

Année Universitaire : 2012- 2013



Master Sciences et Techniques: Biotechnologie microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Sous thème

**Contribution à l'étude de l'effet des extraits du *Thymus vulgaris*
sur la physico-chimie de la surface du bois de cèdre et leur
activité antiadhésive des spores fongiques**

Présenté par:

Meryem ASRI

Encadré par:

Pr. Saad IBNSOUDA KORAICHI
Dr. Soumya ELABED

Soutenu Le 24 Juin 2013 devant le jury composé de:

- Pr. Ibensouda Saad Koraichi
- Dr. El Abed Soumya
- Pr. Ananou Samir
- Pr. Tahri Joutey Mohammed Ali
- Pr. Boukir Abdellatif

Lieu du stage : Laboratoire de biotechnologie microbienne de la FST Fès.



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: ASRI Meryem

Année Universitaire: 2012 - 2013

Titre: Contribution à l'étude de l'effet des extraits du *Thymus vulgaris* sur la physico-chimie de la surface du bois de cèdre et leur activité antiadhésive des spores fongiques

Résumé

Le bois est un matériau traditionnellement utilisé pour les constructions des œuvres monumentales. C'est un biomatériau sensible aux agents biologiques de dégradation en particulier les microorganismes. Dans ce contexte, le présent travail propose d'étudier l'effet des extraits du *Thymus vulgaris* sur la physico-chimie de la surface du bois de cèdre et leur activité antiadhésive des spores fongiques

Le premier objectif de ce travail est d'évaluer l'effet du traitement par les extraits méthanoliques obtenus par deux méthodes d'extraction sur les caractéristiques physico-chimiques de la surface du bois de cèdre. Les résultats montrent que les propriétés physico-chimiques dépendent de la méthode d'extraction (macération ou sonication).

Ensuite, l'effet des extraits méthanoliques du *Thymus vulgaris* sur l'adhésion des microorganismes à la surface du bois de cèdre a été étudié. Cet effet a été démontré pour quatre souches fongiques à différents temps de traitement et à différentes concentrations. Le traitement de la surface du bois par ces extraits a mis en évidence une efficacité antiadhésive.

Enfin, afin d'enrichir la banque des microorganismes responsables de la pourriture du bois, le second objectif de ce travail est la caractérisation et d'identification des microorganismes responsables de la dégradation du bois. La caractérisation moléculaire des ces isolats nous a permis de mettre en évidence la présence au genre appartenant à *Penicillium*.

Mots clés : Biofilm, Bois de cèdre, adhésion, microorganismes, extraits méthanoliques, antiadhésive, caractérisation physico-chimique, MEBE, Angle de contact

Sommaire

Dédicaces	i
Remerciements	ii
Liste des tableaux	iii
Liste des figures	iv
Liste des abréviations	vi
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Dégradation du bois par les micro-organismes	4
I.1 Bois de cèdre : Exploitation et Biodégradation	4
I.2 Biodégradation du bois de cèdre	4
I.2.1.Micro-organismes impliqués dans la biodégradation du bois	5
II.Adhésion et formation des biofilms aux surfaces	8
II.1 qu'est ce qu'un biofilm ?	8
II.2 Formation des biofilms	9
II.3 Mécanismes et interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion microbienne	12
II.3.1-Interactions de van der Waals	12
II.3.2-Interactions électrostatiques	12
II-3-3-Interactions polaires	12
II.4 Facteurs influençant l'adhésion microbienne.	13
II.5 Revue sur les axes de recherches des biofilms sur le bois	14
III.Préservation du bois et moyens de lutte contre les biofilms	15
III.1 Préservation du bois	15
III.1.1- Composés organiques	15
III.1.2-Goudrons et les huiles	16
III-1-3- Composés hydrosolubles	16

III.2 Moyens de lutte contre les biofilms	16
III.2.1 Développement de surfaces antiadhésives	17
III.2.2 Elaboration de matériaux antibactériens	17
III.2.2.1-Incorporation d'espèces inorganiques et/ou chargées	17
III.2.2.2. Incorporation d'agents antimicrobiens	18
III.2.2.3 Revue concernant la lutte contre les biofilms par les PAMs	18

MATERIEL ET METHODES

I-Characterisation physico-chimique de la surface du bois traite	21
I.1.Mesure de l'angle de contact du bois de cèdre	22
I.1.1 Détermination de la rugosité du bois de cèdre	22
I.2. Préparation de substrat	22
II. Effet antiadhésif des extraits bruts du <i>T. vulgaris</i> contre les souches fongiques de dégradation du bois de cèdre.	24
II.1. Matériel végétal.	24
II.2. Traitement du bois de cèdre par l'extrait méthanolique de <i>T. vulgaris</i>	25
II.3. Propriétés physico-chimiques du bois traité par la méthode d'angle de contact	25
III-Effet des extraits bruts du <i>Thymus vulgaris</i> sur l'adhésion des spores fongiques à la surface du bois de cèdre	25
III.1. Spores fongiques et conditions de culture	25
III.2 Traitement du bois de cèdre par l'extrait méthanolique de <i>Thymus vulgaris</i>	26
III.3.Test de l'adhésion	26
III.4.Observation au Microscope Electronique à Balayage Environnemental (M.E.B.E.)	27
IV-Isolement et identification des microorganismes dégradant le bois	28
IV .1Prélèvement et préparation des échantillons	28
IV.2. Repiquage et conservation des souches	28

IV.3 .Identification des microorganismes responsables de la dégradation du bois	29
IV.3.1 Extraction de l'ADN génomique	29
IV.3.2 Protocole de PCR.	30
IV.3.3 Amorces utilisées	30
VI.3.4 Mélange réactionnel	30
VI.3.5 Amplification	31
VI.3.6 Electrophorèse sur gel d'agarose	31
VI.3.7 séquençage au (CURI)	32
VI.3.8 Analyse informatique des séquences	32

RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Caractérisation physico-chimique de la surface du bois traite	35
I.1-Caractéristiques physico-chimiques de la surface du bois de cèdre	35
I.2-Hydrophobicité du bois après traitement par l'extrait du <i>Thymus vulgaris</i>	36
I.2.1- Bois traité avec l'extrait obtenu par macération	36
I.2.2 Bois traité à l'extrait obtenu par sonication	37
I.3-Caractère donneur-accepteur d'électrons du bois de cèdre	39
II. Effet antiadhésif des extraits bruts du <i>T.vulgaris</i> contre les souches fongiques dégradant du bois de cèdre	40
II.1. Témoin non traité	40
II.2-Effet antiadhésif de deux extraits <i>T. vulgaris</i> obtenus par macération et sonication	41
II.3-Effet de la concentration de l'extrait sur le comportement adhésif des spores fongiques	43
II.4-Effet de temps de prétraitement du bois sur le comportement adhésif des spores fongiques	44
III. Corrélation entre les caractéristiques physico-chimiques du bois de cèdre et l'adhésion des spores fongiques	45
IV. Identification des microorganismes responsables de la dégradation du bois.	46
IV.1 Caractérisation moléculaire des isolats	46
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	50

Références bibliographiques

52

Annexe

60

Introduction

De la préhistoire à l'avènement de l'ère industrielle, le bois a été le premier matériau exploité dans l'architecture et la construction. Il a donné naissance à un art de bâtir qui a procédé puis, orienté les autres modes de construction (Herzog et *al* 2005).

Le bois du cèdre, en particulier, fut le matériau noble le plus employé en architecture qu'on rencontre fréquemment dans les villes impériales : Fès, Marrakech, Rabat, Meknès, Tétouan... En fait, il a été utilisé pour de nombreuses actions dont la construction des maisons, bâtiments, de monuments et d'édifices. Les sculpteurs transforment ce matériau en vrai chef-d'œuvre avec des motifs de qualité, riches et originaux.

Bien que pourvue de nombreuses qualités, toute essence forestière y compris le bois de cèdre est un matériau sensible aux agents biologiques de dégradation. Les recherches sur le bois et sa dégradation font l'objet depuis plusieurs décennies de nombreuses publications. Or, toute surface plongée dans un milieu non stérile se recouvre de micro-organismes qui forment un biofilm. Ainsi, l'étude des mécanismes impliqués dans l'adhésion des micro-organismes aux supports fait l'objet d'une partie importante de la littérature scientifique sur une grande variété de surfaces telles que les métaux, les plastiques, les tissus vivants (tissus humains), et les surfaces minérales (pierres, bétons). Les données acquises sur ces supports constituent aujourd'hui la base de la «Science des biofilms». A notre connaissance, peu de travaux ont été publiés sur l'adhésion et la formation des biofilms sur le bois. (Zyani et *al* 2009 ; El Abed et *al* 2010, El Abed et *al* 2011a).

De manière croissante ces dix dernières années, les recherches concernant les moyens de lutte contre les biofilms se multiplient. 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. Depuis quelques années, l'exploitation des molécules antimicrobiennes naturelles contenues dans les plantes aromatiques essentielles, que ça soit par les extraits bruts aromatiques ou bien par leurs huiles essentielles a été reportée dans la littérature scientifique comme une nouvelle approche biologique de lutte contre le formation des biofilms aux surfaces (Cassandra et *al* 2008 ; Jittra Limsong et *al* 2004 ; Taweechaisupapong et *al* 2012). À notre connaissance, un faible nombre d'études scientifiques a été publié sur la lutte contre les biofilms du bois par les PAMs. De ce fait, le présent travail s'est fixé comme objectifs d'étudier.

-L'effet des extraits bruts du *Thymus vulgaris* sur les propriétés physico-chimiques du bois de cèdre

- Effet des extraits bruts du *Thymus vulgaris* sur l'adhésion des spores fongiques à la surface du bois de cèdre.

En plus, afin d'enrichir de la banque des microorganismes responsables de la pourriture du bois, le second objectif de ce travail est l'isolement, la caractérisation et l'identification des microorganismes responsables de la dégradation du bois à partir de certaines constructions de l'ancienne médina de Fès.



Revue bibliographique



I. DEGRADATION DU BOIS PAR LES MICRO-ORGANISMES

I.1 Bois de cèdre : Exploitation et Biodégradation

Le bois de cèdre a été utilisé il y a plus de 10 000 ans au Proche-Orient. Son utilisation s'est ensuite étendue respectivement à la Grèce et dans la Méditerranée occidentale vers 6000 et 5500 à 4500 ans avant J-C.

Tout au long de l'histoire des dynasties Idrisside, Almoravide et Almohade, le cèdre fut le bois le plus employé dans la construction, l'ornementation avec l'apparition de majestueux édifices: grandes mosquées et mausolées, somptueux palais, riads (M'hirit et Benzyane 2006).

En fait, le bois a été utilisé dans la majorité des constructions monumentales dans les villes contemporaines comme Fès, Marrakech, Rabat, Meknès, Tétouan.

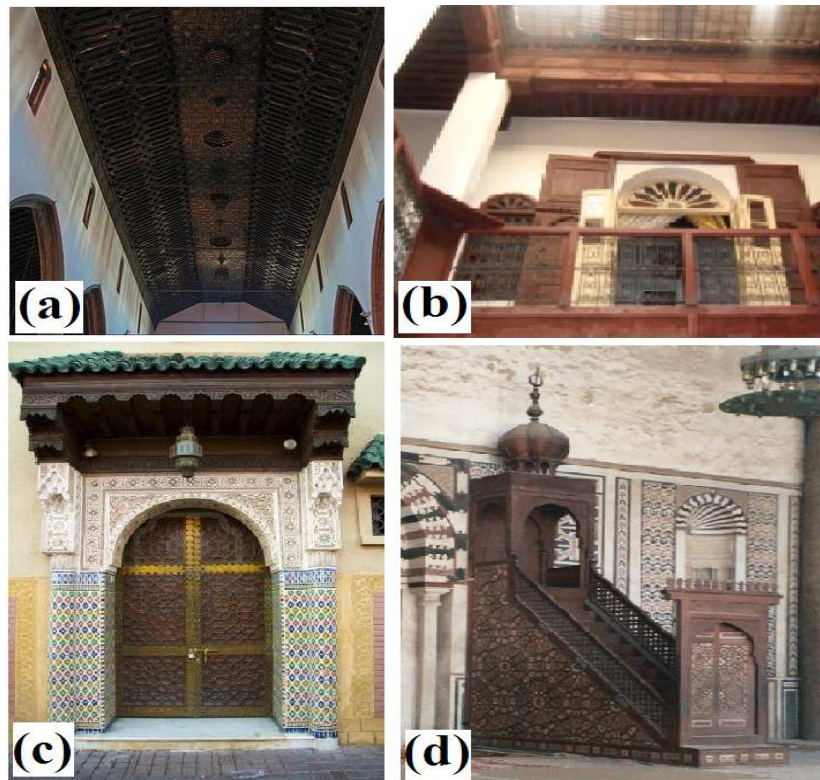


Figure 1. Exemple d'utilisation du bois de cèdre dans les monuments historiques de la médina de Fès. (a) Plafond (b) éléments de construction intérieure d'un Riad (c) un portail traditionnel (d) Minbar de la mosquée Cèdre sculpté.

I.2 Biodégradation du bois de cèdre

Etant un biomatériau végétal complexe et riche, il est menacé d'être attaqué par différents agents de détérioration. Ces organismes, qu'ils soient des insectes xylophages qui creusent des galeries dans le bois pour y pondre leurs œufs, ou des champignons, dégradent les constituants du bois afin d'assurer leur croissance.

La biodégradation est un phénomène complexe influencée 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 la teneur en nutriments des tissus selon les espèces, ainsi que par la mobilité des éléments nutritifs (Gosz *et al* 1973).

I.2.1. Micro-organismes impliqués dans la biodégradation du bois

Une biodétérioration est définie comme étant une dégradation indésirable causée par des organismes vivants. Il en résulte des modifications des propriétés physico-chimiques, mécaniques d'un matériau (Eggins et Oxley 2001). Les études réalisées dans l'axe de la biodégradation du bois ont montré qu'un certain nombre d'espèces d'insectes (Coléoptères, fourmis charpentières, termites) peuvent causer la dégradation du bois et en réduire considérablement la résistance. Par ailleurs,

l'endommagement peut être dû principalement et majoritairement aux bactéries et aux champignons du bois dotés du pouvoir enzymatique attaquant ce matériau et créent une érosion de sa surface.

a) Bactéries du bois

Parmi les bactéries capables de dégrader le bois on rencontre le plus souvent les deux sous embranchements : les eubactéries et les mycobactéries (Cauliez 2007). Cette biodégradation se manifeste par des déchirures localisées ou des cavités dans la paroi cellulaire. Cette activité est favorisée en conditions humides.

