : Ovoïde à ellipsoïde arrondie.
- Ornementation : Réticulée.
- Fruit contenant les graines : Akène

- *Laurus nobilis* عصى موسى, رند

De baies de laurier (*Laurus nobilis* L., Lauraceae) est une espèce endémique de la région méditerranéenne, qui est cultivé dans de nombreux pays avec climat subtropicale tempéré.



Figure 3 : *Laurier noble* (Haddouchi et *al.*, 2008)

De la famille des lauracées, *Laurus nobilis* fait partie des plantes spontanées de la région méditerranéenne, on le trouve sous forme d'arbre ou d'arbuste rustique au feuillage persistant. Il se couvre de petites fleurs crème au printemps. On le trouve dans les sols riches et humides mais bien drainés, dans une orientation ensoleillée et protégée du vent. Les régions côtières lui conviennent très bien tel que le Nord ou les régions de l'est de l'Europe. Elle est surtout cultivée pour ses caractéristiques condimentaires et médicinales (Haddouchi et *al.*, 2008).

- Le laurier est un arbuste mesurant de 2 à 6 m de haut, à tige droite et grise dans sa partie basse, verte en haut.
- Les feuilles de forme lancéolées, alternes, coriaces, à bord ondulé, sont vert foncé sur leur face supérieure et plus clair à la face inférieure.
- Elles dégagent une odeur aromatique quand on les froisse.
- C'est une plante dioïque (fleurs mâles et femelles sur des pieds séparés). Le fruit est une petite baie ovoïde, noir violacé et nue.
- *Laurus nobilis* est très résistant à la sécheresse mais par contre, il redoute le froid excessif, il gèle à -10°C.

II. Généralités sur les biofilms :

1. Définition du biofilm :

Un biofilm est un assemblage de cellules bactériennes et de polymères qui adhèrent à une surface inerte ou vivante. Les biofilms sont présents partout où la vie peut exister et principalement sur toutes les surfaces humides comme celles de sols, de filtres à sable, de conduites d'eau, de réservoirs, de lentilles de contact, de cathéters... (Eighmy et *al.*, 1983; Beveridge et *al.*, 1997; Pratt et Kolter, 1999). Cette structure biologique est donc composée de cellules attachées irréversiblement à une surface ou à une interface et entourées d'une matrice de substances polymériques extracellulaires produite par les cellules elles-mêmes, et incluant des composés abiotiques et non cellulaires (Costerton et *al.*, 1981; Eighmy et *al.*, 1983; Cvitkovitch et *al.*, 2003; Hu et *al.*, 2003).

D'un point de vue historique, ce n'est que vers les années 30 que les premiers biofilms chez les humains (plaque dentaire) ou dans les milieux aquatiques, ont été observés en microscopie, et ont fait l'objet d'études durant les 40 années qui ont suivi. Néanmoins, ce n'est qu'en 1978 que pour la première fois le terme de « biofilm » sera employé (Costerton et *al.*, 1978). La définition d'un biofilm a évolué depuis 1978, car aujourd'hui, il est vu comme un ensemble de microcolonies, entourées d'une matrice hautement hydratée, anionique et constituée d'exopolysaccharides (EPS). Une meilleure compréhension du contrôle génétique de la production des différents composants du biofilm (après adhésion) a fait encore évoluer cette définition (Costerton et *al.*, 1995a).

2. Structure et composition :

2.1. Microcolonie :

L'analyse chimique et physique des biofilms bactériens s'effectue depuis les années 1970 et elle a conduit à l'élaboration d'un modèle basique de la structure des biofilms. Dans ce modèle, les bactéries forment des microcolonies incluses dans une matrice constituée d'une grande quantité d'exopolymères, essentiellement des polysaccharides et des protéines (Hu et *al.*, 2003). La microcolonie peut être composée de 10 à 25 % de cellules et de 75 à 90 % de substances polymériques (Costerton et *al.*, 1999). Ces substances peuvent être produites par les bactéries, issues de la lyse ou encore de la fixation des macromolécules provenant du milieu. Le biofilm peut être considéré comme un gel à l'intérieur duquel se trouve des micro-organismes. C'est une structure poreuse et très absorbante. Entre les microcolonies se

trouvent des canaux où circule l'eau qui transporte les nutriments pour les cellules et qui véhicule les déchets produits par le biofilm (Pratt et Kolter, 1999) (Figure 4).

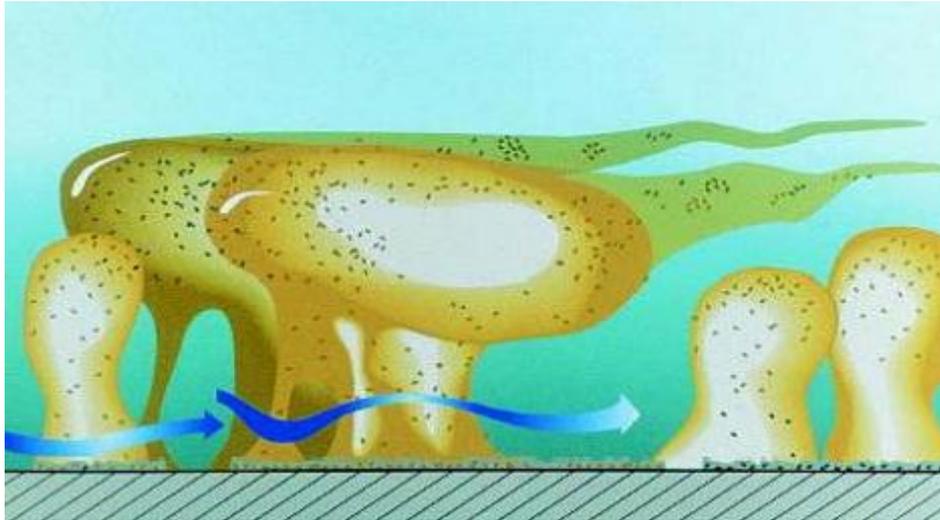


Figure 4 : Structure de microcolonies (Pratt et Kolter, 1999)

2.2. Matrice d'exopolymères :

La matrice d'exopolymères se compose classiquement de divers polysaccharides (hexoses, hexosamines, cétooses...), de protéines, d'acides nucléiques, d'acides humiques, de lipides (Figure 5) et d'eau à la hauteur de 95 % de la masse humide de la matrice (Lazarova et Manem, 1995; Jahn et Nielsen, 1998). Les polysaccharides ont souvent été mentionnés comme les composés les plus importants des biofilms (Figure 5). D'après Jahn et Nielsen (1998), le rapport massique polysaccharides/protéines est compris entre 0,6 et 0,25 dans l'échantillon total du biofilm, dont 84 % des protéines et 70 % des polysaccharides sont extracellulaires (Jahn et Nielsen, 1998). Les substances humiques et les acides uroniques sont seulement extracellulaires.

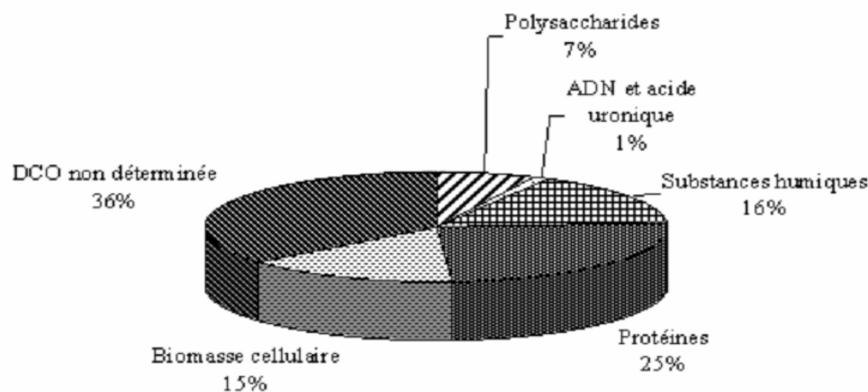


Figure 5 : Composition moyenne de biofilms de réseaux d'eaux usées (Jahn et Nielsen, 1998).

Les quantités de ces composants de base varient, selon les espèces présentes. Tsuneda et *al.* (2003 a) ont mis en évidence des bactéries produisant peu de substances polymériques extracellulaires et d'autres fortement productrices (Figure 6). Ainsi, différentes souches bactériennes n'ont pas les mêmes capacités d'adhésion au substrat. La qualité de l'effluent influence aussi cette production (Sponza, 2003). Les propriétés et la quantité des exopolymères produits par les bactéries changent à la fois selon les micro-organismes en cause et selon leur environnement (Zhang et *al.*, 1998; Block, 1999). Zhang et *al.* (1998) ont observé que les profils des polysaccharides et des protéines des polymères extracellulaires changeaient avec la profondeur du biofilm. Ils ont montré que le biofilm a une structure stratifiée. Le transfert d'oxygène et de substrat ainsi que les interactions entre espèces au sein du biofilm sont considérés comme les principales raisons de cette stratification. La matrice d'exopolymères connecte les cellules à la surface et les cellules entre elles et permet de stabiliser la structure du biofilm (Costerton et *al.*, 1981). Cependant, les fonctions exactes des substances polymériques extracellulaires ne sont pas complètement élucidées du fait de l'hétérogénéité de leur nature et de leur composition.

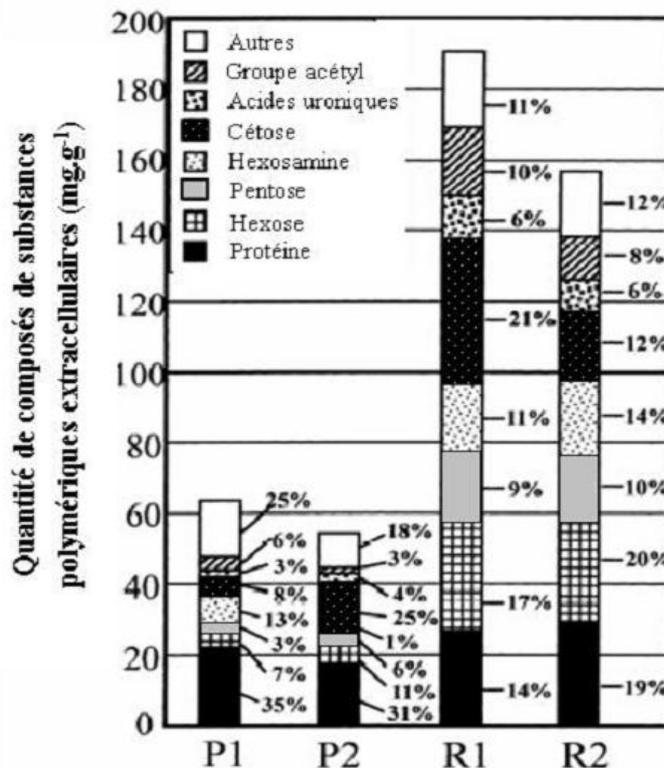


Figure 6 : Composition de substances polymériques extracellulaires de 4 souches bactériennes hétérotrophes (P1, P2, R1 et R2) (Tsuneda et *al.*, 2003a)

2.3. Hétérogénéité du biofilm

En termes de structure et de composition, il existe une grande diversité de types de biofilms. En effet, une espèce de bactéries produit un type de biofilm qui varie en fonction des conditions environnementales (Donlan et Costerton, 2002). Aussi, l'hétérogénéité des biofilms se décline à plusieurs niveaux (Bishop *et al.*, 1995) :

- Hétérogénéité géométrique : épaisseur, rugosité de la surface et porosité du biofilm, surface du substratum recouverte par le biofilm microbien.
- Hétérogénéité chimique : diversité des solutés chimiques (nutriments, produits métaboliques, inhibiteurs...), variations de pH, diversité de réactions (aérobies/anaérobies, etc.).
- Hétérogénéité biologique : diversité des espèces microbiennes et de leurs distributions spatiales, différences d'activité (croissance cellulaire, production de substances polymériques extracellulaires, mort cellulaire, etc.).
- Hétérogénéité physique : densité du biofilm, perméabilité, viscoélasticité, viscosité, propriétés des substances polymériques extracellulaires, force du biofilm, concentration en solutés, diffusivité des solutés, présence de solides abiotiques.

3. Développement des biofilms :

3.1. Dynamique de formation :

En termes de colonisation de surface, la formation du biofilm peut être vue comme un processus successif dans l'arrangement et la composition incluant l'attachement des bactéries et l'établissement d'une structure distincte (Martiny *et al.*, 2003). Selon Apilanez *et al.* (1998) la formation du biofilm nécessite une première étape de pré-conditionnement de la surface, puis une croissance logarithmique et une accumulation progressive jusqu'au détachement partiel du biofilm (Figure 7).

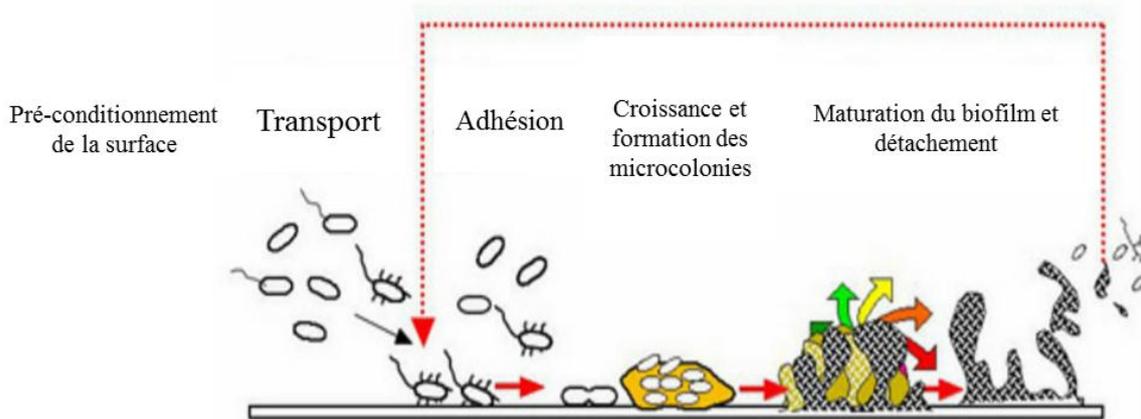


Figure 7 : Développement de biofilm (Chigo Jean-Marc, 2002)

Pour Costerton et *al.* (1999), la formation de biofilms bactériens présente 4 étapes principales de développement : l'adhésion des cellules bactériennes, la formation d'une couche unique de bactéries sur la surface, la formation de microcolonies enveloppées dans la matrice, l'établissement du biofilm mature. Pour Tolker-Nielsen et Molin (2004), la formation d'un biofilm mono-espèce se déroule en processus séquentiels de transport de micro-organismes vers une surface, d'attachement initial, de formation de microcolonies, de prolifération et de maturation du biofilm. De façon consensuelle, nous retiendrons que le développement d'un biofilm nécessite :

- Une préparation initiale de la surface, un pré-conditionnement,
- Une seconde phase, où après transport, les bactéries s'attachent et adhèrent à la surface,
- La troisième étape correspondant à la prolifération des cellules (croissance),
- Une quatrième phase de maturation du biofilm.

3.1.1. Pré-conditionnement de la surface :

Cette étape a lieu quelques minutes après l'exposition d'une surface propre à un fluide contenant des micro-organismes dispersés, des molécules organiques et inorganiques. Un solide immergé dans un liquide acquiert une charge de surface, soit par ionisation de groupes de surface, soit par adsorption d'ions présents dans la phase aqueuse. Une fois chargée, cette surface attire des contre-ions correspondant à des nutriments inorganiques et organiques (protéines, glycoprotéines, etc) pouvant être utilisés par les bactéries. Les propriétés de surface du substratum sont altérées par le film organique. Par conséquent, la formation de

cette double couche électronique diffuse est une source potentielle de nutriments pouvant induire une activité significative à l'interface solide-liquide (Apilanez et *al.*, 1998). Cette adsorption conditionne la surface du support pour la fixation des micro-organismes.

