



Sommaire

| | |
|--|----|
| Introduction | 1 |
| I. Les biofilms : | 3 |
| 1. Définition : | 3 |
| 2. Les Etapes de la formation de biofilm : | 3 |
| a. Transport : | 4 |
| b. Attachement : | 4 |
| c. Consolidation : | 5 |
| d. Colonisation : | 5 |
| 3. Interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion microbienne..... | 6 |
| II. Biofilms, dégradations et moyens de lutte : (cas général) | 6 |
| a) Les nouvelles technologies au service de la lutte contre les biofilms | 6 |
| III. La Dégradation du bois : | 8 |
| IV. LES HUILES ESSENTIELLES..... | 9 |
| a. Définition : | 9 |
| b. Propriétés des huiles essentielles | 10 |
| c. Caractéristiques chimiques : | 10 |
| d. Caractéristiques physico-chimiques..... | 11 |
| e. Activité antifongique | 11 |
| II. MATERIELS ET METHODES | 14 |
| A. Matériels : | 14 |
| 1. Les Souches fongiques et conditions de culture | 14 |



| | |
|---|----|
| 2. Support utilisé : | 14 |
| 3 . Huiles Essentielles et Principes Majoritaires : | 15 |
| II Méthodes : | 16 |
| 1. Conservation des souches : | 16 |
| 2. Lavage et Préparation du support : | 16 |
| 3. Test d'Adhésion : | 16 |
| a. Culture des souches : | 16 |
| b. Récolte, concentration et comptage des spores : | 16 |
| c. Cinétique d'adhésion : | 17 |
| d. Mesure de l'Angle de Contact ; | 18 |
| e. Calcul de l'énergie de surface : | 20 |
| 4. Test d'inhibition : | 21 |
| a. Prétraitement des morceaux de bois : | 21 |
| b. Incubation : | 21 |
| c. Détermination de la CMI : (souches Planctoniques) | 21 |
| 5. Observation au Microscope Electronique à Balayage Environnemental (M.E.B.E.) | 22 |
| a. Principe Général: | 22 |
| b. Optimisation des paramètres : | 23 |
| 6. Quantification de l'adhésion avant et après traitement par le logiciel Matlab | 24 |
| III. Résultats et Discussions : | 26 |
| A. Mesure des propriétés physico-chimiques et Caractérisations de la surface du substrat et la surface des spores : hydrophobicité et caractère donneur-accepteur d'électrons | 26 |



| | |
|---|----|
| 1. Caractéristiques physico-chimiques du bois : | 26 |
| a. Hydrophobicité de la surface du bois de cèdre: | 27 |
| b. Caractère donneur d'électrons et accepteur d'électrons du bois :..... | 27 |
| 2. Caractéristiques physico-chimiques de la surface des spores de Thielaviahyalocapra:... | 28 |
| a. Hydrophobicité de la surface des spores de Thielaviahyalocapra: | 28 |
| b. Caractères donneur d'électron et accepteur d'électrons des spores de Thielavia hyalocapra : | 29 |
| 3. Caractéristiques physico-chimiques de la surface des spores du genre Pénicillium : | 29 |
| a. Hydrophobicité de la surface des spores des souches du genre Pénicillium | 31 |
| b. Caractères donneur d'électrons et accepteur d'électrons des spores du genre Pénicillium..... | 32 |
| 4. Caractéristiques physicochimiques de la surface des sporesdescombinaisons étudiées :32 | |
| a. Hydrophobicité de la surface des spores des combinaisons étudiées : | 34 |
| b. Caractères donneur et accepteur d'électrons de la surface des spores des combinaisons étudiées :..... | 34 |
| discussion: | 35 |
| B. Observation au Microscope (MEBE)..... | 36 |
| 1. Observation après 4h de Prétraitement | 36 |
| C. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)..... | 42 |
| Conclusion et Perspectives : | 45 |
| Annexe: | 47 |
| Références Bibliographiques : | 51 |



Introduction

« Nul n'a le droit d'effacer une page de l'histoire d'un peuple car un peuple sans histoire est comme un monde sans Ame » ; c'est au travers de cette phrase régulièrement citée par un célèbre éditorialiste que nous voulons attirer l'attention sur l'importance de la préservation du patrimoine historique d'un peuple.

En nous inscrivant dans cette logique il ne nous est nul besoin de faire les éloges de l'ancienne médina de Fès ; la plus belle et la plus envoûtante médina du Maroc avec un labyrinthe de 9.500 rues et d'un millier d'impasses grouillantes de petits marchands. On pourrait presque lire son histoire sur les façades de ces murs étroites.

Son inscription au patrimoine universel de l'humanité par l'UNESCO depuis 1981, met l'accent sur l'urgence quant à la question de sa préservation.

En effet sa traversée du temps lui a laissé beaucoup de cicatrices qui sont traitées tant bien que mal au cours des restaurations très coûteuses.

Par tous ces aspects, la présence des biofilms a un impact économique considérable. Il est absolument nécessaire d'éradiquer les biofilms nuisibles. La lutte contre les biofilms peut se définir selon deux axes principaux : empêcher la formation de biofilms, et lorsqu'ils sont déjà présents, les détruire.

C'est pourquoi nous essayons de contribuer à sa préservation en nous attaquant aux biofilms qui causent d'immenses dégâts sur toutes les structures en bois et notamment en bois de cèdres.

Ainsi, tout au long de notre travail, nous nous efforcerons d'apporter notre contribution dans la lutte contre les biofilms ; ainsi dans un premier temps nous étudierons l'évolution des caractéristiques physico-chimiques de la surface du bois de cèdre commercial à l'étape d'adhésion des spores de champignons : ce volet consiste à déterminer si l'étape d'adhésion est catalysée par une modification physico-chimique de la surface du bois par les spores qui s'y déposent. Puis nous testerons, dans un deuxième temps, le potentiel antiadhésif de deux huiles essentielles et de leurs principes majoritaires à cette même phase si cruciale d'adhésion des spores afin d'amorcer une lutte préventive face à la détérioration du patrimoine historique et millénaire de notre chère médina.



Revue bibliographique



I. Les biofilms :

1) Définition :

Dans les écosystèmes naturels, les micro-organismes vivent généralement au sein de communautés microbiennes appelées biofilms. Un biofilm est constitué de micro-organismes adhérant à une surface ou une interface en milieu humide ou aqueux (*Costerton et al., 1994*), on parle alors de communautés microbiennes sessiles. Ces micro-organismes sont englobés dans une matrice généralement constituée de polymères extracellulaires ou EPS ("extrapolymeric substances") sécrétés par ces mêmes micro-organismes. Les EPS renferment en majorité des polysaccharides macromoléculaires et en moindre mesure des protéines, des lipides et acides nucléiques (*Flemming et al., 1999 ; Sutherland, 2001*).

La formation de biofilm est un phénomène très commun et la majorité des matériaux en présence d'humidité sont contaminés par des microorganismes. Les communautés bactériennes ainsi formées peuvent être considérées comme des « refuges » vis à vis des phénomènes de compétition, de prédation et des conditions environnementales défavorables (*Korber et al. 1995*).

2) Les Etapes de la formation de biofilm :

La formation d'un biofilm sur une surface, est le résultat d'un ensemble de processus physique, chimique et biologique, et comprend quatre étapes successives (*Busscher, 1995*) :

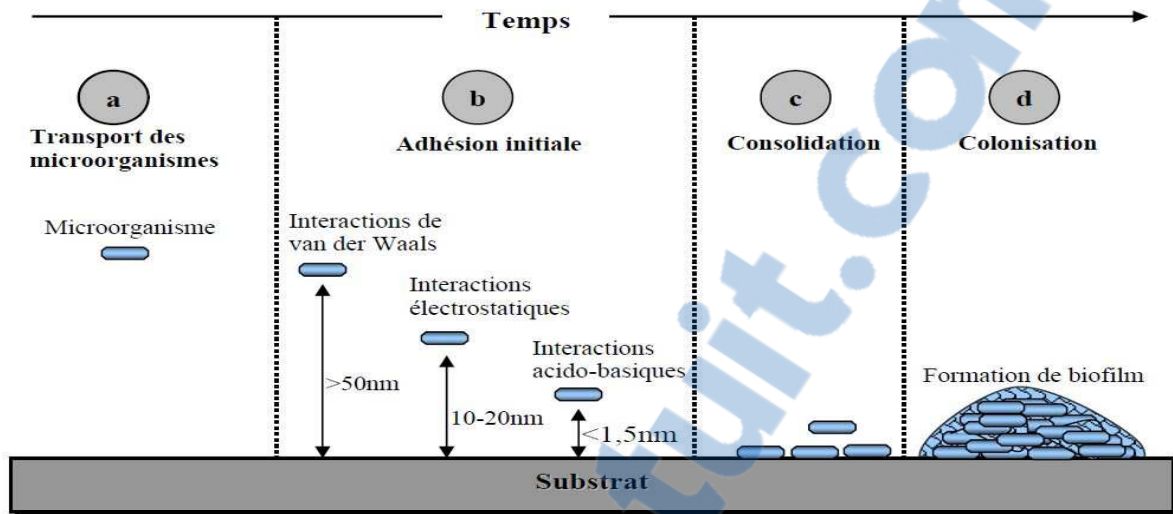


Fig. 1: Etapes de la formation d'un biofilm : a) Le transport des microorganismes, b) L'attachement des microorganismes sur la surface, c) La consolidation, d) La colonisation du support.

a) Transport :

Toute adsorption de microorganismes à une surface suppose le rapprochement de ceux-ci du support. Le transport des microorganismes vers la surface peut être correctement décrit en terme de diffusion pour les particules de petites tailles (0,01 à 0,1 μm) (Dickinson, 1982 ; Macguire & Krisdhasirna, 1992). Pour des particules de grandes tailles (0,5 à 10 μm), comme pour la plupart des microorganismes le transport dépend des conditions hydrodynamiques. Lorsque les forces de cisaillement sont nulles ou faibles (en conditions statiques ou en écoulement laminaire) les particules peuvent s'approcher de la surface par différents mécanismes (Characklis, 1983 ; Marshall, 1986 ; Characklis *et al.*, 1990) :

- **Sédimentation** : Ce phénomène est dû aux forces de gravité et devient prépondérant en cas d'agrégation ou de floculation des particules. (Dickson & Daniels, 1991 ; Banks & Bryers, 1992)
- **Mouvement brownien** : Chaque molécule ou chaque particule immergée dans un milieu liquide présente une énergie de Brown (Van Oss, 1996).

Ce mouvement brownien peut à lui seul provoquer la désorption spontanée de particules adsorbées à une surface si les forces d'adhésion sont par ailleurs suffisamment faibles. Ces forces sont négligeables dans le cas de particules de dimension supérieur à 1 μm .



- **Chimiotaxie** : Ce mécanisme apparaît lorsque les microorganismes mobiles flagellés sont capables de se déplacer vers des substances nutritives telles que les acides aminés ou les sources du carbone (sucres) grâce aux signaux détectés par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

b) Attachement :

Cette étape peut être considérée comme étape-clé de la formation des biofilms, vu qu'elle traduit l'affinité des microorganismes pour un substrat. Plus cette affinité est grande, plus la formation des biofilms est favorable. Elle peut être divisée en deux étapes principales :

- **L'adhérence**, correspond à une adsorption réversible des cellules. Cette étape ne fait intervenir que des processus physiques (interactions électrostatiques, électrodynamiques), et dépend de la nature du support et de son conditionnement préalable (présence de tubercules de corrosion, par exemple). Les microorganismes ne sont fixés que de manière réversible au support; ils se détachent facilement sous l'action de contraintes hydrodynamiques imposées par le milieu. Cette phase est en général aspécifique et de courte durée (5 à 10 heures) (Gauthier *et al.*, 1989).
- **L'adhésion ou fixation irréversible des bactéries**: cette étape est plus lente que la précédente, l'irréversibilité de l'adhésion faisant appel au métabolisme bactérien. En effet, la sécrétion d'exopolymères par les microorganismes leur permet de consolider leur adhésion au support, formant autour de la bactérie une enveloppe, appelée glycocalix.

c) Consolidation :

La consolidation de l'adhésion est réalisée par la synthèse de composés extracellulaires. Plusieurs études ont indiqué que l'attachement aux surfaces commence par un changement phénotypique de la cellule bactérienne qui favorise l'attachement et entraîne l'initiation des microcolonies (Caldwell *et al.*, 1983, Caldwell & Lawrence, 1986) et par conséquent la formation de biofilm.



d) Colonisation :

Dans des conditions favorables, lorsque les microorganismes sont fixés de manière irréversible au support, ils peuvent se multiplier (en quelques heures ou quelques mois selon la quantité de matière organique biodégradable disponible et le taux d'oxydant résiduel). Il y a alors accroissement de la biomasse et production de métabolites sécrétés par les microorganismes.

Cela dit, le cycle de la formation des biofilms n'est complet que lorsqu'une dernière étape dite de "dispersion" au cours de laquelle la structure du biofilm arrivée à maturation, s'éclate et les microorganismes, libérés, se refixent ailleurs sur un support afin de reprendre les étapes.

3) Interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion microbienne

Une fois les microorganismes arrivés à proximité des surfaces, ils adhèrent initialement par l'intermédiaire des interactions physico-chimiques. Ces interactions comprennent essentiellement (Van Oss, 1996) :

- les interactions de van der Waals ;
- les interactions électrostatiques ;
- et les interactions acido-basiques (donneur - accepteur d'électrons au sens de Lewis).

II. Biofilms, dégradations et moyens de lutte : (cas général)



Les biofilms sont à l'origine d'un certain nombre de dégradations (bâtiments, corrosion et perforation de la coque des bateaux, altération de machines...) et ont par conséquent un impact économique important. Les façades de nombreux bâtiments sont attaquées par des algues et des champignons organisés en biofilms et entraînent d'importantes dégradations. Les réparations nécessaires représentent un coût important (Wanner, 2006).

Les biofilms peuvent être en grande partie éliminés grâce à l'augmentation de la vitesse d'écoulement des effluents qui permet d'amplifier le cisaillement et donc de détacher le biofilm. Le nettoyage mécanique reste donc l'un des moyens les plus efficaces pour lutter contre les biofilms indésirables (Wanner, 2006). Il est nécessaire de développer des moyens de lutte efficaces et pérennes contre la formation de biofilms. De manière croissante ces dix dernières années, les recherches concernant les moyens de lutte contre les biofilms se multiplient.