Après la colonisation de la surface du bois et dans des conditions favorables, les bactéries *Cellulomonas* sp et *Cellovibrio vulgaris*, seront capables de dégrader les polysaccharides de la paroi cellulaire aboutissant ainsi à l'augmentation de la perméabilité du bois, et entraînant des pertes de masse, de propriété mécanique et esthétique significatives (Molnar 1997).

b) Champignons du bois

On peut classer les champignons décomposeurs du bois selon la pourriture qu'elles engendrent en trois types:

i. Pourriture molle

Ce sont surtout des Ascomycètes et des Champignons Imparfaits (Kirk et Farrell 1987). Ils attaquent le bois en conditions d'humidité élevée.

La pourriture molle est provoquée par l'action conjointe de plusieurs champignons microscopiques qui détruisent la cellulose. Le bois devient noirâtre et mou et provoque une pourriture cubique superficielle. Les champignons de la pourriture molle attaquent le bois en contact avec la terre.

Une attaque n'est décelable de l'extérieur que tardivement. Le bois attaqué par la pourriture molle est par contre très tendre et peut être enfoncé sans peine. (Dommergues et Mangenot 1970).

ii. Pourriture brune/cubique

La cellulose et les hémicelluloses sont dégradées préférentiellement alors que la lignine subsiste.

Le bois altéré prend une teinte plus foncée que la normale, souvent brunâtre ou brun rougeâtre. Il perd son élasticité et devient de plus en plus cassant, se clivant selon trois directions sensiblement perpendiculaires. Les parois du bois perdent leur structure et sont réduites en une substance amorphe. La formation des cubes se fait par l'extraction de l'eau contenue dans le bois par le champignon, elle est observée sur un bois fortement attaqué représentant le squelette de la lignine. (Dommergues et Mangenot 1970; Kirk et Fenn 1982). Les champignons de pourriture brune sont essentiellement associés aux Gymnospermes et sont largement minoritaires comparativement aux pourritures blanches.

iii. Pourriture blanche

Il s'agit surtout des basidiomycètes qui sont les organismes très efficaces pour dépolymériser la lignine (Haider 1992). La cellulose et les hémicelluloses, sont aussi dégradées mais de façon moins intense. Les vitesses relatives de décomposition de la lignine et de la cellulose varient largement en fonction des espèces de champignons et des conditions qui règnent à l'intérieur du bois. Parmi les différents types de pourriture blanche connus, deux groupes principaux sont généralement reconnus.

- La délignification sélective ou type I

La lignine est dégradée avant la cellulose et les hémicelluloses. Le bois se décolore et perd de sa rigidité. Il acquiert une structure fibreuse et molle et conserve son élasticité tant que subsiste la cellulose.

- La carie simultanée ou type II

La dégradation de la cellulose, des hémicelluloses et de la lignine se produisent à la même vitesse. Le bois dégradé perd de sa rigidité et de son élasticité.

Quelque soit le type de pourriture les dommages qui en résultent se traduisent par une perte des propriétés esthétiques et mécaniques, allant parfois jusqu'à la destruction presque totale de la pièce de bois.

Bien que pourvue de nombreuses qualités, toute essence forestière y compris le bois de cèdre est un matériau sensible aux agents biologiques de dégradation. Les recherches sur le bois et sa dégradation font l'objet depuis plusieurs décennies de nombreuses publications.

Or, toute surface plongée dans un milieu non stérile se recouvre de micro-organismes qui forment un biofilm. Ainsi, l'étude des mécanismes impliqués dans l'adhésion des micro-organismes aux supports fait l'objet d'une partie importante de la littérature scientifique sur une grande variété de surfaces telles que les métaux, les plastiques, les tissus vivants (tissus humains), et les surfaces minérales (pierres, bétons). Les données acquises sur ces supports constituent aujourd'hui la base de la «Science des biofilms». L'écologie microbienne de biofilms implantés sur le bois est un sujet très peu abordé dans la littérature scientifique.

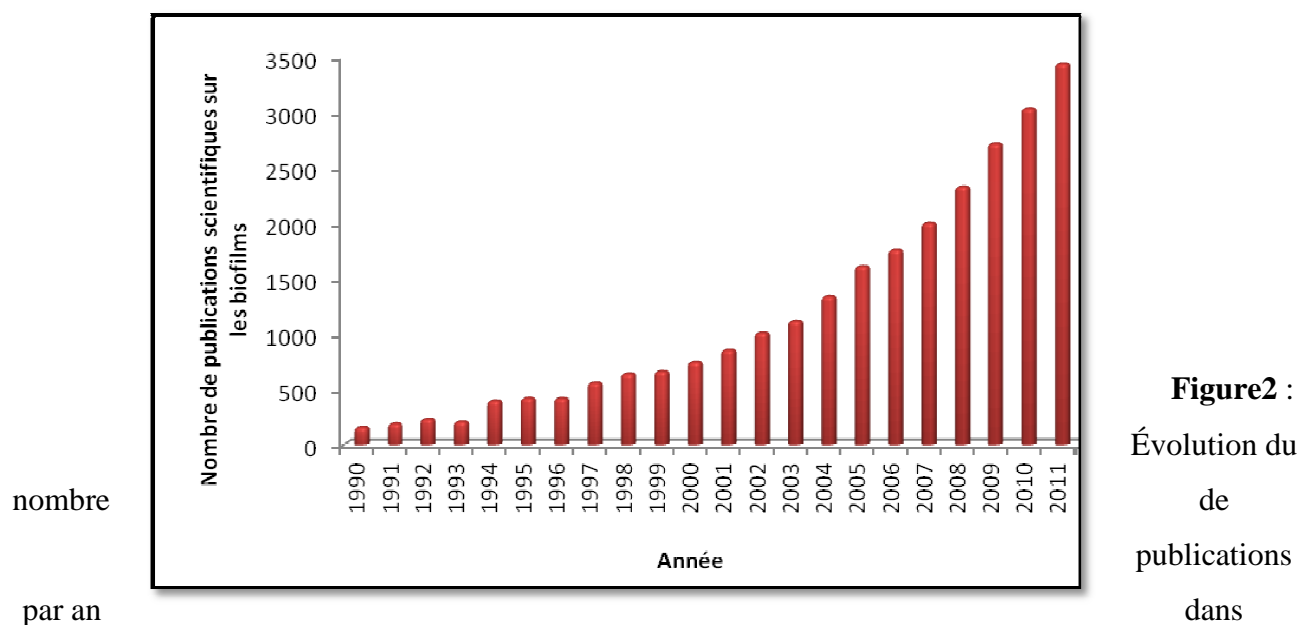


II. ADHESION ET FORMATION DES BIOFILMS AUX SURFACES

Depuis l'époque pasteurienne, la plupart des études de laboratoire menées par les microbiologistes ont porté sur des cellules en suspension. Cependant, dans la majorité des écosystèmes naturels étudiés, le mode planctonique est très rarement rencontré ou ne constitue qu'un état transitoire. Durant ces 20 dernières années, les microbiologistes ont pris conscience que le mode de croissance bactérien utilisé en laboratoire avait ses limites. En effet, dans leur environnement naturel, la vie microbienne se déroule majoritairement et préférentiellement à l'état sessile, fixé sur un support plutôt qu'à l'état planctonique, libre et isolée dans le milieu environnemental. Ce mode de vie ne se réduit cependant pas l'attachement sur une surface mais constitue une réelle stratégie de survie par la mise en place et le développement d'une communauté véritablement organisée, à laquelle W. Costerton dès 1978 a donné le nom de « biofilm ».

II.1 qu'est ce qu'un biofilm ?

Le terme « biofilm » est proposé pour la première fois par John William Costerton et *al* en 1978 comme étant des populations de microorganismes, adhérents les uns aux autres à des surfaces ou interfaces et englobés dans une matrice EPS. La notion de biofilm n'a cessé d'évoluer depuis, en fonction des avancements des travaux visant la compréhension profonde de ce phénomène. Les données acquises sur ces supports constituent aujourd'hui la base de la « science des biofilms » (Figure 2).



II.2 Formation des biofilms

La formation d'un biofilm microbien sur une surface solide est un phénomène complexe dans lequel des processus physiques, chimiques et biologiques sont impliqués (Characklis et Marshall, 1990 ; Lappin-Scott et Costerton, 1995) et l'interdisciplinarité est révélée : microbiologie, physico-chimie de surface, génétique...

La constitution d'un biofilm mature se déroule selon les étapes suivantes (Figure.3):

- Transport
- Phase de conditionnement
- Adhésion des microorganismes
- Croissance du biofilm
- Dispersion du biofilm.

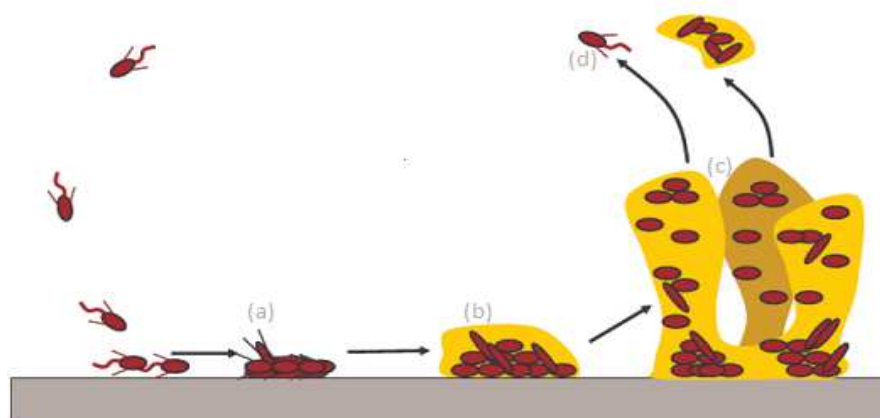


Figure 3: Schéma des étapes conduisant à la formation d'un biofilm. (Filloux & Vallet 2003).

a) Transport

L'adhésion des microorganismes sur les surfaces est forcément précédé d'un rapprochement entre les deux éléments qui se fait par le transport des cellules. L'approche des microorganismes de la surface dépend des propriétés dynamiques du milieu (vitesse d'écoulement du fluide) et des propriétés physico chimiques de la surface (Stoodley et *al* 2002). L'adhésion microbienne implique le déplacement de la cellule vers le lieu de son adhésion.

Cette approche nécessite différents appendices bactériens, tels que les flagelles et les cils (Katsikogianni et *al* 2004) qui permettent également à la bactérie de se déplacer sur la surface.



D'autres appendices, les pilis sont pour leur part impliqués dans l'attachement initial à la surface (Gavin et *al* 2003).

Les différents mécanismes de ce transport sont : la sédimentation, le mouvement brownien, chimiotaxie (Characklis et *al* 1983; Marshall et *al* 1986; Characklis et *al* 1990)

- Sédimentation : ce phénomène est dû aux forces de gravité qui favorisent le rapprochement des microorganismes vers les surfaces.
- Mouvement Brownien : c'est un mouvement lié à l'énergie de surfaces des molécules immergées dans un milieu liquide (Van Oss 1996).
- Chimiotaxie : c'est un mécanisme rencontré chez les espèces mobiles par le biais de flagelles qui s'en servent pour le déplacement vers les nutriments.

b) Phase du conditionnement

La nature du milieu, du matériau, ainsi que les caractéristiques de surface de ce dernier, sont des paramètres essentiels intervenant lors de cette première étape. En effet, la surface est le siège d'une absorption irréversible de macromolécules telles que des acides humiques, des polysaccharides ou des protéines, conduisant à la formation d'un film conditionnant ("conditioning film") (Ishida et Griffiths 1990). Ce film est qualifié de conditionnant car il peut modifier les propriétés de surface initiales du matériau ce qui a pour conséquence soit de prévenir l'approche des bactéries soit au contraire de créer un microenvironnement favorable à l'adhésion stable des bactéries.

c) Adhésion des microorganismes

Dans un premier temps l'adhésion est due à des interactions faibles entre la surface et les microorganismes (interactions de type van der Waals et électrostatiques). A ce stade, le microorganisme peut se détacher de la surface et retrouver son état planctonique, l'adhésion est donc réversible.

Dans un deuxième temps, l'adhésion devient irréversible grâce à la sécrétion d'exopolymères par les microorganismes permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas, des interactions



fortes s'établissent entre le microorganisme et la surface avec des liaisons de type hydrophobe. La synthèse des EPS, qui débute dès les premières étapes d'adhésion, se poursuit pendant la maturation du biofilm (McBride 2001) et la matrice peut alors occuper jusqu'à 75-95 % du volume d'un biofilm mature.

d) Croissance du biofilm

Une fois que le microorganisme est irréversiblement adhérent à la surface, sa multiplication conduit à la formation de colonies qui vont recouvrir toute ou une partie de la surface selon les propriétés de surface des microorganismes et des matériaux. La structure du biofilm dépend des conditions environnementales telles que la source de carbone ou le régime hydrodynamique (Stanley et al 2003). Par la suite le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel (Lappin et al 1995; Davey et al 2000). Dans cette structure tridimensionnelle se forment des canaux permettant la circulation de nutriments, d'oxygène et l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien. Finalement l'épaisseur du biofilm se stabilise lorsque les phénomènes d'arrachement du biofilm compensent sa croissance.

e) Dispersion du biofilm

Le détachement de cellules du biofilm intervient lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables : limitation de la disponibilité en oxygène dans des biofilms épais, apparition de forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques, diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles (Davey et al 2000; Costerton et al 1999 a et b). Les microorganismes peuvent alors migrer afin de trouver un environnement plus favorable à leur développement. Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm mais peut avoir lieu, soit par lyse cellulaire soit par le départ de cellules viables, tout au long de la formation du biofilm et en réponse à un changement d'environnement.

II.3 Mécanismes et interactions physico-chimiques responsables de l'adhésion microbienne



Une fois les microorganismes arrivés à proximité des surfaces, ils adhèrent initialement par l'intermédiaire de certaines interactions physico-chimiques (Van Oss 1996) essentiellement les interactions de van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions acido-basiques (donneur - accepteur d'électrons au sens de Lewis).

II.3.1-Interactions de van der Waals

Les forces de van der Waals ont été ainsi nommées en l'honneur du physicien hollandais Johannes Diderik van der Waals (1873-1923). Ces forces impliquent l'existence d'une interaction d'attraction entre deux atomes neutres.

II.3.2-Interactions électrostatiques

Une particule, bactérie ou surface plane immergée dans un fluide, acquiert une charge de surface par le fait de l'adsorption ou l'ionisation des groupements présents à sa surface (James, 1991). Cette adsorption et cette ionisation dépendent du pH du milieu. Pour un pH neutre, la plupart des corps solides (microorganismes) portent une charge négative.

L'immersion dans un milieu aqueux facilite la redistribution des ions. Les ions de même signe (co-ions) seront repoussés de la surface tandis que les ions chargés positivement (contre-ions) seront attirés.