3.1.2. Transport des bactéries

Le transport des cellules bactériennes vers la surface s'effectue par leur propre mobilité ou par la turbulence du fluide. Dans les massifs filtrants, il est principalement régi par les conditions hydrodynamiques. Dans un environnement calme, la sédimentation joue un rôle important. En condition d'écoulement laminaire, c'est la diffusion moléculaire qui prédomine. Les mouvements convectifs interviennent dans des conditions d'écoulement turbulent. Quant à la mobilité des cellules, elle joue un rôle moins important et elle n'interviendrait qu'à proximité des surfaces ou seulement en environnement calme. Les mouvements actifs d'une cellule peuvent être motivés par chimiotaxie positive (vers une source de nourriture) ou négative (depuis une zone de présence d'une substance toxique).

3.1.3. Adhésion ou attachement

L'adhésion bactérienne sur le support solide met en jeu différents types d'interactions selon la nature du substrat à coloniser. En effet, si le support est abiotique la fixation sera médiée par des interactions non spécifiques de types hydrophobes, au contraire lorsque l'adhésion se fait sur un tissu vivant (ou dévitalisé) elle met en jeu des mécanismes moléculaires spécifiques type lectine ou adhésine (Dunne, 2002). Par exemple, la surface bactérienne est très généralement hydrophobe de part la présence de fimbriae et/ou de flagelles (Donlan, 2002) ; cette propriété sera d'autant plus marquée que le substrat de fixation sera apolaire.

La formation d'un biofilm bactérien débute avec l'adhésion à une surface d'un petit nombre de cellules bactériennes constituant une première couche (Martiny et *al.*, 2003). Le développement de biofilm multicellulaire (multicouche) fait intervenir des interactions spécifiques cellule/cellule et cellule/surface, et dans quelques cas une communication bactérienne appelée "quorum sensing" (Lawrence et *al.*, 1995 ; Tolker-Nielsen et Molin, 2004).

La plupart des auteurs distinguent une étape d'attachement réversible qui précède celle de l'attachement irréversible (adhésion). Toutefois, la première étape ne conduit pas toujours à l'adhésion, particulièrement en fonction des conditions hydrodynamiques. L'attachement réversible fait appel à un phénomène physique généralement non spécifique et précaire, qui peut s'achever en quelques dizaines de secondes. Les forces d'attraction qui entrent en jeu varient selon le type de support, mais celles qui interviennent généralement dans ce processus

sont électrostatiques (liens de Van der Waals, liaisons hydrogène, interactions hydrophobes). L'attachement irréversible ou l'adhésion ferme est une fixation active de la cellule grâce à son activité métabolique. Elle nécessite l'interaction des polymères élastiques de la matrice extracellulaire qui connecte les cellules au substratum (Eighmy et *al.*, 1983; Tolker-Nielsen et Molin, 2004). L'attachement des bactéries implique aussi la participation des composés cellulaires comme les protéines de la membrane externe, les polysaccharides de la capsule, les lipopolysaccharides, les agglutinines de la surface cellulaire et les exopolysaccharides produits par les bactéries elles-mêmes (Davey et O'Toole, 2000). Selon de nombreux auteurs, la synthèse d'exopolysaccharides semble être le facteur le plus important de l'adhésion irréversible des bactéries (Bellamy et *al.*, 1985; McDowell-Boyer et *al.*, 1986; Costerton et *al.*, 1999; Stevik et *al.*, 2004).

3.1.4. Prolifération des cellules

Cette phase de croissance résulte de la reproduction des cellules irréversiblement attachées et de la production de substances polymériques extracellulaires. Durant cette phase, le biofilm se développe rapidement en microcolonies, formant des réseaux de polymères qui maintiennent l'intégrité structurale du biofilm (Apilanez et *al.*, 1998). L'adhésion de nouvelles bactéries et des particules du liquide dans la matrice peuvent contribuer au développement du biofilm. A la fin de cette phase, la surface est totalement recouverte et colonisée par la structure complexe du biofilm.

3.1.5. Maturation et détachement

Le biofilm mature est un système biologique dynamique en équilibre entre la production des nouvelles cellules et le détachement (Bryers, 2000 ; Molin et *al.*, 2000 ; Del Pozo et *al.*, 2002 ; Liu et *al.*, 2003).

La maturation du biofilm est divisée en deux phases (Clutterbuck, 2007). La première phase est marquée par des régulations de gènes importantes, engendrant un changement marqué de phénotype par rapport aux formes planctoniques. Elles concernent essentiellement des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies ; cela suggère la faible présence d'oxygène, surtout dans les zones les plus proches du support (Sauer, 2002). La seconde phase de maturation du biofilm est marquée par des synthèses protéiques importantes, très différentes de celles ayant lieu lors de la première phase de maturation du biofilm. L'épaisseur maximale du biofilm est atteinte durant la phase de maturation (Clutterbuck, 2007). Soixante-dix gènes subiraient des modifications au cours de la maturation d'un biofilm (Whiteley et Banger, 2001).

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu. Il s'agit du stade de dispersion : des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur, à partir du biofilm. Des remaniements génétiques sont à l'origine du détachement des formes planctoniques. Ce dernier permet non seulement de promouvoir une diversité génétique mais aussi de favoriser la colonisation de nouvelles niches écologiques et par conséquent la formation d'autres biofilms (Clutterbuck, 2007). La libération des formes planctoniques à partir du biofilm peut se faire selon deux modalités (Characklis, 1990 a). Les bactéries peuvent se détacher de façon continue, en petites quantités : on parle d'« érosion » du biofilm. Mais on peut assister à un détachement massif et rapide, « en lambeaux », de quantités importantes de bactéries, appelé « sloughing ». Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques du biofilm, comme l'antibiorésistance. En effet, les bactéries planctoniques essaimant d'un biofilm sont capables de résister aux défenses immunes de l'hôte et être à l'origine d'une infection (Donlan, 2002). Par exemple, les bactéries planctoniques qui essaient à partir de prothèses et d'implants médicaux sont capables de survivre à la phagocytose réalisée par les polynucléaires neutrophiles et d'engendrer une infection systémique (Clutterbuck, 2007).

3.2 Facteurs influençant le développement du biofilm :

Tout comme pour l'adsorption de molécules organiques, de nombreux facteurs peuvent influencer l'adhésion bactérienne par modification des caractéristiques du micro-organisme ou de la surface solide.

3.2.1. Les facteurs liés au micro-organisme.

Chaque famille de micro-organisme possède des propriétés physico-chimiques qui lui sont propres. Toute modification des caractéristiques énergétiques de surface des micro-organismes peut entraîner une augmentation ou une diminution de l'adhésion bactérienne (Grivet et al., 2000). Grivet et al. ont par exemple mis en évidence que l'adhésion de quatre souches de *Streptococcus* sur des alliages dentaires dépend de leurs caractéristiques énergétiques, la souche la plus hydrophile présentant les plus faibles taux d'adhésion. Il apparaît que le mode de préparation de la culture bactérienne peut avoir de grandes conséquences sur les propriétés physico-chimiques de surfaces des bactéries (Pedersen, 1986 ; Bruinsma et al., 2001) Par exemple, la centrifugation des cultures permettant un "lavage" des micro-organismes peut rompre les flagelles et les pili, modifiant la composition de surface des micro-organismes (Neu, 1996) et par conséquent les caractéristiques

énergétiques de surface de la bactérie (Rubio, 1998). La disparition des flagelles et des pili peut perturber l'adhésion (Neu, 1996 ; Stanley, 1983 ; Vidal et *al.*, 1998), ces organites ayant un rôle très important dans les premières phases d'adhésion en permettant le déplacement vers la surface. La composition du milieu suspendant peut aussi avoir une influence sur l'adhésion bactérienne ; pH et force ionique en modifiant les composantes électrostatiques de la surface du micro-organisme (Briandet et *al.*, 1999 ; Bunt et *al.*, 1995 ; Pelletier et *al.*, 1997) vont conduire à une adhésion différente des bactéries sur les supports solides (Stanley, 1983 ; Pembrey et *al.*, 1999 ; Jana et *al.*, 2000). Cependant, Peng et *al.* ont présenté des résultats contradictoires où le taux d'adhésion ne varie pas en fonction du milieu suspendant.

3.2.2. Facteurs liés à la surface solide.

Pour étudier l'adhésion bactérienne sur les matériaux, il est important de prendre en compte le type de métal ou de matériau, l'hydrophobicité, la rugosité de surface, les procédures de nettoyage (Boulangé-Petermann, 1996) et la présence ou non d'un film organique. Une surface possède des imperfections (anfractuosités) dues au mode de préparation employé lors de l'usinage des matériaux. Intuitivement, les rainures semblent être un parfait environnement pour le développement bactérien puisque l'aire colonisable est augmentée et les sites d'adhésion plus nombreux. Les bactéries en se logeant dans ces imperfections peuvent alors être protégées des agressions extérieures (nettoyant-désinfectant, ultrasons) (Boulangé-Petermann, 1996). Cependant, l'effet de la rugosité sur l'adhésion bactérienne n'est pas clair :

- Kerr et *al.* (1999) ont observé une augmentation de l'adhésion bactérienne sur des échantillons de verre et d'acrylique immergés en eau de mer naturelle lorsque la rugosité augmente de 0,25 à 30 μm .
- Boulangé-Peterman et *al.* (1996) ont montré que l'augmentation de la rugosité d'une surface d'acier inoxydable AISI 304 entre 0,01 et 1 μm n'avait pas de conséquences sur l'adhésion de *Streptococcus thermophilus* ; conclusion identique pour Jansen et Kohnen (1995) sur des échantillons de polyuréthane dont la rugosité est comprise entre 0,4 et 1,4 μm .
- Scheuerman et *al.* (1998) ont conclu que la présence d'anfractuosités augmentait la quantité de *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* adhérents sur des échantillons de silicone, mais qu'une rugosité supérieure à 10 μm n'avait aucun effet supplémentaire. De façon générale, il est admis que les micro-organismes hydrophobes adhèrent fortement sur des matériaux hydrophobes alors que les micro-organismes hydrophiles adhèrent plus fortement sur des matériaux hydrophiles (Grivet et *al.*, 2000 ;

Boulangé-Petermann, 1993 ; Briandet et *al.*, 2001). Les caractéristiques énergétiques de surface des échantillons dépendent de plusieurs facteurs :

- La composition chimique de la surface solide étudiée (chrome, fer, nickel, cuivre, verre, PTFE), les différents types de matériaux présentant des caractéristiques physico-chimiques dissemblables, peut conduire à d'importantes différences d'adhésion bactérienne (Boulangé-Petermann, 1996).
- Le mode de nettoyage des surfaces solides, en modifiant les caractéristiques énergétiques d'échantillons d'acier inoxydable AISI 304, les rendant plus ou moins hydrophobes, influence l'adhésion de *Streptococcus thermophilus* (Boulangé-Petermann, 1993).
- L'adsorption d'ion ferriques sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 304 (Briandet et *al.*, 2001) d'ions calcium et de cuivre sur des échantillons d'acier inoxydable AISI 316 (Tang et Cooney, 1998) d'argent sur des échantillons de polyuréthane (Jansen et Kohnen, 1995) va, en modifiant les propriétés de surface du matériau, provoquer soit la diminution soit l'augmentation de l'adhésion bactérienne.
- L'adsorption de composés organiques sur la surface solide entraîne la modification physico-chimique de la surface solide. Ce film organique masque en partie ou totalement les propriétés initiales de la surface (Rubio, 1998 ; Baier, 1970) et augmente l'adhésion (Bradshaw, 1997) ou au contraire la diminue (Pratt-Terpstra et *al.*, 1987 ; Fletcher, 1976). Le conditionnement par des molécules organiques ne semble cependant pas éliminer l'adhésion bactérienne (Baier, 1970).

4. Régulation de la formation des biofilms :

4.1. Quorum sensing :

4.1.1. Définition et mécanismes

La dynamique du biofilm repose sur un comportement collectif, impliquant nécessairement des mécanismes efficaces de communication cellulaire. Il est bien connu, aujourd'hui, que les bactéries au sein d'un biofilm communiquent entre elles par de petites molécules signal. Ces échanges d'information permettent aux individus d'évaluer la densité cellulaire locale (quorum) dans le but d'initier une réponse concertée de la population bactérienne. En terme de réponse, une sécrétion et une accumulation de molécules vont avoir lieu dans le milieu extracellulaire. Cette régulation, population dépendante, est appelée quorum sensing. Il s'agit de mécanismes 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 du quota. Ces mécanismes sont basés sur le principe de masse critique (Costerton, 1999 ; Tomlin, 2005). Une fois que les signaux atteignent une valeur seuil (valeur critique), des régulateurs transcriptionnels sont activés et exercent un contrôle sur des gènes spécifiques (Costerton, 1999 ; Clutterbuck, 2007 ; Irie, 2008). La nature et la fonction des molécules signalant les échanges de cellule-à-cellule changent à partir d'une concentration donnée des bactéries (Costerton, 1999). Des mutations de gènes impliqués dans les mécanismes de quorum sensing entraînent des répercussions sur les stades tardifs de formation des biofilms. Ces gènes exercent un contrôle sur une grande partie de l'expression du transcriptome et du protéome, avec en particulier un contrôle de l'expression de facteurs de virulence comme les protéases par exemple (Tomlin, 2005). Les molécules du quorum sensing sont variées, et diffèrent d'une espèce bactérienne à une autre.

4.1.2. Les molécules du quorum sensing

Il existe plusieurs classes de molécules comparées très souvent dans leur action aux hormones. Selon le type de bactéries, ces triggers n'auront pas la même origine chimique : pour les bactéries Gram négatif les Acyl HomoSerine Lactone (AHL ou AHSL) seront les plus fréquemment rencontrés (Eberl et al., 1996), tandis que pour les bactéries à Gram positif ce seront plutôt de petits peptides. Un dernier type de molécule a été mis en évidence par Bassler et al. (1994), mais sa structure n'a été connue qu'en 2001 (Schauder et al., 2001b), il s'agit d'une furanone (ou AI-2) qui permettrait une communication inter-espèce, contrairement aux deux autres qui se limitent à l'intra-espèce (figure 8).

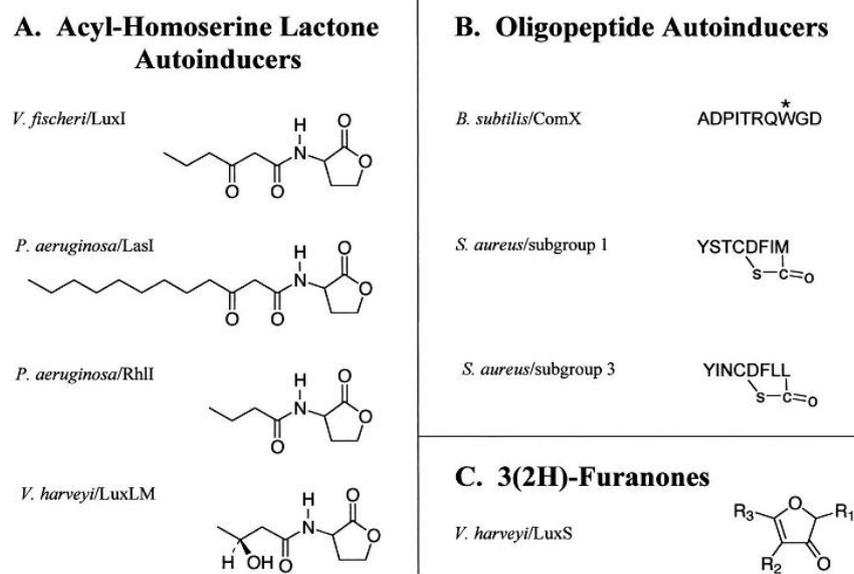


Figure 8 : Formules de molécules de communication (Schauder & Bassler, 2001b)

L'origine métabolique des AHLs et AI-2 est bien connue, puisqu'elles proviennent toutes les deux du même précurseur : la S-Adenosyl Methionine (SAM) (figure 9).