Compte-tenu de l'importance considérable des biofilms et des problèmes qu'ils posent, de nombreuses pistes de recherche sont consacrées à la lutte contre la formation des biofilms. Ce sont souvent les nouvelles technologies qui sont utilisées.

a) Les nouvelles technologies au service de la lutte contre les biofilms :

- Il existe des revêtements destinés aux biomatériaux implantables, comme les sondes urinaires ou les cathéters veineux centraux, qui empêchent l'adhérence des micro-organismes. Des molécules chargées retardent la fixation de ces derniers par le jeu de forces de répulsion. Les antibiotiques ou le système immunitaire auraient alors le temps d'agir contre les micro-organismes non fixés (Donlan, 2008). Cette technique de lutte contre les biofilms reste néanmoins peu efficace car la matrice extracellulaire qui se forme autour des prothèses peut elle-même être initiatrice de la formation de biofilms (Bury-Moné, 2007) ;
- Pour inhiber l'adhésion des micro-organismes, on peut utiliser la vaccinologie. Des vaccins sont actuellement en cours de développement, comme par exemple les vaccins contre les caries, dirigés contre *Streptococcus mutans* (Bury-Moné, 2007). Le but de la vaccinologie est de former des IgA qui vont inhiber les phénomènes responsables de



- l'adhésion des micro-organismes (Donlan, 2008). Certains vaccins ont été efficaces sur des modèles animaux, mais beaucoup reste encore à prouver (Otto, 2008) ;
- On peut aussi essayer d'agir au niveau des molécules de signalisation du quorum sensing, afin de perturber l'architecture du biofilm et ses propriétés d'antibiorésistance (Donlan, 2008 ; Tomlin, 2005). Cette méthode semble très prometteuse ; Elle est, entre autre, utilisée en aquaculture et dans les revêtements des bateaux. Des études sur les mécanismes d'inhibition de la formation de biofilms ont été réalisées sur une algue rouge, *Delisea pulchra*, car elle ne porte aucun biofilm à sa surface. Elle sécrète des furanones, qui sont des homologues des homosérinelactones, substances exerçant un contrôle inhibiteur sur la communication bactérienne (Bury-Moné, 2007) ;
 - On peut lutter contre la formation de biofilms en inhibant la synthèse des exopolysaccharides de la matrice. Certaines souches de phages d'*Enterobacter agglomerans* produisent une enzyme capable de détruire la matrice extracellulaire puis d'infecter et de lyser les bactéries du biofilm (Bury-Moné, 2007) ;
 - L'utilisation d'ultrasons combinée à celle des antibiotiques permet d'éliminer des bactéries Gram-négative planctoniques ou sous forme de biofilms (Donlan, 2008) ;
 - Les recherches en génie génétique consistent à rechercher des gènes spécifiquement exprimés au sein des biofilms afin de créer de nouvelles cibles (Donlan, 2008).
 - Enfin, une méthode plus traditionnelle, mais ayant déjà fait ses preuves, consiste à appliquer de l'huile sur la matière à conserver (aliments, table de travail,...etc) afin d'empêcher le développement des microorganismes.

III. La Dégradation du bois :

La décomposition est un phénomène complexe influencé par l'activité et la demande en nutriments des hétérotrophes, par les conditions environnementales régulant ces activités et par des différences dans la sapidité et le contenu en nutriments des tissus selon les espèces, ainsi que par la mobilité des éléments nutritifs (Gosz *et al.*, 1973).

Ainsi donc le bois est dégradé par les microorganismes plus ou moins vite en fonction de différents paramètres et notamment l'humidité.



Parmi ces micro-organismes, les champignons jouent un rôle majeur (Swift, 1982). Les champignons sont des eucaryotes filamenteux à croissance axiale et apicale, et leurs hyphes sont équipés d'enzymes sur toute leur longueur ou seulement à l'apex de ces derniers (Reisinger et Kilbertus, 1980). La fragmentation du bois permet donc une meilleure pénétration des hyphes fongiques (Allison, 1973).

On peut classer les champignons décomposeurs du bois en trois types:

- Les champignons de pourriture molle: Ce sont surtout des *Ascomycètes* et des Champignons Imparfaites (Dommergues et Mangenot, 1970; Käärik, 1974; Kirk et Farrell, 1987; Eriksson *et al.*, 1990).
- Les champignons de pourriture brune : Ce sont généralement des *Basidiomycètes* et le mode d'attaque est caractérisé par une importante dégradation de la cellulose et des hémicelluloses qui sont métabolisées. Les champignons de pourriture brune sont essentiellement associés aux Gymnospermes et sont largement minoritaires comparativement aux pourritures blanches (Eriksson *et al.*, 1990).
- Les champignons de pourriture blanche : Ce sont surtout des *Basidiomycètes* et ce sont les organismes les plus efficaces pour dépolymériser la lignine (Toutain *et al.*, 1981; Eriksson *et al.*, 1990; Haider, 1992). Les pourritures blanches colonisent rapidement le bois et s'établissent dans toutes les cellules du xylème (Eriksson *et al.*, 1990). Ces champignons dégradent simultanément la cellulose et les hémicelluloses ainsi que la lignine qui sont alors métabolisées (Dommergues et Mangenot, 1970; Kirk et Fenn, 1982; Eriksson *et al.*, 1990).

Coriolus versicolor (L.) Quélet est l'un des basidiomycètes les plus communs dans l'altération du bois d'œuvre. Champignon de pourriture blanche, il cause la dégradation aussi bien de la lignine que de la cellulose et de l'hémicellulose (Dumonceaux *et al.*, 1998 ; Tanaka *et al.*, 1999). Il produit diverses enzymes fongiques extracellulaires dont la laccase, la peroxydase et la cellobiose déshydrogénase qui sont les plus importantes dans le processus lignocellulotique (Archibald *et al.*, 1997).

Les ventes semestrielles du bois d'œuvre au marché international sont estimées à plus de six milliards de dollars US. Ce secteur est dominé par le bois traité aux benzimidazoles, au



chromate acide de cuivre (CCA), à l'arséniat de cuivre chromé (ACC) et à l'arséniat de cuivre et zinc (ACZA), des fongicides dont l'usage est de plus en plus dénoncé en raison de leur grande toxicité (Deferera et al., 2000). En plus, un sérieux problème se pose sur l'efficacité de ces produits chimiques et qui consiste au développement de la résistance par les champignons pathogènes (Deferera et al., 2000). Pour cela, le développement de nouveaux produits de protection du bois d'œuvre ayant pour principes actifs des biomolécules naturellement présentes dans les plantes aromatiques et médicinales peut s'inscrire comme une solution écologique à un coût moindre (Haluk et al., 1998).

Les huiles essentielles de nombreuses plantes sont devenues populaires ces dernières années et leurs principes bioactifs ont conquis récemment plusieurs secteurs industriels (Ismail et al., 1990 ; Paster et al., 1990 ; Mahmoud, 1994 ; Adam et al., 1998).

IV. LES HUILES ESSENTIELLES

a) Définition :

La norme AFNOR NF T 75-006 définit une huile essentielle comme: « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Une huile essentielle ou huile aromatique est donc un mélange complexe de substances organiques aromatiques et liquides qu'on trouve naturellement dans diverses parties des plantes aromatiques.

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ces composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante.

Bien que ces plantes ne représentent que 1% des espèces végétales, certaines familles se caractérisent par le grand nombre d'espèces à essences qu'elles regroupent ; en particulier les *Labiés* (Thym, Menthe, Lavande, Origan, Sauge, etc.), les *Ombellifères* (Anis, Fenouil,



Angélique, Cumin, Coriandre, Persil, etc.), les *Myrtacées* (Myrthe, Eucalyptus) et les *Lauracées* (Camphrier, Laurier-sauce, Cannelle) (Benayad, 2008).

Ces huiles sont très concentrées, volatiles, sensibles à la chaleur et sont classées parmi les métabolites secondaires. Leur synthèse et accumulation se font généralement au niveau des structures histologiques spécialisées, souvent localisées sur la surface de la plante.

b) Propriétés des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques ; Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers. Ce qui a donné naissance à une nouvelle branche de la phytothérapie : l'aromathérapie (Delaquis et al., 2002).

Cependant, elles possèdent également des propriétés cytotoxiques qui les rapprochent donc des désinfectants en tant qu'agents antimicrobiens à large spectre (Hernandez, 2005).

Du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HES, il est probable que leur activité antimicrobienne ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, mais à plusieurs sites d'action au niveau cellulaire (Carson *et al.*, 2002).

Le mode d'action des HES dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane (Cox *et al.*, 2000; Carson *et al.*, 2002).

c) Caractéristiques chimiques :

Elles sont composées d'un mélange hétérogène complexe pouvant contenir plusieurs dizaines voire des centaines de constituants dont les teneurs relatives peuvent varier de l'état de trace à plus de 90% et sont subdivisées en deux grandes familles : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane.

Les terpénoïdes qui possèdent un rôle écologique lors des interactions végétales, comme agents allélopathiques, c'est-à-dire inhibiteur de la germination, mais aussi lors des interactions végétal-animal, comme agent de protection contre les prédateurs tels que les



insectes. Ils interviennent également, par leurs odeurs caractéristiques, dans l'attraction de pollinisateurs.

Il y a également en faibles proportions dans la constitution des huiles essentielles des acides organiques des cétones de faibles poids moléculaire et des coumarines volatiles (Paris et Hurabielle 1981).

Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides pariétales grâce à leurs groupes fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (Dorman et Deans, 2000).

d) Caractéristiques physico-chimiques

En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques, les huiles essentielles forment un groupe très homogène (Bernard *et al.*, 1988 ; Bruneton, 1993). Les principales caractéristiques sont :

- Liquides à température ambiante ;
- N'ont pas le toucher gras et onctueux des huiles fixes ;
- Volatiles et très rarement colorées ;
- Une densité faible pour les huiles essentielles à forte teneur en monoterpènes ;
- Un indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé, cependant une teneur élevée en dérivés oxygénés produira l'effet inverse ;
- Solubles dans les alcools à titre alcoométrique élevé et dans la plupart des solvants organiques mais peu solubles dans l'eau ;
- Douées d'un pouvoir rotatoire puisqu'elles sont formées principalement de composés asymétriques ;
- Très altérables, sensibles à l'oxydation et ont tendance à se polymériser donnant lieu à la formation de produits résineux, il convient alors de les conserver à l'abri de la lumière et de l'air.

e) Activité antifongique



Ainsi l'activité fongistatique des composés aromatiques semble être liée à la présence de certaines fonctions chimiques (Voukou *et al.*, 1988). Ils concluent que les phénols (eugénol, chavicol 4-allyl-2-6-diméthoxyphénol) sont plus antifongiques et que les aldéhydes testés (cinnamique et hydrocinnamique). Ils présentent également des propriétés fongistatiques très marquées. Les groupements méthoxy, à l'inverse, ne semblent pas apporter à ce type de molécules une fongitoxicité significative. Cette activité est estimée selon la durée d'inhibition de la croissance déterminée par simple observation macroscopique. L'activité antifongique décroît selon le type de fonction chimique :

Phénols > Alcools > Aldéhydes > Cétones > Ethers > Hydrocarbures

Parmi les aldéhydes aliphatiques, le cinnamaldéhyde s'est révélé le plus actif. En ce qui concerne les composés phénoliques, l'activité antifongique augmente avec l'encombrement stérique de la molécule (p-n-propylphénol > thymol > isoeugénol > eugénol) (Utree *et al.*, 2002).



Matériels et Méthodes

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A. Matériels :

1. Les Souches fongiques et conditions de culture

Toutes les souches de champignons sur lesquelles nous avons travaillé avaient été isolées et identifiées au sein même de notre laboratoire à partir des bois prélevés dans des habitations en dégradation de l'ancienne médina de Fès. Il s'agit de :

- *Penicillium commune;*
- *Thielavia hyalocarpa ;*
- *Penicillium chrytosum;*
- *Penicillium commun;*



- *Penicillium expansum*.

Ces souches peuvent dégrader, du fait de leur capacité à adhérer au bois, les macromolécules de ce dernier (cellulose, hémicelluloses, lignine...) grâce à leur potentiel enzymatique et les utilisent comme substrat pour leur croissance.

Etant donné que nous travaillons sur des champignons nous avons choisi l'Extrait de Malt 2% comme milieu de culture aussi bien pour le repiquage que pour les différents tests réalisés ; sous la forme liquide (tubes) ou gélosée (boîtes de pétrie). (Voir Annexe1)

2. Support utilisé :

- Origine et Dimensions :

Le support utilisé ici dans notre étude est le bois de cèdre local qui est largement utilisé dans la construction des habitations à l'ancienne médina de Fès afin de travailler dans les conditions les plus proches du terrain. Cela dit nous avons pris la peine de passer quelques recommandations aux artisans qui nous l'ont fourni à savoir :

- de les découper dans des dimensions qui nous permettraient d'incuber les morceaux de bois sans difficultés dans les boîtes de pétrie ; ainsi donc les dimensions sont de :
 - ✓ pour le test d'Adhésion : Longueur : 3,2cm ; largeur : 1cm ; épaisseur : 0,4cm ;
 - ✓ Et pour le test d'Inhibition : Longueur : 4,8cm ; largeur: 1cm ; épaisseur : 0,4cm.
- Puis de les polir afin que les tests réalisés ne soient pas affectés par l'irrégularité des surfaces de ces morceaux de bois (facteur très important).

3. Huiles Essentielles et Principes Majoritaires :

Les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... L'essence de thym est souvent rapportée comme étant parmi les huiles les plus actives (AgnihotriA. , 2003 ; et Bourrel C. , 1993).



Etant donné la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles, malgré de possibles synergies certains auteurs préfèrent étudier l'effet d'un composé isolé pour pouvoir ensuite le comparer à l'activité globale de l'huile.

C'est également dans cette optique que nos recherches ont été orientées ; ainsi donc nous avons choisi de tester comme huiles essentielles l'Origan et le Thym extraites respectivement de l'*Origanum vulgare* et du *Thymus vulgaris* et comme principes majoritaires le Thymol et le Carvéol.

L'huile essentielle d'Origan vulgare est très étudiée et surtout très utilisée. En fonction de son origine sa composition est très variable (Veres K. et al; 2003). Par conséquent, le rendement fluctue aussi fortement (B.M. LAWRENCE. 1984 rapporte des chiffres allant de 0,5% à 2,9 %).

Le Thymol est un constituant majeur des huiles essentielles du Thym (*Thymus vulgaris* et *Thymus pulegioides*). Le thymol utilisé seul montre une activité significativement plus forte que l'huile essentielle du Thym (*Thymus vulgaris*) sur les espèces *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* et *Mucor*. Globalement il a été rapporté dans une étude que le thymol a une activité inhibitrice trois fois plus forte que l'huile de Thym prise dans son ensemble (Klaric MS. Et al. 2006).

Dans des préparations pharmaceutiques, les terpènes phénoliques, comme le thymol et le carvacrol, sont souvent utilisés comme antiseptiques, antibactériens et antifongiques. Le thymol est très irritant, astringent et caustique. La dose de thymol applicable sur la peau et les muqueuses est de 0,5%. Ingré à la dose de 2 g ou à plus fortes doses, il est responsable de gastralgies avec nausées (Zambonelli A. et al.; 2004).

Le thymol est sous forme de poudre cristallisé, est mis en émulsion dans un bain-marie à 50°C puis, mis à une concentration de 10% dans une solution de 0,2% d'agar (solution mère)
Le carvéol, lui, est utilisable directement.

II. Méthodes :

1. Conservation des souches : (voir Annexe 2)

2. Lavage et Préparation du support :



Les morceaux de bois de cèdre commercialisés chez les artisans, polis et taillés dans les dimensions indiquées précédemment, sont lavés à 6 reprises avec de l'eau distillée puis séchés, numérotés et emballés séparément dans du papier aluminium pour stérilisation classique par autoclavage.