II.3.3-Interactions polaires

Ces interactions restent les plus mal comprises d'un point de vue théorique ; ce sont les interactions que l'on trouve en milieu aqueux, et qui décroissent de façon exponentielle en fonction de la distance. Elles concernent principalement l'interaction entre donneur et accepteur d'électrons (van Oss 1996 ; Hamadi 2005). Parmi les interactions polaires on distingue :

-Liaisons hydrogène : une interaction de nature électrique entre atomes électronégatifs (O, Cl, F, N...) et atomes d'hydrogène liés à un atome électronégatif. Un composé donné peut être hydrophile, c'est-à-dire capable d'intervenir avec des liaisons hydrogène (Vergnault 2004).

-Répulsion hydrophile et interactions hydrophobes : Les interactions hydrophiles et hydrophobes sont toutes les deux dues à une restructuration des molécules d'eau au voisinage des surfaces respectivement hydrophiles ou hydrophobes. Cependant aucune approche théorique satisfaisante expliquant l'origine de ces deux forces n'est disponible dans la littérature (Vergnault 2004)

Les surfaces hydrophiles représentent celles ayant plus d'affinité pour l'eau qu'entre elles, ce qui se traduit par l'existence d'une couche d'eau liée à la surface et organisée en réseau (Vergnault



2004). Quand les deux surfaces hydratées s'approchent l'une de l'autre, la présence de cette eau liée induit une énergie de répulsion hydrophile (nommées également forces de solvatation ou d'hydratation).

Les surfaces ayant peu d'affinité pour l'eau sont dites hydrophobes, Autour de ces surfaces, l'eau va s'organiser d'une façon défavorable d'un point de vue entropique (plus ordonnée que dans la masse de la phase aqueuse). Elle va donc tendre à se dissocier de ce type de surface, ce qui se traduit par une énergie d'attraction hydrophobe.

II.4 Facteurs influençant l'adhésion microbienne.

L'adhésion microbienne aux surfaces solides constitue l'étape initiale de la formation des biofilms. Ce processus est régi par de nombreux facteurs liés à la fois aux caractéristiques des micro-organismes du support et de l'environnement aqueux. Selon Stoodley et *al* (1997), quatre catégories de facteurs qui influencent la structure d'un biofilm:

- Les caractères de la surface sur laquelle il se développe : hydrophobicité (Elabed et *el* 2011 ; Liu et *al* 2004), rugosité (Elabed et *al* 2012).
- Les conditions hydrodynamiques dans lesquelles le biofilm se développe. En effet, les conditions hydrodynamiques influencent la forme physique du biofilm à travers la contrainte de cisaillement, ainsi on aura un biofilm résistant, compact et fin s'il est soumis à une force physique élevée. Une forte contrainte de cisaillement, le détachement du biofilm va avoir lieu via l'érosion du biofilm créant des biofilms lisses.
- La composition du milieu (les nutriments, présence de substances antimicrobiennes);
- Les espèces composant du biofilm.

En effet, plusieurs paramètres sont susceptibles et peuvent potentiellement influencer l'adhésion microbienne sur un support solide. Nous présentons dans le tableau (1) suivant une liste non exhaustive des différents paramètres pouvant modifier l'adhésion microbienne.

Tableau 1. Récapitulatif des facteurs influençant l'adhésion d'un micro-organisme sur une surface solide



Facteurs liés au support	Facteurs liés au micro-organisme	Facteurs liés à l'environnement
-Contaminations organiques	-Concentration microbienne	-Temps de contact
-Film conditionnant	-Espèce	-Température
-Nature chimique de la surface	Composition et structure de la surface cellulaire	Force ionique et nature des sels
-Rugosité	-Caractéristiques physico-chimiques de la surface microbienne (hydrophobie, charge)	-pH
-Charge de surface	-Phase de croissance (état physiologique)	-Présence de macromolécules, de surfactants et d'éléments nutritifs
-Hydrophobie	-Adaptation phénotypique	-Conditions hydrodynamiques

II.5 Recherches des biofilms sur le bois

L'écologie microbienne de biofilms implantés sur le bois est un sujet très peu abordé dans la littérature scientifique. En effet, la complexité de l'étude de ce matériau (multiplicité des facteurs et des conditions d'utilisation) est à l'origine de la divergence des conclusions des études réalisées (Carpentier 1997).

La formation du biofilm a été rapportée dans de nombreux domaines dont l'agroalimentaire, l'environnement et le domaine biomédical. (Rogers et al 1996; Lellouche et al 2012; Ganesh et al 1998) et sur de nombreux matériaux (l'acier inoxydable, le verre, le bois) (Dick van der Kooij et al 1995 ;Thierry Meylheuc et al 2006; Hallam et al 2001; Estivill et al 2011). À notre connaissance, un faible nombre d'études scientifiques a été publié sur le sujet. Les différents travaux concernant l'étude des biofilms à la surface du bois sont résumés dans le tableau. 2 :

Tableau 2: Revue des différents travaux concernant l'étude des biofilms à la surface du bois



Micro-organismes étudiés	Domaine de recherche	Références
- <i>E.coli</i> - <i>E.coli</i> 0157:H7	Agroalimentaire	Adetunji et Opeyem (2011)
- <i>Listeria monocytogenes</i> - <i>Listeria spp</i>	Agroalimentaire	Adetunji et Opeyem (2011)
- <i>Listeria monocytogenes</i>	Agroalimentaire	Guillier et al (2008)
-Biofilm entier	Agroalimentaire	Oulahal et al (2009)
-Biofilm entier	Agroalimentaire	Mariani et al (2007)
- Bactéries lactiques, -Bactéries acétiques - Levures	Agroalimentaire	Swaffield et al (1997)
-Biofilm entier	Agroalimentaire	Richard (1997)
- <i>Listeria innocua</i>	Agroalimentaire	Carminati et al (2000)
-Biofilm entier	Agroalimentaire	Licitra et al (2007)
- <i>Aureobasidium pullulans</i>	Génie civil et environnement	Sailer et al (2010)

III. Préservation du bois et moyens de lutte contre les biofilms

III.1 Préservation du bois

La durabilité d'une espèce de bois est, en fait, sa résistance naturelle contre l'attaque par des champignons et des insectes. Si le bois, qui n'est pas durable par nature, est utilisé en milieu humide ou en contact direct avec le sol ou l'eau, il nécessite un traitement de préservation artificiel préalable, généralement à base de produits chimiques, pour prolonger sa durabilité.

Historiquement plusieurs méthodes de préservation de bois ont été utilisées, ces méthodes peuvent être classées en trois grandes familles.

III.1.1- Composés organiques

Il s'agit de produits organiques appartenant à des différentes familles chimiques : des organochlorés, des carbamates et des triazoles. Ils ont été pendant longtemps utilisés en solution dans des solvants organiques. Ces composés se fixent dans le bois après évaporation du solvant ayant servi à les introduire dans le bois mais du fait des nouvelles réglementations visant à réduire les émissions



de COV (composés organique volatiles) ils sont utilisés sous forme aqueuse.(Marias et *al* 2001; Cui et Preston 2006; Hyvonen et *al* 2006).

III.1.2-Goudrons et huiles

Les goudrons sont des produits obtenus par distillation destructive sous pyrolyse. Ils sont composés de centaines de substances chimiques, dont plusieurs sont considérées comme cancérogènes ou potentiellement dangereuses.

Cette classe englobe des composés constitués d'un mélange extrêmement complexe d'hydrocarbures aromatiques, de composés phénoliques et d'hydrocarbures aromatiques azotés.

L'utilisation de ces composés organiques a été arrêtée du fait de leurs toxicités (Borgin et Corbett 1970).

III-1-3- Composés hydrosolubles

Ils sont des produits minéraux introduits dans le bois sous forme de solutions aqueuses à l'aide de formulations multisels à base de chrome (Cr), de cuivre (Cu) et d'arsenic (As)qui protègent efficacement le bois (Yamada et *al* 1998; Nicholas et *al* 2000). Or ces sels peuvent toutefois induire de nombreuses pathologies chez les êtres vivants, ce qui a conduit à leur abandon progressif dans la plupart des pays européens.

III.2 Moyens de lutte contre les biofilms

Par les dommages qu'ils causent en industrie et sur les structures, par tous ces aspects, les biofilms ont un impact économique considérable. De ce fait il est absolument nécessaire d'éradiquer les biofilms nuisibles en développant des moyens efficaces et pérennes. De manière croissante ces dix dernières années, les recherches concernant les moyens de lutte contre les biofilms se multiplient. 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.

Les moyens de lutter contre la formation de biofilms indésirables peuvent être de nature physiques, chimiques, biologiques. Flemming (1990) aborde les différentes méthodes d'élimination des biofilms utilisées dans les systèmes industriels .Ces méthodes sont nombreuses, mais aucune n'assure une maîtrise totale du système.

Au niveau des matériaux, deux grandes stratégies sont actuellement proposées.

- Développement de surfaces antiadhésives
- Elaboration de matériaux antibactériens.



III.2.1 Développement de surfaces antiadhésives

L'inhibition de la formation des biofilms passe par un choix judicieux des matériaux, diminuer la rugosité des surfaces ou choisir des matériaux à faible rugosité initiale et à forte résistance à l'usure est une mesure intéressante en industrie agro-alimentaire (Carpentier et *al* 1999)

Une autre voie de recherche a permis le développement de revêtements non toxiques et sans biocides à base de silicone. Ils ne préviennent pas totalement l'adhésion des organismes mais réduisent les forces d'adhésion de façon à permettre un décrochage des salissures par l'augmentation des vitesses de flux et des forces de cisaillement.

Une diminution significative de l'adhésion bactérienne a également été obtenue avec des hydrogels (Nakagawa et *al* 1994), polymères hydrophiles présentant une forte capacité de gonflement. Lorsque la quantité d'eau dans l'hydrogel est comprise entre 10 et 98 %, ce gonflement induit la formation d'un film d'eau à la surface qui devient donc plus lisse.

III.2.2 Elaboration de matériaux antibactériens

III.2.2.1-Incorporation d'espèces inorganiques et/ou chargées

Le développement de revêtements contenant des particules d'argent ou des sels d'argent est une méthode efficace pour prévenir la colonisation bactérienne. L'argent possède un large spectre antibactérien (Cioffi et *al* 2005). La fonctionnalisation des surfaces par des ammoniums quaternaires ou des polymères cationiques (poly (éthylèneimine)) réduit aussi considérablement l'adhésion microbienne (Lin et *al* 2002). Il a été montré que des films multicouches de polyélectrolytes contenant de la cétrimide inhibent fortement la colonisation bactérienne (Grulon et *al* 2005). De bons résultats ont également été obtenus par greffage d'ions N^+ et Si^+ sur la silicone ou le polyuréthane (Gray et *al* 2005).

L'utilisation des revêtements destinés aux biomatériaux implantables, comme les sondes urinaires ou les cathéters veineux centraux, qui empêchent l'adhérence des microorganismes, des molécules chargées retardent la fixation de ces derniers par le jeu de forces de répulsion. Cette technique de lutte est peu efficace car la matrice extracellulaire qui se forme autour des prothèses peut elle-même être initiateur de la formation des biofilms (Bury et *al* 2007).

III.2.2.2. Incorporation d'agents antimicrobiens



L'incorporation d'agents antimicrobiens (antibiotiques, antiseptiques ou enzymes) dans des polymères est une des stratégies utilisées pour lutter contre les biofilms. Deux méthodes sont utilisées :

- (i) l'adsorption de la molécule sur la surface après fabrication du matériau ;
- (ii) l'incorporation de la molécule dans le polymère durant le processus de fabrication.

Cette seconde approche concerne entre autres des peptides antibactériens piégés au sein de films multicouches de polyélectrolytes (Guomard et *al* 2008). L'avantage de cette approche est que les molécules diffusent lentement, maintenant dans le milieu environnant des concentrations inhibitrices sur de longues périodes. L'inconvénient majeur est le risque d'émergence de multi-résistance. Pour éviter ce risque, de nouvelles stratégies ont été proposées comme le greffage chimique de ces agents antibactériens, le challenge consistant à maintenir leur activité biologique. Cela implique également que ces agents doivent agir au niveau de la paroi bactérienne. Dans ce contexte, Haynie et *al* (1995) ont lié de façon covalente le résidu C-terminal de la magainine sur une résine de polyamine-éthylènediamine modifiée.

Compte tenu de l'émergence des résistances aux antibiotiques et de la toxicité des molécules utilisées (métaux lourds), un marché important est ouvert concernant la recherche de nouvelles molécules moins toxiques. Au début des années 1990, Steinberg s'est étonné de voir la capacité de l'algue marine *Delisea pulchra* à rester libre de toute colonisation dans des eaux pourtant fortement contaminées. Manefield et *al* (1999) ont démontré que la molécule, appelée furanone, qui prévient la contamination de l'algue, a une structure très proche des molécules signales (HSL: Homo Sérine Lactone) et se comporte donc comme un antagoniste des HSL. Ces furanones sont aujourd'hui incorporées dans divers produits comme les pâtes dentifrices et des vernis.

III.2.2.3 la lutte contre les biofilms par les PAMs

Depuis quelques années, l'exploitation des molécules antimicrobiennes naturelles contenues dans les plantes aromatiques essentielles, que ça soit par les extraits bruts aromatiques ou bien par leurs huiles essentielles a été reporté dans la littérature scientifique comme une nouvelle approche biologique de lutte contre la formation des biofilms aux surfaces. À notre connaissance, un faible nombre d'études scientifiques a été publié sur le sujet. Les différents travaux concernant l'utilisation des PAM pour lutter contre les biofilms sont résumés dans le tableau.3 :

Tableau 3 : Revue des différents travaux concernant la lutte contre les biofilms par les PAMs

Souche	PAM utilisé	Type d'extrait	surface	Référence
--------	-------------	----------------	---------	-----------



<i>Staphylococcus mutans</i>	Thé vert	Extrait brut	Plaque dentaire	Honraet et al 2006
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Cymbopogon citratus</i> (Citronnelle)	Huile essentielle	Verre	Taweechaisupapong et al 2012
<i>Listeria Monocytogenes</i>	<i>Syzygium aromaticum</i> (clou de girofle)	Huile essentielle	--	Leonard et al 2012
<i>Listeria Monocytogenes</i>	<i>Mentha spicata</i> (menthe verte)	Huile essentielle	--	Leonard et al 2012
<i>Listeria Monocytogenes</i>	<i>Lippia rehmannii</i> et <i>Cymbopogon citratus</i> (citronnelle)	Huile essentielle	--	Leonard et al 2012
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	Composé majoritaire	Bois de cèdre	ElAbed et al 2011b
<i>Listeria monocytogenes</i>	--	Les monoterpenes des huiles essentielles	--	Sandasi et al 2007
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Origan</i>	Les composés majoritaires	La peau	Nostro, et al 2007
<i>Staphylococcus aureus</i>	- <i>Lonicera alpigena</i> , - <i>Castanea sativa</i> , - <i>Juglans regia</i> , - <i>Ballota nigra</i> , - <i>Rosmarinus officinalis</i> , - <i>Leopoldia comosa</i> , - <i>Malva sylvestris</i> , - <i>Rosa canina</i> - <i>Rubus ulmifolius</i>	Extraits bruts	--	Cassandra et al 2008
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Glycyrrhiza glabra L.</i>	Extraits bruts	Muqueuse gastrique humaine	Nicole Wittschier et al 2009
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Andrographis paniculata</i> ; <i>Cassia alata</i> ; <i>Chinese black tea (Camellia sinensis)</i> ; <i>guava (Psidium guajava)</i> ; <i>Harrisonia perforata</i> and <i>Streblus asper</i> ,	Extraits bruts	--	Jittra Limsong et al 2004
mutans streptococci	<i>Mikania</i>	Extraits bruts	--	Yatsuda et al 2005



Matériel & Méthodes



I-CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE LA SURFACE DU BOIS TRAITE

La principale méthodologie sur laquelle se base la première partie du travail consiste à mesurer les angles de contact faits par des gouttelettes liquides déposées sur la surfaces étudiée Cette balance de force fut proposée d'abord par Thomas Young en 1805.