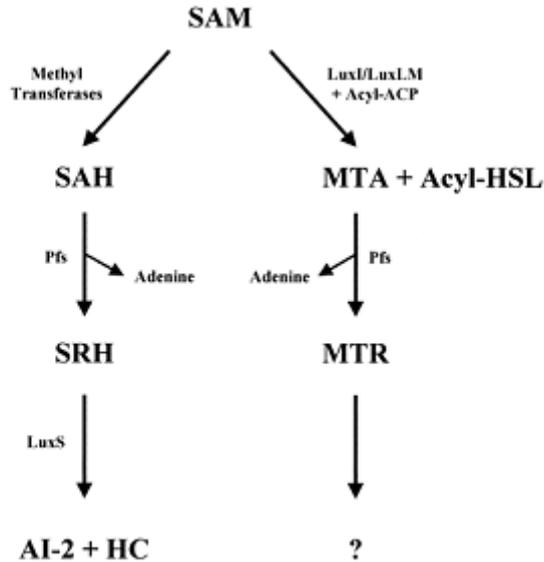


Figure 9 : Voie de synthèse des AHL et AI-2 à partir de SAM (Schauder et Bassler, 2001a)

Les mécanismes moléculaires sur lesquels repose le quorum sensing a intéressé de nombreux chercheurs, et plus particulièrement chez des bactéries à Gram négatif mettant en jeu des AHL.

4.1.3. Rôles du quorum sensing

Le quorum sensing régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm, et en prenant en compte les conditions environnementales. Il initie les phénomènes de dispersion et d'essaimage de bactérie planctoniques à partir du biofilm (Irie, 2008). Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm (Clutterbuck, 2007). Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases (Clutterbuck, 2007 ; Irie, 2008). Le quorum sensing jouerait un rôle dans l'établissement d'antibiorésistances, mais cette hypothèse reste controversée. Les molécules du quorum sensing jouent aussi un rôle dans la lutte contre l'attaque d'autres organismes vivants, comme les protozoaires (exemple de *Serratia marcescens*) (Queck, 2006). Les synergies observées au sein des biofilms constitués de différentes espèces de micro-

organismes sont permises grâce aux molécules intervenant dans le quorum sensing (Bjarnsholt, 2005). Les biofilms composés de plusieurs communautés de bactéries d'espèces différentes ont de fortes concentrations en molécules du quorum sensing, compte-tenu de la densité élevée de cellules présentes.

4.1.4. Altération du quorum sensing

L'altération des mécanismes de quorum sensing 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). Les biofilms mutants pour les molécules du quorum sensing ont une structure tridimensionnelle déficiente. Par exemple, les mutants de *Burkholderia cenocepacia* pour les molécules du quorum sensing sont toujours capables de se fixer à une surface mais l'organisation spatiale des cellules est altérée de façon drastique ; de plus, on constate une augmentation de la sensibilité aux antibiotiques de ces bactéries pendant la phase de croissance du biofilm (Tomlin, 2005). Des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* mutantes pour les molécules du quorum sensing sont moins résistants à l'action de la tobramycine, du peroxyde d'hydrogène et des macrophages (Burmolle, 2006).

4.1.5. Intéraction du quorum sensing avec d'autres molécules : exemple de la lactoferrine

L'organisme possède un moyen d'empêcher la formation de biofilms. Le système immunitaire inné de l'hôte possède une protéine chélatant des ions, la lactoferrine, capable d'interférer avec les molécules du quorum sensing. Elle confère aux bactéries un type de motilité particulier, appelé « twitching », qui les empêche de former des agglomérats de cellules et par conséquent de former un biofilm (Singh, 2002).

La formation d'un biofilm est contrôlée par des signaux de cellules à cellules, mais pas uniquement. Il existe une régulation génétique de la formation de biofilms par les cellules fixées, différentes des mécanismes du quorum sensing.

4.2. Régulation génétique par les cellules fixées :

Après fixation sur un substrat, l'expression d'un certain nombre de gènes est régulée par les cellules fixées. Cette régulation peut être de type inhibiteur ou stimulateur. Elle va entraîner une modification phénotypique des bactéries et avoir pour conséquence la formation d'un biofilm (Donlan, 2002). Au cours de la formation d'un biofilm, 22% des gènes sont stimulés

et l'expression de 16% des gènes est inhibée (Prigent-Combaret, 1999). Lors de la formation de biofilms de *Staphylococcus aureus*, des gènes codant pour des enzymes intervenant dans la fermentation et la glycolyse (phosphoglycérate mutase, triosephosphate isomérase et alcool déshydrogénase) sont stimulés. Ceci peut être relié au fait que la concentration d'oxygène dans le biofilm diminue au fur et à mesure de son développement (Becker, 2001).

4.3. Régulation de la formation des biofilms par le GMP-c :

Le 3'-5'-guanosine-monophosphate cyclique, plus communément appelé GMP-c, est un régulateur central du mode de vie sous forme de biofilms et de l'expression de facteurs de virulence. Le GMP-c est un second messager, intervenant dans des cascades de phosphorylations et modulant l'expression de certains gènes des bactéries du biofilm, impliqués dans les mécanismes de formation du biofilm et dans l'expression de la virulence. La transformation du GTP en GMP-c par la diguanylate cyclase est activée par des signaux extracellulaires, différents selon les bactéries concernées. Lorsque la quantité de GMP-c augmente au sein de la cellule, la quantité de protéines jouant un rôle de facteurs de virulence augmente (Cotter, 2007). Beaucoup d'interrogations à propos de ce mécanisme restent encore en suspens.

4.4. Régulation de la formation des biofilms par l'acétyl phosphate et l'alarmone :

Régulation de l'expression de certains gènes en fonction des conditions nutritionnelles. Récemment, de petites molécules intervenant dans la régulation de la formation d'un biofilm selon les conditions nutritionnelles du milieu ont été identifiées. Il s'agit de l'acétyl phosphate et de l'alarmone. L'acétyl phosphate s'accumule dans le milieu intracellulaire lorsque la concentration en source carbonée augmente et/ou lorsque la concentration en oxygène est basse (Wolfe, 2003). L'alarmone s'accumule lorsque les concentrations en nutriments sont très basses : elle induit une cascade enzymatique aboutissant à la régulation de l'expression de gènes, notamment de gènes codant pour des fimbriae de type I. L'action de cette molécule va permettre d'augmenter la probabilité de survie des bactéries dans des milieux stressants (Beloin, 2008).

4.5. Autres mécanismes régulateurs de la formation de biofilms :

Les polysaccharides présents à la surface des cellules jouent un rôle important dans les interactions entre bactéries et leur environnement immédiat. Par exemple, on trouve à la surface d'*Escherichia coli* l'antigène du lipopolysaccharide O (LPS) et l'antigène polysaccharidique de capsule K. Les lipopolysaccharides, appelés aussi endotoxines, font

partie de la paroi des bactéries Gram-négatives. Ils peuvent inhiber ou stimuler la formation de biofilms selon les cas. Les polysaccharides des capsules sont des facteurs de virulence ; ils protègent les bactéries des défenses immunitaires de l'hôte (phagocytose et activation du complément) (Beloin, 2008). Trois polymères synthétisés par les bactéries du biofilm et faisant partie de la matrice ont un rôle important dans la formation d'un biofilm et dans l'expression de facteurs de virulence; il s'agit de la cellulose, de l'acide colanique (polymère chargé composé de glucose, galactose, fucose et acide glucuronique) et du PGA (β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine).

La synthèse d'acide colanique peut être induite par des concentrations d'antibiotiques de la famille des β -lactamines, proches des concentrations létales ; l'acide colanique forme une capsule. Il en résulte une exacerbation de la formation et de la persistance d'un biofilm face à des agents anti- microbiens (Sailer, 2003). Le mode de vie sous forme de biofilms protège les micro-organismes qui le constituent et leur confère de nombreux avantages : coopération dans certains systèmes cataboliques, synergies entre micro-organismes, expressions phénotypiques de facteurs de résistance lors de situations de stress...

5. Résistance du biofilm aux contraintes environnementales :

Dans la plupart des écosystèmes, les bactéries préfèrent s'installer en biofilm car elles tirent plusieurs avantages de cette formation tels que l'effet de concentration des nutriments, une protection contre les prédateurs (protozoaires, bactériophages) et contre les agents toxiques (biocides, antibiotiques) (Donlan et Costerton, 2002 ; Jefferson, 2004). De plus, il confère une résistance à certaine force physique, mais aussi à une carence nutritive, aux variations de pH, aux espèces réactives de l'oxygène. Dans l'enchevêtrement de polymères se crée un environnement différent des conditions du milieu. En effet, les bactéries ayant un mode de vie sessile présentent une résistance aux antibiotiques 100 fois plus importante qu'une bactérie planctonique. Les mécanismes responsables de ce phénomène pourraient être dus à une ou plusieurs causes, comme une diffusion retardée de l'agent à travers la matrice du biofilm, un temps de génération plus long pour les bactéries sessiles (donc moins sensible aux antibiotiques) ou encore grâce au polymorphisme (Lewis, 2001 ; Stewart et *al.*, 2001 ; Mah et *al.*, 2001). Les bactéries vivant en biofilm présentent un taux de croissance cellulaire plus lent que les bactéries planctoniques. De ce fait, les antibiotiques verront leur efficacité réduite, puisque certains, comme l'ampicilline ou la pénicilline, n'ont aucun effet sur les cellules qui ne sont pas en division (Lewis, 2001).

La difficulté d'un antibiotique à diffuser à l'intérieur des micro-colonies pourrait être due à l'un des constituants du biofilm. En effet, la formation d'un biofilm implique la synthèse massive d'exoproduits, formant le slime, permettant aux bactéries de se protéger des agressions du milieu extérieur (agents anti-microbiens, leucocytes ou autres...). Le slime va également réduire les forces de frictions (effet surfactant) avec le support solide facilitant la migration des bactéries (Gygi et *al.*, 1995). Cette matrice extracellulaire, constituée d'eau et d'exopolysaccharides renforce la structure du biofilm tout en maintenant une certaine plasticité. Les exopolysaccharides aussi appelés glycocalyx (Costerton, 1995a) présentent 3 avantages pour le biofilm (Dunne, 2002):

- Une protection mécanique vis-à-vis des forces de cisaillement et des forts écoulements.
- Une protection chimique puisque des molécules comme les antibiotiques diffusent mal dans cette matrice polysaccharidique.
- Un point d'ancrage au support solide.

Mais la raison pour laquelle les biofilms développent des propriétés importantes de résistance, est due à l'expression de gènes particuliers. Certaines bactéries vont développer des mécanismes moléculaires de résistances en fonction du type d'agent anti-microbien et/ou de leur localisation au sein du biofilm (Brooun et *al.*, 2000). Mis à part cette propriété de résistance, un autre type de propriété émergente est observée dans les biofilms, plus particulièrement au sein de consortia, il s'agit de mécanismes de coopérativité métabolique (Cowan et *al.*, 2000). Ce mode de vie structuré, entraîne certains auteurs à y rechercher des propriétés jusque-là considérées comme exclusives des eucaryotes. Par exemple, Lewis (2000) a évoqué pour la première fois, l'existence d'une mort cellulaire programmée au sein même d'une micro-colonie. Dans le cas où des bactéries auraient subi des dommages irréversibles ou seraient infectées par un virus, elles se suicideraient afin de ne pas entraîner la perte de ses congénères, les débris cellulaires pouvant être assimilés par la population bactérienne.

6. Biofilm dans l'industrie alimentaire :

Les industries agro-alimentaires sont, elles aussi, confrontées aux biofilms et à leurs conséquences. En effet, à l'intérieur des canalisations véhiculant les liquides (comme le lait, l'eau...) des biofilms peuvent se former. Progressivement, les effluents transportés vont contribuer à la croissance du biofilm, dans le cas où le matériau se prête à l'adhésion, créant ainsi de véritables niches de micro-organismes. Ces derniers vont provoquer la

contamination de l'effluent passant dans ces tuyaux, lors de décrochages ponctuels du biofilm fixé provoquant une augmentation massive et rapide du nombre de bactéries à la sortie, mais également des pertes de charges liées à la réduction du diamètre des canalisations. Ce problème est d'autant plus important lorsque les canalisations sont fortement coudées, ce qui conduit à de graves problèmes d'hygiène et des pertes économiques dues à l'altération des aliments (Holah et Kearney, 1992 ; Mattila-Sandholm et Wirtanen, 1992 ; Carpentier et Cerf, 1993). En plus de cela, un certain nombre de rapports ont été apparus sur la persistance de plusieurs pathogènes d'origine alimentaire sur les surfaces de contact alimentaire comme *Listeria monocytogenes* (Farber et Peterkin, 1991), *Yersinia enterocolitica* (Kumar et Singh, 1994), *Campylobacter jejuni* (Stern et Kazmi, 1989) et *Escherichia coli* O157: H7 (Doyle et Padhye, 1988 ; Doyle, 1991 ; Dewanti et Wong, 1995).

La désinfection est un moyen très utilisé pour éliminer les biofilms, malheureusement il est très souvent inefficace (Le Chevallier et *al.*, 1988) ; il existe également des techniques de changement de régime d'écoulement dans le but de décrocher le biofilm.

Parmi les bactéries capables de former des biofilms dans les industries agroalimentaires nous trouvons : *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, ces bactéries ont été choisies dans notre étude afin de tester l'effet antibactérien des H.E. sur la formation de biofilm.

***Listeria monocytogenes* :**

Listeria monocytogenes, une bactérie Gram-positif-communément dans le sol, l'eau, les plantes, les eaux usées et des aliments, tels que les fromages à pâte molle (Farber et Peterkin, 1991 ; Gandhi et Chikindas, 2007), est l'agent causal de la listériose, une maladie rare mais mortelle d'infection d'origine alimentaire. La nature omniprésente du micro-organisme est une préoccupation majeure dans l'industrie de transformation des aliments. Plusieurs études ont démontré que cet organisme est en mesure de persister dans les environnements de transformation des aliments, parfois pendant de nombreuses années (Bagge-Ravn et *al.*, 2003 ; Fonnesbech et *al.*, 2001 ; Miettinen et *al.*, 1999 ; Senczek et *al.*, 2000 ; Unnerstad et *al.*, 1996). Ainsi, la contamination au cours du traitement est la principale source de l'agent pathogène dans plusieurs produits prêts-à-manger (Fonnesbech Vogel et *al.*, 2001 ; Maijala et *al.*, 2001 ; Miettinen et *al.*, 1999 ; Unnerstad et *al.*, 1996). On ne sait pas si cette persistance est le résultat de l'adaptation de certains sous-types de l'organisme, d'un mauvais nettoyage et de désinfection, ou de la capacité de l'organisme à développer une tolérance à certains

produits utilisés. Il y'a donc un grand intérêt dans l'étude des efficacités des produits de nettoyage et de désinfection sur la bactérie. En particulier, il serait utile d'évaluer si certains produits sont plus efficaces contre *L. monocytogenes* que d'autres et dans quelle mesure l'efficacité de ces produits sur l'organisme est influencée par les contaminations organiques de la surface. En général, les bactéries adhérentes semblent moins sensibles au nettoyage et à la désinfection que les bactéries en suspension (Briand et al., 1999 ; Eginton et al., 1998 ; Gelinas et Goulet, 1983 ; Gilbert et al. 1998 ; Norwood et Gilmour, 2000). En effet, les cellules de *Listeria* adhérentes sont plus résistantes aux biocides que les cellules de *Listeria* en suspension (Aarnisalo et al., 2000 ; Best et al. 1990 ; Frank et Koy, 1990 ; Wirtanen et Mattila-Sandholm, 1992).