3. Méthode d'Adhésion :

L'objectif de notre étude étant de lutter contre la formation de biofilms en s'attaquant à l'étape de l'adhésion ; il nous était d'abord impératif de nous assurer que ces souches de champignons que nous étudions pouvaient bien franchir avec succès la première étape de la formation des biofilms. Nous avons réalisé ce test d'Adhésion en appliquant séparément les spores de chacune de nos souches sur la face supérieure des morceaux de bois ; Et pour cela nous avons procédé aux manipulations suivantes :

a. Culture des souches :

Tout au long de notre travail, la culture et le maintien de nos cinq souches ont été réalisés dans la gélose à l'Extrait de Malt 2% telle que décrite par Zyani et al.2011, en procédant à des repiquages par des stries très serrées dans le but d'obtenir, au terme de l'incubation de 7 jours à 30°C, un tapis fongique complet qui nous fournirait un maximum de spores.

b. Récolte, concentration et comptage des spores :

La récolte des spores est réalisée dans une solution de KNO_3 à 0,1 M en raclant la surface du tapis avec un racloir en verre. Elle joue un rôle très important car elle nous permettrait d'éliminer les effets des interactions Electrostatiques, dont nous ne disposons pas de l'appareil adéquat pour la mesure afin, qu'ils ne perturbent pas le bon déroulement de l'expérience. La préparation de la solution de KNO_3 consiste à dissoudre 5,055g de KNO_3 en poudre dans 500ml d'E.D.S et est utilisable après autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.

Nous avons réalisé la suspension de spores de chacune des souches fongiques dans deux tubes de centrifugation de 50ml puis procédé à la concentration des spores par centrifugation à



10000rpm pendant 15min à 4°C (El Abed S. et al. 2010). Nous avons par la suite versé les surnageants (KNO₃) et mélangé les culots des deux tubes pour obtenir une plus forte concentration de spores.

L'étape du comptage est réalisée au grossissement x40 du microscope optique à l'aide d'un hématimètre (Malassez) en y déposant un volume de 10 à 15µl de la suspension de spores et en la recouvrant d'une lamelle. Il est question par la suite de totaliser les spores présentes dans chacune des vingt petites cellules qui occupent un volume de 0,2 mm³ et d'en fin obtenir, la concentration des spores dans 1ml. Notre objectif à ce stade est d'arriver à des concentrations comprises dans l'intervalle de 10⁷ à 10⁸ spores/ml.

c. Cinétique d'adhésion :

Les morceaux de bois lavés, séchés et numérotés sont disposés et collés dans les petites boîtes de pétri. A cette étape, pour chacune des souches étudiées, nous avons mis 6 bois qui correspondent respectivement à des temps d'incubation de 2h, 4h, 6h, 8h, 10h et 24h. Puis la suspension de spores réalisée précédemment est coulée dans ces boîtes de pétri jusqu'à immersion totale des morceaux de bois. Notre objectif était de déterminer si au cours du temps la physico-chimie de la surface du bois allait être modifiée ou pas.

Ainsi, au terme des temps indiqués, un morceau de bois est retiré de chaque boîte de pétri correspondant à chacune des souches puis rincé et posé à température ambiante dans une boîte stérile pour séchage pendant une nuit.

Dans certaines études les chercheurs avaient mis en contact le bois avec un volume de 10ml de leurs suspensions microbiennes pendant 10 h à 25°C ; et avaient ensuite éliminées les cellules non adhérentes en rinçant manuellement et délicatement le substrat trois fois avec de l'eau distillée stérile (Herald et Zottola, 1988 ; Braindet et al. 1999, Hamadi et al. 2005).

d. Mesure de l'Angle de Contact ;

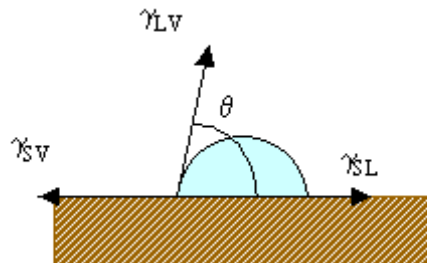
La mesure d'angle de contact rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface par mouillabilité. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil d'une goutte

déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. Elle permet de calculer l'énergie de surface du liquide ou du solide.

- *Principe*

Une goutte d'un liquide déterminé (nous avons utilisé pour notre étude l'Eau, le Diodométhane et le Formamide) est déposée sur une surface solide plane. Une photo de la goutte est prise à incidence rasante. Après numérisation du contour de la goutte, l'angle que fait la tangente à la goutte au point triple solide-liquide-gaz et la surface solide est calculé.

Cet angle est appelé angle de contact (Θ).



Plus le matériau mesuré a d'affinités avec le liquide, plus la goutte va s'étaler et l'angle de contact sera faible. Moins il y a d'affinités entre le solide et le liquide plus la goutte restera sphérique et l'angle de contact sera élevé.

La Photo du dispositif de l'appareil de mesure de l'angle de contact est présentée ci-dessous :

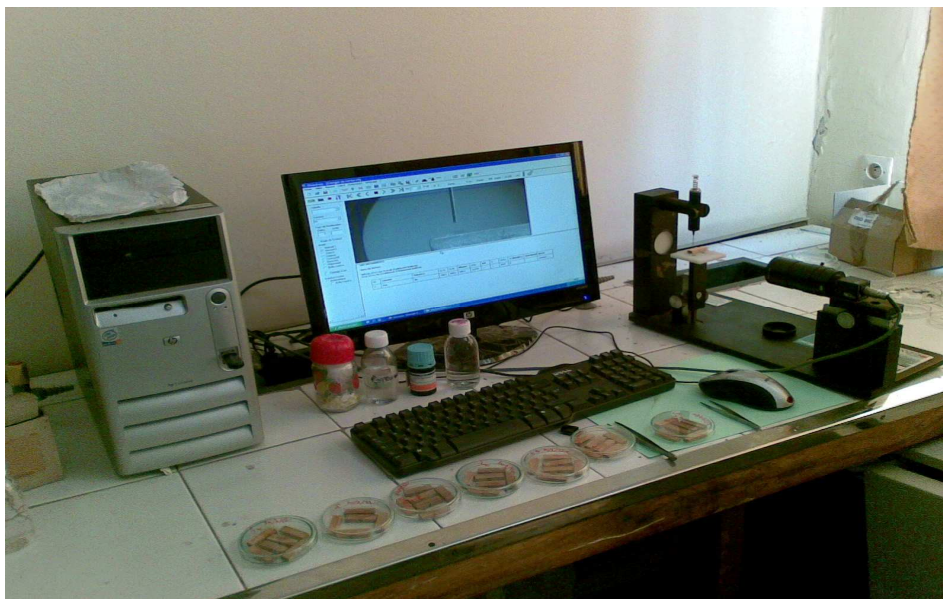


Fig. 2 : Photo du dispositif de l'appareil de mesure de l'angle de contact

La mesure de cet angle nous donne deux types d'information :

- Déterminer l'affinité d'un liquide vis-à-vis d'une surface, dans le cas de l'eau, le caractère hydrophobe (grand angle, faible énergie de surface) ou hydrophile (petit angle, grande énergie de surface) de la surface.
- Si on utilise plusieurs liquides de référence différents, on peut accéder à l'énergie libre de la surface, tout en discriminant les composantes polaires ou apolaires de cette énergie en utilisant le modèle de Good Van Oss ou celui de Owens et Wendt.

Le logiciel WINDROP installé dans l'ordinateur permet de mesurer les angles de chaque côté de la goutte (à Droite et à Gauche) par traitement de l'image.

Tableau 2: Caractéristiques énergétiques (mJ.m^{-2}) de liquides purs utilisés pour mesurer les angles de contact (Van Oss 1996)

| Liquides | γ_{LW} (mJ.m^{-2}) | γ_{+} (mJ.m^{-2}) | γ_{-} (mJ.m^{-2}) |
|---------------|---|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Eau | 21,8 | 25,5 | 25,5 |
| Formamide | 39 | 2,3 | 39,6 |
| Diiodomethane | 50,5 | 0 | 0 |

e. Calcul de l'énergie de surface :

La forme d'une goutte à la surface d'un solide est régit par 3 paramètres :

- La tension interfaciale solide-liquide γ_{SL} ;
- La tension interfaciale solide-vapeur γ_{SV} (γ_{S}) ;
- La tension interfaciale liquide-vapeur γ_{LV} (γ_{L}).

Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation de Young- Van :



$$\Delta G_{iwi} = -2\gamma_{iw} = -2 \left[(\gamma_i^{LW})^{1/2} - (\gamma_w^{LW})^{1/2} \right]^2 + 2 \left[(\gamma_i^+ \gamma_i^-)^{1/2} + (\gamma_w^+ \gamma_w^-)^{1/2} - (\gamma_i^+ \gamma_w^-)^{1/2} - (\gamma_w^+ \gamma_i^-)^{1/2} \right]$$

4. Méthode d'inhibition :

a. Prétraitement des morceaux de bois :

Nous avons procédé de deux façons :

- ✓ D'abord nous avons ajouté 10 μ l (ou à 10% pour le Thymol) d'huile essentielle à un volume de 11ml d'Agar à 0,2% (Remmal et al. 1993) suffisant pour immerger les morceaux de bois. Puis après une bonne agitation pour homogénéiser, nous avons coulé le tout dans les boites de pétri dans lesquelles sont disposés les morceaux de bois. Enfin nous les avons pré-incubés pendant 4h à température ambiante au terme desquelles, ils sont rincés et mis dans des boites stériles pour séchage overnight. Le bois est alors prêt pour la phase du test d'adhésion le lendemain ;
- ✓ Puis nous avons opté pour un prétraitement direct ; c'est-à-dire nous avons appliqué différents volumes de 50 μ l ; 40 μ l ; 30 μ l ; 20 μ l ; 10 μ l et 5 μ l des huiles essentielles et leurs principes majoritaires directement sur les morceaux de bois. Les H.E. étant



hydrophobes, s'étalent sur toute la surface du bois ; c'est pourquoi nous avons demandé à nos artisans fournisseurs, d'augmenter de moitié la taille des morceaux de bois utilisés pour les tests d'inhibition : La phase du test d'adhésion est tout de suite amorcée.

b. Incubation :

L'incubation des morceaux de bois prétraités avec la solution de spores, est réalisée telle que décrite précédemment pour le test d'adhésion pendant une durée de 10h à 30°C.

c. Détermination de la CMI : (souches Planctoniques)

Nous avons opté pour la technique des disques de papier Watman. Nous avons préparé des cultures liquides de chacune des souches fongiques dans de l'extrait de malt (7 jours à 30°C sous agitation) dont nous avons étalé 100µl sur des milieux gélosés ; puis après disposition des disques nous y avons déposé 5µl de différentes dilutions des H.E. 1/500 ; 1/400 ; 1/300 ; 1/200 et 1/100 réalisées dans de l'Agar à 0,2%. Par la suite aussi procédé à d'autres dilutions moins importantes de l'ordre de 1/80 ; 1/60 ; 1/40 ; 1/20 (et 1/10 et 1 ; 1/2 ; 1/4 ; 1/6 et 1/8 pour le Thymol).

Les boîtes sont scellées à l'aide de parafilm et l'incubation est toujours réalisée à 30°C pendant 7 jours.

5. Observation au Microscope Electronique à Balayage Environnemental (M.E.B.E.)

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy) est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons balaie la surface d'un échantillon à analyser qui, en réponse, réémet certaines particules. Différents détecteurs permettent d'analyser ces particules et de reconstruire une image de la surface. Dans la pratique, un grand nombre de constructeurs proposent désormais des microscopes à balayage équipés de détecteurs d'électrons secondaires et dont la résolution se situe entre 1 et 20 nm.

a. Principe Général:



Un faisceau très fin d'électrons, monocinétique, balaie la surface d'un échantillon sur laquelle se produisent des interactions détectées par un capteur qui contrôle la brillance d'un oscilloscope cathodique dont le balayage est synchronisé avec celui du faisceau d'électrons. Il est ainsi possible de comparer le MEB à un système de télévision en circuit fermé.

La figure A.1 montre le schéma de principe d'un MEB : une sonde électronique fine est projetée sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre la sonde électronique et l'échantillon génère des électrons secondaires, de basse énergie, qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires amplifiant le signal. À chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact qui détermine le rendement en électrons secondaires et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

La sonde électronique fine est produite par un canon à électrons qui joue le rôle d'une source réduite par des lentilles électroniques agissant vis-à-vis du faisceau d'électrons comme des lentilles conventionnelles. Des bobines disposées selon les deux axes perpendiculaires à l'axe du faisceau et parcourues par des courants synchronisés permettent de soumettre la sonde à un balayage du même type que celui de la télévision. Les lentilles électroniques, qui sont généralement des lentilles magnétiques, et les bobines de balayage forment un ensemble que l'on appelle la colonne électronique. (Cours de M. Perrin ; CMEBA, Université de Rennes I)

6. Optimisation des paramètres :

Dans la deuxième phase de notre travail nous avons procédé à l'observation de nos échantillons après traitement au Centre Universitaire Régional et d'Interface (C.U.R.I.) sur un MEB de type **Quanta 200 FEI équipé de sonde EDAX** pour microanalyse de surfaces. Il présente les performances suivantes:

- Différents modes de vides (High Vacuum, Low Vacuum et ESEM).
- Observations de tout type d'échantillons : isolant, conducteur biologique
- Grossissement optique de 20 à 500000 de fois (+ grossissement numérique)
- Résolution : 3.5nm.
- Tension d'accélération de 0.5 à 30KV

- 4 axes complètement motorisés.
- Analyseur EDAX muni d'un logiciel.
- Genesis 2000i pour intégration avec le Quanta.
- Platine Peltier pour des observations à des températures variant de -2 à 60°C.



Fig. 3 : photo du dispositif de l'appareil du MEB du centre C.U.R.I.

6. Quantification de l'adhésion avant et après traitement par le logiciel Matlab :

Le logiciel Matlab de version 7. 1 permet de quantifier l'adhésion en évaluant la surface du support occupé par les spores ; et par conséquent permet de déterminer l'efficacité à l'étape d'inhibition des huiles essentielles et des composantes majoritaires. Il est obtenu en jouant sur le contraste de l'image du MEB en visualisant la surface du support en noir et les spores en blanc ou inversement.

Il y a une autre technique dite classique qui se veut une alternative au MEB pour déterminer le taux d'adhésion des spores. Elle consiste à d'abord procéder au test d'adhésion normalement tel que décrit précédemment avec une concentration de spores comprise entre 10^7 et 10^8



spores par millilitre puis de récupérer au terme du temps d'incubation de 10h à 30°C des morceaux de bois le liquide de rinçage et de déterminer la concentration de spores restante. La quantité de spores qui aurait adhérees à la surface du bois pourra être estimée par déduction. Cela dit, cette technique est loin d'être précise et demande surtout beaucoup de temps (facteur crucial dans la recherche).

Résultats et Discussions



III. Résultats et Discussions :

A. Propriétés physico-chimiques et Caractérisations de la surface du substrat et la surface des spores: hydrophobicité et caractère donneur-accepteur d'électrons.

Telle que mentionné dans la partie précédente de ce rapport, nous avons déterminé l'hydrophobicité par la méthode de l'angle de contact qui est une méthode simple et rapide. Les propriétés acido-basiques des échantillons sont obtenues à partir des mesures d'angles de contact effectuées avec de l'Eau, du Diiodométhane et du Formamide.