La précision, et la versatilité avec laquelle elle permettait de déterminer l'énergie de l'adhésion libre entre liquides et solides exactement à leur interface d'interaction ont été, jusqu'à ce jour, difficiles à reproduire par une autre méthode.

- **Principe**

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 mesurer l'énergie de surface du liquide ou du solide. La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie libre d'une surface. Elle permet aussi la discrimination de la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide solide. On peut ainsi déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface. Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide est appelé angle de contact (θ)(Figure4). La mesure de cet angle nous donne trois types d'information :

- Si on utilise l'eau comme liquide de mesure d'angle de contact, on peut déduire 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 d'Owens Wendt.
- Si on mesure de l'hystérésis entre l'angle à l'avancée de la goutte et au retrait de la goutte on obtient des renseignements sur la non homogénéité physique (rugosité) ou chimique de la surface.

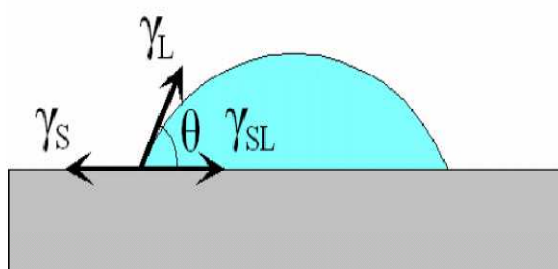


Figure 4 : Schéma représentatif de l'angle formé entre un liquide et un support.

I.1.Mesure de l'angle de contact du bois de cèdre

Avant de passer à la caractérisation physico-chimique du bois, les morceaux de bois ont subi un polissage mécanique à l'aide de papier abrasif de 300 g/cm. La rugosité des morceaux du bois a été fixée à une gamme de rugosité 0,7-1 μm .

I.1.1 Détermination de la rugosité du bois de cèdre

La rugosité du bois de cèdre a été déterminée par rugosimètre «Mitutoya SJ 301» du Laboratoire Génie Mécanique de L'Ecole Supérieure de Technologie de Fès. Cette méthode de mesures consiste à effectuer un « palpé » mécanique le long d'un ou plusieurs profils en déplaçant un stylet. Les irrégularités de la surface analysée provoquent les déplacements verticaux du stylet, ces derniers permettent de remonter l'état géométrique de la surface réelle (Leban et Triboulot 1994). Parmi les nombreux critères de la rugosité de surface, l'écart moyen arithmétique (R_a) est probablement le paramètre le plus utilisé lors des études de la topographie des surfaces.

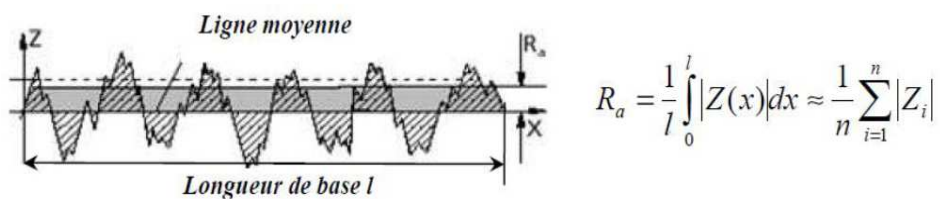


Figure 5 :

Mesure de la rugosité

I.2. Préparation de substrat

La surface solide sélectionnée pour cette étude est le bois de cèdre. Les échantillons sont coupés selon les dimensions suivantes: Longueur: 3,2 cm; largeur: 1 cm; Epaisseur: 0,3 cm. Les morceaux de bois de cèdre de gamme de rugosité définie -comme indiqué précédemment- sont lavés à 6 reprises avec de l'eau distillée puis séchés, et emballés séparément dans du papier aluminium pour ensuite être stérilisés par autoclavage pendant 20 minutes à 120°C.

Les angles de contact ont été mesurés avec trois liquides purs de caractéristiques énergétiques connues (Tableau 4) : eau distillée, diiodométhane et formamide.

Tableau 4 : Propriétés de la tension de la surface [Lifshitz-van der Waals (γ_{LW}), électron accepteur (γ^-) et électron donneur (γ^+)] de l'eau, le formamide et le Diodométhane.

Liquide utilisé	γ_{LW} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)
Water H ₂ O	21,6	25,4	25,4
Formamide CH ₃ NO	38,7	2,3	39,4
Diiodométhane (CH ₂ I ₂)	50,5	0,7	0,0

Les



caractéristiques physico-



chimiques de la surface du bois sont obtenues à partir de mesures d'angles de contact à l'aide d'un goniomètre (GBX, France) (Figure.6).

Figure.6. Appareil de mesure de l'angle de contact

L'Hydrophobicité :

L'angle de contact vis-à-vis de l'eau (θ_w) peut être utilisé comme une méthode qualitative pour estimer l'hydrophobicité de la surface (Oliveira et al, 1997). D'après Vogler (1998), la surface est considérée hydrophobe si θ_w est supérieur à 65° et hydrophile si θ_w est inférieur à 65° .

Selon l'approche de Van Oss (1997), il est possible de déterminer le degré d'hydrophobicité d'une substance vis-à-vis de l'eau. Il est exprimé en unité internationale (mJ/m^2). La surface peut être classée hydrophile quand le ΔG_{iwi} est positive et hydrophobe quand le ΔG_{iwi} est négative. L'énergie libre de la surface du substrat, les composants de van der Waals et les paramètres électron donneur (ou base de Lewis) et électron accepteur (ou acide de Lewis) ont été calculés par l'équation de Young-van Oss (Absolom et al, 1983).

$$\gamma_L (\cos\theta + 1) = 2(\gamma_s^{LW} \gamma_L^{LW})^{1/2} / \gamma_L + 2(\gamma_s^+ \gamma_L^-)^{1/2} / \gamma_L + 2(\gamma_s^- \gamma_L^+)^{1/2}$$

γ^{sLW} : Composantes de Lifshitz- Van der Waals de la surface.

γ^{LLW} : Composantes de Lifshitz- Van der Waals du liquide.

γ^{s+} : Composante(s) accepteurs d'électrons de la surface.

γ^{L+} : Composante(s) accepteurs d'électrons du liquide.

γ^{s-} : Composante(s) donneurs d'électrons de la surface.

γ^{L+} : Composante(s) donneurs d'électrons du liquide.

La composante acide-base de Lewis (γ_{AB}) a été déterminée par : $\gamma_S^{AB} = 2(\gamma_S^- \gamma_S^+)^{1/2}$

L'interaction de l'énergie libre de la surface avec l'eau (ΔG_{iwi}) s'écrit comme suite :



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

γ^{LW} : Composantes de Lifshitz-Van der waals de la surface (i).

γ^+ : Composantes d'accepteurs d'électrons.

γ^- : Composantes de donneurs d'électrons.

II.EFFET ANTIADHESIF DES EXTRAITS BRUTS DU *T. VULGARIS* CONTRE LES SOUCHES FONGIQUES DE DEGRADATION DU BOIS DE CEDRE.

II.1. Matériel végétal.

La plante utilisée pour l'ensemble de nos travaux est: *Thymus vulgaris*. Cette plante est récoltée au sein de l'Institut des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate. Cette plante médicinale aromatique est largement utilisée dans plusieurs applications de fait qu'elle est parmi les essences et les extraits les plus actives, connues pour leurs propriétés antimicrobiennes (antibactériennes et antifongiques)

Après séchage, les parties aériennes feuilles et tiges de l'espèce *Thymus vulgaris*, triées avec soin ont été soumises à différentes méthodes d'extraction par solvant (Macération et Sonication) après leur broyage en augmentant la surface de contact matière végétale- solvant. Le protocole d'extraction des extraits méthanoliques de *Thymus vulgaris* a été décrit par Sadiki et al 2010.

II.2. Traitement du bois de cèdre par l'extrait méthanolique de *T. vulgaris*

Un volume de 10 μ l de l'extrait de plante obtenu par macération ou sonication d'une concentration de 5mg/ml a été appliqué à la surface du bois de cèdre. L'extrait brut de *T. vulgaris* est solubilisé dans une solution de Dimethyl Sulfoxide (DMSO) à 2%.

II.3. Propriétés physico-chimiques du bois traité par la méthode d'angle de contact

L'effet de l'extrait de *T. vulgaris* obtenu par les deux méthodes d'extraction (macération et sonication) sur les paramètres physico-chimiques de la surface de bois de cèdre a été déterminé par la méthode d'angle de contact comme déjà indiqué





dans la partie I «Matériels et méthodes».

III-EFFET DES EXTRAITS BRUTS DU *T.VULGARIS* SUR L'ADHESION DES SPORES FONGIQUES A LA SURFACE DU BOIS DE CEDRE

III.1. Spores fongiques et conditions de culture :

L'évaluation de l'activité antiadhésive des extraits aromatiques testés a été menée sur quatre souches fongiques appartenant au genre *Penicillium* et *Cladosporium*. Les souches étudiées sont:

- *Penicillium commune*;
- *Penicillium chrysosum*;
- *Penicillium expansum*
- *Cladosporium cladosporioides*

Les souches fongiques sont incubées pendant 7 jours à 25 °C dans le milieu à Extrait de Malt Agar. Pendant cette période d'incubation, le mycélium s'est développé sur la surface gélosée, en produisant des spores.

Pour passer à l'adhésion des spores fongiques à la surface du bois de cèdre et étudier l'effet des extraits sur leur adhésion. Les spores fongiques sont suspendues dans une solution de KNO_3 (0.1 M) et la densité des spores a été évaluée avec un hématimètre (Malassez) et un microscope optique (Zeiss, grossissement x 40) afin d'obtenir une densité de 10^7 à 10^8 spores. ml^{-1} .

III.2 Traitement du bois de cèdre par l'extrait méthanolique de *Thymus vulgaris*

Un volume de 10 μl de l'extrait de plante obtenue par macération ou sonication a été appliqué à la surface du bois de cèdre. L'extrait brut de *T. vulgaris* est solubilisé dans une solution de Diméthyl Sulfoxyde (DMSO) à 2%. Dans un premier temps, on fixe le temps de traitement par l'extrait brut à t_0 , et on évalue l'adhésion des souches fongiques sur le bois de cèdre en fonction de la concentration de l'extrait de la PMA par observation au MEBE. En deuxième lieu, on fixe la concentration à 40mg/ml et on varie le temps de traitement. Le tableau. 5 résume le volume et le temps de contact de l'extrait avec la surface du bois.

Tableau 5 : Volume et le temps de contact de l'extrait avec la surface du bois de cèdre

Temps de contact (h)	Concentration (mg/ml)
0	5
1	20
4	40

III.3.Test de

l'adhésion

Pour évaluer l'effet antiadhésif des extraits de la plante *T. vulgaris* pour différentes concentrations, à différents temps et selon la méthode d'extraction, les essais de l'adhésion en conditions statiques (par sédimentation) sont réalisés par sédimentation à 25°C. Les cellules non adhérentes sont éliminées en rinçant manuellement et délicatement le substrat trois fois avec de l'eau distillée stérile (figure 7) (Braindet et al 1999, Hamadi et al 2005).

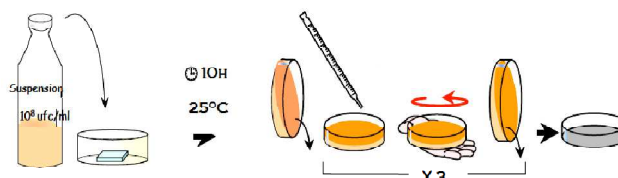


Figure.7. Protocole de l'adhésion des micro-organismes au bois

III.4.Observation au Microscope Electronique à Balayage Environnemental (M.E.B.E.)

Les échantillons avant et après traitement du bois par les extraits ont été ensuite analysées par le Microscope Electronique à Balayage Environnemental (ESEM Quanta 200: Environmental Scanning Electron Microscopy) afin d'obtenir les images et d'observer l'effet antiadhésive des extraits et comportement adhésif de chaque souche testée. 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.

Une sonde électronique fine (faisceau d'électrons) 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 qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond 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. (Joseph Goldstein, 1992).



IV-ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES MICROORGANISMES DEGRADANT LE BOIS

IV .1Prélèvement et préparation des échantillons

Dans le but d'isoler les microorganismes formant des biofilms à la surface du bois de cèdre, et qui sont responsables de la biodégradation des structures, Les prospections ont été effectuées à partir de deux sites à l'ancienne Médina de la ville de Fès.

- Site 1 : un portail d'une ancienne maison traditionnelle.
- Site 2 : une maison en ruine.

L'isolement des micro-organismes est effectué le même jour que le prélèvement. Dès son arrivé au laboratoire, le prélèvement du biofilm attaché aux bois de cèdre est réalisé. Le protocole du prélèvement des isolats a été inspiré des travaux d'Oulahal-Lagsir et *al* (2003) avec quelques modifications. La méthode consistait à découper des morceaux de bois de 25 g dans 225 ml du milieu de culture LB, puis portés sous agitation pendant 3h.

Les colonies sont discriminées et sélectionnées à partir de leur morphologie, puis ensemencées individuellement sur des boites de Pétri contenant du milieu de culture afin d'obtenir des cultures microbiennes pures.

Les différents milieux de culture ainsi que les conditions d'incubation sont résumés dans le Tableau.6.

Tableau.6. Milieux de culture et conditions d'incubation en fonction des micro-organismes

Micro-organismes	Milieu de culture	Conditions de culture
Bactéries	Milieu LB*	25°C –30°C pendant 24h
Champignons	Milieu Extrait de Malt*	30°C pendant 72h

* : composition des milieux de culture (annexe).