***Escherichia coli* :**

Escherichia coli a été choisi comme modèle dans notre étude pour tester l'effet des H.E. sur la formation du biofilm des bactéries Gram négatif, cette espèce bactérienne est à l'origine de diverses maladies chez l'homme et elle est responsable de plus de 70% d'infections urinaires (Leclerc et al., 1995). *E.coli*, un hôte commun de l'intestin de l'homme (10^8 /g de selles), et des animaux; elle est recherchée à ce titre, comme germe témoin de contamination fécale, dans l'eau et les aliments, à l'intérieur de l'espèce il y'a des pathotypes souvent associés à des sérotypes particuliers. Certains de ces pathotypes sont responsables d'infections intestinales (gastro-entérites et diarrhées), leur pouvoir pathogène est induit par des facteurs d'adhésion et/ou la production d'entérotoxines. *E.coli* entéropathogène (diarrhées infantiles), *E.coli* entérotoxigène (Leclerc et al., 1995). La bactérie *E.coli* O157:H7 est également responsable de nombreux problèmes d'hygiène et de santé publique (Takeuchi et Frank, 2000). Les aliments, à l'origine de la transmission de ce microorganisme pathogène à l'Homme, sont les viandes de bœuf (Griffin et Tauxe, 1991) et de poulet (Ahmed et al., 1995), le fromage (Arocha et al., 1992), le salami (McDonald et al., 2004), la salade (Tauxe, 1997) et les pommes ou produits dérivés (Burnett et al., 2000). La capacité d'adhésion d'*E. coli* à l'acier inoxydable a été démontrée (Faille et al., 2003 ; Ryu et al., 2004) et cette bactérie a été utilisée comme modèle pour étudier les mécanismes de croissance au sein de communautés microbiennes sessiles (Schembri et al., 2003). Selon Lebert et al. (2007), *E. coli* peut être considérée comme une cible dans l'industrie agro-alimentaire, pour la conception de traitements limitant son développement sur les surfaces.

***Staphylococcus aureus* :**

Staphylococcus aureus est une bactérie aéro-anaérobie facultative, thermosensible, qui requiert des températures de croissance comprises entre 6 et 46°C (avec optimum à 37°C). C'est une bactérie neutrophile (croissance entre pH 4 et 9,8) qui survit dans les aliments déshydratés et/ou congelés et qui tolère pour sa croissance une concentration en sels (NaCl) élevée (jusqu'à 20%) et une activité de l'eau (a_w) réduite (0,83). *S. aureus* est l'un des principaux agents responsables de toxi-infections alimentaires (ex. : gastro-entérites), liées à la sécrétion d'entérotoxines par le microorganisme (Gorman et al., 2002 ; Jorgensen et al., 2005). La contamination peut survenir lors de la préparation des produits (jambon, lait, fromage, crème glacée), car *S.aureus*, microorganisme ubiquitaire et commensal de l'Homme, est capable de coloniser puis de croître dans de nombreux aliments (du fait de la large gamme de température, de pH et de force ionique permettant sa croissance) (Le Loir et al., 2003). De plus, *S. aureus* présente la capacité d'adhérer à l'acier inoxydable (Knowles et Roller, 2001). C'est pourquoi cette bactérie fait partie d'un groupe de microorganismes pathogènes cibles, dans la norme européenne établissant les règles de test des désinfectants dans les industries agro-alimentaires (European Standards for Suspension and Surface Tests for Disinfectants CEN/TC216 – European Committee for Standardization, 1995).

Partie 2 : Matériel & méthodes

1. Activité antibactérienne :

1.1. Extraction des huiles essentielles :

Les feuilles des plantes médicinales *Laurus nobilis* et *Mentha pulegium* ont été collectées de la région du nord du Maroc, leurs huiles essentielles ont été extraites par la méthode d'entraînement à la vapeur dans le laboratoire d'équipe de recherche en Biotechnologie et Génie des Biomolécules (ERBGB) à la FST de Tanger et ont été conservées à 4°C dans le noir.

1.2. Souches bactériennes et conditions de croissance :

Les huiles essentielles ont été testées sur 2 bactéries Gram-positif et une bactérie Gram-négatif. La souche Gram négatif représentée par *Escherichia coli* (CECT 471) et les souches Gram-positif représentées par *Staphylococcus aureus* (CECT 976) et *Listeria monocytogenes* (CECT 4031). Toutes les souches ont été obtenues de la collection espagnole (CECT). Les souches bactériennes ont été cultivées en gélose nutritive et incubées à 37°C. Les suspensions bactériennes ont été réalisées dans du Brain Heart Infusion (BHI) à partir des colonies obtenues de la gélose nutritive et incubées pendant 24 heures à 37°C jusqu'à ce que la phase stationnaire de croissance a été atteinte.

1.3. Détermination de la CMI et de la CMB :

La concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) des huiles essentielles ont été déterminées par la méthode de dilution en bouillon (Ismaili et al., 2004), à l'aide de résazurine comme indicateur de la croissance bactérienne (Mann et Markham, 1998). Les huiles essentielles ont été dissoutes dans 0,5% (v / v) de Tween 80. Une Série de dilutions de 0,5 à 56 µl / ml de chaque huile a été préparée dans du Muller Hinton (MHB). Après agitation, 180 µl de chaque solution a été ajoutée à chaque puits de 96 puits de la microplaque.

Les suspensions de souches microbiennes utilisées ont été diluées à 10^7 UFC / ml et 20µl a été ajoutée à chaque puits positif. Les puits servant en tant que contrôle négatif, ne contiennent pas d'huile essentielle, et ceux servant de témoin positif contiennent d'huile essentielle sans suspensions bactériennes. Les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 18-24 h. Pour la révélation de la CMI, 5 µl de la résazurine 0,01% (p / v) a été ajoutée à chaque puits. La CMI a été définie comme étant la plus faible concentration d'huile essentielle

qui n'a pas produit un changement dans la couleur de la résazurine, et qui correspond à l'absence de croissance bactérienne. Pour déterminer la valeur CMB, le bouillon a été pris à partir des puits dont la croissance microbienne n'a pas été observée, inoculé dans Muller Hinton Agar (MHA) pendant 18-24 h à 37°C. La CMB a été définie comme la plus faible concentration à laquelle les bactéries ont été totalement tuées. L'évaluation de la CMI et CMB a été réalisée en trois exemplaires.

2. Activité anti-biofilm :

2.1. Préparation des cultures bactériennes :

Les souches *S. aureus* CECT 976, *E. coli* CECT 471 et *L. monocytogenes* CECT 4031, ont été conservées à -20°C, réactivées dans le bouillon nutritif et incubées à 37°C pour *S. aureus*, *E. coli* et 30°C pour *L. monocytogenes* jusqu'à ce que le nombre des bactéries atteint environ 10⁸ UFC / ml.

2.2. Préparation du système permettant la formation du biofilm :

Le modèle expérimental de la formation de biofilm a été élaboré sur la base d'un système utilisé par (Bagge et *al.*, 2001 ; Gram et *al.*, 2007) avec quelques modifications. Le système se compose d'un bécher de 1 litre contenant 2 disques d'acier inoxydable sur lesquels, il peut être placé des pièces d'acier inoxydables en position droite. Les pièces sont âgées de plus de 3 ans, faites d'acier inoxydable (AISI 304), coupées en 10 - 28 mm avec une épaisseur de 1 mm. Ces morceaux d'acier ont été utilisés dans une société agroalimentaire. Le support contenant les morceaux d'acier est immergé dans un milieu de culture contenant les bactéries à tester, l'agitation du milieu est assurée par un agitateur magnétique. Le béccher a été scellé avec une boîte de Pétri et du papier aluminium. Les bactéries sont laissées en contact avec les pièces d'acier inoxydable pendant une période de 3, 24 et 240 h. Cette longue période de 240 h a été choisie pour former des biofilms matures, pour représenter ainsi les bactéries des usines qui échappent au nettoyage et à la désinfection sur une plus longue période. Celle de 24 h permet la formation d'un biofilm jeune, alors que celle de 3 h représente la phase de début de formation du biofilm.

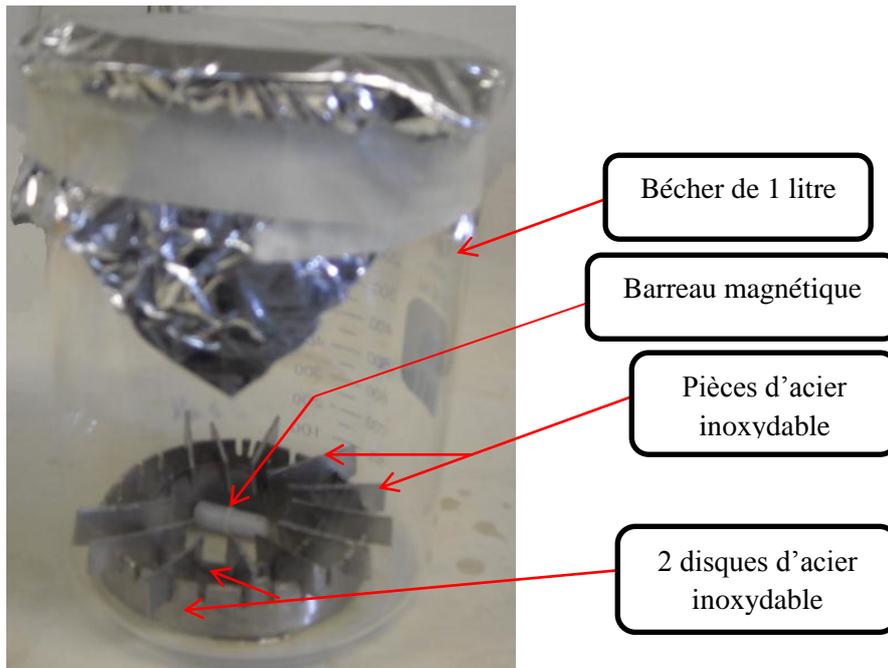


Figure 10 : Système utilisé pour la formation des biofilms

2.3. Préparation et nettoyage des pièces d'acier :

Afin d'engager la phase d'adhérence des cellules bactériennes, les morceaux et les disques d'acier inoxydable ont été précédemment hygiénisés et stérilisés selon une procédure utilisée par Rossoni et Gaylarde, 2000.

- Nettoyage avec de l'acétone à 100% ;
- Lavage par immersion dans un détergent alcalin NaOH 1% pendant 1 h ;
- Rincage à l'eau distillée stérile ;
- Séchage et nettoyage avec de l'alcool 70% ;
- Après l'hygiénisation, elles ont été lavées avec de l'eau distillée ;
- Séchage pendant 2 h à 60°C et stérilisation à l'autoclave à 121°C/15 min.

2.4. Adhésion des bactéries à la surface des morceaux d'acier inoxydables :

Pour favoriser la formation des biofilms sur les pièces d'acier inoxydables, 450 ml de bouillon nutritif stérilisé et 50 ml de bouillon nutritif contenant la culture bactérienne ont été ajoutés dans le bécher contenant les pièces d'acier inoxydable fixées sur les 2 disques et le barreau magnétique. Le bécher a été scellé et incubé pendant 3, 24 ou 240 h à 37°C avec une vitesse d'agitation de 150 tr/min. Ces périodes ont été choisies pour tester l'activité antibactérienne des huiles essentielles sur la phase de début de formation du biofilm (3 ou 5 h), sur les biofilms âgés d'un jour et les biofilms âgés (240 h). Pour le développement du biofilm mature (240 h), chaque 48 h les pièces d'acier sont déplacées du bécher, plongées dans une

solution saline pour éliminer les cellules planctoniques, et de nouveau placées dans un nouveau bécher contenant un barreau magnétique et 450 ml de bouillon nutritif. L'ensemble a également été stérilisé. Le système est bien fermé et incubé à 37°C et à 150 tr / min d'agitation. Cette procédure a été répétée toutes les 48 h, complétant 240 h d'incubation.



Figure 11 : Incubation des béchers à 37°C avec une agitation de 150 tr / min

2.5. Traitement des pièces d'acier inoxydable à l'aide des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ont d'abord été diluées avec l'éthanol, puis par l'ajout de la solution saline à 0,5% de Tween 80. La concentration des huiles essentielles utilisées dans chaque solution désinfectante était fondée sur les précédentes études réalisées sur l'effet bactériostatique des cellules planctoniques de *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *E. coli*. Pour chaque solution désinfectante, la quantité d'huile essentielle utilisée était une concentration minimale inhibitrice (CMI) et une double CMI. L'action de la désinfection de chaque solution contre les cellules bactériennes adhérentes à la surface des pièces d'acier inoxydable a été évaluée par les 3 différentes phases de formation du biofilm : 3, 24 et 240 h. Ainsi, les pièces d'acier ont été plongées dans la solution saline pour éliminer les cellules planctoniques, suivie par 20 min d'immersion dans 4 ml de la solution désinfectante contenant des huiles essentielles et dans la solution de contrôle. Le temps de contact de 20 min a été choisi en tenant compte de l'utilisation de ces solutions dans le processus d'hygiénisation dans les industries alimentaires.



Figure 12 : Traitement des pièces d'acier par une solution désinfectante

La solution du contrôle contient 80% de la solution saline à 0,5% de Tween 80 et 20% de l'éthanol absolu, utilisée pour évaluer la fraction du biofilm éliminée par ces 3 solutions ajoutées à la solution désinfectante.

Tableau 1: Composition des solutions désinfectantes testées et de contrôle

Solution désinfectante	Souche	Composition $\mu\text{l}/4\text{ml}$				Solution saline avec 0.5% de Tween 80
		CMI		CMI x 2		
		H.E.	éthanol	H.E.	éthanol	
<i>Mentha pulegium</i>	<i>E.coli</i>	8	0.792	16	0.784	3200
	<i>L.monocytogenes</i>	8	0.792	16	0.784	3200
	<i>S.aureus</i>	8	0.792	16	0.784	3200
<i>Laurus nobilis</i>	<i>E.coli</i>	56	0.744	112	0.688	3200
	<i>L.monocytogenes</i>	2	0.798	4	0.796	3200
	<i>S.aureus</i>	16	0.784	32	0.768	3200
Contrôle		00	0.800	00	0.800	3200

2.6. Dénombrement des cellules bactériennes adhérees :

Le nombre des cellules adhérees aux morceaux d'acier inoxydable a été déterminé après des traitements utilisant les solutions désinfectantes à base des huiles essentielles et la solution de contrôle à 3, 24 et 240 h de formation de biofilm. Le nombre des cellules adhérees sur les pièces non traitées par les solutions désinfectantes a également été calculé. Initialement, les pièces ont été plongées dans une solution saline, pour supprimer tout résidu de la solution désinfectante, ainsi que les cellules planctoniques. Cela a été suivi par l'élimination des cellules adhérees antérieurement par grattage de la surface de la pièce à l'aide d'écouvillons stériles. Les écouvillons sont ensuite transférés dans des tubes contenant 10 ml de l'eau peptonée tamponnée (E.P.T.), suivie d'une agitation au vortex pendant 1 min. Des dilutions en série sont réalisées dans des tubes eppendorf contenant 900 µl d'E.P.T., un aliquote de 100 µl de chaque dilution a été ensemencé dans une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive, en utilisant la technique de diffusion en profondeur. Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pour *S. aureus*, *E. coli* et 30°C pour *L. monocytogenes* pendant 24 h.



Figure 13 : Grattage de la pièce d'acier par un écouvillon

2.7. Conception expérimentale et analyse statistique :

Les trois phases de la formation de biofilm (3 ou 5 h, 24 h et 240 h) et les 3 souches utilisées ont été individuellement analysées. Dans chaque expérience, 6×2 pièces d'acier (désinfectants × répétition) ont été disposées dans le système. Pour avoir des résultats significatifs, nous avons réalisé plusieurs expériences pour chaque facteur.

Une analyse statistique a été effectuée afin de déterminer si les résultats obtenus en fonction des solutions désinfectantes sont statistiquement différents ou non. Pour cela, nous avons utilisé l'analyse de variance ANOVA 1 du logiciel STATGRAPHICS en posant comme hypothèses : H0, les solutions désinfectantes donnent des résultats équivalents et H1, les solutions désinfectantes donnent des résultats différents. En prenant un intervalle de confiance à 95%, l'hypothèse H0 est rejetée si $P < 0,05$, indiquant que les résultats de dénombrement sont statistiquement différents.