Les graphes 1, 2, 3, 4 et 5 suivants regroupent, pour chacune des souches de spores et le bois de cèdre, les résultats des mesures des angles de contacts des trois solutions ainsi que les composantes de Lifshitz-Van der waals (γ^{LW}), donneur d'électrons (γ) et accepteur d'électrons (γ^+), obtenus par calcul à partir de l'équation de Yong-Van Oss (1988) ; cela afin de mieux observer l'évolution de la physico-chimie de la surface du bois tout au long du temps d'incubation de 24h, c'est-à-dire le temps nécessaire pour l'adhésion des spores. En fait au départ nous comptons également établir une cinétique de l'adhésion de nos différentes souches sur le bois de cèdre, mais il s'agit pour les résultats que nous avons de l'impact de la variation des paramètres physico-chimiques de la surface du bois et non d'une cinétique d'adhésion des spores.



Selon Vogler (1998), la surface des matières biologiques sont dites hydrophobes lorsqu'elles présentent des valeurs de l'angle de contact avec l'Eau supérieures à 65° ; et elles sont dites hydrophiles lorsque l'angle avec l'Eau est inférieur à 65° . De même qu'une valeur positive de ΔG_{wi} signifie que la matière biologique est hydrophile et une valeur négative indique qu'elle est hydrophobe.

1. Caractéristiques physico-chimiques du bois :

Le tableau 3 suivant regroupe les caractéristiques physicochimiques de la surface de l'échantillon du bois de cèdre commercial que nous avons analysé au sein de notre laboratoire.

Tableau 3 :Caractérisation de l'Hydrophobicité et composantes de l'énergie de surface de la surface du bois de cèdre

| Support utilisé : | Angles de Contact ($^\circ$) | | | Tension de Surface: composantes et paramètres (mJ.m^{-2}) | | | ΔG_{wi} |
|--------------------------|--------------------------------|------------|------------|--|------------|------------|-----------------|
| | θ_w | θ_F | θ_D | γ_{LW} | γ_+ | γ_- | |
| Bois de cèdre commercial | 123,1 | 29,6 | 17,2 | 48,4526109 | 10,5900511 | 40,7174128 | -1,03 |

a. Hydrophobicité de la surface du bois de cèdre:

En se basant sur le principe de Vogler, énoncé précédemment, nous pouvons dire que ce bois étudié présente un caractère fortement hydrophobe révélé par un $\theta_w = 123,1^\circ$ qui est largement supérieur à 65° et un $\Delta G_{wi} = -1,03$ négatif (inférieur à 0).

Ce résultat n'est pas celui auquel on pourrait s'attendre lorsqu'on sait que le bois est constitué principalement de cellulose et d'hémicellulose qui sont à caractères hydrophiles (Okamoto et al. 2000).



On peut cependant expliquer cette modification du caractère hydrophobe/hydrophile de la surface du bois en l'imputant aux prétraitements (et notamment à la chaleur) qu'auraient subi le bois de cèdre avant sa commercialisation.

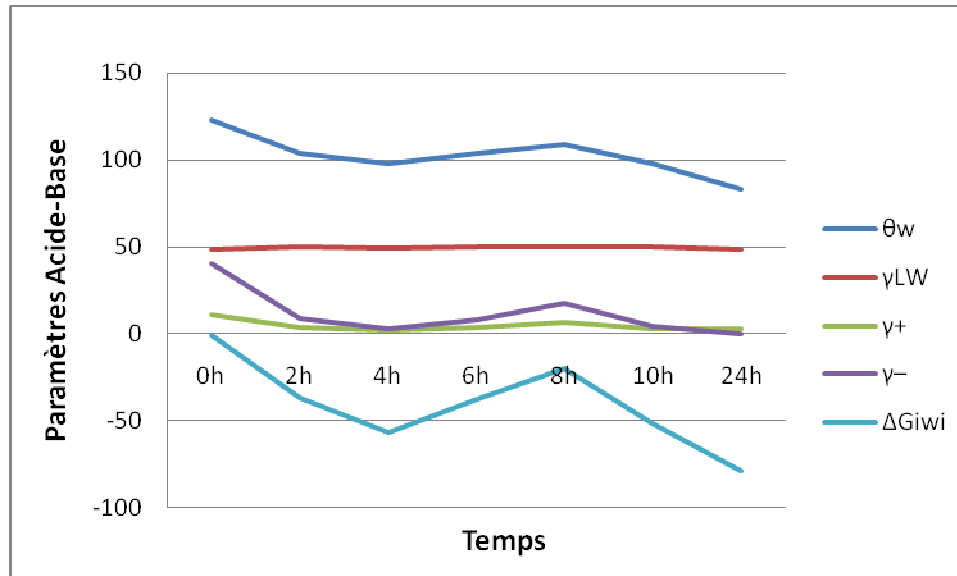
b. Caractère donneur d'électrons et accepteur d'électrons du bois :

Nous pouvons constater selon les résultats consignés dans le tableau 3 que le caractère donneur d'électrons de la surface du bois est significativement plus élevé que l'électron-accepteur : $\gamma^- = 40,717$; $\gamma^+ = 10,59$ et un caractère de Lifshitz van der Waals de 48,452. Ces résultats indiquent donc une basicité de la surface.

Les résultats de nos travaux sur le bois sont en partie en accord avec les travaux de VanOss (1995) et d'El Abed Soumya (2008). Ils ont observé tout comme nous un caractère hydrophobe du bois mais présentent qu'un caractère électron donneur-accepteur faible et relativement proches.

2. Caractéristiques physico-chimiques de la surface des spores de Thielavia hyalocarpa:

Les caractéristiques physicochimiques de la surface des spores de la souche fongique *Thielavia hyalocarpa* sont regroupées dans le tableau 4 (Voir Annexes 3) et représentées sur les courbes du graphe1 suivant:



Graphe 1 : évolution des paramètres physico-chimiques de la surface du bois de cèdre et de celle des Spores de *T. hyalocapra* (*Pdlb3*)

a. Hydrophobicité de la surface des spores de *Thielavia hyalocapra*:

Tout comme pour la surface du bois, celle des spores tout au long des 24h présente des caractères fortement hydrophobes tel que représenté dans le graphe1 avec notamment un pic après 8h d'incubation.

Certaines études ont montré que c'est aux alentours de 8h à 10h d'incubation que les spores adhèrent de façon irréversible à la surface du bois.

La courbe des ΔG_{iwi} se maintient toujours dans la zone négative et par conséquent confirment le caractère hydrophobe de la surface des spores de *Thielavia hyalocapra*.

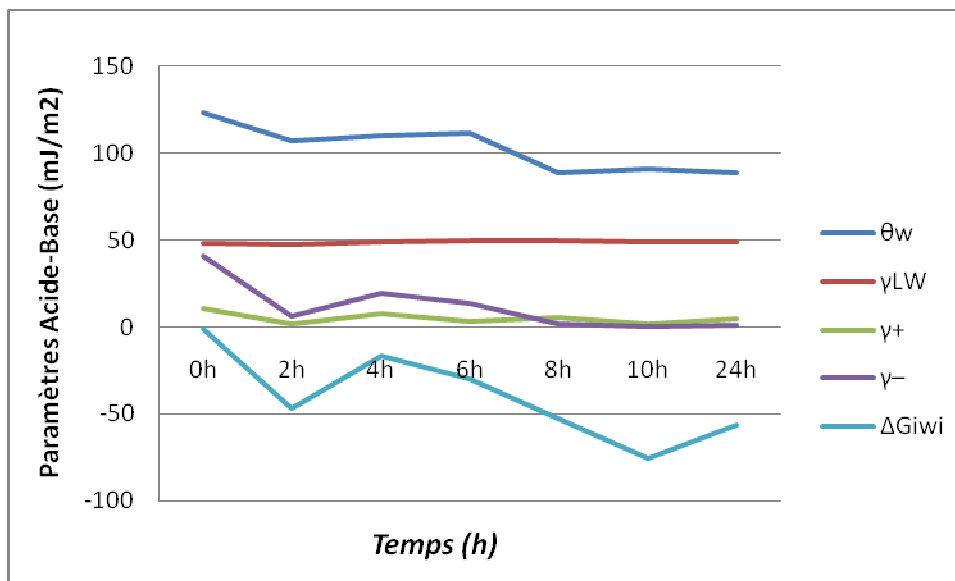
b. Caractères donneur d'électron et accepteur d'électrons des spores de *Thielavia hyalocapra* :

Les résultats indiquent que les spores de la souche *Thielavia hyalocapra* présentent une surface à caractère légèrement plus électron-donneur qu'électron-accepteur avec un caractère

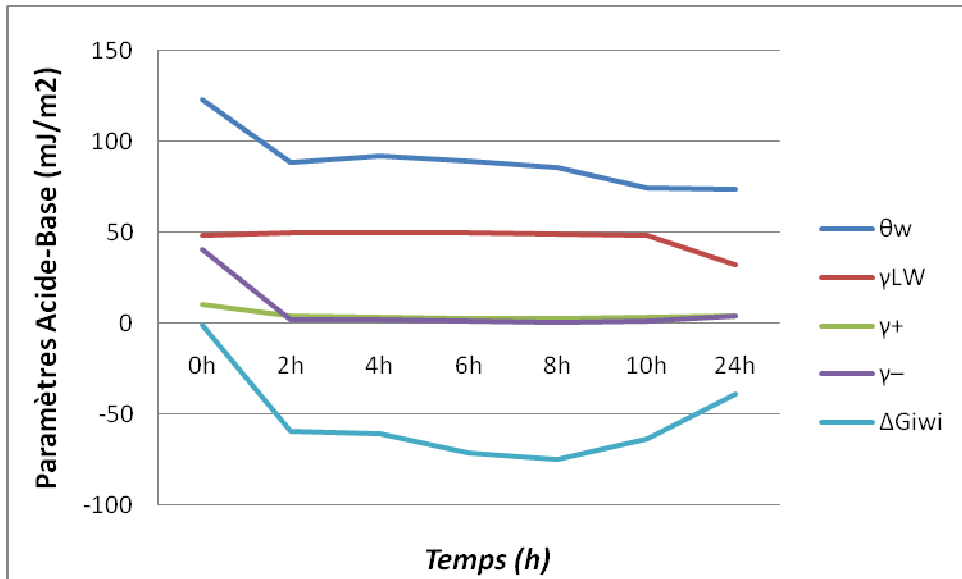
donneur d'électrons plus significatif à 8h. Nous constatons également la constance durant l'expérience du caractère de Lifshitz van der Waals.

3. Caractéristiques physico-chimiques de la surface des spores du genre *Penicillium* :

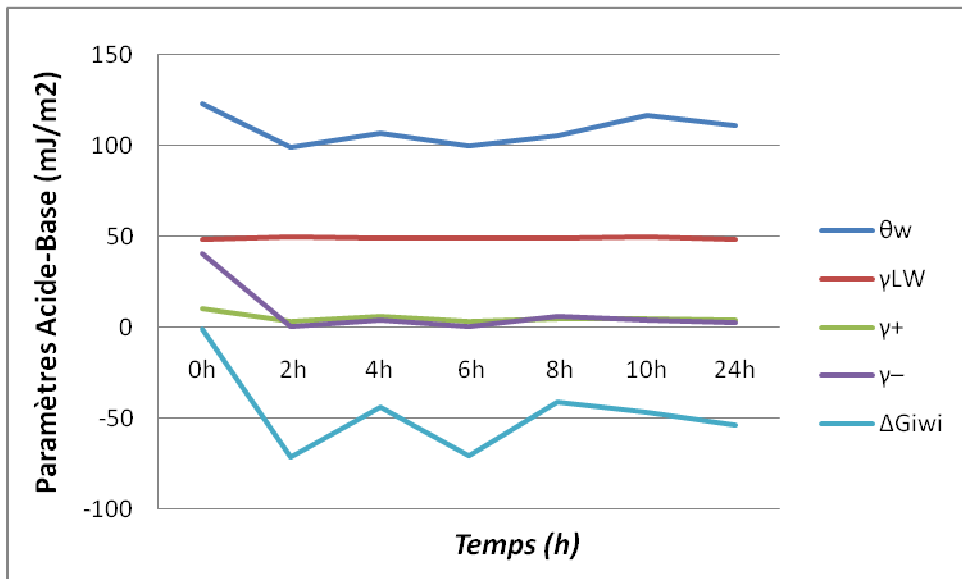
L'analyse des graphes 2, 3, 4 et 5 suivants qui représentent les résultats des caractéristiques physicochimiques des spores du genre *Penicillium*, permet une observation assez intéressante surtout du point de vue comparatif avec la physicochimie initiale du bois de cèdre que nous décrypterons au fur et à mesure.



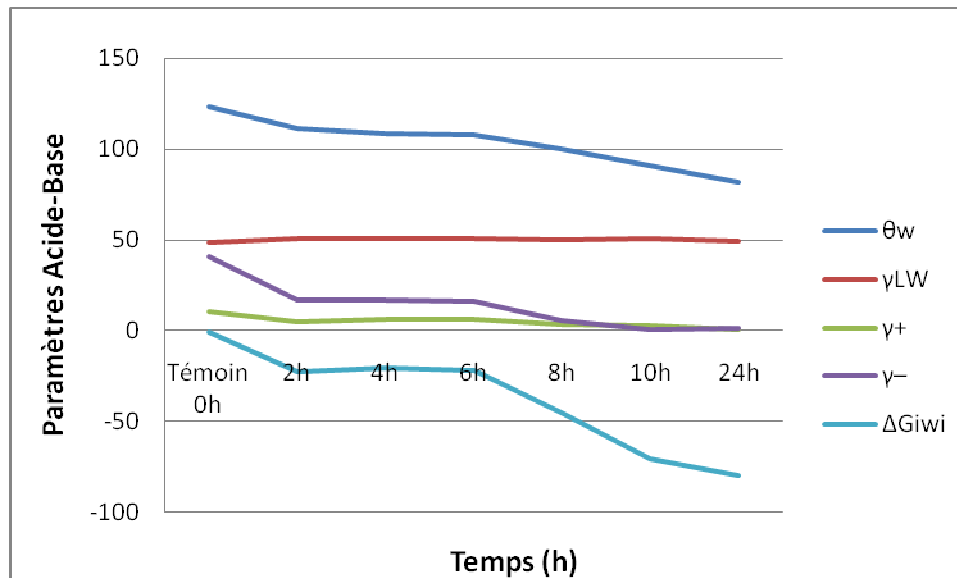
Graphe 2 : évolution des paramètres physico-chimiques de la surface du bois de cèdre et de celle des Spores de *P. commune*



Graphe 3 : évolution des paramètres physico-chimiques de la surface du bois de cèdre et de celle des Spores de *P. chrytosum*



Graphe 4 : évolution des paramètres physico-chimiques de la surface du bois de cèdre avec les Spores de *P. commun*



Graph 5 : évolution des paramètres physico-chimiques de la surface du bois de cèdre avec les Spores de *P.expansum*

a. Hydrophobicité de la surface des spores des souches du genre *Penicillium*

Au cours de notre analyse, nous ne tiendrons pas compte des légères fluctuations dans les courbes qui peuvent s'expliquer de multiples façons mais faisons une lecture globale de l'évolution de nos différents paramètres.

Ainsi donc, du point de vue de l'hydrophobicité, nous constatons toujours un caractère hydrophobe bien marqué chez les quatre souches. Bien que l'angle θ_w de l'eau pour la souche *P. chrystosum* ($\theta_w = 73,7$) soit très proche de la limite de 65° établie par Vogler, la surface des spores de nos quatre souches du genre *Penicillium* demeure hydrophobe.