Le milieu LB permet d'isoler les bactéries après incubation à 37°C pendant 24h, alors que le milieu EM permet d'isoler les champignons après incubation à 30°C pendant 3-7 jours.

IV.2. Repiquage et conservation des souches

Afin de conserver les souches bactériennes et les champignons purs on a utilisé les méthodes de conservation suivantes :



Dans des tubes Eppendorf on met un volume de 800 µl de la culture liquide additionné de 200 µl du glycérol, ensuite les tubes sont parfaitement agités pour éviter la précipitation des souches qu'on conserve à -20°C (conservation pour courte période) et à -80°C (stockage d'une longue période) (Aba Lain et al 1985).

Les souches sont également conservées dans des tubes qui contiennent 1,5 ml d'une eau physiologique composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (Na Cl) : solution à 0,9 % de masse/volume de Na Cl soit 9 g/l qu'on met à -20°C. (Adoubryn et al 2005).

IV.3. Identification des microorganismes responsables de la dégradation du bois

L'identification moléculaire a été réalisée pour 3 isolats : 1 bactérie et 2 champignons capables de dégrader le bois.

IV.3.1 Extraction de l'ADN génomique

Le protocole de l'extraction de l'ADN suivit est le même pour les bactéries et pour les champignons qui est le choc thermique à deux ou trois reprises.

→Protocole :

-Mettre une colonie de la bactérie ou un fragment de mycélium des champignons en question dans un volume de 50µl d'eau distillée stérile.

-les tubes sont mis à congélation pendant 20 minutes à température -20°C, puis ont passés au bain marie pendant 5 minutes à température 80°C.

De la même manière la méthode se refait pour deux à trois fois, suivits d'une centrifugation 7000 rpm pendant 10 minutes. Après centrifugation, 2 µl du surnageant contenant l'ADN est récupéré pour la réaction d'amplification (PCR). Pour les champignons le surnageant est dilué 2 fois avant de l'utiliser dans la PCR.

L'amplification de l'ADNr 16 S pour les bactéries, et de l'ADNr 5,8S pour les champignons (Woese et al 1987).

III.3.2 Protocole de PCR.

La réaction d'amplification par PCR est réalisée dans un appareil (thermocycleur) permettant de programmer les durées et les températures des trois étapes d'un cycle ainsi que le nombre de cycles désirés. (Méthode inventée par Mullis en 1983 et brevetée en 1985).

III.3.3 Amorces utilisées.

Les amorces utilisées sont des amorces universelles. Pour l'identification des bactéries, on utilise les amorces FD1 et RS16, pour les champignons on utilise les ITS1 et ITS4 (White et al 1990).



Tableau 7 : les séquences nucléotidiques des amorces utilisées dans la PCR.

Amorces	Séquence nucléotidique	Taille des amorces
FD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20 pb
RS16	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	22 pb
ITS1	CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A	22 pb
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	20 pb

III.3.4 Mélange réactionnel.

Dans un tube Eppendorf adapté au thermocycleur, on prépare le mélange réactionnel du PCR

Tableau 8: Mélange réactionnel de la PCR.

Réactif	Volume (μ l)	Concentration finale
Tampon Taq (10X)	2	1X
Mgcl ₂ (25 mM)	2	1,5 mM
dNTPs (1 mM)	4	0,2 mM
ITS1(10 μ M) ou FD1	2	1 μ M
ITS4(10 μ M) ou RS16	2	1 μ M
Taq polymérase (5U/ μ l)	0,2	0,05 U/ μ l
H ₂ O pure	5,8	-
ADN	2	-
Volume finale	20	

III.3.5 Amplification

Après avoir placé les tubes dans le thermocycleur, une pré-dénaturation à 94°C pendant 5 minutes est entamée. Ensuite, le programme d'amplification est exécuté selon trois étapes durant 35 cycles.

Tableau 9: Programme de la PCR utilisé.

Phase	Bactéries	Champignons
-------	-----------	-------------



	Température	Durée	Température	Durée
Dénaturation initiale	94°C	5 min	94°C	5 min
35 cycles	Dénaturation	94°C	94°C	30s
	Hybridation	55°C	50°C	45s
	Elongation	72°C	72°C	1min30
Elongation finale	72°C	5 min	72°C	5min

Le dernier cycle est suivi d'une phase d'élongation terminale à 72°C pendant 5 minutes. Les produits amplifiés sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

III.3.6 Electrophorèse sur gel d'agarose

✓ Préparation du gel.

Une solution d'agarose à 1% est préparée dans du TAE 1X (TAE 50X : Tris base : 242g ; Acide acétique glacial : 57,1 ml ; EDTA 0,5M « pH 8 » : 100 ml) (Tampon de migration), chauffée jusqu'à dissolution complète après refroidissement à 60°C on ajoute du BET (10mg/ml).

Le gel est coulé dans un moule muni d'un peigne à 16 puits. Après polymérisation, le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse et immergé dans une solution de TAE 1X.

✓ Dépôt des produits d'amplification.

Afin de suivre la migration du produit d'amplification dans le gel d'agarose, 2µl de ce produit est mélangé à 2µl d'une solution de charge avant de le déposer dans les puits du gel. La solution de charge contient essentiellement :

- 700 µl/ml de l'eau distillée stérile
- 300 µl/ml de glycérol (un alourdisseur) pour entraîner l'ADN au fond des puits
- 2,5 mg/ml de bleu de bromophénol (marqueur de mobilité). Le bleu de bromophénol (violet) migre avec les fragments de petite taille. On peut ainsi suivre indirectement la migration de l'ADN.

✓ Migration.

La molécule d'ADN placée dans le tampon (TAE 1X, pH 8) et dans le champ électrique crée dans la cuve à électrophorèse va migrer vers l'anode (+). On va donc effectuer les dépôts sur le côté cathode (-). La migration de l'ADN sous l'effet du champ électrique va se réaliser dans l'épaisseur du gel poreux d'agarose dans lequel l'ADN a été déposé. Les pores de ce gel vont se comporter comme un tamis qui freine le déplacement des fragments d'ADN.



La migration est réalisée au moyen d'un générateur de courant sous un voltage de 70 Volts pendant 5 minutes pour permettre la sortie de l'ADN des puits ,ensuite à 50 volts durant le reste de l'électrophorèse. Celle-ci est arrêtée lorsque le témoin de migration (bleu de bromophénol) atteint les trois quarts de la longueur du gel.

✓ Visualisation.

La visualisation de l'ADN sur le gel d'agarose est réalisée grâce à un colorant fluorescent Bromure d'Ethidium (BET).Ce composé possède la propriété de s'intercaler entre les paires de base des acides nucléiques. On ajoute le BET (0,5 µg/ml) directement à la solution d'agarose avant de la couler dans la cuve de l'électrophorèse.

Le gel est visualisé à l'aide d'un transilluminateur à UV.

III.3.7 séquençage au (CURI)

La visualisation par l'UV permet de vérifier la bonne procédure de PCR, l'obtention d'une bande qui correspond à l'amplifiât confirme que la réaction a bien marché, les produits sont acheminés pour la PCR à CURI.

Le séquençage de l'ADN, est la détermination de la succession des nucléotides le composant. Pour ce faire la méthode de Sanger a été utilisée :

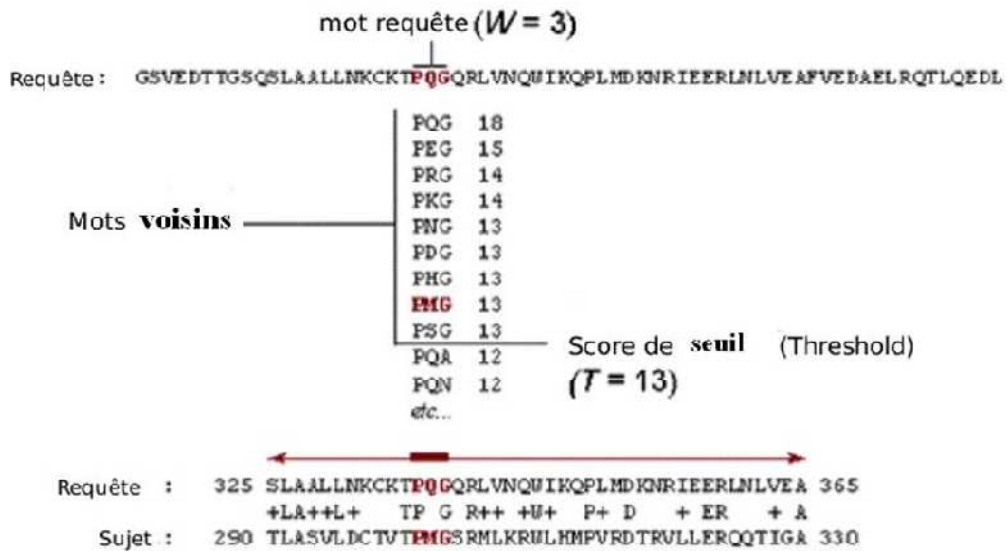
On utilise pour le séquençage des nucléotides légèrement différents : les didésoxyribonucléotides (ddNTP). Les ddNTP diffèrent des dNTP par l'absence d'un groupement OH en position 3'. En effet, lorsqu'une ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, elle n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête.

L'utilisation d'un ddNTP permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles, correspondant aux emplacements d'un nucléotide donné.

III.3.8 Analyse informatique des séquences

Après séquençage automatique par un séquenceur biosystème 3130, les séquences du gène de l'ARNr 16S (bactéries) ou 5,8S (champignons) obtenues sont comparées à une base de données de séquences de ce même gène de différentes bactéries, et champignons de références. Le degré de parenté est alors déterminé en fonction des homologies de séquences.

Cette comparaison est réalisée par un logiciel BLASTn, il est donné disponible au centre National de l'information pour la biotechnologie (NCBI).



High-scoring Segment Pair (HSP)

Figure 8 : Le principe d'action de BLAST



Résultats & Discussions



I. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE DE LA SURFACE DU BOIS

La méthode d'angle de contact est la méthode la plus utilisée pour la caractérisation des propriétés physico-chimiques d'une surface qu'elle soit la surface d'une cellule ou d'un matériau. Cette technique permet d'évaluer un ou plusieurs de ces caractéristiques :

- Le caractère hydrophobe/hydrophile d'une surface par rapport à l'eau.
- les propriétés acide-base d'une surface.
- le caractère donneur d'électrons / accepteur d'électrons.



Afin de visualiser l'effet qu'exerce le traitement par les extraits sur la surface du bois et plus précisément sur ses caractéristiques physico-chimiques, nous avons utilisé l'appareil de l'angle de contact pour déterminer les propriétés de la surface du bois avant et après traitement par les extraits méthanoliques du *Thymus vulgaris*. Les résultats de la mesure de l'angle de contact avant et après traitement de bois de cèdre sont représentés ci dessous.

I.1-Caractéristiques physico-chimiques de la surface du bois de cèdre :

Le tableau 10 illustre l'ensemble des caractéristiques physico-chimiques de la surface du bois de cèdre avant et après le traitement par les deux extraits de *T. vulgaris*.

Tableau 10 : Composantes de Van der Waals (γ^{LW}), composantes donneurs d'électrons (γ^-) et d'accepteurs d'électrons (γ^+) du bois de cèdre avant et après traitement.

Support utilisé	Angles de contact (°)			Composante et paramètres (mJm^{-2})			
	θ_w	θ_F	θ_D	γ^{LW}	γ^+	γ^-	$\Delta Giwi$
Bois non traité (témoin)	86,3	36.6	14.9	49,00	2,04	0,03	-81,37
Bois traité par l'extrait de <i>T. vulgaris</i> obtenu par macération	29,9	20.5	11.9	49,61	0,14	43,76	17,86
Bois traité par l'extrait de <i>T. vulgaris</i> obtenu par sonication	18,34	21.9	51.5	33,36	2,02	53,80	30,65

L'angle de contact vis-à-vis de l'eau (θ_w) peut être utilisé comme une méthode qualitative pour évaluer l'hydrophobicité de la surface (Oliveira et al, 1997). D'après Vogler (1998), la surface est considérée hydrophobe si θ_w est supérieur à 65° et hydrophile si θ_w est inférieur à 65° .

En effet, et selon l'approche de Van Oss (1997), il est possible de déterminer le degré d'hydrophobicité d'une substance vis-à-vis de l'eau. Il est exprimé en unité internationale (mJ/m^2). La surface peut être classée hydrophile quand le $\Delta Giwi$ est positive et hydrophobe quand le $\Delta Giwi$ est négative.

D'après les résultats présentés dans Le tableau 10 et la figure 9 : le bois de cèdre étudié non traité présente un caractère hydrophobe qualitativement $\theta_w = 86,3^\circ > 65^\circ$ et quantitativement à une valeur de $\Delta Giwi = -81 mJ.m^{-2} < 0$. Ces résultats corroborent avec ceux obtenus par (Elabed et al 2011b) en évaluant le caractère hydrophobe du même matériau qui possède un caractère hydrophobe ($\theta_w =$



82,5°, $\Delta G_{\text{wi}} < 0$). Nos résultats corroborent également avec les études De Meijer et *al* (2000) qui ont trouvé une valeur d'angle de contact de l'ordre de $69^\circ \pm 2$. et $\Delta G_{\text{wi}} < 0$ pour le bois cèdre.

Pour le caractère donneur accepteur d'électrons, le tableau 10 montre que la surface du bois étudié présente un caractère électron-donneur faible $\gamma^- = 0,03 \text{ mJ.m}^{-2}$ qu'électron-accepteur $\gamma^+ = 2,04 \text{ mJ.m}^{-2}$; et un caractère de Lifshitz van der Waals de $49,00 \text{ mJ.m}^{-2}$. Ces constatations indiquent une basicité de la surface confirmée par une valeur θ^{F} de l'ordre de $36,6^\circ$. Ces résultats corrélerent avec ceux trouvés par (El Abed 2011b, De Meiger et *al* 2000) qui ont rapportés que le bois de cèdre avait des valeurs de $\gamma^- = 5,5 \text{ mJ.m}^{-2}$ et $\gamma^+ = 0 \text{ mJ.m}^{-2}$ et une basicité de surface avec une valeur $\theta_{\text{F}} = 61,8^\circ$ et une composante de Lifshitz van der Waals d'une valeur $\gamma^{\text{LW}} = 37,3 \text{ mJ.m}^{-2}$. En conclusion, le bois de cèdre étudié dans ce présent travail présente un caractère hydrophobe, un caractère électron-accepteur plus que donneur.

I.2-Hydrophobicité du bois après traitement par l'extrait du *Thymus vulgaris*

I.2.1- Bois traité avec l'extrait obtenu par macération

Le tableau 10 et la figure 9 montrent la comparaison entre le caractère hydrophobe avant et après traitement de la surface du bois par macération.