Partie 3 : Résultats & discussions

➤ Résultats :

1. Détermination des CMI et CMB :

Afin de pouvoir utiliser l'effet antibactérien des deux huiles essentielles ; il nous a paru nécessaire de déterminer les valeurs de CMI et CMB de ces huiles pour qu'on puisse tester leur effet anti-biofilm en utilisant des valeurs qui ont démontré avoir une activité antimicrobienne. En se basant sur les résultats obtenus, on peut également comparer l'activité de ces huiles sur les cellules bactériennes à l'état planctonique et à l'état sessile.

Les résultats *in-vitro* de l'activité antibactérienne (CMI et CMB) des huiles essentielles testées sont donnés par le tableau 2.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des H.E. sélectionnées varie entre 0,5 à 14 µl/ml. Les résultats ont révélé que l'huile essentielle *M. pulegium* possède une activité antimicrobienne pour les trois souches testées : *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *E. coli* ; de même ordre de grandeur pour les CMI aussi bien pour les CMB : la valeur enregistrée pour la CMI est de 2 µl / ml et 14 µl / ml pour la CMB.

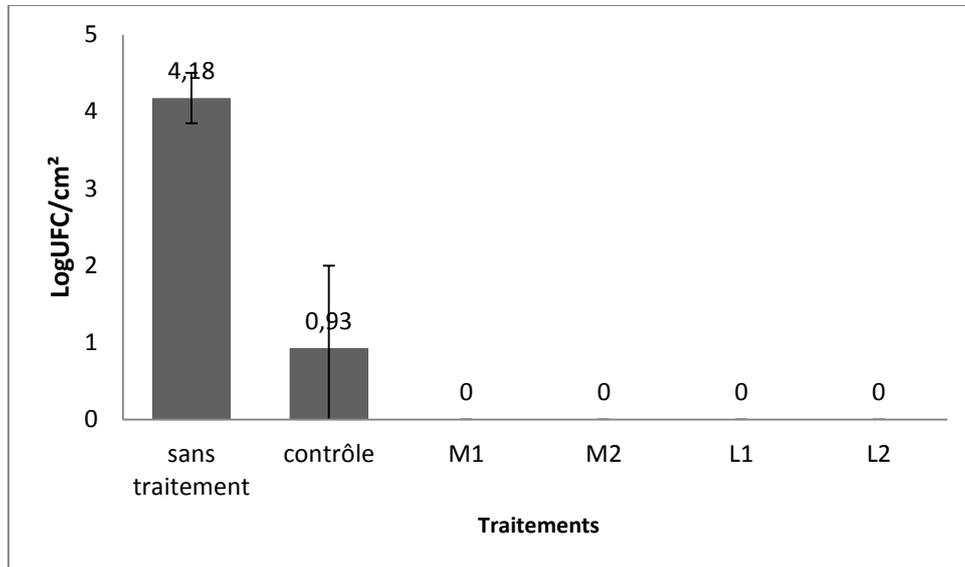
L. monocytogenes 4031 est la bactérie la plus sensible. Une concentration de 0,5 µl/ml de l'huile *L. nobilis* a été suffisante pour inhiber sa croissance. La CMI la plus élevée est celle d'*E. coli* de 14 µl/ml. Les résultats obtenus de CMB pour *L. nobilis* sont de 14 µl/ml pour *L. monocytogenes* et 21 µl / ml pour *S. aureus* et *E. coli*.

Tableau 2 : CMI et CMB obtenues pour *Mentha pulegium* et *Laurus nobilis*

Bactéries testées						
H.E. µl/ml	<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Mentha pulegium</i>	2.0	14.0	2.0	14.0	2.0	14.0
<i>Laurus nobilis</i>	4.0	21.0	0.5	14.0	14.0	21.0

2. Activité anti-biofilm :

2.1 Développement et désinfection du Biofilm de *S. aureus* :

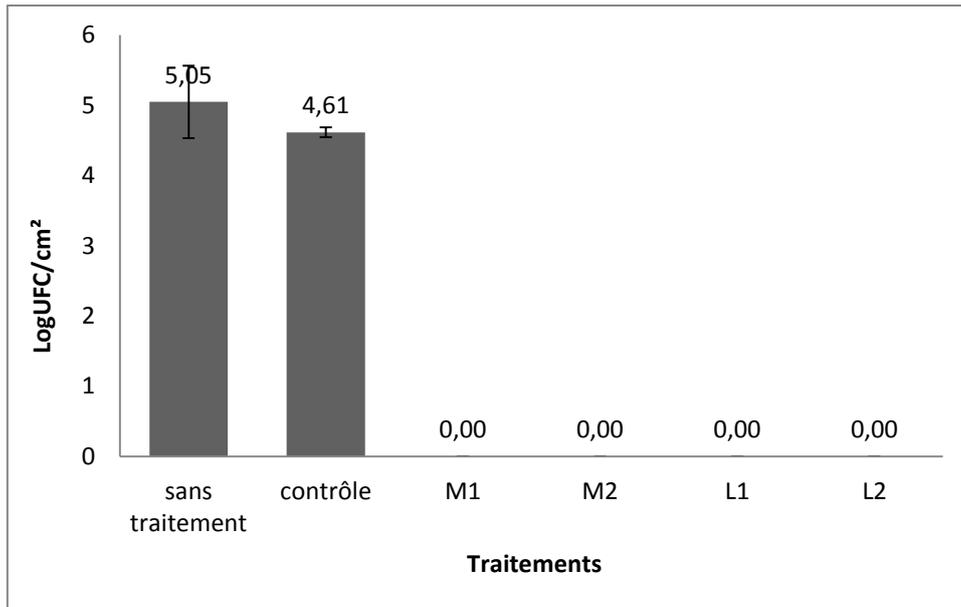


M1: CMI *M. pulegium*, M2 : 2xCMI *M. pulegium*, L1 : CMI *L. nobilis* L2 : 2xCMI *L. nobilis*

Figure 14 : Effet antibactérien des HE sur un biofilm de *S. aureus* obtenu après 5 h de culture.

L'efficacité des solutions désinfectantes peut être mesurée par les valeurs obtenues après leur utilisation comme traitement des coupons d'acier inoxydable contenant les cellules bactériennes sessiles (Figure 14).

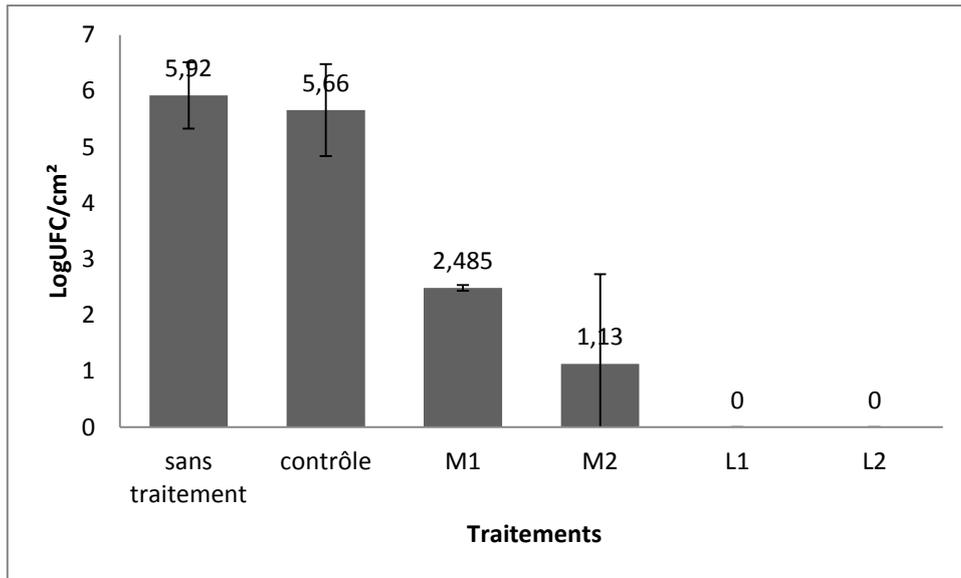
Une durée de 5 h de culture a été suffisante pour former un biofilm de *S. aureus* contenant 4,18 Log UFC/cm². Contrairement aux autres biofilms bactériens développés durant nos expériences, la solution utilisée ici comme contrôle a été très efficace, elle a réduit d'environ 2,5 unités log des *S. aureus* adhérentes, ce qui montre la nature fragile du biofilm âgé de 5 h de *S. aureus*. D'autre part, aucune bactérie n'a pu être détectée après l'utilisation des agents désinfectants contenant l'une des 2 H.E. testées.



M1: CMI *M. pulegium*, M2 : 2xCMI *M. pulegium*, L1 : CMI *L. nobilis* L2 : 2xCMI *L. nobilis*

Figure 15 : Effet antibactérien des HE sur un biofilm de *S. aureus* obtenu après 24 h de culture.

Après 24 h de culture, le nombre des bactéries fixées sur la surface des pièces d'acier inoxydables avant la désinfection était de 5,05 Log UFC/cm² (Figure 15). L'utilisation de la solution de contrôle a réduit d'environ 0,5 unité log des cellules. Aucune bactérie de *S. aureus* n'a pu être détectée sur les surfaces des pièces d'acier après un nettoyage de 20 min par les deux H.E. *M. pulegium* et *L. nobilis* et cela pour les 2 concentrations utilisées, celle de CMI et celle de double CMI. Il n'était pas possible de comparer l'efficacité de désinfection de deux traitements utilisés contre les biofilms développés par la bactérie *S. aureus* puisque tous les traitements ont pu enlever 100% des bactéries adhérentes.



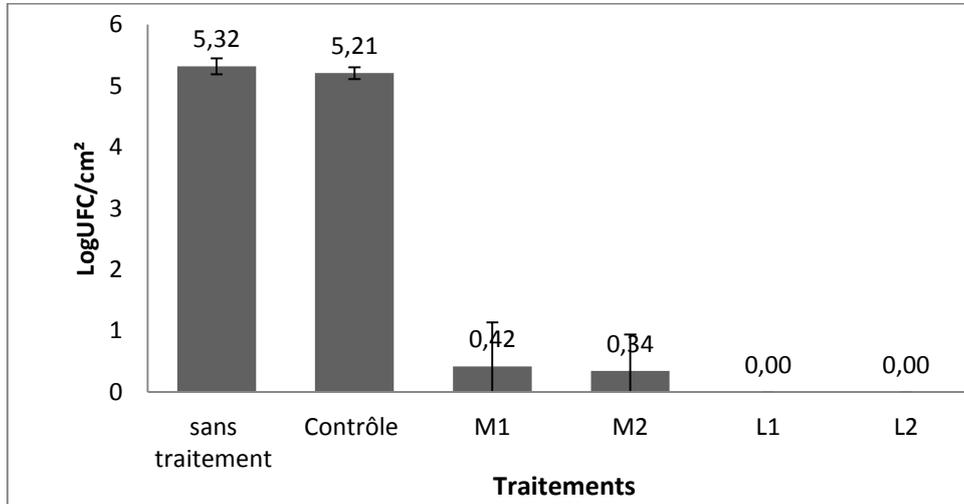
M1: CMI *M. pulegium*, M2 : 2xCMI *M. pulegium*, L1 : CMI *L. nobilis* L2 : 2xCMI *L. nobilis*

Figure 16 : Effet antibactérien des HE sur un biofilm de *S. aureus* obtenu après 240 h de culture.

Le nombre des bactéries qui ont pu adhérer sur les surfaces d'acier après 10 jours de culture, est légèrement supérieur à celui obtenu après 24 h et atteint 5,92 Log UFC/cm². L'utilisation de la solution contrôle a réduit ce nombre à 5,66 Log UFC/cm² (Figure 16).

L'activité anti-biofilm des solutions désinfectantes à base de *Laurus* est restée efficace pour le traitement du biofilm âgé de 240 h. Une concentration minimale inhibitrice (L1) était suffisante pour empêcher toutes les phases de formation du biofilm de *S. aureus*. Cependant, les concentrations testées des solutions à base de *Mentha* n'étaient pas suffisantes pour enlever tout le biofilm de 10 jours. Une quantité de 2,48 Log UFC/cm² du biofilm est restée fixe après la désinfection, toutefois, ce niveau a été réduit à 1,13 Log UFC/cm² en doublant la concentration CMI de cette H.E.

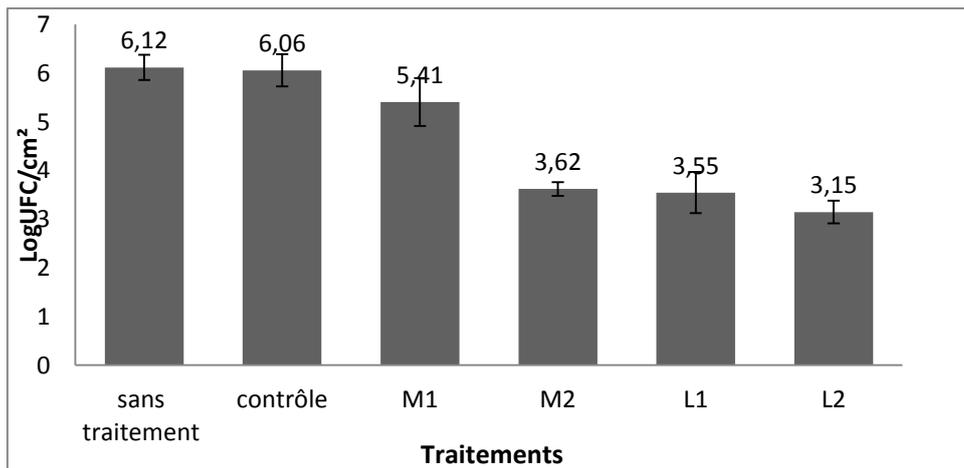
2.2 Développement et désinfection du Biofilm d'*E. coli* :



M1 : CMI *M. pulegium*, M2 : 2xCMI *M. pulegium*, L1 : CMI *L. nobilis* L2 : 2xCMI *L. nobilis*

Figure 17 : Effet antibactérien des HE sur un biofilm d'*E. coli* obtenu après 3 h de culture.

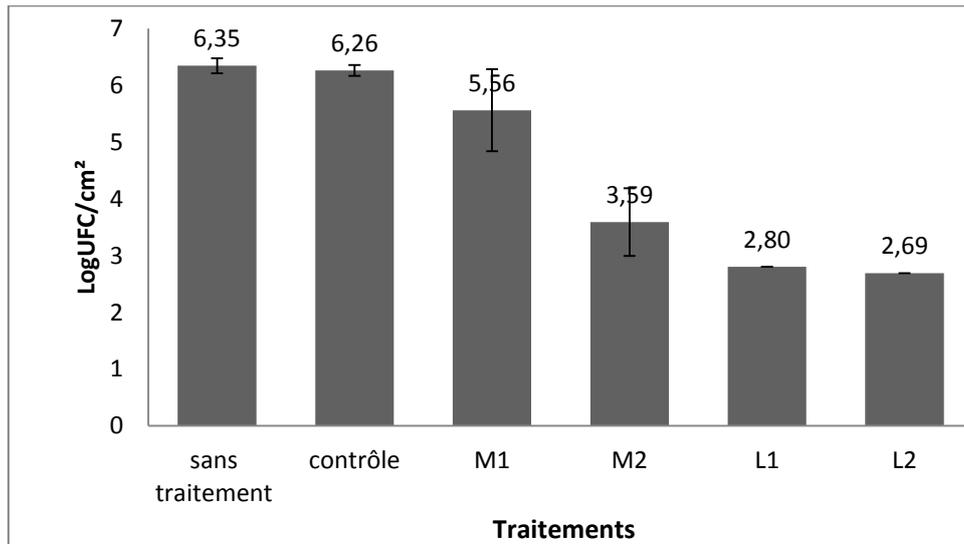
Au bout de 3 h, le biofilm d'*E. coli* atteint environ 5 Log UFC/cm², ce niveau est resté constant après le nettoyage par la solution de contrôle. L'utilisation des solutions à base d'H.E. *Laurus* s'est avérée très efficace, elle a éliminé toute trace du biofilm sur les supports d'acier. Les traitements utilisant H.E. *Mentha* ont également été efficaces et ont pu réduire le nombre des cellules adhérentes à un niveau qui tend vers 0.