Cela est d'ailleurs confirmé chez elles par le maintien de toutes leurs $\Delta Giwi$ en dessous de zéro tout au long de la durée de l'incubation.

b. Caractères donneur d'électrons et accepteur d'électrons des spores du genre *Penicillium* :



L'analyse des données des tableaux (voir Annexe 3) et des graphes nous permet de dresser le constat suivant :

- La surface des quatre souches du genre *Penicillium* présente des caractères de donneurs et d'accepteurs d'électrons assez semblables. En effet, ces dernières sont très faibles et relativement proches sur toute la durée du test.
- parallèlement, nous relevons aussi que la composante du caractère de Lifshitz van der Waals, elle, s'est maintenue constante chez tout le genre *Penicillium* que nous avons étudié.

4. Caractéristiques physicochimiques de la surface des spores des combinaisons étudiées :

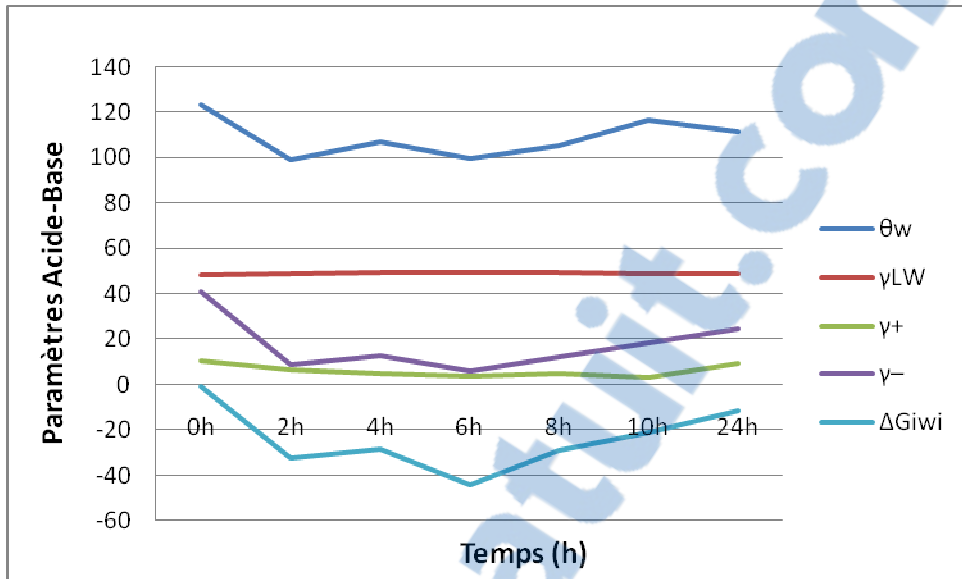
En partant du principe que dans la nature les biofilms ne sont en aucun cas des structures homogènes ne renfermant qu'une seule espèce microbienne, nous avons voulu essayer de comprendre en commençant déjà par des combinaisons de deux souches de spores, l'évolution des paramètres physico-chimiques de la surface au cours du temps.

Pour cela, nous avons procédé de la même manière que pour le test d'adhésion ; Puis les suspensions de spores réalisées sont d'abord mélangées (V/V) dans un même tube de centrifugation après concentration et comptages des spores (entre 10^7 et 10^8 spores/ml) ; puis coulées dans les boîtes de pétri jusqu'à immersion totale des morceaux de bois.

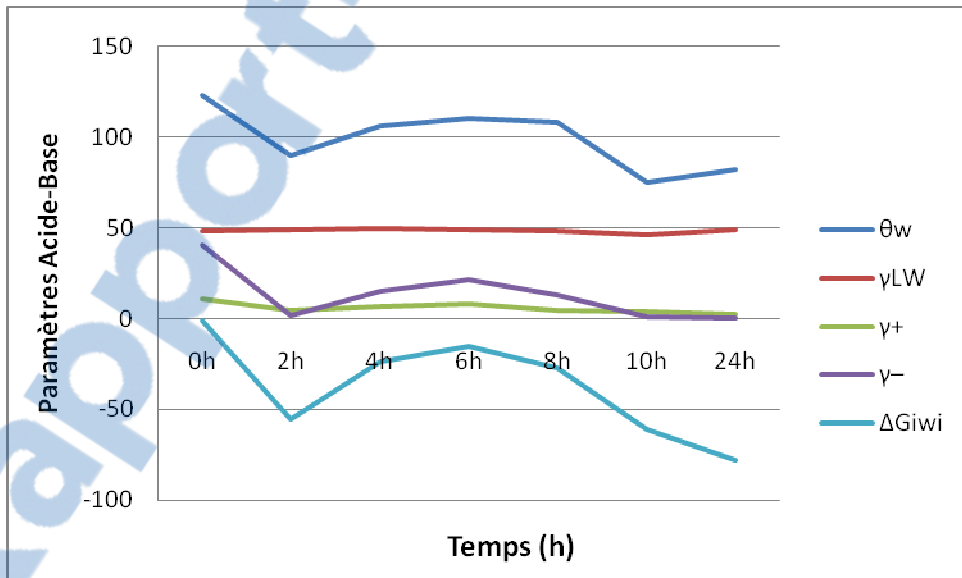
Les paramètres de l'incubation sont les mêmes c'est-à-dire de 30°C et qu'un morceau de bois est retiré et rincé au terme du temps imparti (Herald et Zottola, 1988 ; Braindet et al. 1999, Hamadi et al. 2005).

Ceci n'ayant jamais été réalisé auparavant, nous tentons pour la première fois, dans ce travail, d'évaluer l'impact de la modification de la physico-chimie de la surface du bois de cèdre.

Ainsi donc les tableaux et les graphes suivants présentent leurs caractéristiques.



Graph 6 : évolution des paramètres physico-chimiques de la surface du bois de cèdre avec les combinaisons de Spores de *P. expansum* et de *P. commun*



Graph 7 : évolution des paramètres physico-chimiques de la surface du bois de cèdre avec les combinaisons de Spores de *T. hyalocapraet* de *P. chrytosum*



a) Hydrophobicité de la surface des spores des combinaisons étudiées :

- L'observation globale, des paramètres de la combinaison des deux souches de *P. expansum* et de *P. commun*, nous permet de constater un caractère hydrophobe de la surface plus marqué que celui des deux souches prises séparément ; mais demeure néanmoins toujours quelque peu en dessous du caractère hydrophobe initial du bois de cèdre.
- Contrairement à ce premier constat, le caractère hydrophobe de la combinaison des spores des souches de *T. hyalocapra* et de *P. chrytosum* bien qu'il demeure aussi hydrophobe car au-dessus de la limite dite de Vogler (1998) mais s'y rapproche tout de même ($\theta_w = 75^\circ$).

Pour ces deux constats l'hydrophobicité est confirmée au vue de tous les ΔG_{iwi} en dessous de la barre des abscisses.

b) Caractères donneur et accepteur d'électrons de la surface des spores des combinaisons étudiées :

- Tout au long de l'expérience, les graphes indiquent que la surface des spores de la combinaison des souches *P. expansum* et *P. commun* présente un caractère plus donneur qu'accepteur d'électrons. Notons tout de même que le caractère accepteur d'électrons est, à terme, quasiment le même que celui du bois de cèdre initialement contrairement au caractère donneur qui se retrouve pratiquement réduit de moitié.
- Au niveau de la deuxième combinaison de spores, nous constatons un affaiblissement considérable des deux paramètres donneur/accepteur d'électrons qui s'annulent presque à terme.

La composante de Lifshitz van der Waals demeure toujours approximativement inchangée pour les deux combinaisons.



Discussion :

La physico-chimie de la surface du bois de cèdre est-elle modifiée au fil du temps par le phénomène d'adhésion des spores à sa surface.

Cette question posée au cours de nos recherches trouve ici une réponse.

Les mesures de l'angle de contact de l'eau et l'énergie libre d'interaction (ΔG_{wi}) montrent que la surface du bois de cèdre est bien hydrophobe. Cela est en accord avec les travaux de Meijer et al. (2000) et de Soumya El Abed et al. (2010) qui eux rapportent une relative hydrophobicité.

D'autre part, en ayant pu déterminer et confirmer le caractère hydrophobe de la surface à la fois du bois de cèdre et des spores de nos cinq souches en plus des deux tests de combinaison, nous constatons que le caractère donneur d'électron s'est considérablement réduit voire annulé à l'exception de la combinaison de spores de *P. expansum* et *P. commun*.

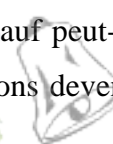
A l'inverse de nos travaux, les recherches de Pelletier (1997) et Braindel (1999a) ont rapporté que ce sont les microorganismes hydrophiles qui possèdent un caractère donneur d'électrons important.

Cependant, les travaux de plusieurs chercheurs (Marshall, 1985; Partt-Terpstra et al 1988; Sjollem et al 1990) indiquent que l'hydrophobie ne peut pas expliquer les résultats de l'adhésion microbienne sur un support.

De même, les travaux de JEFFS (1999) ont montré qu'ils avaient une corrélation positive entre l'hydrophobicité des spores et les hydrates de carbone de surface. En effet, le rapport hydrate de carbone/protéine avait tendance à être plus faible dans les extraits des spores hydrophobes que ceux hydrophiles.

JEFFS (1999) rapporte également au cours de ses travaux que les spores qui étaient hydrophobes présentaient une surface rugueuse tandis que celles hydrophiles avaient une surface lisse.

Par conséquent, lorsque nous nous rapportons à ses travaux, nous sommes amenés à dire que les spores de notre collection, y compris celles des tests de combinaisons réalisées, présentent une surface lisse et un rapport hydrate de carbone/protéine faible. Sauf peut-être pour le cas des spores de la souche *P. chrytosum* (Pdle9) que nous soupçonnons devenir hydrophile a





plus long terme ; mais bien entendu que cela reste à être démontré lors d'une étude plus poussée dans le temps.

Enfin, selon la littérature, les travaux de Hamadi et al. (2005, 2008), de Henriques et al. (2004) et de Soumya El Abed (2010) ont montré que les interactions acide-base ont été un facteur important dans la médiation de l'adhérence des microorganismes à une grande variété de surfaces dont le bois de cèdre.

Quant à ce qui est de nos résultats, ils indiquent clairement une modification assez importante des caractéristiques acide-base (donneurs/accepteurs).

En effet, que ce soit pour nos souches prises séparément ou pour les combinaisons que nous avons réalisés, nous interprétons la modification des propriétés acides-bases de la surface du bois de cèdre suite à l'adhésion des spore comme étant un facteur indispensable permettant à d'autres microorganismes (sous leur forme sporulée ou végétative) n'ayant pas la faculté d'adhérer au bois de cèdre par leurs propres moyens, à y adhérer quand même, dans une phase secondaire après la fixation première des souches qui le peuvent.

Notons aussi qu'il s'agit là des résultats d'un travail nouveau jamais encore réalisé et pour lequel nous n'avons encore aucun élément de comparaison surtout en ce qui concerne la combinaison des spores.

Bien que les caractéristiques physico-chimiques nous aident à comprendre le phénomène d'adhésion elles ne sont toutefois pas les seules impliquées pour une adhésion définitive.

En effet Certaines études ont indiqué que la capacité des champignons à s'attacher sur un substrat est contrôlée par des hydrophobines (Van Wetter et al, 2000b ; Wösten et al 1994). Selon les données de la littérature, les Ascomycètes filamenteux et les Basidiomycètes produisent de petites protéines appelées hydrophobines qui sont modérément hydrophobes. Celles-ci contiennent généralement des gènes multiples (Wösten, 2001).

B. Observation au Microscope (MEBE)

Cette deuxième partie de notre travail consiste à tester l'effet de différentes huiles essentielles et de leurs principales composantes majoritaires sur l'étape de l'adhésion ; l'objectif étant de prévenir la formation des biofilms. Ainsi donc, tel que nous l'avions mentionné



précédemment, nous avons procédé un prétraitement des morceaux de bois avec des volumes précis puis entamé le test d'adhésion des différentes souches de spores.

Cependant, nous avons joué sur le facteur du temps de traitement. En effet, d'une part, la durée du prétraitement était de 4h et d'autre part, le test d'adhésion avait été lancé tout de suite après la diffusion de l'huile essentielle sur le bois.

Ainsi donc, les images suivantes prises sur les échantillons présentent, en fonction du processus de prétraitement opéré, les résultats des souches de *Thielavia hyalocarpa* et de *Penicillium chrytosum*.

1. Observation après 4h de Prétraitement

La figure 4 illustre bien l'adhésion des spores de la souche *Thielavia hyalocarpa* sur le bois de cèdre après 10h d'incubation. Sa répartition à la surface du bois est homogène et aléatoire. On peut même observer que les spores ce sont fixés individuellement ou par petit groupes de deux ou trois tel que le confirme l'image de la figure 5 avec un plus fort grossissement.

Pour ce qui est maintenant de l'effet d'inhibition, ne disposant pas de l'image du témoin n'ayant pas subi de traitement, nous pouvons toutefois comparer l'effet de l'inhibition des spores de *Thielavia hyalocarpa* par l'huile essentielle du thym par rapport à son composante majoritaire le thymol.

Ainsi donc, la comparaison des images des figures 4 et 5 avec celui de la figure 6 est suffisamment concluante d'elle-même. En effet, après 4h de prétraitement nous pouvons observer la très forte inhibition de l'adhésion des spores de *Thielavia hyalocarpa* due au thymol par rapport à l'huile de thym dans son ensemble.

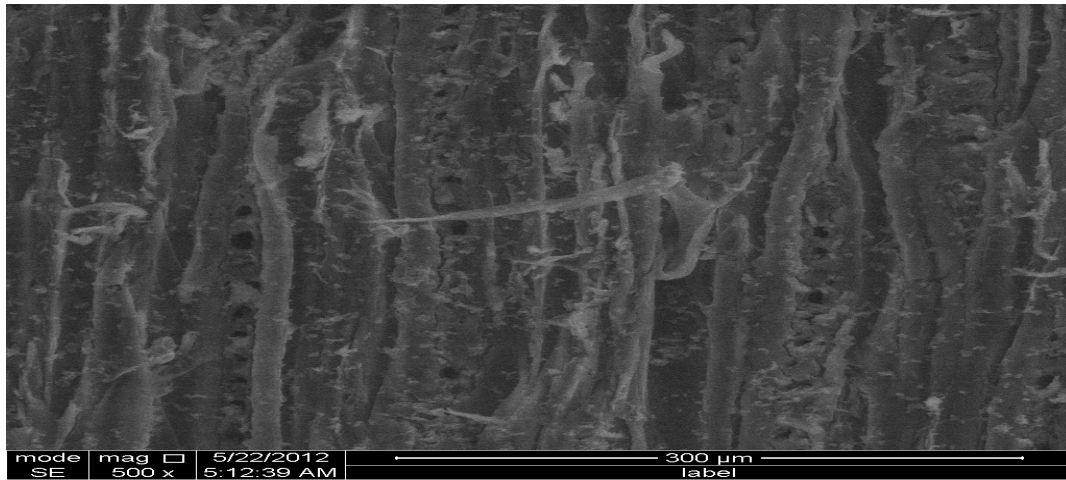


Fig. 4 : Observation par ESEM de l'inhibition de l'adhésion des spores de *Thielavia hyalocarpa* sur le bois de cèdre après traitement (4h) de ce dernier par le thym (x 3000).