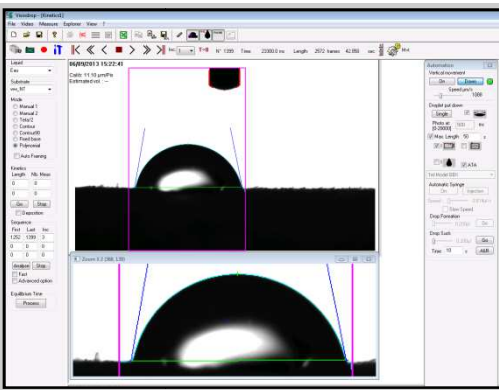
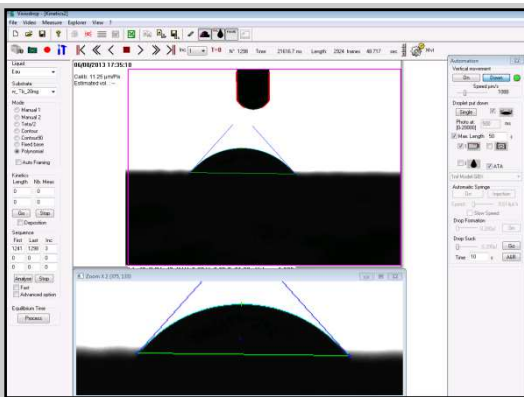
Solvant	Angle de contact par rapport à l'eau	
	Non traité	Après traitement (macération)
Eau	 $\theta_w = 86,3^\circ$	 $\theta_w = 18,34^\circ$

Figure 9: Mesure de l'hydrophobicité du bois de cèdre par rapport à l'eau avant et après traitement par l'extrait du *T. vulgaris* obtenu par macération

A la lumière des résultats obtenues, on remarque que le traitement de la surface du bois par l'extrait de *Thymus vulgaris* obtenu par macération change le degré d'hydrophobicité la surface du bois aussi bien du point de vue qualitative que quantitative. En effet, Le bois qui était hydrophobe à l'état non traité avec des valeurs $\theta_w = 86,3^\circ$ et $\Delta Gi_w = -81,37 \text{ mJ.m}^{-2}$ est devenu hydrophile avec des valeurs $\theta_w = 29,9^\circ (< 65^\circ)$ et $\Delta Gi_w = 17,86 \text{ mJ.m}^{-2} (> 0)$. Ceci nous a permis de conclure que l'extrait méthanolique obtenu par macération a un pouvoir remarquable de modification de l'hydrophobicité du bois. Ceci peut être à l'origine de sa teneur en polyphénols totaux de l'ordre de 171,1 mg EAG/g (Sadiki et al. 2011).

I.2.2 Bois traité à l'extrait obtenu par sonication

Le tableau 10 et la figure 10 montre la comparaison entre le caractère hydrophobe avant et après traitement de la surface du bois par sonication.

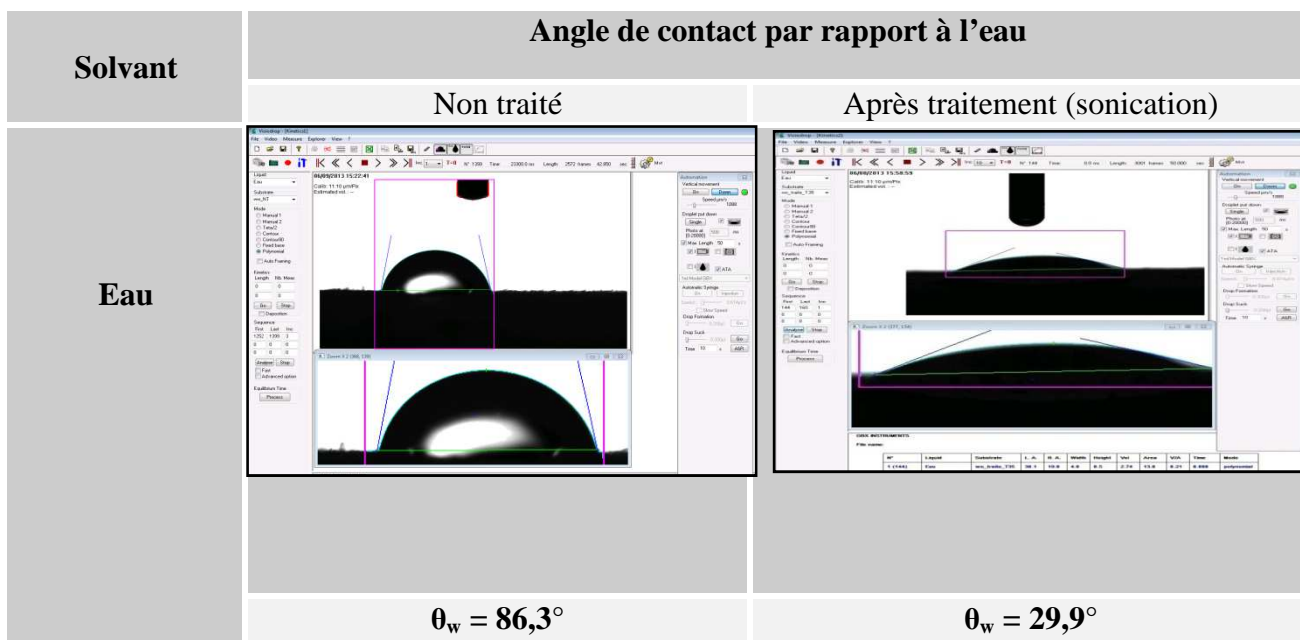


Figure 10 : Mesure du caractère hydrophobicité du bois de cèdre par rapport à l'eau avant et après traitement par l'extrait du *Thymus vulgaris* obtenu par sonication

D'après les résultats illustrés dans le tableau 10 et la figure 10, on constate que le traitement par l'extrait obtenu par sonication engendre également un changement plus important des caractères



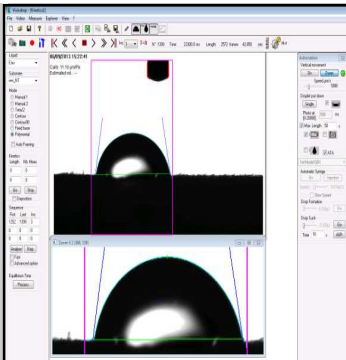
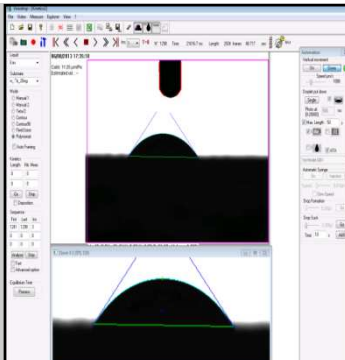
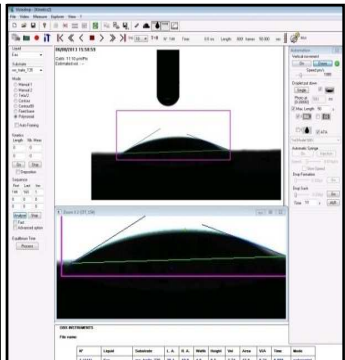
physico-chimiques. En effet, le degré d'hydrophobicité a chuté arrivant à des valeurs très hydrophiles de l'ordre de $\theta_w = 18,34^\circ$ et $\Delta G_{iwi} = 30,65 \text{ mJ.m}^{-2}$.

En comparaison avec le traitement par l'extrait obtenu par macération, l'effet de l'extrait obtenu par sonication est plus important, ainsi le bois traité par l'extrait récupéré par ultrason est devenu plus hydrophile par rapport à celui traité par l'extrait obtenu par macération ce qui peut être dû à la teneur élevée en polyphénols de 191,4 mg EAG/g dans l'extrait méthanolique obtenu par ultrason par rapport à celui de macération (171,1 mg EAG/g) (Sadiki et al.2011). Cela peut être expliqué par le fait que l'ultrason permet d'extraire le maximum de contenu cellulaire par le phénomène de cavitation acoustique qui facilite et accélère la pénétration de solvant dans la matière végétale (Besombes et al 2008).

En résumé, le traitement du bois par les deux extraits du *T. vulgaris* diminue fortement l'hydrophobicité de sa surface, qui devient très hydrophile. Cette hydrophilicité peut être due à la composition chimique de ces extraits très riches en polyphénols. Ces derniers sont des composés polyhydroxylés polaires (molécules hydrophiles) comparées aux huiles essentielles connues par leur comportement hydrophobe. Ainsi, le traitement de la surface du bois par ces extraits diminue l'hydrophobicité de sa surface qui devient très hydrophile.

I.3-Caractère donneur-accepteur d'électrons du bois de cèdre

Les composantes de Lifshitz-Van der waals (γ^{LW}), donneur d'électrons (γ^-) et accepteur d'électrons (γ^+) du bois traité et non traité sont données dans le tableau 10 et la figure 11

Solvant	Angle de contact		
	Non traité	Après traitement (macération)	Après traitement (sonication)
Eau	 $\theta_w = 86,3^\circ$	 $\theta_w = 29,9^\circ$	 $\theta_w = 18,34^\circ$

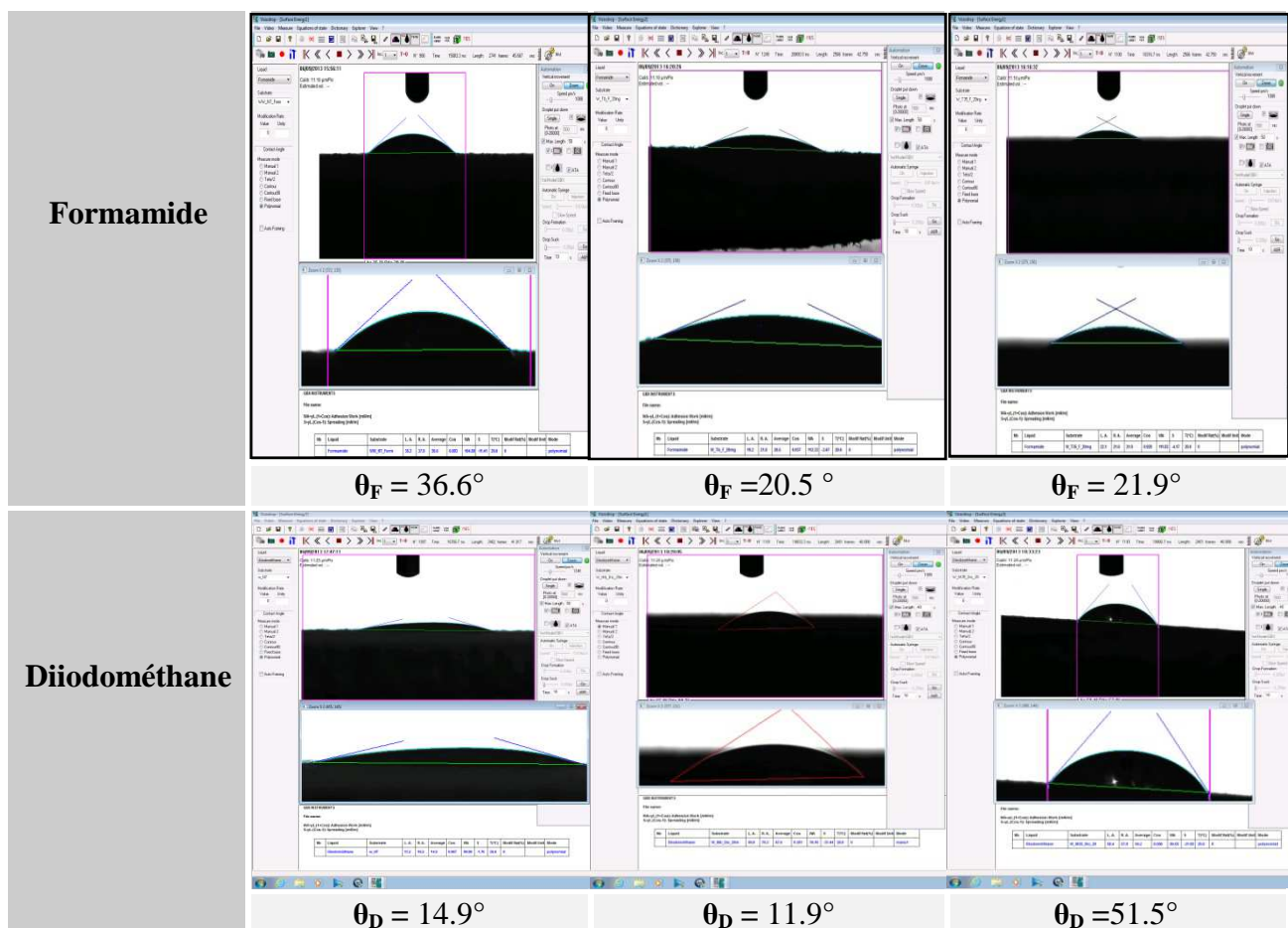


Figure 11 : Mesure du caractère donneur-accepteur d'électrons du bois de cèdre avant et après traitement par l'extrait du *Thymus vulgaris*

En plus de l'effet du traitement par les extraits sur le caractère d'hydrophobicité, on remarque l'effet important de ce traitement sur le caractère donneur-accepteur d'électrons.

Concernant le bois traité par l'extrait obtenu par macération et d'après les résultats présentés dans le tableau 10 et la figure 11, la valeur de la composante de Lifshitz Van Der Waals a été maintenue. Quant à celle du caractère accepteur d'électron à été annulée ($\gamma^+ = 0,14 \text{ mJ.m}^{-2}$); cependant, le caractère donneur d'électron a fortement augmenté ($\gamma^- = 43,76 \text{ mJ.m}^{-2}$).

Les résultats du tableau 10 et la figure 11 montrent que le traitement par l'extrait obtenu par ultrason a exercé un effet sur le caractère donneur-accepteur d'électrons. En effet, d'une part, la valeur de la composante de Lifshitz Van Der Waals a baissé à une valeur de $\gamma^{LW} = 33,36 \text{ mJ.m}^{-2}$ alors qu'elle est de $\gamma^{LW} = 49,00 \text{ mJ.m}^{-2}$ dans le cas du bois non traité. Et d'autre part, Le caractère donneur d'électrons a fortement augmenté arrivant à une valeur de $\gamma^- = 0,03 \text{ mJ.m}^{-2}$ par rapport à celui du bois non traité qui est de $\gamma^- = 53,83 \text{ mJ.m}^{-2}$ et le caractère accepteur est pratiquement le même.