M1 : CMI *M. pulegium*, M2 : 2xCMI *M. pulegium*, L1 : CMI *L. nobilis* L2 : 2xCMI *L. nobilis*

Figure 18 : Effet antibactérien des HE sur un biofilm d'*E. coli* obtenu après 24 h de culture.

La désinfection par la solution de contrôle n'a pas pu diminuer le nombre des *E. coli* fixées. La solution désinfectante M1 a réduit significativement le nombre des bactéries adhérees de 6,12 Log UFC/cm² à 5,4 Log UFC/cm². Toutefois les 3 autres solutions ont été plus efficaces que M1 et ont réduit de plus de la moitié le nombre des cellules du biofilm formé.

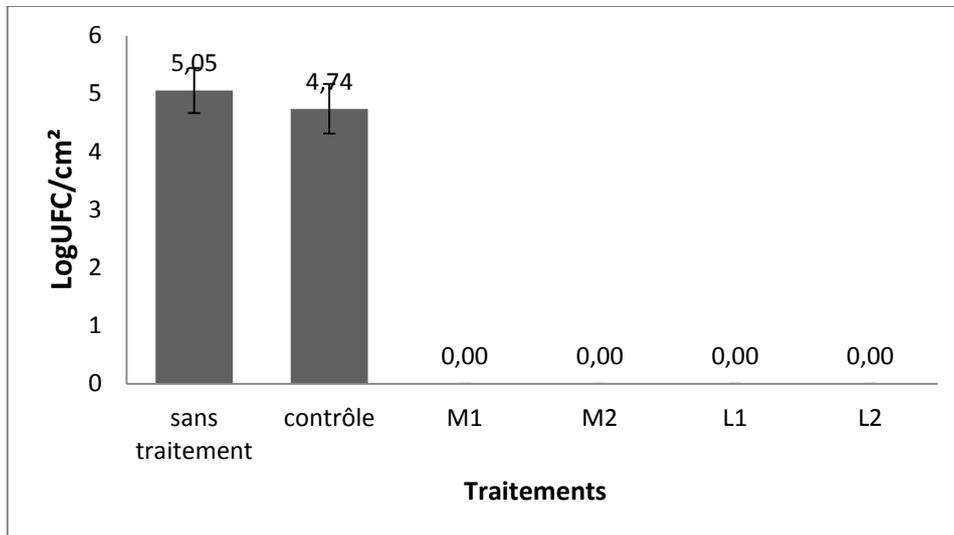


M1: CMI *M. pulegium*, M2 : 2xCMI *M. pulegium*, L1 : CMI *L. nobilis* L2 : 2xCMI *L. nobilis*

Figure 19 : Effet antibactérien des HE sur un biofilm d'*E. coli* obtenu après 240 h de culture.

Le nombre des *E. coli* fixées sur les surfaces des pièces d'acier était légèrement supérieur à celui des biofilms formés par les 2 autres souches, et il a passé de 6,12 Log UFC/cm² après 24 h de culture à 6,35 Log UFC/cm² après 10 jours. Le traitement par les solutions désinfectantes a suivi la même tendance que celle du biofilm âgé de 24 h.

2.3 Développement et désinfection du Biofilm de *L. monocytogenes* :



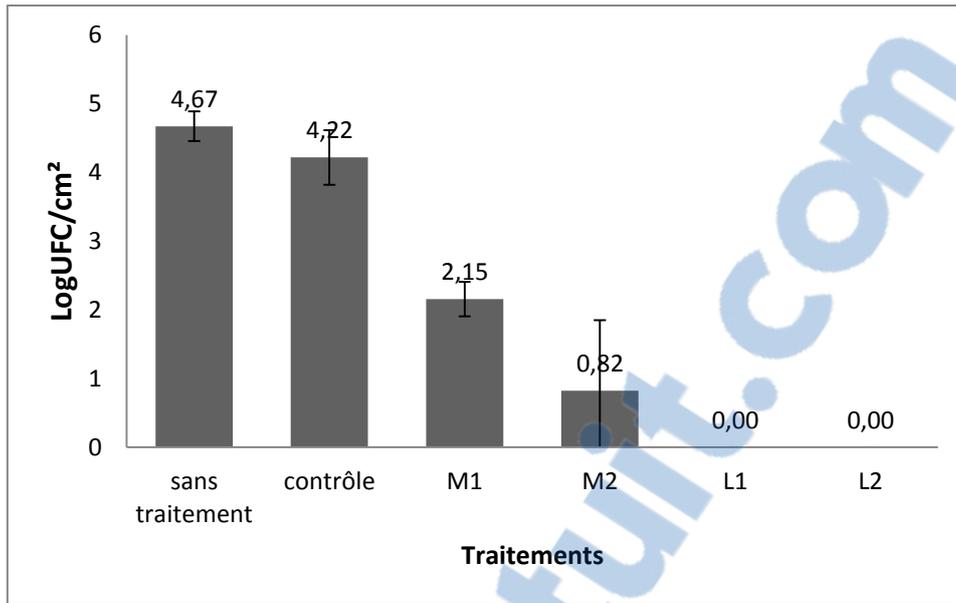
M1: CMI *M. pulegium*, M2 : 2xCMI *M. pulegium*, L1 : CMI *L. nobilis* L2 : 2xCMI *L. nobilis*

Figure 20 : Effet antibactérien des HE sur un biofilm de *Listeria monocytogenes*, obtenu après 5H de culture.

Le nombre de bactéries adhérentes après 5 heures de contact de la suspension bactérienne sur le support solide était d'environ 5.10^5 UFC/cm², l'immersion des pièces d'acier 20 minutes dans la solution de contrôle a réduit les bactéries fixées à 4,74 Log UFC/cm².

Le contact de 3 h n'a permis l'adhésion que de 4.10^2 bactéries (données non présentées). L'application de la solution de contrôle a éliminé toutes les cellules fixées ce qui ne permet pas de tester l'efficacité des huiles essentielles sur la première phase de formation du biofilm de *Listeria monocytogenes*, ce qui explique que la fixation de cette bactérie sur l'acier inoxydable est relativement moins rapide que celle d'*E. coli*.

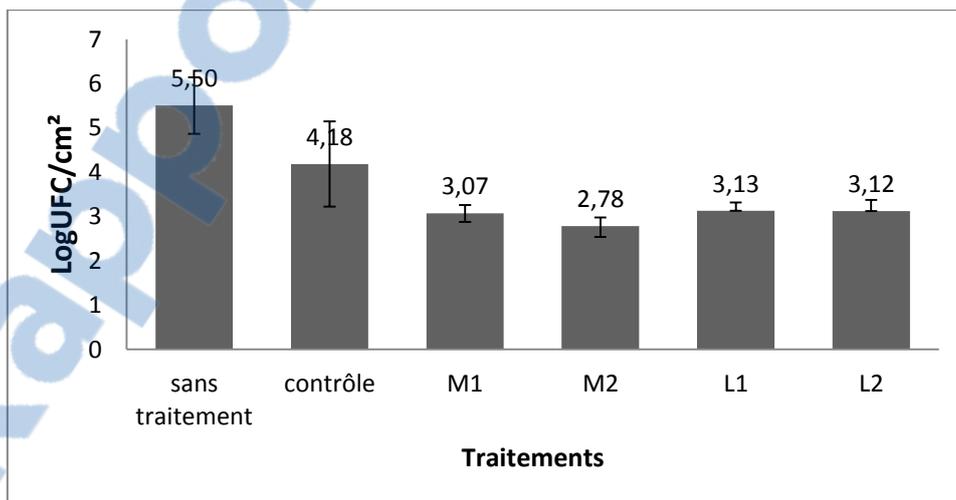
Les différentes H.E. testées se sont avérées efficaces pour l'élimination du biofilm de *L. monocytogenes* lors de la première phase de développement et aucune bactérie n'ayant été dénombrée sur les pièces d'acier inoxydables.



M1: CMI *M. pulegium*, M2 : 2xCMI *M. pulegium*, L1 : CMI *L. nobilis* L2 : 2xCMI *L. nobilis*

Figure 21 : Effet antibactérien des HE sur un biofilm de *Listeria monocytogenes*, obtenu après 24 h de culture.

Le nombre des cellules de *L. monocytogenes* qui ont adhéré après 24 h de contact était voisin de celui obtenu après 5 h de culture. L'effet des solutions M1 et M2 sur le biofilm âgé de 24 h n'était pas totalement efficace comme dans le cas de biofilm de 5 h. Elles ont réduit le niveau des bactéries formant le biofilm d'environ 2,5 et 4 unité log respectivement pour M1 et M2, alors que l'utilisation de H.E. *Laurus* a permis d'enlever toutes les bactéries fixées.



M1: CMI *M. pulegium*, M2 : 2xCMI *M. pulegium*, L1 : CMI *L. nobilis* L2 : 2xCMI *L. nobilis*

Figure 22 : Effet antibactérien des HE sur un biofilm de *Listeria monocytogenes*, obtenu après 240 h de culture.

Après 10 jours de contact suspension bactérienne-support solide, le nombre de bactéries fixées sur les supports solides est resté relativement constant, la solution de contrôle a enlevé environ 1 unité log des *L. monocytogenes* adhérees. La désinfection du biofilm mature de 10 jours par les solutions désinfectantes M2, L1 et L2 ont été moins efficaces par rapport à la désinfection du biofilm âgé de 24 h et de 5 h, elles ont éliminé environ 2,5 unité log des bactéries.

➤ Discussions :

Dans notre étude, *M. pulegium* a montré une forte activité bactériostatique et bactéricide contre les bactéries testées, ce qui est en conformité avec l'étude de M. Mahboubi et G. Haggi (2008) ; ils ont constaté que l'huile de *M. pulegium* montre un fort effet bactéricide contre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*, mais à faible valeur CMI et CMB que nous. Cette différence est probablement attribuable à la différence dans la composition chimique de l'huile. Dans une étude réalisée par Derwich et al. (2010b), il a été signalé qu'une H.E. marocaine de *M. pulegium* a montré une forte activité contre *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*.

L'huile essentielle *L. nobilis* a montré aussi une forte activité bactéricide et bactériostatique contre toutes les bactéries testées. *L.monocytogenes* ont été jugées les bactéries les plus sensibles à cette huile. Une autre huile de laurier marocaine a montré un effet inhibiteur sur la croissance de certaines bactéries (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* et *Klebsiella pneumoniae*) (Derwich et al., 2009). Les différences dans la composition chimique, peut également expliquer la variation observée dans l'activité antimicrobienne des 2 H.E. évaluées.

Il est difficile de comparer les données avec la littérature, car les résultats peuvent être influencés par la composition chimique différente, puisque la composition des huiles essentielles d'une même espèce varie selon la localisation géographique, les conditions climatiques, la période de récolte, la partie de la plante utilisée... Par conséquent, leurs propriétés antimicrobiennes varient également (Oussalah et al., 2007).

Les souches utilisées pour former les biofilms : *L. monocytogenes*, *S. aureus* et *E. coli* s'attachent rapidement sur les surfaces d'acier inoxydable, après 5 h (3 h pour *E. coli*) de contact (suspension bactérienne - pièces d'acier) ; le nombre des bactéries fixées était au niveau 10^4 - 10^6 Log UFC/cm², notre résultat était en accord avec le résultat de Gram et al. (2007). Nous avons aussi constaté que ces 3 micro-organismes ne développent pas de biofilms épais, formés de multicouches : 10^9 - 10^{12} par cm² selon Gram et al. (2007), mais forment des biofilms qui ne dépassent pas 10^7 CFU/cm² après 240 h de contact.

Les huiles essentielles utilisées dans cette expérience ont pu enlever significativement les cellules bactériennes adhérentes sur les surfaces d'acier quel que soit le stade de maturation du biofilm, pourtant l'efficacité du traitement diffère selon la bactérie traitée et la concentration et la nature des huiles essentielles utilisées. En revanche, certaines études ont démontré que

des désinfectants chimiques tels que l'acide peracétique, le chlorure de mercure et le formaldéhyde n'ont aucun effet sur les biofilms (Carpentier et Cerf, 1993), Il est également rapporté que la bactérie *Listeria monocytogenes* attachée sur les surfaces, a montré une augmentation de résistance aux désinfectants classiques comme l'acide anionique et des composés d'ammonium quaternaire (Petrocci, 1983 ; Mustapha et Liewen, 1989 ; Frank et Koy, 1990).

L'activité anti-biofilm des solutions désinfectantes à la base de *Laurus* sur les différentes phases de développement du biofilm 5, 24 et 240 h a donné des résultats plus efficaces que les solutions contenant H.E. *Mentha* ; Ces différences constatées entre les actions de solutions de désinfectants à base d'huiles essentielles dans chaque phase de la formation de biofilms analysés peuvent être attribuées principalement à la différence dans la nature de leurs constituants chimiques, tels que la composition, groupements fonctionnels, la configuration structurelle des composants et les interactions synergiques possibles (Chang, Chen, & Chang, 2001). Nous avons constaté que l'activité anti-biofilm des solutions désinfectantes utilisées diminue avec le développement des biofilms, ces résultats ont été prouvés par certaines études sur des bactéries d'origine alimentaires menées par Anwar et *al.* (1990), qui ont montré que la résistance contre les divers désinfectants est plus importante chez les biofilms plus âgés (plus de 24 h) que chez les plus jeunes. Ceci peut être relié au fait que la majorité des cellules des jeunes biofilms sont encore à la phase reverse d'adhérence, cette adhérence des bactéries à la surface se fait en deux phases: adhésion réversible suivie d'adhésion irréversible, pendant l'adhésion réversible, les bactéries sont facilement supprimées par l'application de forces minimum (Watnick & Kolter, 2000). Cependant, la suppression des adhésions irréversibles est difficile, exigeant l'application des méthodes plus puissantes (Sinde & Carballo, 2000).

Malgré l'utilisation des CMI ou encore la double CMI des H.E. sur les trois souches testées, les solutions désinfectantes n'ont été pas décisives pour l'élimination de toutes les cellules adhérentes. Selon Holah et *al.* (1990), le meilleur désinfectant pour les cellules planctoniques ne sont pas nécessairement les plus appropriées pour les cellules formant des biofilms, cela implique que les bactéries présentes dans un biofilm varient physiologiquement de celles vivantes à l'état planctonique (Brown et *al.*, 1988). En effet, les bactéries ayant un mode de vie sessile présentent une résistance aux antibiotiques 100 fois plus importante qu'une bactérie planctonique (Lewis, 2001 ; Stewart et *al.*, 2001 ; Mah et *al.*, 2001).

Les mécanismes responsables de ce phénomène pourraient être dus à une ou plusieurs causes, comme une diffusion retardée de l'agent à travers la matrice du biofilm, un

temps de génération plus long pour les bactéries sessiles (donc moins sensibles) ou encore grâce au polymorphisme (Lewis, 2001 ; Stewart et *al.*, 2001 ; Mah et *al.*, 2001).

Parmi les micro-organismes testés, la bactérie *E. coli* (Gram négatif) s'est avérée la plus résistante aux traitements par les 2 huiles essentielles utilisées, ce résultat se concorde avec le résultat obtenu par M. Mahboubi et G. Hagh (2008) ; qui ont conclu que les bactéries Gram négatif sont moins sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram positif. Effectivement, la membrane externe des micro-organismes Gram négatif est riche en lipopolysaccharides hydrophobes qui assurent une protection contre les différents agents (Nikaido et Vaara, 1985).