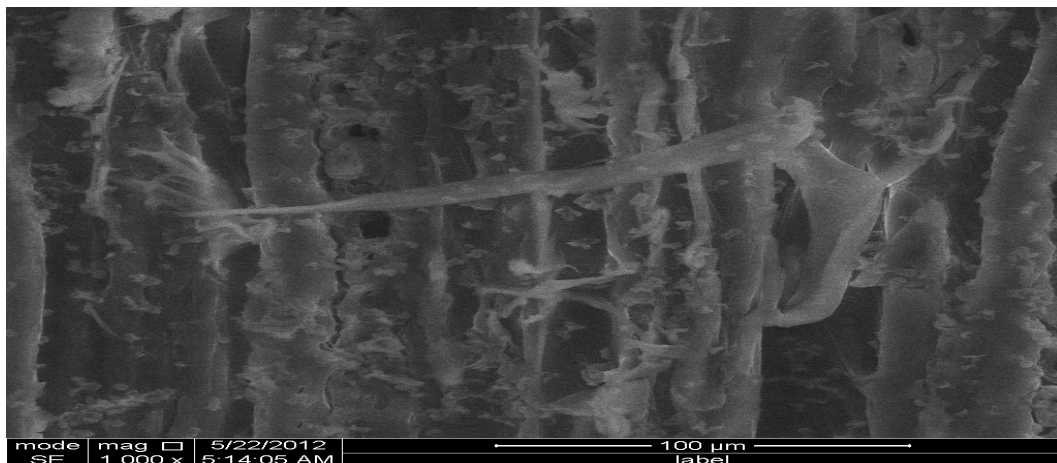


Fig. 5: Observation par ESEM de l'inhibition de l'adhésion des spores de *Thielavia hyalocarpa* sur le bois de cèdre après traitement (4h) de ce dernier par le **thym**.

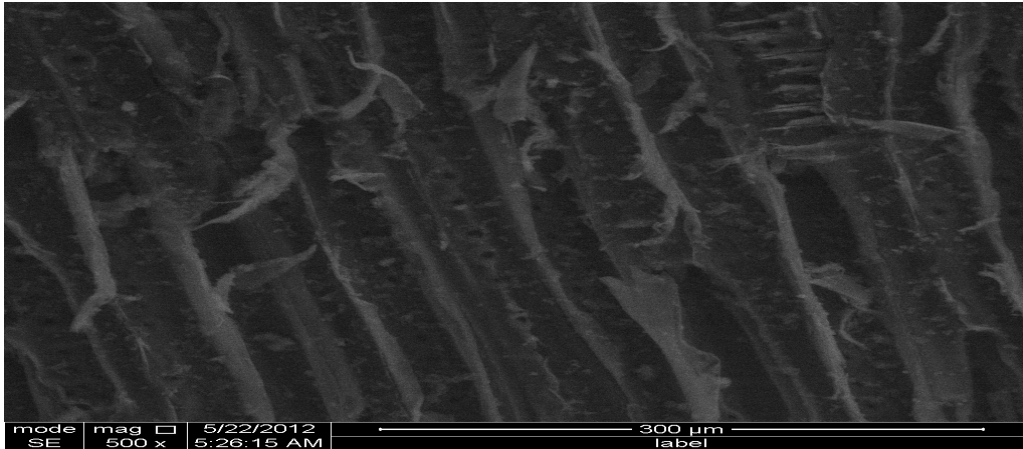


Fig. 6 : Observation par ESEM de l'inhibition de l'adhésion des spores de *Thielavia hyalocarpa* sur le bois de cèdre après traitement (4h) de ce dernier par le thymol

Les figures 7 ; 8 et 9 suivantes représentent trois zones d'observation des spores de la même souche *P. chrystosum* à la surface du bois de cèdre. On constate donc une très grande concentration à la surface du bois qui a pourtant été préalablement traitée pendant 4h avec l'huile essentielle de l'origan (10 μ l) ; Et contrairement aux spores de *Thielavia hyalocarpa*, celles de *P. chrystosum* sont légèrement plus regroupées.

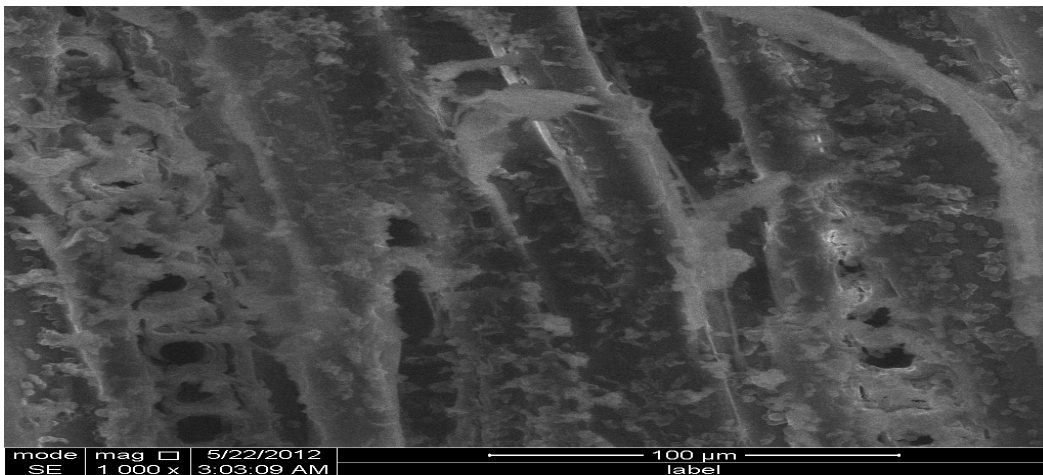


Fig. 7 : Observation par ESEM de l'inhibition de l'adhésion des spores de *P. chrystosum* sur le bois de cèdre après traitement (4h) de ce dernier par l'origan 10 μ l

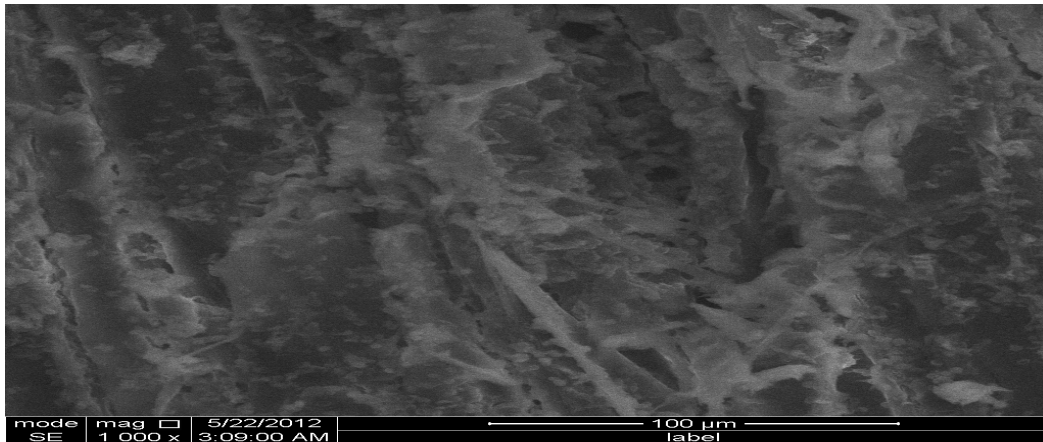


Fig. 8 : 2^{ème} Observation par ESEM de l'inhibition de l'adhésion des spores de *P. chrytosum* sur le bois de cèdre après traitement (4h) de ce dernier par l'origon 10µl

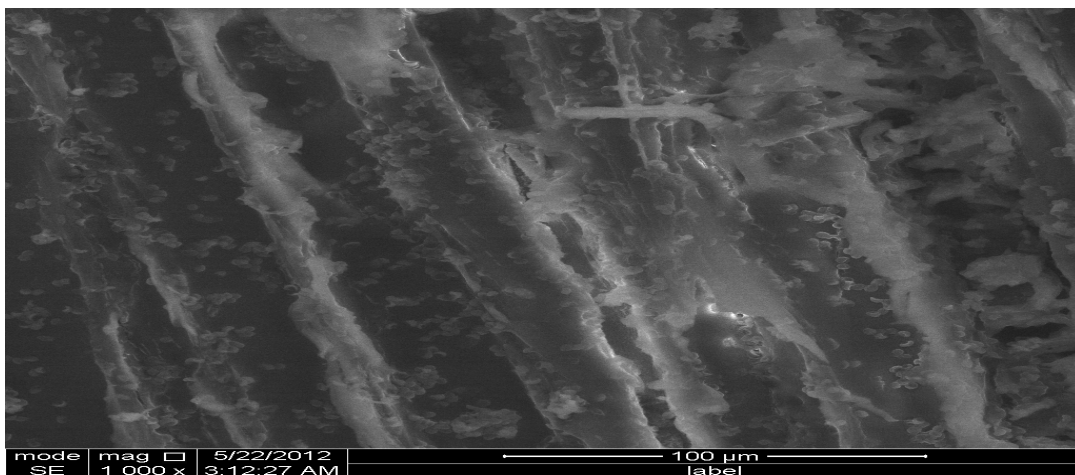


Fig. 9 : 3^{ème} Observation par ESEM de l'inhibition de l'adhésion des spores de *P. chrytosum* sur le bois de cèdre après traitement (4h) de ce dernier par l'origon 10µl.

La deuxième partie de cette phase du test d'inhibition consistait à déterminer l'impact de la durée de prétraitement sur l'efficacité de l'inhibition proprement dite.

A cet effet, l'analyse des images suivantes du MEB nous permet de relever la presque similitude du taux d'adhésion des spores de *P. chrytosum* sur la surface de la partie traitée (Fig. 10) et celle non traitée (Fig. 11) du bois de cèdre par l'Origan.

Ce constat se confirme également à l'observation de la surface de la partie traitée d'un deuxième échantillon (Fig. 12).

Cela nous laisse suggérer que le facteur **Temps de prétraitement** joue un rôle très déterminant indépendamment de la capacité même de l'huile essentielle à inhiber l'adhésion des spores à la surface du bois de cèdre.

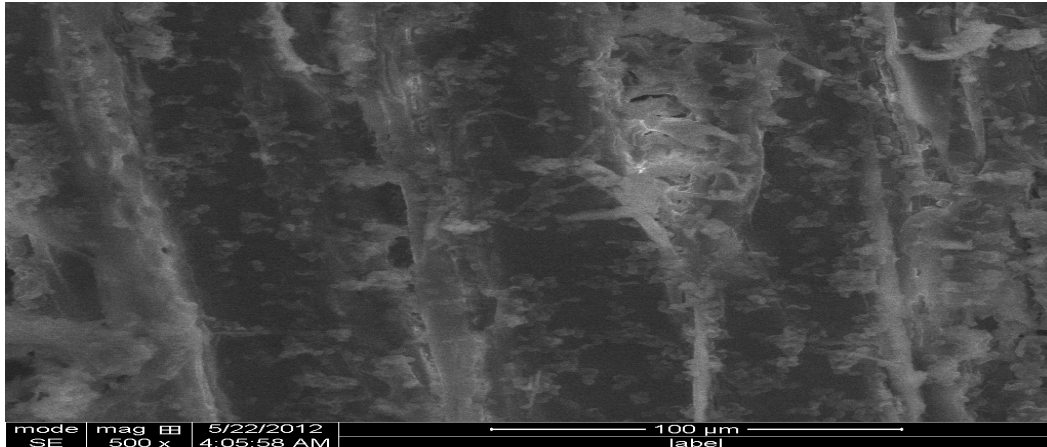


Fig. 10: Observation par ESEM de l'adhésion directe des spores de *P. chrytosum* sur la partie du bois de cèdre non traitée par l'origon

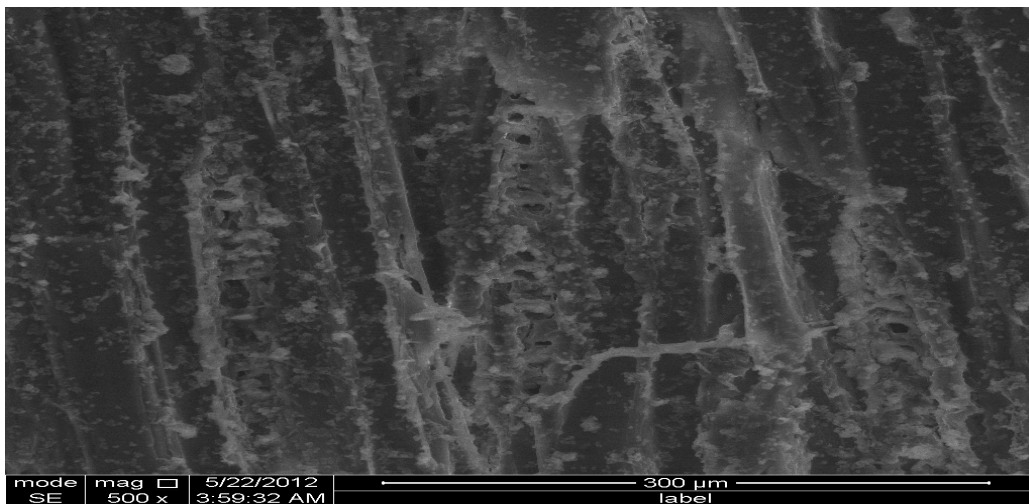


Fig. 11 : Observation par ESEM de l'adhésion directe des spores de *P. chrytosum* sur la partie du bois de cèdre traitée par l'origon

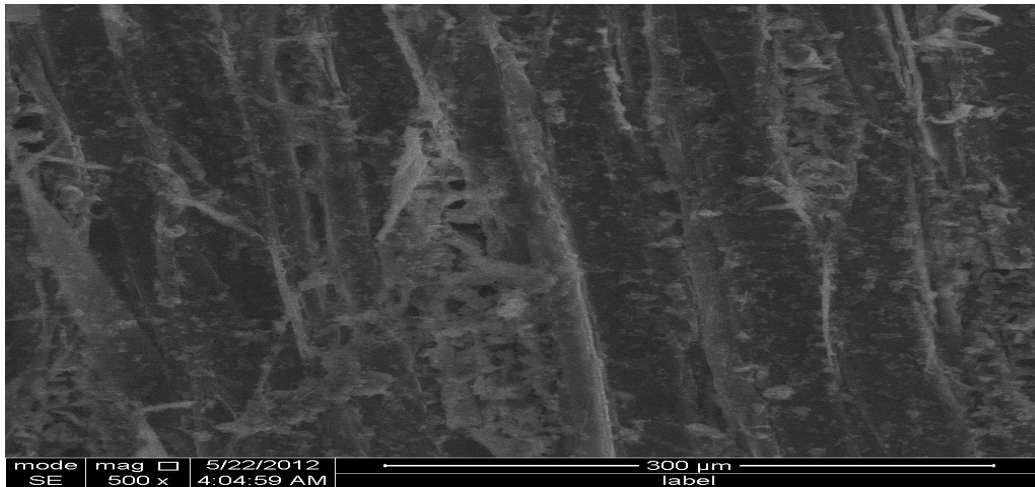


Fig. 12 : 2^{ème} Observation par ESEM de l'adhésion directe des spores de *P. chrystosum* sur la partie du bois de cèdre traitée par l'origan

C. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La CMI étant un paramètre très important qu'il nous faille absolument trouver, nous avons utilisé la technique des disques de papier Watman pour la déterminer. Malheureusement, le test n'a rien donné au terme du temps d'incubation. En effet, nous avons constaté la formation d'un tapis fongique à la surface de la gélose pour les dilutions suivantes des H.E. : 1/500 ; 1/400 ; 1/300 ; 1/200 et 1/100 réalisées dans de l'Agar à 0,2% tel qu'indiqué par Remmal et al.(1993).