IV. EFFET ANTIADHESIF DES EXTRAITS BRUTS DU *T.VULGARIS* CONTRE LES SOUCHES FONGIQUES DEGRADANT DU BOIS DE CEDRE

Les résultats de l'effet antiadhésif des extraits étudiés sur le bois obtenus par Microscopie Electronique à Balayage Environnemental sont illustrés ci-dessous

II.1-Témoin non traité

Les résultats donnés par Microscopie Electronique à Balayage Environnemental, concernant l'adhésion des spores fongiques sur le bois de cèdre sont illustrés ci-dessous : Les images de l'adhésion de la souche *Penicillium commune* sur la surface du bois sont illustrées dans la figure 12:

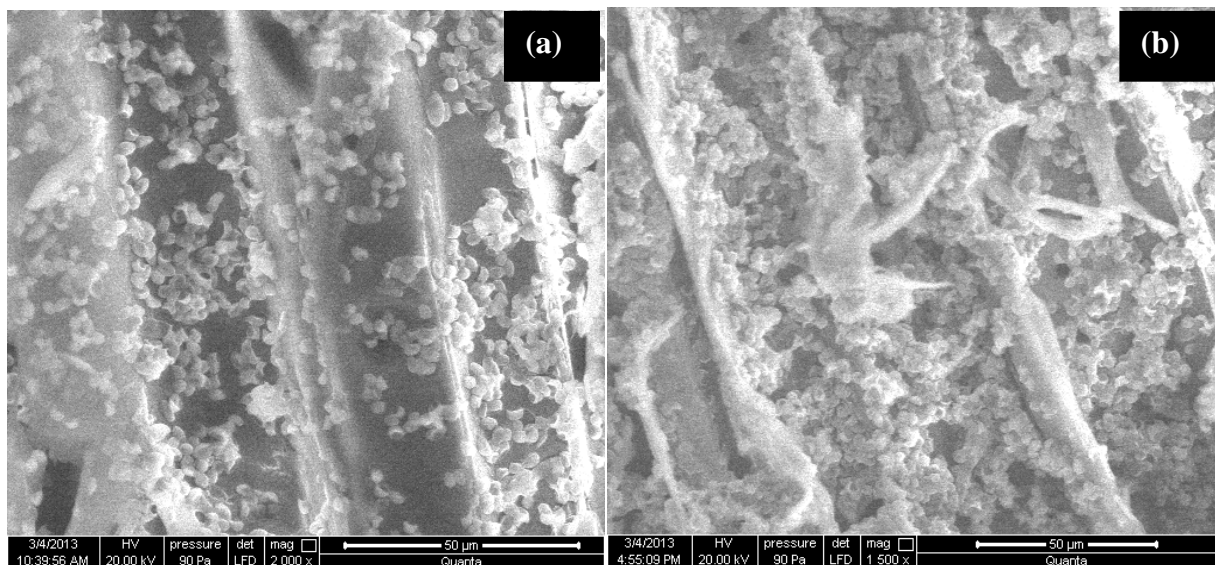


Figure 12 : Observation par ESEM de l'adhésion des spores fongiques au bois de cèdre non traité (x2000). (a) *Penicillium commune* (b) *Penicillium expansum*

La figure 12 obtenue par le MEBE, représentant le comportement adhésif du *Penicillium commune* et de *Penicillium expansum* sur le bois de cèdre non traité. Le même résultat a été observé pour les trois autres souches *Penicillium chrysosum* et *Cladosporium cladosporioides* avec une adhésion importante et relativement similaire. Ces résultats corroborent avec celui obtenu par El Abed et al 2011b qui a montré une forte adhésion des deux souches fongiques *Aspergillus niger* et *Penicillium expansum* sur le bois de cèdre avec les pourcentages d'adhésion de 62 et de 30% respectivement.

II.2-Effet antiadhésif de deux extraits *T. vulgaris* obtenus par macération et sonication

Le but ici est de comparer le pouvoir antiadhésif contre les spores fongiques des deux extraits de *Thymus vulgaris* obtenu par les deux méthodes différentes macération et sonication. Pour ce faire, les morceaux de bois de cèdre ont été traités par les deux différents extraits à une concentration de 5 mg/ml

La figure 13 montre le comportement adhésif de *Penicillium commune* au bois traité par des extraits de *T. vulgaris* obtenus par les deux différentes méthodes (Macération et sonication).

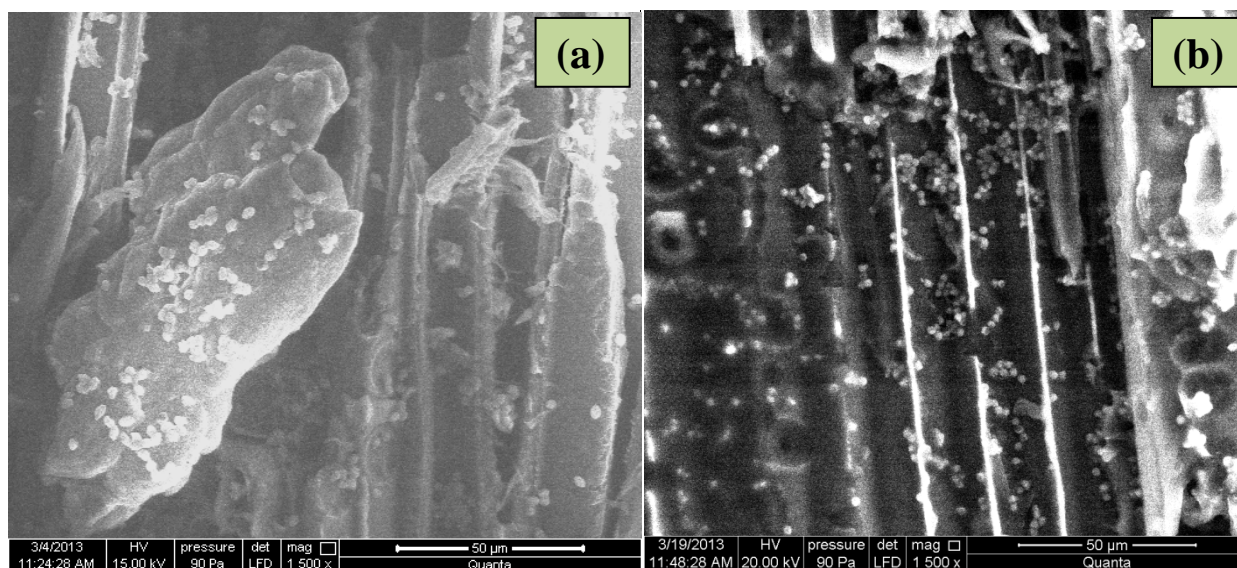


Figure 13 : Observation par ESEM de l'adhésion de *Penicillium commune* au bois de cèdre traité par l'extrait du *Thymus vulgaris* (x1500).

(a): extrait obtenu par sonication (b) : extrait obtenu par macération.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait obtenu par sonication exerce un pouvoir antiadhésif plus efficace que celle obtenu par macération. Ainsi le pourcentage d'adhésion des spores fongiques est moins important dans le cas du traitement par l'extrait de sonication par rapport à celui observé après traitement par l'extrait de macération. En effet, selon sadiki et al 2011, la méthode d'extraction influence la concentration en polyphénols totaux dans l'extrait obtenu. Ainsi la concentration en polyphénols totaux de l'ordre de 191,4 mg/gAG dans l'extrait obtenu par sonication est plus importante que celle dans l'extrait obtenu par macération 171,1mg/gAG. Cela peut être expliqué par le fait que l'ultrason permet d'extraire le maximum de contenu cellulaire par le phénomène de cavitation acoustique qui facilite et accélère la pénétration du solvant dans la matière végétale.

Le tableau 11 montre les résultats du dosage de polyphénols totaux présents dans nos extraits.

Tableau 11 : Résultat du dosage des polyphénols totaux dans les extraits bruts de *T. vulgaris*



Plante	Méthode d'extraction	Concentration en polyphénols totaux (mg eq AG/g extrait méthanolique)
<i>Thymus vulgaris</i>	Sonication	191,4
	Macération	171,1

De ce fait, le pouvoir antiadhésif important peut être à l'origine de la composition chimique des extraits riches en polyphénols pour l'extrait obtenu par sonication que celle obtenue par macération. En plus, les travaux de Marzouk et al (2012) ont montré que les extraits de *C. colocynthis* qui renferment la teneur la plus élevée en polyphénols sont doués de la meilleure activité antimicrobienne en mode planctonique vis-à-vis de toutes les souches expérimentées.

II.3-Effet de la concentration de l'extrait sur le comportement adhésif des spores fongiques

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que l'activité antiadhésive de l'extrait obtenu par sonication est plus importante que celle de l'extrait obtenu par macération. De ce fait, les études qui suivent vont se focaliser sur l'optimisation de la concentration et du temps de prétraitement avec l'extrait obtenu par sonication.

Dans le but de déterminer la concentration d'extrait brut ayant un pouvoir antiadhésif sur les spores fongiques. Trois concentrations différentes d'extraits 5 mg/ml 20mg/ml et 40 mg/ml ont été testées. L'évaluation et la comparaison de l'effet antiadhésif ont été faites en se basant sur les images obtenues par le MEBE. La figure 14 présente l'évaluation de l'effet de la concentration de l'extrait sur l'activité antiadhésive.

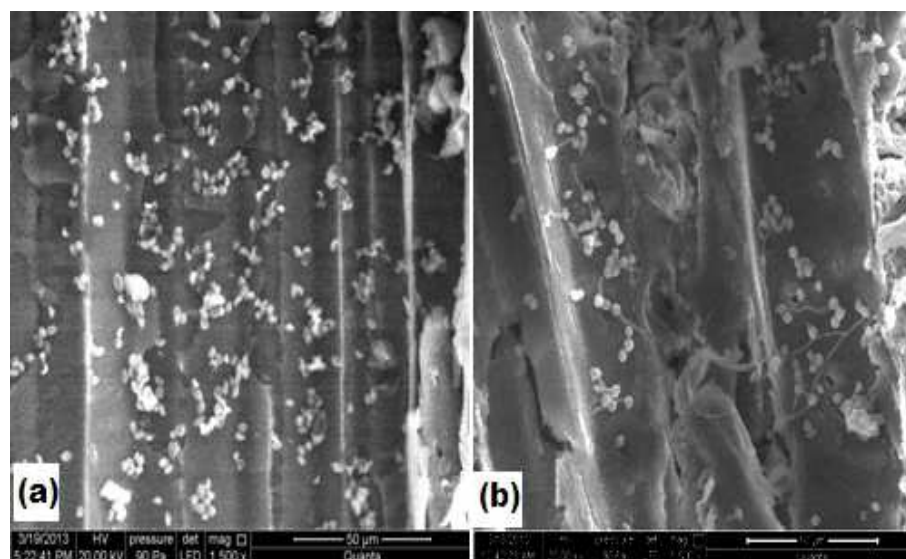


Figure 14 : Observation par ESEM de l'adhésion de *Penicillium commune* au bois de cèdre traité par l'extrait du *Thymus vulgaris* obtenu par sonication (x1500).

(a) : (concentration 5 mg/ml) (b) : (concentration 40 mg/ml)

En comparaison avec le témoin (figure 12), on remarque qu'à partir d'une concentration de 5 mg/ml de l'extrait méthanolique du *T. vulgaris*, il y a une diminution du pourcentage d'adhésion des spores fongiques. Or les deux concentrations 5 mg/ml et 20 mg/ml ont exercés relativement le même effet antiadhésif vis-à-vis des spores de *Penicillium commune*. Concernant l'effet de la concentration 40 mg/ml, les images montrent que cette concentration a donnée une activité antiadhésive plus remarquable contre la souche fongique par rapport à celle observée par 5 mg/ml et 20 mg/ml. Le même résultat a été observé pour les trois autres souches étudiées *Penicillium chrysosum*; *Penicillium expansum*; *Cladosporium cladosporioides*. Nos résultats corroborent avec plusieurs travaux qui ont montré que plus la concentration est élevée, plus l'activité antibiofilm est plus importante (Braga et al 2008; Limsong et al 2004 ; Dalleau et al , 2008).

II.4-Effet de temps de prétraitement du bois sur le comportement adhésif des spores fongiques

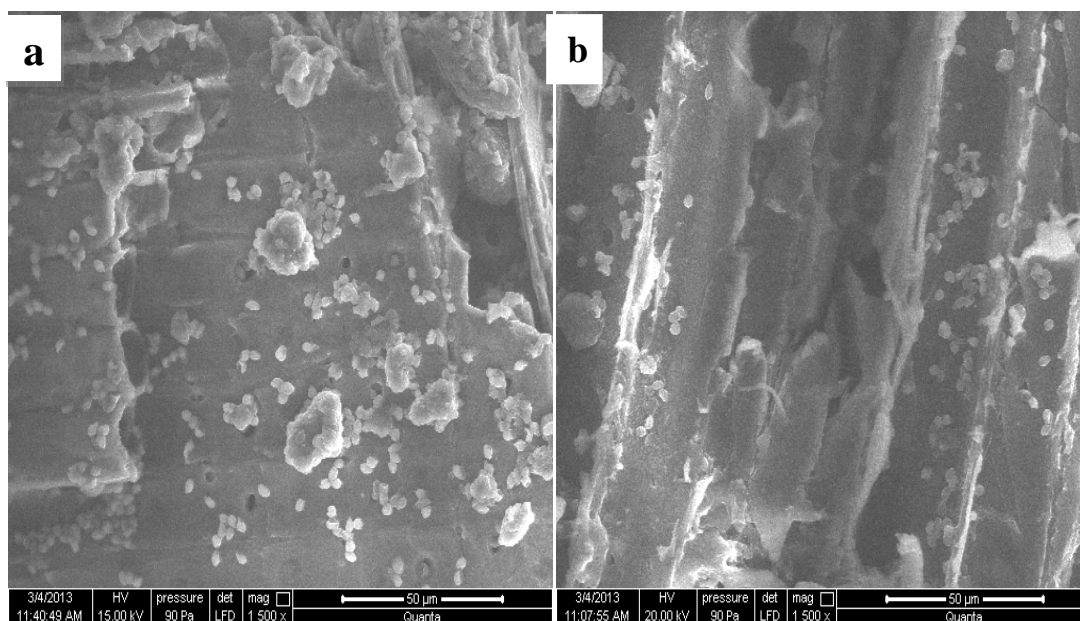


Figure 15 : Observation par ESEM de l'adhésion de *Penicillium commune* au bois de cèdre traité par l'extrait du *Thymus vulgaris* obtenu par sonication à une concentration 40mg/ml (x1500).