Conclusion et perspectives :

Les deux huiles essentielles étudiées ont montré une activité antibactérienne et anti-biofilm efficace contre les biofilms formés par *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *E. coli*. Toutefois, les solutions désinfectantes à base de *Laurus nobilis* sont les plus efficaces pour enlever les bactéries fixées sur les surfaces d'acier inoxydable. Nous avons montré aussi que la résistance des cellules adhérentes aux huiles essentielles augmente avec l'avancement de l'âge du biofilm. La bactérie Gram négatif analysée dans notre étude *E. coli*, s'est avérée la plus résistante, ce résultat a été confirmé par de nombreuses autres recherches menées sur l'activité antibactérienne des H.E.

En conclusion, nos résultats suggèrent que ces deux produits naturels *Laurus nobilis* et *Mentha pulegium* peuvent être de nouvelles alternatives pour assainir les surfaces d'acier utilisées dans des sociétés d'industrie agroalimentaire ; contaminées par des micro-organismes pathogènes qui conduisent à des graves problèmes sanitaires et économiques. Pourtant pour renforcer cette suggestion, il faut élargir nos études sur d'autres souches bactériennes qui ont des caractéristiques métaboliques et physiologiques différentes, également sur d'autres huiles essentielles susceptibles d'avoir un effet anti-biofilm plus remarquable. Pour s'approcher encore plus des conditions réelles des industries agroalimentaires, il faut penser aussi à travailler dans des milieux plus complexes au lieu du bouillon nutritif (lait, poissons...) etensemencés à la fois par plusieurs souches différentes.

Références bibliographiques

- Aarnisalo K., Salo S., Miettinen H., Suihk M. L., Wirtanen G., Autio, T., 2000. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*, 20, 237–250.
- Ahmed N.M., Conner D.E., Huffman D.L., 1995. Heatresistance of *Escherichia coli* O157:H7 in meat and poultry as affected by product composition, *J. Food Sci.*, 60, 606–610.
- Anwar H., Dasgupta M., Costerton J.W., 1990. Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2043–2046.
- Apilanez I., Gutierrez A., et Diaz M., 1998. Effect of surface materials on initial biofilm development. *Bioresource Technology* 66:225-230.
- Arocha M.M., McVey M., Loder S.D., Rupnow J.H., Bullerma L., 1992. Behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese, *J. Food Protect.*, 55, 379-381.
- Bagge D., Hjelm M., Johansen C., Huber I., & Gram L., 2001. *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2319–2325.
- Bagge-Ravn D., Gardshodn K., Gram L., & Vogel B. F., 2003. Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: Survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 66, 592–598.
- Baier R.E., 1970. Surface Properties Influencing Biological Adhesion, in *Adhesion in Biological Systems*, E.R.S. Manly, Editor. Academic Press. p. 15-48.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M., 2008. Biological effects of essential-oils — a review. *Food and Chemical Toxicology* 46, 446–475.
- Bassler B. L., M. Wright., et M. R Silverman., 1994. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol Microbiol.* 13:273-86
- Bellakhdar J., 1978. Médecine traditionnelle et toxicologie ouest-sahariennes, contribution à l'étude de la pharmacopée marocaine. Edition technique nord-africaine. Rabat.
- Bellamy W. D., Hendricks D. W et Logsdon G. S., 1985. Slow sand filtration: influences of selected process variables. *Journal American Water Works Association* 12:62-66.
- Bellon-Fontaine M.N., and Cerf O., 1991. Mécanismes d'adhésion des micro-organismes aux surfaces : Facteurs influant sur l'adhésion. *Cahier Scientifique et Technique*, IAA. Janvier-Février: p. 13-17
- Beloin C, Roux A, Ghigo JM., 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322: 249- 289
- O'Toole, 1998
- Beraoud L., Bessière J.M. & Tantaoui Elaraki A., 1991. Chemical composition of the essential oils of selected plant materials used in Moroccan cuisine. *Al-Birunya Rev. Mar. Pharm.* 7, 49-69.
- Best M., Kennedy M. E., et Coates F., 1990. Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 377–380.
- Beuchat L.R., 1976. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *J. Food. Sc.* 41, 899-902.
- Beveridge T. J., S. A Makin, J. L Kadurugamuwa et Z. Li., 1997. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiology Reviews* 20:291-303.

- Beylier-Maurel M.F., 1992. Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana. E.P.P.O.S.*, 1976, 58: 283-286.
- Bilgrami K.S., Sinha K.K & Sinha A.K., 1992. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol, onion, and garlic extracts. *Indian. J. Med. Res.* 96, 171-175.
- Bishop P. L., Zhang T. C et Fu Y. C., 1995. Effects of biofilm structure, microbial distributions and mass transport on biodegradation processes. *Water Science Technology* 31:143-152.
- Bjarnsholt T., Jensen P., Burmolle M., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum sensing dependent. *Microbiology*, 151(2): 373-383
- Block J. C., 1999. Adhésion-aggrégation des bactéries: comportement individuel ou social? *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* 14:13-18.
- Boulangé-Petermann L., Rault J., and Bellon-Fontaine M.N., 1997. Adhesion of *Streptococcus Thermophilus* to Stainless Steel with Different Surface Topography and Roughness. *Biofouling*, 11(13): p. 201-216.
- Boulangé-Petermann L., 1996. Process of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability : a review with special reference to food industry. *Biofouling*, 10(4): p. 275-300.
- Boulangé-Petermann L., Baroux B., and Bellon-Fontaine M.N., 1993. The Influence of Metallic Surface Wettability on Bacterial Adhesion. *Journal of adhesion science and technology*, 7(3): p. 221-230
- Bradshaw D.J., 1997. Effect of Conditioning Films on Oral Microbial Biofilm Development. *Biofouling*, 11(3): p. 217-226.
- Briandet R., Leriche V., Carpentier B., & Bellon-Fontaine M. N., 1999. Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. *Journal of Food Protection*, 62, 994-998.
- Briandet R., 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A : cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and environmental microbiology*, 65(12): p. 5328-5333.
- Briandet R., Herry J., and B.-F. MN., 2001. Determination of the van der Waals, electron donor and electron acceptor surface tension components of static gram positive microbial biofilms. *Colloids and Surface B : Biointerface*, 21: p. 299-310.
- Brooun A., Liu S., and Lewis K., 2000. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:640-6.
- Brown M.R.W., Allison D.G., Gilbert P., 1988. Resistance of bacterial biofilm to antibiotics: A growth-rate related effect. *J. Antimicrob. Chemother.* 22, 777-780.
- Bruinsma G., 2001. Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of microbiological methods*, 45: p. 95-101.
- Bryers J. D., 2000. Biofilm formation and persistence, p. 45-89. In J. Bryers (ed.), *Biofilms II: Process analysis and applications*. Wiley-Liss, New York.
- Bunt C., D. Jones, and I. Tucker., 1995. The effects of pH, ionic strength and polyvalent ions on the cell surface hydrophobicity of *Escherichia coli* evaluated by the BATH and HIC methods. *International journal of pharmaceuticals*, 113: p. 257-26
- Burmolle M, Webb JS., 2006. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 3916-3923.

- Burnett S.L., J. Chen L.R., Beuchat., 2000. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4679-4687.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food. *International Journal of Food Microbiology* 94 223– 253
- Busscher H.J., 1997. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Applied and environmental microbiology*. Oct; p. 3810-3817.
- Busta F.F & foegeding P.M., 1980. Chemical food preservatives. In S. block. "Disinfection, sterilization and preservation". 656-694. Lea and febiger Eds, Philadelphia. USA.
- Carnesecchi S., Schneider Y., Ceraline J., Duranton B., Gosse F., Seiler N. & Raul F., 2001. Geraniol a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298(1): 197-200.
- Carpentier B., Cerf O., 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75, 499–511.
- Carson C.F. & Riley T.V., 1995. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl Bacteriol.* 78(3): 264-269.
- Carson C.F., Mee B.J., Riley T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46 (6), 1914–1920.
- Castonguay MH., Van der Schaaf S., Koester W., 2006. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Res. Microbiol.*, 157: 471- 478
- Chalchat J.C., M.S. Gorunovic., Z.A. Maksimovic and S.D. Petrovic., 2000. Essential oil of wild growing *Mentha pulegium* L. from Yugoslavia, *J. Essential Oil Res.*, 12: 598-600.
- Chang S. T., Chen P. F., & Chang S. C., 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 123–127.
- Characklis WG., Marshall KC., 1990a. Biofilms, 195-23
- Chigo Jean-Marc., 2002. Etude de la formation du biofilm chez les bactéries. Rapport d'activité institut pasteur.
- Chmielewski R. A. N., & Frank, J. F., 2003. Biofilm formation and control in foodprocessing facilities. *International Journal of Food Science and Technology*, 2, 22–32.
- Clutterbuck A.L., 2007. Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol.*, Mar 31; 121 (1-2): 1-17
- Conner D.E., 1993. Naturally occurring compounds. P.441-468. In P.M. Davidson, and A. Branen (ed.), *Antimicrobials in foods*, 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology* 29, 130– 135.
- Costerton J. W., Z. Lewandowski., D. E. Caldwell., D. R. Korber., and H. M. Lappin-Scott., 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol.* 49:711-45
- Costerton J. W., G. G. Geesey., and K. J. Cheng., 1978. How bacteria stick. *Sci Am.* 238:86-95.

- Costerton J. W., P. S. Stewart et E. P. Greenberg., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
- Costerton J. W., R. T. Irvin et K. J. Cheng., 1981. The role of bacterial surface structures in pathogenesis. *Critical Review of Microbiology* 8:303-338.
- Cotter PA., Stibitz S., 2007. GMP-c mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 17-23
- Cowan S. E., E. Gilbert., D. Liepmann., and J. D. Keasling., 2000. Commensal interactions in a dual-species biofilm exposed to mixed organic compounds. *Appl Environ Microbiol.* 66:4481-5.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R., Wyllie, S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88, 170–175.
- Cox S.D., Mann CM., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R & Wyllie S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88(1): 170-175.
- Cvitkovitch D. G., Y. H. Li et R. P. Ellen., 2003. Quorum sensing and biofilm formation in streptococcal infections. *The Journal of Clinical Investigation* 112:1626-1632.
- Davey M. E. et G. A. O'Toole., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64:847-867.
- Davidson P.M., 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*. ASM, New York, pp. 520–556.
- Del Pozo. R., V. Diez S. E., Garrido M., Morales et R. Osorio., 2002. Hydraulic distribution effect on a real-scale trickling filter. *Environmental Engineering Science* 19:151-157.
- Denyer S.P., Hugo W.B., 1991a. Biocide-induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane. In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.), *Mechanisms of Action of Chemical Biocides*. The Society for Applied Bacteriology, Technical Series No 27. Oxford Blackwell Scientific Publication, Oxford, pp. 171– 188.
- Denyer S.P., Hugo W.B., 1991b. Mechanisms of antibacterial action—A summary. In: Denyer, S.P., Hugo, W.B. (Eds.), *Mechanisms of Action of Chemical Biocides*. Blackwell, Oxford, pp. 331– 334.
- Derwich E., Benziane Z. and Boukir A., 2009. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(4): 3818-3824.
- Derwich E., Benziane Z. and Boukir A., 2010b. GC/MS Analysis and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Mentha pulegium* Grown in Morocco. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6(3): 191-198.
- Dewanti R., Wong A.C.L., 1995. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J.Food Microbiol.* 26, 147–164.
- Donlan R. M. et J. W. Costerton., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review* 15:167-193.
- Dorman H.J. & Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88(2): 308-316.
- Doyle M.P., 1991. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 289–302.
- Doyle M.P., et Padhye V.V., 1988. *Escherichia coli* . In: Doyle, M.P. (Ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 235–282.

- Duboc P., 2008. livre :Labiacées de la Basse-Combraille .p- 10.
- Dunne W. M., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately: Clin Microbiol Rev. 15:155-66.
- Eberl L., G. Christiansen., S. Molin., and M. Givskov., 1996. Differentiation of *Serratia liquefaciens* into swarm cells is controlled by the expression of the flhD master operon. J Bacteriol. 178:554-9
- Eginton P. J., Holah J., Allison D. G., Handley P. S., & Gilbert P., 1998. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. Letters in Applied Microbiology, 27, 101–105.
- Eighmy T. T., D. Maratea et P. L. Bishop., 1983. Electron microscopic examination of wastewater biofilm forming and structural components. Applied and Environmental Microbiology 45:1921-1931.
- El Naghy M.A ., Maghazy S.N., Fadl-Allah & El Gendy Z.K., 1992. Fungistatic action of natural oils and fatty acids on dermatophytic and saprophytic fungi. Zentralbl. Microbiol. 147 : 214-220.
- Faille C., F. Fontaine., C. Lelievre., T. Benezech., 2003. Adhesion of *Escherichia coli* , *Citrobacter freundii* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from milk: consequence on the efficiency of sanitation procedures, Water Sci. Technol.47(5), 225-231.
- Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M., El-Baroty G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. Journal of Food Protection 52 (9), 665– 667.
- Farber J.M., Peterkin P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. Microbiological Reviews 55, 476–511.
- Fenaroli G., 1995. Fenaroli's Handbook of flavor ingredient, 3rd ed.CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- Flamini G., Cioni P.L., Puleio R., Morelli I. & Panizzi L., 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. Phytother Res. 13(4): 349-351.
- Flemming R.G., 2000. Bacterial colonisation of functionalised polyurethanes biomaterials. 21: p. 273-281.
- Fletcher M., 1976. The effect of proteins on bacterial attachment to polystyrene. Journal of general microbiology. 94: p. 400-404.
- Fonnesbech Vogel B., Huss H. H., Ojeniyi B., Ahrens P., & Gram L., 2001. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. Applied and Environmental Microbiology, 67, 2586–2595.
- Frank J. F., & KoY R. A., 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. Journal of Food Protection, 53, 550–554.
- Gandhi M., Chikindas L., 2007. *Listeria* : a food borne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology 113, 1–15.
- Garry P., 1997. Propriétés physico-chimiques de surfaces en polyuréthane et conséquences sur l'encrassement et l'adhésion de *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*, in thèse de doctorat de l'université Claude Bernard-Lyon I. claud Bernard-Lyon I: Lyon. p. 124.
- Gelinas P., & Goulet J.,1983. Effectiveness of 8 disinfectants on 3 types of contaminated surfaces in *Pseudomonas aeruginosa*. Canadian Journal of Microbiology, 29, 1715–1730.
- Goller CC, Romeo T .,2008. Environmental influences on biofilm development. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 322: 37- 66
- Gorman R., S. Bloomfield., C.C. Adley., 2002. A study of crosscontamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland, Int. J. Food Microbiol. 76(1-2), 143-150.