Nous avons donc procédé à d'autres moins importantes de l'ordre de 1/80 ; 1/60 ; 1/40 ; 1/20 et 1/10 et 1 ; 1/2 ; 1/4 ; 1/6 et 1/8 pour le Thymol. Ce deuxième test n'est pas très concluant quant à la CMI mais nous avons quand même observé quelques halos d'inhibition dont les résultats de la mesure des diamètres sont consignés dans les tableaux. Chacun des tableaux renferme les résultats des mesures des diamètres d'inhibition de de la souche testée indiquée au-dessus et le dernier tableau concerne toutes les souches car elles ont été testées avec le thymol à des dilutions différentes de celles des autres huiles essentielles.



Tableau 10 : ensemble de tableaux regroupant les mesures des diamètres des halos d'inhibitions

T. hyalocara

| Dilutions | Origon | Thym | Carvéol |
|-----------|--------|------|---------|
| 1/10 | 7mm | — | — |
| 1/20 | — | — | — |
| 1/40 | — | — | — |
| 1/60 | — | — | — |
| 1/80 | — | — | — |

| Dilutions | Origon | Thym | Carvéol |
|-----------|--------|------|---------|
| 1/10 | 11mm | 8mm | — |
| 1/20 | — | 5mm | — |
| 1/40 | — | — | — |
| 1/60 | — | — | — |
| 1/80 | — | — | — |

P. commun

P. expansum

P. chrystosum



| Dilutions | Origon | Thym | Carvéol |
|-----------|--------|------|---------|
| 1/10 | 7mm | 12mm | — |
| 1/20 | — | 7mm | — |
| 1/40 | — | 6mm | — |
| 1/60 | — | 5mm | — |
| 1/80 | — | 5mm | — |

| Dilutions | Origon | Thym | Carvéol |
|-----------|--------|------|---------|
| 1/10 | 13mm | — | — |
| 1/20 | 8mm | 5mm | — |
| 1/40 | — | 9mm | — |
| 1/60 | — | 7mm | — |
| 1/80 | — | 5mm | — |

P.commune

| Dilutions | Origon | Thym | Carvéol |
|-----------|--------|------|---------|
| 1/10 | — | — | — |
| 1/20 | — | — | — |
| 1/40 | — | — | — |
| 1/60 | — | — | — |
| 1/80 | — | — | — |

Thymol

| Dilutions | Pdlb3 | Pdld " | Pdle9 | F4 | D10 |
|-----------|-------|--------|-------|----|-----|
| 1 | — | — | — | — | — |
| 1/2 | — | — | — | — | — |
| 1/4 | — | — | — | — | — |
| 1/6 | — | — | — | — | — |
| 1/8 | — | — | — | — | — |



Cependant, la littérature indique que la meilleure manière de déterminer la CMI demeure la dilution des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires directement dans la gélose du milieu de culture.

Par conséquent, la CMI de H.E. utilisés sur les souches fongiques reste à être déterminée.

Conclusion et perspectives

Conclusion et Perspectives :

Tout au long de ce stage, en plus de l'esprit scientifique dont nous avons fait preuve pour traiter ce sujet, nous avons fait de ce dernier un problème presque personnel. En effet, il nous est impensable que l'on puisse visiter l'ancienne médina de Fès, se promener dans ses ruelles ou encore découvrir ses souks et ses riads tels sortis des contes des mille et une nuit, sans



succomber au charme de cette cité millénaire et souhaiter qu'il se perpétue pour les millénaires à venir.

Motivé par ce souci de préservation, notre travail a porté ses fruits au travers des résultats que nous avons commentés et soumis à discussion en comparaison avec les travaux déjà réalisés.

Par conséquent, nous avons mis en évidence, pour toutes les cinq souches que nous avons étudiées, l'évolution des caractéristiques de la physico-chimie de la surface de leurs spores comparativement à ceux du bois de cèdre initialement :

- Toutes les spores étudiées révèlent un caractère hydrophobe très marqué aussi bien séparément que pour les deux combinaisons. A l'exception peut-être des spores de la souche *Penicillium chrysosum* dont nous soupçonnons l'évolution vers l'hydrophilicité à plus long terme mais ceci reste à être confirmé ;
- Nous convenons avec la littérature que le caractère hydrophobe du bois de cèdre, mais notre étude montre pour ce dernier un caractère donneur d'électron très élevé ce qui traduit son acidité.
- Nous notons aussi que la modification de la physico-chimie initiale du bois de cèdre par les spores conduirait à la fixation d'autres microorganismes ; ce qui expliquerait d'ailleurs la présence dans les biofilms naturels de souches incapable d'y adhérer d'elles-mêmes.
- Les tests d'inhibition ont montré que pour le même temps de prétraitement, le thymol est plus efficace que l'huile essentielle du thym prise dans son ensemble; ce qui est en accord avec les travaux de plusieurs chercheurs qui ont aussi montré qu'en plus de l'action antifongique, les huiles essentielles modifient aussi la physico-chimie en rendant la surface hydrophobe.
- Nous relevons également après avoir testé les deux approches pour l'inhibition que l'effet du temps de prétraitement est primordial pour optimiser l'effet des huiles essentielles ou des principes majoritaires.

Pour la suite de nos travaux afin de préserver le patrimoine culturel exceptionnel de notre chère Médina de Fès, nous énumérons comme perspectives à court terme :

- l'approfondissement de l'étude des caractéristiques physico-chimiques à la formation des biofilms fongiques multi-espèces sur la surface du bois que nous avons déjà amorcé afin d'étudier le phénomène dans les conditions proches de la réalité ;



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie



-la détermination des concentrations minimales inhibitrices pour les huiles que nous avons utilisées.



Annexe 1 :

1. **Tableau 1** : milieu de culture utilisé

| Milieu de culture | Constituants |
|------------------------------|---|
| -Milieu Extrait de Malt (EM) | -Extrait de Malte 30g/l -Agar 15-20g/l |

Annexe 2 :

1. **Conservation des souches :**

Dans le souci de conserver les souches pures nous avons procédé selon deux protocoles :

- Conservation au Glycérol :
 - Pour cela nous avonsensemencé nos cinq souches dans de l'Extrait de Malt 2% liquide puis incubé pendant 7jours à 30°C sous agitation;
 - Puis nous les avons préparé dans du Glycérol à 25% (250µl de culture pour 750µl de Glycérol) ;
 - Et enfin conservé au congélateur à -20°C.
- Conservation dans des Tubes Inclines :
 - Cette méthode consiste quant à elle à ensemencer par des stries serrées les souches à conserver dans des tubes inclinés contenant le milieu Extrait de Malte ;
 - l'incubation se fait à 30°C pendant 7jours ;
 - et enfin la conservation au réfrigérateur à 4°C.

Annexe 3:

1. **Tableau 4** :Caractérisation de l'Hydrophobicité et composantes de l'énergie de surface de la surface du bois de cèdre et des spores de *Thielavia hyalocarpa* (Pdlb3)

| Souche : <i>Thielavia hyalocarpa</i> | Angles de Contact (°) | | | Tension de Surface: composantes et paramètres (mJ m ⁻²) | | | ΔG _{wi} |
|---|-----------------------|----------------|----------------|---|----------------|----------------|------------------|
| | θ _w | θ _F | θ _D | γ _{LW} | γ ₊ | γ ₋ | |
| Témoin 0h | 123,1 | 29,6 | 17,2 | 48,4526109 | 10,5900511 | 40,7174128 | -1,03 |
| Pdlb3, 2h | 103,6 | 37,5 | 10,4 | 49,8649861 | 3,95643648 | 8,78173151 | -37,08 |
| Pdlb3, 4h | 98,3 | 41,7 | 12,4 | 49,5187119 | 2,32892985 | 3,32089388 | -56,79 |
| Pdlb3, 6h | 103,8 | 38,8 | 11 | 49,7672792 | 3,68233687 | 8,47612486 | -38,25 |
| Pdlb3, 8h | 108,9 | 30,4 | 8,6 | 50,1260137 | 6,70545131 | 17,8231501 | -19,86 |
| Pdlb3, 10h | 98,3 | 38,6 | 10,7 | 49,8167976 | 2,94383684 | 4,12685616 | -51,75 |
| Pdlb3, 24h | 83,3 | 31,5 | 17,1 | 48,4781209 | 2,73091411 | 1,7654E-05 | -79,17 |



2. **Tableau 5** : Caractérisation de l'Hydrophobicité et composantes de l'énergie de surface de la surface du bois de cèdre et des spores de *Penicillium commune* (Pdld")

| Souche : <i>Penicillium commune</i> | Angles de Contact (°) | | | Tension de Surface: composantes et paramètres (mJ m ⁻²) | | | ΔGiwi |
|--|-----------------------|------|------|---|------------|------------|--------|
| | θw | θF | θD | γLW | γ+ | γ- | |
| Témoin 0h | 123,1 | 29,6 | 17,2 | 48,4526109 | 10,5900511 | 40,7174128 | -1,03 |
| Pdld", 2h | 107,4 | 51,3 | 21,3 | 47,2906639 | 1,69770811 | 6,59827575 | -47,01 |
| Pdld", 4h | 110 | 29,6 | 15,1 | 48,9591644 | 7,59750091 | 19,7407631 | -16,49 |
| Pdld", 6h | 111,6 | 45,4 | 11,4 | 49,6991919 | 3,06153556 | 13,4936313 | -29,59 |
| Pdld", 8h | 88,8 | 21,9 | 12,6 | 49,4808654 | 5,06913138 | 1,82734017 | -52,67 |
| Pdld", 10h | 91,3 | 41,3 | 15,6 | 48,8441465 | 1,7627184 | 0,49171881 | -75,59 |
| Pdld", 24h | 89,1 | 26,4 | 14,4 | 49,1142513 | 4,39036589 | 1,46268884 | -56,41 |

3. **Tableau 6** : Caractérisation de l'Hydrophobicité et composantes de l'énergie de surface de la surface du bois de cèdre et des spores de *Penicillium chrysosum* (Pdle9)

| Souche : <i>Penicillium chrysosum</i> | Angles de Contact (°) | | | Tension de Surface: composantes et paramètres (mJ m ⁻²) | | | ΔGiwi |
|--|-----------------------|------|------|---|------------|------------|--------|
| | θw | θF | θD | γLW | γ+ | γ- | |
| Témoin 0h | 123,1 | 29,6 | 17,2 | 48,4526109 | 10,5900511 | 40,7174128 | -1,03 |
| Pdle9, 2h | 88,2 | 25,4 | 8,9 | 50,0858698 | 4,14644321 | 1,21101702 | -59,29 |
| Pdle9, 4h | 92,3 | 34,2 | 10,5 | 49,8490712 | 3,07491649 | 1,73937059 | -60,72 |
| Pdle9, 6h | 89,1 | 34,8 | 9,4 | 50,0159689 | 2,49493181 | 0,56633094 | -71,29 |
| Pdle9, 8h | 85,8 | 32 | 12 | 49,5926577 | 2,69795455 | 0,13882657 | -75,09 |
| Pdle9, 10h | 74,3 | 23 | 17,8 | 48,296671 | 2,98743885 | 1,10607315 | -63,60 |
| Pdle9, 24h | 73,7 | 40,5 | 53,6 | 32,1780644 | 4,10813057 | 4,00318351 | -38,92 |

4. **Tableau 7** : Caractérisation de l'Hydrophobicité et composantes de l'énergie de surface de la surface du bois de cèdre et des spores de *Penicillium commun* (D10)



| Souche : <i>Penicillium commun</i> | Angles de Contact (°) | | | Tension de Surface: composantes et paramètres (mJ m ⁻²) | | | ΔGiwi |
|------------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|---|----------------|----------------|--------|
| | θ _w | θ _F | θ _D | γ _{LW} | γ ₊ | γ ₋ | |
| Témoin 0h | 123,1 | 29,6 | 17,2 | 48,4526109 | 10,5900511 | 40,7174128 | -1,03 |
| D10, 2h | 84,6 | 26,9 | 8,9 | 50,0858698 | 3,32982852 | 0,19034539 | -71,20 |
| D10, 4h | 91 | 18 | 14,2 | 49,1572822 | 6,2599873 | 3,45339205 | -43,58 |
| D10, 6h | 84,8 | 27,5 | 11,6 | 49,6642666 | 3,36291465 | 0,19621602 | -70,66 |
| D10, 8h | 98,8 | 33,1 | 15,3 | 48,9135799 | 4,58038572 | 6,04697494 | -41,04 |
| D10, 10h | 93,1 | 24,9 | 9,8 | 49,9573608 | 5,11258119 | 3,74097004 | -46,35 |
| D10, 24h | 92,6 | 31,8 | 16,5 | 48,6282832 | 3,96503238 | 2,29306232 | -53,96 |

5. **Tableau 8** : Caractérisation de l'Hydrophobicité et composantes de l'énergie de surface de la surface du bois de cèdre et des spores de *Penicillium expansum* (F4)

| Souche : <i>Penicillium expansum</i> | Angles de Contact (°) | | | Tension de Surface: composantes et paramètres (mJ m ⁻²) | | | ΔGiwi |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------|----------------|---|----------------|----------------|--------|
| | θ _w | θ _F | θ _D | γ _{LW} | γ ₊ | γ ₋ | |
| Témoin 0h | 123,1 | 29,6 | 17,2 | 48,4526109 | 10,5900511 | 40,7174128 | -1,03 |
| F4, 2h | 111,2 | 38,3 | 5,6 | 50,4527446 | 4,75732341 | 16,8660289 | -22,76 |
| F4, 4h | 108,4 | 30,5 | 6,7 | 50,3487813 | 6,50035235 | 17,1114382 | -21,00 |
| F4, 6h | 107,8 | 31,1 | 7,6 | 50,2500551 | 6,25836607 | 16,0834838 | -22,39 |
| F4, 8h | 99,9 | 37,4 | 10,8 | 49,800439 | 3,44940053 | 5,62150581 | -45,70 |
| F4, 10h | 90,7 | 36,7 | 5,2 | 50,4859767 | 2,22591816 | 0,80474975 | -71,06 |
| F4, 24h | 81,9 | 47,6 | 12,9 | 49,4230069 | 0,20307759 | 1,73957033 | -79,87 |

6. **Tableau 9** : Caractérisation de l'Hydrophobicité et composantes de l'énergie de surface de la surface du bois de cèdre et de la combinaison des spores de *P. expansum*(F4) et de *P. commun* (D10)

| Souches : <i>P. expansum</i> + <i>P. commun</i> | Angles de Contact (°) | Tension de Surface: composantes et paramètres (mJ m ⁻²) | |
|---|-----------------------|---|--|
| | | | |



| | θ_w | θ_F | θ_D | γ_{LW} | γ_+ | γ_- | ΔG_{iwi} |
|-------------|------------|------------|------------|---------------|------------|------------|------------------|
| Témoin 0h | 123,1 | 29,6 | 17,2 | 48,4526109 | 10,5900511 | 40,7174128 | -1,03 |
| F4+D10, 2h | 99,1 | 25,8 | 15,3 | 48,9135799 | 6,40395228 | 8,33374615 | -32,69 |
| F4+D10, 4h | 106,7 | 36,3 | 12,5 | 49,4998613 | 4,88114329 | 12,5092272 | -28,48 |
| F4+D10, 6h | 99,6 | 36,4 | 13 | 49,403431 | 3,75375062 | 5,70248203 | -44,36 |
| F4+D10, 8h | 105,5 | 34,8 | 12,4 | 49,5187119 | 5,08316976 | 11,8201653 | -29,13 |
| F4+D10, 10h | 116,6 | 47,5 | 13,8 | 49,2416297 | 3,24664857 | 18,2373879 | -21,24 |
| F4+D10, 24h | 111,2 | 23,3 | 15,1 | 48,9591644 | 9,59028633 | 24,2562564 | -11,90 |