- Gram L., Bagge-Ravn D., Ng Y. Y., Gymoese P., & Vogel B. F., 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. Food Control, 18, 1165–1171.
- Griffin P.M., and Tauxe R.V., 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome, Epidemiol. Rev. 13, 60-98.
- Grivet M., 2000. Effect of hydrophobicity on *in-vitro streptococcal* adhesion to dental alloys. journal of material science : materials in medicine. 11: p. 637-642.
- Gustafson J.E., Liew Y.C., Chew S., Markham J.L., Bell H.C., Wyllie S.G., Warmington J.R., 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. Letters in Applied Microbiology 26, 194–198.
- Gygi D., Rahman M. M., Lai H. C., Carlson R., Guard-Petter J., and Hughes C., 1995. A cell surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cells of *Proteus mirabilis*. Mol Microbiol 17:1167-75.
- Haddouchi f et benmansour A., 2008. Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques .Technologies de Laboratoire Vol: 3 Issue: 8 Pages/record No.: 20-27
- Hala G.M., Christ H. & Carla K., 2000. Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of essential oils. Journal of Ethnopharmacology. 71(3): 513-520.
- Hammer K.A., Carson C.F. & Riley T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl Microbiol. 86(6): 985-990.
- Helander I.M., Alakomi H.-L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M., Von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46, 3590–3595.
- Hitokoto H., Morozomi S., Wauke T., Sakai S & Kurata H., 1980. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. Appl. Environ. Microbil. 39 : 818-822.
- Holah J.T., Higgs C., Robinson S., Worthington D., Spenceley H., 1990. A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. Lett. Appl. Microbiol. 11, 255–259.
- Holah J.T., Kearney I.R., 1992. Introduction to biofilms in the food industry. In: Melo, L.F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. (Eds.), Biofilms-Science and Technology. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 35–41.
- Hu J. Y., Fan Y., Lin H., Zhang H. B., Ong S. L., Dong N., Xu J. L., Ng W. J., et Zhang L. H., 2003. Microbial diversity and prevalence of virulent pathogens in biofilms developed in a water reclamation system. Research in Microbiology 154:623-629.
- Inyoue S., Tsuruoka T., Uchida K. & Ymaguchi H., 2001. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. Microbiol Immunol. 45(3): 201-208.
- Irie Y., Parsek MR., 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 322: 67-84.
- Ismaili H., Milella L., Fkih-Tetouani S., Iidirissi A., Camporese A., Sosa S., Altinier G., Loggia R.D. and Aquino R., 2004. In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. J.Ethnopharmacol. 91, 31-36.
- Jahn A. et Nielsen P. H., 1998. Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. Water Science Technology 37:17-24.
- Jana T., 2000. Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. Canadian journal of microbiology. 46: p. 28-37.

- Jansen B. and Kohnen W., 1995. Prevention of biofilm formation by polymer modification. *Journal of industrial microbiology*. 15: p. 391-396.
- Jorgensen H.J., Mathisen T., Lovseth A., Omoe K., Qvale K.S., Loncarevic S., 2005. An outbreak of *staphylococcal* food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk, *FEMS Microbiol. Lett.*, 252(2), 267-272.
- Juliano C., Mattana A., Usai M., 2000. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus herba-barona* Loisel growing wild in Sardinia. *Journal of Essential Oil Research* 12, 516–522.
- Karaman S., Digrak M., Ravid U., & Ilcim A., 2001. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *thymus revolutus* Celak from Turkey. *J. Ethnopharmacology*. 76(2): 183-186
- Kato T., Lijima H., Ishihara K., Kanek T., Hirai K., Naito Y & Okuda K., 1990. Antibacterial effect of listerine on oral bacteria. *Bull. Tokyo. Dent. Coll.* 31(4) : 301-307.
- Kerr A ., 1999. Some factors affecting the accumulation of biofouling. *Journal of marine biology Ass. U.K.* 79(2): p. 357-359.
- Knobloch K., Weigand H., Weis N., Schwarm H.M., Vigen-schow H., 1986. Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke, E.J. (Ed.), *Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils*. De Gruyter, Berlin, pp. 429– 445.
- Knowles J and Roller S., 2001. Efficacy of chitosan, carvacrol, and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel, *J. Food Prot.*, 64(10), 1542-1548.
- Koedam A., 1977a. Antimikrobielle Wirksamkeit Ätherischer Öle: Eine Literaturarbeit 1960 –1976—Fortsetzung und Schluss. *Riechstoffe, Aromen, Kosmetica* 27 (2), 36– 41.
- Koedam A., 1977b. Antimikrobielle Wirksamkeit atherischer Öle: Eine Literaturarbeit 1960– 1976—Teil I. *Riechstoffe, Aromen, Kosmetica* 27 (1), 8– 11.
- Kumar C.G., Singh R.S., 1994. *Yersinia enterocolitica*, an emerging foodborne pathogen—a review. *Indian J. Dairy Sci.* 47, 537–544.
- Lachowicz K.J., Jones G.P., Briggs D.R., Bienvenu F.E., Wan J., Wilcock A. & Coventry M.J., 1998. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L) against acid tolerant food microflora. *Lett Appl Microbiol.* 26(3): 209-214.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas G.J.E., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology* 91, 453–462.
- Lawrence J.R., Korber D. R., Wolfaardt G. M., et Caldwell D. E., 1995. Behavioral strategies of surface-colonizing bacteria. In G. Jones (ed.), *Advances in Microbial Ecology*, vol. 14. Plenum Press, New York.
- Lazarova V. et Manem J., 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research* 29:2227-2245.
- Le Chevallier M. W., Cawthon C. D., and Lee R. G., 1988. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 54:2492-9.
- Le Loir Y., Baron F., Gautier M., 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning, *Genet. Mol. Res.*, 2(1), 63-76.
- Lebert I., Leroy S., Talon R., 2007. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm, *Food Microbiol.*, 24, 281-287.
- Leclerc H., Gaillard J-L., Simonet M., 1995. *Microbiologie générale, la bactérie et le monde bactérien*. Doin Editeurs, Paris.

- Lewis K., 2000. Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:503-14.
- Lewis K., 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:999-1007.
- Lis-Balchin M., Buchbauer G., Hirtenlehner T., & Resch M., 1998. Antimicrobial Activity of Pelargonium essential oils added to a quiche filling as a model food system. *Lett Appl Microbiol.* 27(4): 207-210.
- Lis-Balchin M., Hart S & Simpson E., 2001. Buchu (*Agathosma betulina* and *A. crenulata*, Rutaceae) essential oils: their pharmacological action on guinea-pig ileum and antimicrobial activity on microorganisms. *J. Pharm Pharmacol.* Apr; 53(4): 579-582.
- Liu Q., Mancl K., et Tuovinen O. H., 2003. Biomass accumulation and carbon utilization in layered sand filter biofilm systems receiving milk fat and detergent mixtures. *Bioresource Technology* 89:275-279.
- M Banger., 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413 :860-864
- Mah T. F., and O'Toole G. A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9:34-9.
- Mahboubi M., and Haghi G., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology.* 119, 325- 327.
- Maijala R., Lytikainen O., Johansson T., Autio T., Aalto T., Haavisto L., 2001. Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 97–109.
- Mallea M., Soler M., Anfosso F & Charpin J., 1979. Activité antifongique d'essences aromatiques. *Pathol. Biol.* 27: 597-602.
- Mann C.M., and Markham J.L., 1998. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Appl. Microbiol.* 84, 538-544.
- Martiny A. C., Jorgensen T. M., Albrechtsen H. J., Arvin E., et Molin S., 2003. Long-term succession of structure and diversity of a biofilm formed in a model drinking water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6899-6907.
- Maruzzella J.C., 1962. The germicidal properties of perfume oils perfumery chemicals. *Am. Perfum. Cosmet.* 77(1): 67-72.
- McDonald D.-D., Biaggio S.R., Song H., 1992. Point defect model for passive films – Identification of charge carriers, *J. Electrochem. Soc.*, 139, 1701-1717.
- McDowell-Boyer L. M., Hunt J. R., et Sitar N., 1986. Particle transport through porous media. *Water Research* 22:1901-1021.
- Miettinen, M. K., Bjorkroth K. J., & Korkeala H. J., 1999. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-Field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 187–192.
- Molin S., Nielsen P. A., Christensen B. B., Andersen J. B., Licht T. R., Tolker-Nielsen T., Sternberg C., Hansen M. C., Ramos C., et Givskov M., 2000. Molecular ecology of biofilms, p. 89-120. In J. Bryers (ed.), *Biofilm II: Process analysis and applications*. Wiley-Liss, New York.
- Mustapha A., Liewen M.B., 1989. Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers. *J. Food Prot.* 52, 306–311.
- Neu T.R., 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological reviews*, Mar: p. 151-166
- Nikaido H., Vaara M., 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Review* 49, 1–32.

- Norwood D. E., & Gilmour A., 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 512-520.
- Nychas G.J.E., 1995. Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W. (Ed.), *New Methods of Food Preservation*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 58– 89.
- Ong Y.L., 1999. Adhesion forces between *E.coli* bacteria and biomaterial surfaces. *Langmuir*. 15: p. 2719-2725.
- Oosterhaven, K., Poolman B., Smid E.J., 1995. S-carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteriostatic compound. *Industrial Crops and Products* 4, 23–31.
- Oussalah M., caillet S., saucier L., and Iacroux M., 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on four pathogen bacteria growth: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 18 (5), 414-420.
- Pedersen K., 1986. Statistic evaluation of the influence of species variation, culture conditions, surface wettability and fluid shear on attachment and biofilm development of marine bacteria. *Ach. Microbiolog.* 145: p. 1-8.
- Pelletier C., 1997. Cell surface characteristics of *LactoBacillus casei* subsp *casei*, *LactoBacillus paracasei* subsp *paracasei* and *LactoBacillus rhamnosus* strains. *Applied and environmental microbiology*. May: p. 1725-1731.
- Pembrey R.S., Marshall K.C., and Schneider R.P., 1999. Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties: *App. Env. Microbiol.* 65(7): p. 2877-2894.
- Peng J., Tsai W., and Chou C., 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. *International journal of food microbiology*. 65: p. 105-111.
- Petrocci M.S., 1983. Surface-active agents: quarternary ammonium compounds. In: Block, S.S. (Ed.), *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 3rd ed. Lea and Febiger, Philadelphia, PA, USA, pp. 309–329.
- Pratt J. R. et Cairns J. J., 1985. Functional groups in the protozoa: role in differing ecosystems. *Journal of Protozoology* 32:415-423.
- Pratt-Terpstra I.H., Weerkamp A.H., and Busscher H.J., 1987. Adhesion of Oral Streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumine-coated surfaces. *Journal of general microbiology*. 133: p. 3199-3206.
- Prigent- Combaret C., Vidal O., Dorel C., 1999. Abiotic surface sensing and biofilm- dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli* . *J. Bacteriol.* 181: 5993-6002
- Queck S-Y., Weitere M., Moreno AM., 2006. The role of quorum sensing mediated developmental traits in the resistance of *Serratia marcescens* biofilms against protozoan grazing. *Environ. Microbiol.*, 8: 1017- 1025
- Romdhane M., Hedhili L., Tizaoui C., Gadri A., Gourdon C., Casamatta G., Ouederni A., Abderabba M., 2001. Conception d'une nouvelle unité de vapodistillation: Extraction de l'huile essentielle de grains d'anis et modélisation du transfert de matière. *Génie de la Séparation, Société Française de Génie des Procédés*. 81: 267-274 .
- Rossoni E. M. M., & Gaylarde C. C., 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 81–85.
- Roulier G., 1992. Les huiles essentielles pour votre santé. *Traité pratique d'aromathérapie : propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes*. Edt. Dangles. France.
- Rubio C., 1998. Caractérisation de l'adsorption de la SAB sur des surfaces de chrome et d'acier inoxydable AISI 304, conséquences sur l'adhésion de *Pseudomonas fragi* K1: Orsay.p. 25.
- Ryu J.H., Kim H., Frank J.F., Beuchat L.R., 2004. Attachment and biofilm formation on stainless steel by *Escherichia coli* O157:H7 as affected by curli production, *Lett. Appl. Microbiol.*, 39, 359-362.

- Sailer FC., Meberg BM., Young KD., 2003. Beta-lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett., 226: 245- 249
- Sauer K., Camper. , 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during developing a biofilm. J. Bacteriol. 184: 1140-1154
- Schauder S., and Bassler B. L., 2001a. The languages of bacteria. Genes Dev. 15:1468-80.
- Schauder, S., Shokat K., Surette M. G., and Bassler B. L., 2001b. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. Microbiol. 41:463-76.
- Schembri M.A., Kjaergaard K., Klemm P., 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms, Mol. Microbiol., 48(1), 253-267.
- Scheuerman T.R., Camper A.K., and Hamilton M.A., 1998. Effects of substratum topography on bacterial adhesion. Journal of colloid and interface science. 208: p. 23-33.91.
- Senczek D., Stephan R., & Untermann F., 2000. Pulsed-Field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. International Journal of Food Microbiology, 62, 155–159.
- Shelef L.A., 1983. Antimicrobial effects of spices. Journal of Food Safety 6, 29– 44.
- Siani A.C., Ramos M.F.S., Menezes-de-Lima O., Ribeiro-dos-Santos R., Fernandez-Ferreira E., Soares R.O.A., Rosas E.C., Susunaga G.S., Guimaraes A.C., Zoghbi M.G.B. & Henriques M.G.M.O., 1999. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. Journal of Ethnopharmacology. 66(1): 57-69.
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. Journal of Biological Chemistry 269 (11), 8022–8028.
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews 59 (2), 201– 222.
- Sinde E., & Carballo J., 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluoroethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. Food Microbiology, 17, 439–447.
- Singh PK., Parsek MR., Greenberg EP., 2002. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature, 417:552-555
- Skandamis P.N., Nychas G.-J.E., 2001. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. Journal of Applied Microbiology 91, 1011 – 1022.
- Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Journal of Applied Microbiology 26, 118–122.
- Sponza D. T., 2003. Investigation of extracellular polymer substances (EPS) and physicochemical properties of different activated sludge flocs under steady-state conditions. Enzyme and Microbial Technology 32:375-385.
- Stanley P.M., Factors Affecting the Irreversible Attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to Stainless Steel. Canadian Journal of Microbiology, 1983. 29: p. 1493-1499.
- Stern N.J., Kazmi S.U., 1989. *Campylobacter jejuni*. In: Doyle, M.P. (Ed.), Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York, USA, pp. 71–110.
- Stevik T.K., Ausland K. G., et Hanssen J. F., 2004. Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. Water Research 2004:1355-1367.

- Stewart P.S., and Costerton J. W., 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 358:135-8.
- Takeuchi K. and Frank J.F., 2000. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce tissues as affected by inoculum size and temperature and the effect of chlorine treatment on cell viability, *J. Food Prot.*, 63, 434-440.
- Taldykin O.E., 1979. Use of phytoncidic activity of essential oils for improving the air in sealed place. *Rol Biogeotsenozkh Znach Med Mater Soveshch.* 1 : 201-203.
- Tang R.J. and Cooney J.J., 1998. Effects of marine paints on microbial biofilm development on three materials. *J. Indus. Microbiol. & Biotechnol.* 20: p. 275-280.
- Tauxe R.V., 1997. Emerging foodborne disease: an evolving public health challenge. *Emerg. Infect. Dis.*, 3(4), 425-434.
- Thoroski J., Blank G., Biliaderis C., 1989. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection* 52 (6), 399-403.
- Tolker-Nielsen T., et Molin S., 2004. Biofilm development by *Pseudomonas*. Presented at the European Symposium on Environmental Biotechnology.
- Tomlin., 2005. Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5208- 5218
- Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., et Hirata A., 2003a. Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters* 223:287-292.
- Ultee A., Bennink M.H.J., Moezelaar R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4), 1561-1568. PhD thesis, ISBN 90-5808-219-9.
- Unnerstad H., Bannerman E., Bille J., DanielssonTham M. L., Waak E., & Tham W., 1996. Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 493-499.
- Valnet J., 1974. Phytothérapie et aromatothérapie : nouvelles observations. *Plantes médicinales et phytothérapie.* 8 : 229-236.
- Valnet J., Duraffourd C.H., Duraffourd P & Cilapraz J., 1978. L'aromatogramme : nouveaux résultats et essais d'interprétation sur 268 cas cliniques. *Plant Med Phytother.* 12 : 43-52.
- Vidal O., Longin R., Prigent-Combaret C., 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces : involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J. Bacteriol.* 180: 2442- 2449
- Watnick P., et Kolter R., 2000. Minireview: Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, 182, 2675-7679.
- Whiteley M., et Bangerla., 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413 :860-864.
- Wirtanen, G., & Mattila-Sandholm, T. (1992). Removal of foodborne biofilms – comparison of surface and suspension tests. 1. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 25, 43-49.
- Wolfe AJ., Chang DE., Walker JD., 2003. Evidence that acetyl phosphate functions as a global signal during biofilm development. *Mol. Microbiol.*, 48: 977- 988
- Zhang X., Bishop P. L., et Kupferle J., 1998. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science Technology* 37:345-348.