7. **Tableau 10** : Caractérisation de l'Hydrophobicité et composantes de l'énergie de surface de la surface du bois de cèdre et de la combinaison des spores de *T. hyalocapra*(Pd1b3) et de *P. chrystosum*(Pd1e9)

| Souches : <i>T. hyalocapra</i> + <i>P. chrystosum</i> | Angles de Contact (°) | | | Tension de Surface: composantes et paramètres (mJ m ⁻²) | | | ΔG_{iwi} |
|--|-----------------------|------------|------------|---|------------|------------|------------------|
| | θ_w | θ_F | θ_D | γ_{LW} | γ_+ | γ_- | |
| Témoin | 123,1 | 29,6 | 17,2 | 48,4526109 | 10,5900511 | 40,7174128 | -1,03 |
| Pd1b3+Pd1e9, 2h | 89,8 | 27,4 | 15,3 | 48,9135799 | 4,36656003 | 1,63519519 | -55,54 |
| Pd1b3+Pd1e9, 4h | 106,2 | 29,5 | 11,6 | 49,6642666 | 6,59673554 | 14,7934986 | -23,34 |
| Pd1b3+Pd1e9, 6h | 110,5 | 28,1 | 13,9 | 49,2207575 | 8,0226486 | 21,1178478 | -15,13 |
| Pd1b3+Pd1e9, 8h | 108,4 | 39,4 | 18,6 | 48,0811262 | 4,73066349 | 13,0561247 | -26,86 |
| Pd1b3+Pd1e9, 10h | 75 | 22 | 24 | 46,4063663 | 3,74108024 | 0,78719871 | -61,14 |
| Pd1b3+Pd1e9, 24h | 81,9 | 31,4 | 15,6 | 48,8441465 | 2,48629261 | 0,05324955 | -77,79 |

Références Bibliographiques :



- Adam K. et al., 1998. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirtus*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1739-1745.
- Agnihotri A., S. Khatoon., M. Shanta. 2003. Pharmacognostical evaluation of an antioxidant plant-Acorus calamus linn. *Nat. Prod. Sci.* 9(4)264-269.
- ALLISON, F.E., (1973). «Soil organic matter and its role in crop production». Development in soil science 3. Elsevier Scientific Publishing Compagny, Amsterdam, 637 p.
- Archibald F.S. et al., 1997. Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *J. Biotechnol.*, 53, 215-236.
- Banks, M. K , et J. D. Bryers. 1992. Deposition of bacterial cells into glass and biofilm surfaces. *Biofouling*. 6:81-86.
- Benayad N., 2008. Utilisation des huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines comme insecticides pour lutter contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées, projet de recherche, rapport d'activité, Faculté de sciences rabat, Maroc 2008.
- Bernard T., Periau F., Brav O., Delmas M. & Gaset A., 1988. Extraction des huiles essentielles. *Chimie et Technologie. Information chimie*.
- Bourrel C. , 1993. Analyse chimique, activités biostatiques et antioxydantes d'extraits de plantes aromatiques sélectionnées. Thèse de l'Institut National Polytechnique de toulouse. Toulouse, France.
- Brandet R, Leriche V, Carpentier B, Bellon Fontaine MN. 1999a. Effects of the growth procedures on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cell and their adhesion to stainless steel. *J.Food. Protection.*, 62: 994-998.
- Bruneton J. 1993. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Tec & Doc, Lavoisier, Paris.p: 915.
- Bury- Moné S. (2007) *Les biofilms*. Polycopié. Ecole Normale Supérieure de Cachan. 17 p.
- Busscher H.J., Bos R. and van der Mei H.C. 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbioly Letters*, 46, pp 229-234.
- Caldwell, D. E., 1983. Derivation of Growth Rate Equation Describing Microbiological Surface Colonization. *Microbial Ecology*. 9:1-6.



- Caldwell, D. E., et J. R. Lawrence. 1986. Bacterial growth kinetics in the hydrodynamic boundary layer of solid-liquid interfaces. *Microb. Ecol.* 12:299–312.
- Carson C.F., Rilley T.V., Bosque F., 2002. Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Malaleuca alternifolia*. *Journal of Applied Bacteriology.* 78, p:264-269.
- Characklis, W. G., 1983. Process analysis in microbial systems: biofilms as a case study in mathematics in microbiology. Bazin M. Academic Press London. 171-234.
- Characklis, W. G., Mcfeters G.A., et K.C. Marshall. 1990. physiological ecology in biofilm systems. In *Biofilm*. Characklis W.G., Marshall K.C. (eds). John, wiely et sons News York, 265-340.
- Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.F., Warmington J.R. &Wyllie S.G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Malaleuca alternifolia* (tee tree oil). *Journal of Applied Microbiology.* 88, p:170-175.
- Deferera D.J., Ziogas B.N. & Polissiou M.G., 2000. GCMS Analysis of essential oil from some Greek aromatic plants and their fungi toxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chem.*, 48(6), 2576-2581.
- Delaquis PJ, Stanich K, *et al.*,2002. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils.*Int J Food Microbiol.* 25 Mar2002;74(1-2):101-9.
- Dickinson, E., et G. Stainsby. 1982. *Colloids in food*. Applied science publishers. Londers-New York.
- Dickson J. S., et E. K. Daniels. 1991. Attachment of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* to glass as affected by surface film thickness. Cell density and bacterial motility. *J. Industrial Microbiol.* 8:281-283.
- DOMMERGUE, S. Y., MANGENOT, F., (1970). «Écologie microbienne du sol». Masson & Cie, Paris, 796 p.
- Donlan RM (2008) Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322: 133-161.
- Dorman H. J. D. & Deans S. G. , 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. 88,p: 308-316.



- Dumonceaux T.J. et al., 1998. Cloning and sequencing of a gene encoding cellobiose dehydrogenase from *Trametes versicolor*. *Gene*, 210, 211-219.
- El Abed Soumya, Fatima Hamadi, Hassan Latrache, Houssaini Mohamed Iraqui, Koraichi Saad Ibsouda. 2010. Adhesion of *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* spores on Fez cedar wood substrata. Springer-Verlag and the University of Milan 2010.
- ERIKSSON, K.E., BLANCHETTE, R.A., ANDERSON, P., (1990). «Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components.» Springer-Verlag, Berlin, 407 p.
- Gauthier, Y., et P. Isoard. 1989. L'adhésion des bactéries sur les surfaces. *Industries alimentaires et agricoles*. 106:31-33.
- GOSZ, J.R., LIKENS, G.E., BORMAN, F.H., (1973). «Nutrient release from decomposing leaf and branch litter in the Hubbard Brook Forest, New Hampshire». *Ecol. Monograph* 43: 173-191.
- HAIDER, K., (1992). «Problems related to the humification processes in soils of temperate climates». *In* : G. Stotzky & J.M. Bollag (éds.), *Soil Biochemistry* vol. 7. Marcel Dekker, New York, pp. 55-94.
- Haluk J.P. & Roussel C., 1998. Durabilité naturelle du Red cedar et application des biotechnologies végétales dans le domaine de la préservation du bois. *In* : *Communication 2e Journées Scientifiques Bois-Forêt, 1998, Épinal, France*.
- Hamadi F, Latrache H, Mabrouki M, Elghmari A, Outzourhit A, Ellouali M, Chtaini A (2005) Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. *J Adhes Sci Technol* 19:73–85
- Hamadi F, Latrache H, Mallouki B, Mliji E, El Ghmari A, Mabrouki M, Bengourram J, Ellouali M (2008) Adhesion of *Escherichia coli* to glass under different pH. *J Pure Appl Microbiol* 2.
- Hamadi F., Latrache H., Mabrouki M., Elghmari A., Outzourhit A., Ellouali M. et Chtaini A. (2005a). Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. *J. Adhesion. Sci. Technol.* 19, 73-85.
- Henriques M, Azeredo J, Oliveira R (2004) Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids Surf B* 33:235–241 Van



Wetter MA, Wösten HAB, Wessels JGH (2000b) SC3 and SC4 hydrophobins have distinct roles in formation of aerial structures in dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Mol Microbiol* 36:201–210

- Herald PJ et Zottola EA, 1988 . Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at selected temperatures and pH values *J. Food Protection*, 51: 445-448.
- Ismaiel A. & Pierson M.D., 1990. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by essential oil of spices. *J. Food Sci.*, 55, 1676-1678.
- KÄÄRIK, A.A., (1974). «Decomposition of wood». *In* : C.H. Dickinson & G.J.F. Pugh (eds.), *Biology of plant litter decomposition*, Volume I, Academic Press, London, pp. 129-174.
- KIRK, T.K., FARRELL, R.L., (1987). «Enzymatic “combustion” : the microbial degradation of lignin». *Ann. Rev. Microbiol.* 41: 465-505.
- KIRK, T.K., FENN, P., (1982). «Formation and action of the ligninolytic system in basidiomycetes». *In* : J.C. Frankland, J.N. Hedger & M.J. Swift (éds.), *Decomposer basidiomycetes : their biology and ecology*. Cambridge University Press, London, pp. 67-90.
- Klaric MS. , Kosalec I. , Mastelic J. , Pieckova E. , Pepeljnak S. (2006). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and Thymol against moulds from damp dwelling. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (1) : 36-42.
- Korber D.R., Lawrence J.R., Lappin-Scott H.M., Costerton J.W (1995). Growth of microorganisms on surfaces. *In* Lappin-Scott H.M., Costerton J.W (Eds), *Microbial Biofilms* pp 15-45.
- Lawrence B.M. 1984. The botanical and chemical aspects of oregano. *Perfum. Flav.* 9(5),41-51.
- Macguire, J., V. Krisdhasirna. 1992. Surface thermodynamics, protein adsorption and biofilm development *In* *Physical Chemistry of Food*. Scharzberg H. G., Wartel R. W. (eds). Marcel Dekker, New York.
- Mahmoud A.L.E., 1994. Antifungal action and anti aflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Lett. Appl. Microbiol.*, 19, 110-113.





- Marshall KC (1985) In: Savage DC, Fletcher M (eds) Bacterial adhesion: mechanisms and physiological significance. Plenum, New York
- Marshall, K. C., 1986. Adsorption and adhesion processes in microbial growth at interfaces. *Adv. Colloid. Interface. Sci.*, 25:59-86.
- Microscopie électronique à balayage et microanalyse, Cours de M. Perrin, directeur du Centre de microscopie électronique à balayage et microanalyse (CMEBA, Université de Rennes I), cours disponible sur Internet à l'adresse http://www.cmeba.univrennes1.fr/Principe_MEB.html.
- Okamoto et al. (2000): Wood-Plastic Composite Added with Steam-Exploded Wood Flour 3rd International Wood and Natural Fibre Composites Symposium mber 19-20, Kassel/Germany.
- Otto M (2008) Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **322**: 207-228.
- Partt-Terpstra IH, Weerkamp AH, Busscher HJ (1988) On a relation between interfacial free energy dependent and non interfacial free energy dependent adherence of oral streptococci to solid substrata. *Curr Microbiol* 16:311–313.
- Paster N. et al., 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on moulds and foodborne bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.*, 11, 33-37.
- Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bouirlioux, Bellon – Fontaine MN. 1997. Cell surface characteristics of lactobacillus caesi subsp.casei. Lactobacillus paracasei subsp.paracasei and Lactobacillus rhamnosus strains. *App. Environ. Microbiol.*, 63 : 1725-1731.
- REISINGER, O., KILBERTUS, G., (1980). «Mécanismes et facteurs de biodégradation en milieu forestier». In : P. Pesson (éd.), *Actualités d'Écologie Forestière*, Gauthier-Villars, Paris, pp. 61-86.
- Remmal A, Tantaoui-Elaraki A, Bouchikhi T, Ettayebi M (1993). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar Medium. *J. Essent. Oil. Res.*, 5:1179-1184.
- Sjollem J, Van der Mei HC, Wugen HM, Busscher HJ (1990) The influence of collector and bacterial cell surface properties on the deposition of oral streptococci in a parallel plate flow cell. *J Adhes Sci Technol* 4:765–777



- SWIFT, M.J., (1982). «Basidiomycetes as components of ecosystems». In : J.C. Frankland, J.N. Hedger & M.J. Swift (éds.), *Decomposer basidiomycetes : their biology and ecology*. Cambridge University Press, London, pp. 307-337.
- Tanaka H., Itakura S. & Enoki A., 1999. Hydroxyl radical generation by an extracellular low-molecular-weight substance and phenol oxidase activity during wood degradation by the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *J. Biotechnol.*, 75, 57-70.
- Tomlin KL, Malott RJ *et al.* (2005) Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5208-5218.
- TOUTAIN, F., BRISSON, M., BRUN, J.P., JANEL, P., VILLEMIN, G., (1981). «Transfert et diaggnèse organique dans les sols». In : *Migrations organominérales dans les sols tempérés*, Colloques internationaux du C.N.R.S. n° 303, Nancy 24-28 septembre 1979. Éditions du C.N.R.S., Paris, pp. 95-102.
- Utree A., Slump R.A, Steging G. & Smid E.J., 2002. Antimicrobial activity of carvacrol on rice. *Journal of food protection*.63,p:620-624.
- Van Oss, C.J., Chaudhury, M.K., and Good, R.J, Interfacial Lifshitz_van der Waals and Polar Interactions in Macroscopic Systems, *Chem. Rev.*, 1988, vol. 88, pp. 927–941.
- Van Oss, C.J., *Interfacial Forces in Aqueous Media*, New York: Dekker, 1996.
- Van Oss. (1995). Hydrophobicity of biosurfaces –origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids Surf B.*, 5: 91-100.
- Veres K., E. Varga, A. Dobos, Zs. Hajdu, I. Mathe, E. Nemeth, K. Szabo. 2003. Investigation of the composition and stability of the essential oils of *origanum vulgare* ssp., vulgre L., and *O. Vulgare* ssp. *Hirtus* (Link) Ietswaart. *Chromatographia*. 57 (12), 95-98.
- Vogler, E.A., *Structure and Reactivity of Water at Biomaterial Surfaces*, *Adv. Colloid. Interface. Sci.*, 1998, vol. 74, pp. 69–117.
- Vokou D., Kokkini S. & Bressiere J.M.,1988. *Origanum onites*(Lamiaceae) in Greece Distribution , volatile oil yield, and composition . *Economy botanic*. 42, p:407-412.



- Wanner O, Bauchrowitz M (2006) Les biofilms sont omniprésents. *EAWAG News* **60** f: 4-7.
- Wösten HAB (2001) Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol* 55:625–646
- Wösten HAB, Schuren FHJ, Wessels JGH (1994) Interfacial selfassembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J* 13:5848–5854
- Zambonelli A., A.Z. D'Aurelio., A. Severi., E. Benvenuti., L. Maggi., A. Bianchi. 2004. Chemical composition and fungicidal activity of commercial essential oils of thymus vulgaris L. *J. Essent. Oil Res* 16(1), 69-74.