(a) : à T=0h (b) : à T=1h

D'après les images de la figure 15 obtenues par le MEBE, on remarque qu'après un prétraitement d'une heure de la surface du bois de cèdre par l'extrait du *T. vulgaris* obtenu par sonication, il y a une forte inhibition de l'adhésion des spores fongiques de la souche *Penicillium commune*, comparativement à celle obtenue directement après le traitement (à T=0h). Roxanne et al (2012) ont constaté que la formation du biofilm a été respectivement réduite de 95, 97 et 99% après 6, 24 et 30 heures d'exposition à la concentration minimale inhibitrice de l'extrait brut. Cette inhibition en fonction du temps de prétraitement peut être expliquée par le changement des propriétés physico-chimiques et aussi par l'efficacité antifongique de l'extrait. En plus, les travaux El abed et al ont montré que plus le temps de traitement avec le carvacrol augmente plus l'inhibition devient forte. Cette inhibition en fonction du temps de prétraitement peut être expliquée par le changement des propriétés physico-chimiques et aussi par l'efficacité antifongique de l'extrait.

III. CORRELATION ENTRE LES CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU BOIS DE CEDRE ET L'ADHESION DES SPORES FONGIQUES



Dans la littérature scientifique, l'évaluation du phénomène d'adhésion microbienne et le développement du biofilm sur différentes surfaces en différents domaines est reliée généralement à des modifications génétiques, des perturbations des mécanismes de quorum-sensing (Vasantha Packiavathy et *al* 2012), ou bien à la sécrétion de certaines protéines responsables de l'adhésion (Razieh Yazdanparast et *al* 2008). Cependant, peu sont les travaux qui expliquent l'inhibition de l'adhésion d'un biofilm en se basant sur la modification des caractéristiques physico-chimique de la surface des supports utilisés ou bien celle des souches microbiennes étudiées. De ce fait, ce travail s'est focalisé sur la corrélation entre les caractéristiques physico-chimiques du bois et l'inhibition l'adhésion des spores fongiques.

L'hydrophobicité de la surface est généralement acceptée comme facteur important dans le phénomène de l'adhésion (Van Loosdrecht et *al* 1987a, 1987b). Van Loosdrecht et *al* (1987a) ont montré que l'hydrophobicité de plusieurs micro-organismes est bien corrélée avec l'adhésion à une surface solide hydrophobe. Cette corrélation linéaire indique que les cellules hydrophobes adhèrent mieux que les souches hydrophiles sur des surfaces hydrophobes. Cependant, d'après nos résultats et sachant que les souches testées sont toutes hydrophiles (El Abed 2011b) on constate que cette corrélation n'est pas linéaire, car l'adhésion de nos cellules hydrophiles a diminué après traitement par les extraits aromatiques qui ont diminué l'hydrophobicité de la surface du bois. Cela nous mène à conclure que le caractère hydrophobicité n'est pas à prendre en considération dans notre étude.

Des travaux précédents (McEldowney et Fletcher 1986; Partt-terpstra et *al* 1988; Sjollem et *al* 1990) ont rapporté que l'hydrophobicité ne peut pas expliquer systématiquement les résultats de l'adhésion microbienne sur un support et que les interactions acides –bases jouent un rôle très important dans ce phénomène (Henriques et *al* 2004; Hamadi et *al* 2005a ; Hamadi et *al* 2008c).

Ce caractère peut expliquer l'inhibition de l'adhésion des spores fongiques observé après traitement par les extraits, car le bois devient beaucoup plus donneur qu'accepteur d'électrons. Donc, les interactions avec les souches vont devenir plus faibles vu qu'elles ont toutes un caractère donneur d'électrons important, ce qui est confirmé par les images obtenues par le MEBE.

IV. IDENTIFICATION DES MICROORGANISMES RESPONSABLES DE LA DEGRADATION DU BOIS.

IV.1 Caractérisation moléculaire des isolats

Le prélèvement à partir des deux sites différents de l'ancienne Médina a aboutit à l'isolement de dix isolats fongiques et douze isolats bactériens. L'identification moléculaire a été réalisée pour deux isolats fongiques.



Pour identifier un genre microbien par une approche moléculaire il faut que les homologies des ARNr soient supérieures ou égales à 97%. Une homologie supérieure ou égale à 99% traduit l'appartenance à une même espèce. Alors qu'un score d'homologie inférieur à 97% ne permet pas l'identification. Les résultats sont sous forme d'un pourcentage d'identité entre nos séquences d'ADN ribosomal et les séquences disponibles dans la banque de données disponibles sur le site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Seuls les résultats avec un pourcentage d'identité supérieur ou égale à 98 % sont retenus.

Les alignements des souches fongiques sont réalisés afin de montrer le degré d'homologie des gènes codant pour l'ARN 5,8S. Les résultats de ces alignements sont présentés ci-dessous.

- Souche C1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
507 bits(274)	3e-140	279/284(98%)	0/284(0%)	Plus/Minus
Query 1	GCCCGTCCCCSGGSgggggggACGGGGCCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAA	60		
Sbjct 366	GCCCGTCCCCCGGGGGGGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAA	307		
Query 61	TGACGCTCGGACAGGCATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACT	120		
Sbjct 306	TGACGCTCGGACAGGCATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACT	247		
Query 121	CGATGATCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATC	180		
Sbjct 246	CGATGATCACTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTCGCTGCGTTCCTTCATC	187		
Query 181	GATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAACTAATTCGTTATAGGTCTCAG	240		
Sbjct 186	GATGCCGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTAACTAATTCGTTATAGGTCTCAG	127		
Query 241	ACTGCAACTTCAGACMSCGTTTCAGGGGGSCCGTCGGCGGGCGC	284		
Sbjct 126	ACTGCAACTTCAGACAGCGTTTCAGGGGGSCCGTCGGCGGGCGC	83		

Figure 16 : Alignement entre le segment du gène codant pour l'ARN 5,8S de la souche C1 et celui de *Penicillium citrinum*



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 1

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Penicillium citrinum isolate YLJ-19 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosom	507	507	100%	3e-140	98%	JX231000.1

Figure 17: Résultat de l'alignement de la souche C1 par le logiciel Blast

- Souche C4:

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
785 bits(425)	0.0	434/441(98%)	1/441(0%)	Plus/Minus
Query 1	CTGAG-WAATTAAGGTTGGGGTTCGGCTGGCGCCGGCCGGCCCTACTAGAGSGGGTGAC			59
Sbjct 467	CTGAGATAATTAAGGTTGGGGTTCGGCTGGCGCCGGCCGGCCCTACTAGAGCGGGTGAC			408
Query 60	GAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCCGCTGCCTTTCGGGCCGTCCCC			119
Sbjct 407	GAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACGCGGTGCCCGCTGCCTTTCGGGCCGTCCCC			348
Query 120	CCGGCgggggggACSGGGCCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGG			179
Sbjct 347	CCGGCGGGGGGACGGGGCCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGACGCTCGG			288
Query 180	ACAGGCATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATCA			239
Sbjct 287	ACAGGCATGCCCTCCGGAATACCAGAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGACTCGATGATCA			228
Query 240	CTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCAITTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAA			299
Sbjct 227	CTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCAITTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCGGAA			168
Query 300	CCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTAATTCGTTATAGGTCTCAGACTGCAACTT			359
Sbjct 167	CCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTAATTCGTTATAGGTCTCAGACTGCAACTT			108
Query 360	CAGACRGCCTCAGGGGGCCGTCGGGGGGCGGGGCCCGAGGCWMCATAGGTTTCG			419
Sbjct 107	CAGACAGCGTTCAGGGGGCCGTCGGGGGGCGGGGCCCGAGGCAACATAGGTTTCG			48
Query 420	GGCAACACGGGTGGGAGGTTG 440			
Sbjct 47	GGCAACACGGGTGGGAGGTTG 27			



Figure 18: Alignement entre le segment du gène codant pour l'ARN 5,8S de la souche C4 et celui de *Penicillium sp*

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Max ident	Accession
<input type="checkbox"/> Penicillium sp. 7-6-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, c.	785	785	100%	0.0	98%	JX014399.1

Figure 19: Résultat de l'alignement de la souche C4 par le logiciel Blast

D'après les résultats de l'identification moléculaire obtenu par l'alignement des séquences à la base de données du logiciel BLAST on constate que:

✓ Deux souches fongiques ont été isolées à partir du bois pourris prélevé de deux sites différents de l'ancienne Médina de Fès appartiennent au genre *Penicillium* dont les deux espèces sont *Penicillium citrinum* et *Penicillium sp.*

Ce résultat corrèle avec les résultats des études antérieures qui ont été faites au sein de notre laboratoire par Berguadi et al 2011 et Zyani et al 2009 qui ont fait des isolements à partir de différents sites de l'ancienne Médina de Fès et qui ont en commun avec les sites de nos prélèvements la forte dégradation du bois de construction (le bois de cèdre).

Leur prélèvement a donné comme résultat l'identification de cinq souches fongiques du genre *Penicillium* : *P.crustosum*, *P.granulatum*, *P.commune*, *P.chrysogenum*, *P.expansum*, on est arrivé à identifier deux nouvelles espèces causant la biodégradation du bois de cèdre enrichissant ainsi la banque fongique formée par notre équipe de recherche.

D'après ces études on peut s'attendre à rencontrer les espèces de ce genre adhérees à la surface du bois à l'état sessile en formant des biofilms en raison de leur pouvoir enzymatique (cellulase, hémicellulase) qui ont été révéleés chez d'autres espèces du genre *Penicillium* (Zyani et al 2009) ce qui leur permet de causer des problèmes majeurs de biodégradation du bois en dégradant ses différents constituants (Cellulose, Hémicellulose, Lignine).



La présence de ce genre fongique au niveau de ces constructions pourris peut s'expliquer également par le développement d'une résistance d'une part contre les fongicides utilisés pour le traitement du bois et par leur capacité de pousser sur des matériaux de construction dans des environnements endommagés par l'eau (Storey et al 2004).

Ces deux nouvelles espèces fongiques qui ont été identifiées ont servi pour enrichir la banque microbienne formée au sein du laboratoire de biotechnologie microbienne, nécessaire aux travaux du même axe de recherche.

Conclusions et perspectives

Les travaux mis en œuvre et présentés dans ce présent travail représentent une recherche qui s'intensifie au fil des années «lutte contre le développement des biofilms et préservation du bois». Notre étude s'est focalisée sur l'étape initiale du processus de formation, à savoir l'adhésion des micro-organismes aux surfaces.

De ce fait, l'utilisation de la méthode d'angle de contact dédiée à l'analyse fine des surfaces a été mise en œuvre afin de caractériser la surface du bois de cèdre en termes d'hydrophobicité et les composantes accepteur/donneurs d'électrons avant et après traitement par les extraits méthanoliques de *Thymus vulgaris* obtenus par deux méthodes d'extraction. Les résultats montrent que les propriétés physico-chimiques (caractère hydrophile, caractère donneur-accepteur d'électron) dépendent de la méthode d'extraction qu'il soit macération ou sonication.

Pour approfondir notre compréhension quant à l'effet des extraits méthanoliques du *Thymus vulgaris* sur l'adhésion des spores fongiques à la surface du bois de cèdre, l'utilisation de la Microscopie Electronique à Balayage Environnemental (MEBE) est jugée nécessaire. D'autre part, les extraits méthanoliques du *T.vulgaris* exerce une activité antiadhésive importante contre les souches fongiques



testées. D'autre part, le temps de prétraitement du bois de cèdre est un paramètre qui influence l'adhésion des spores. En effet le temps de prétraitement 1h s'est montré plus efficace que celui de 0h en terme d'inhibition de l'adhésion des spores fongiques ainsi que la concentration de l'extrait est un paramètre déterminant lors du traitement du bois dans le but de le préserver, Ainsi on a montré par ces études que la concentration 40 mg/ml a donné une forte inhibition de l'adhésion des spores fongiques.

Enfin, La dernière partie de notre étude a été consacrée à enrichir la banque de la population microbienne cultivable attachée à la surface du bois de cèdre. La caractérisation moléculaire de ces isolats nous a permis de mettre en évidence la présence du genre fongique appartenant à *Penicillium*.

Un certain nombre de perspectives sont donc envisageables à l'issue de ce travail à citer :

- Approfondissement des travaux à propos de la physico-chimie de surface du bois de cèdre avant et après traitement.
- Effet des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires sur les propriétés physico-chimiques de bois de cèdre.
- Effet des huiles essentielles et de leurs composés majoritaires sur l'adhésion des microorganismes au bois de cèdre
- Etude du mécanisme d'inhibition d'adhésion des microorganismes par les extraits méthanoliques.



Références bibliographiques

- Aba lain M.I, I. Casln , J. Chambon , C. Chanal , B. duti LH S , A. Felten ,M, Guibou Rdenche , A. le faou ~, M. Meyran ,Y. Pean , G, Pinon ,M.F. Prere L, J.Y. Riou ET A (1985). **Thabaut transport et conservation des souches de *Neisseria* médecine et maladies infectieuses** -9his - 495 & 498.
- Adetunji VO, Isola TO. (2011) **Crystal Violet Binding Assay for Assessment of Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria sp* on Wood, Steel and Glass Surfaces**. Global Veterinaria., 6: 06-10.
- Adoubryn K.D,C.Douchet,J ,Chandenier,A.Ferrer,D.Richard-Lenoble (2005)-**preservation of *Cryptococcus* in aqueous medium**.Medical mycology 15 293-241.
- Azeredo R, J, Teixeira P, Fonseca AP. (2001). **The Role of Hydrophobicity in Bacterial Adhesion, in Biofilm Community Interactions: Chance or Necessity?** Cardiff: Bioline : 11–22.
- Beever RE, Dempsey GP (1978) **Function of rodlets on the surface of fungal spores**. Nature 272:608–610.
- Besombes C. (2008) à la rochelle.Thèse :**contribution à l'études des phénomènes d'extraction hydro-thermo-mécanique d'herbes aromatiques.Applications généralisées**.
- Borgin K, Corbett K. (1970). **The stability and weathering properties of wood treated with various oils**. Plast Paint Rubber. 14:69-72.
- Braga P.C., M.Culici, M.Alfieri, M. Dal Sasso (2008)**Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm** .Antimicrobial Agents :472–477.
- Braindet R, Leriche V, Carpentier B, Bellon Fontaine MN. (1999). **Effects of the growth procedures on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cell and their adhesion to stainless steel**.Food. Protection., 62: 994-998.
- Bury-Moné S.(2007) **les biofilms.polycopié**.Ecole normale supérieure de Cachan 17.
- Carminati D, Perrone A, Neviani E, Mucchetti G (2000) **Influence of traditional brine washing of smear Taleggio cheese on the surface spreading of *Listeria innocua***. Food Protection 63:1353-1358.
- Carpentier B.(1999).**les biofilms dans l'industrie agro-alimentaire**.Bull.Soc.Fr.Microbial. :105-111.
- Cassandra L. Quave, Lisa R.W. Plano, Traci Pantuso, Bradley C. Bennett (2008) **Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***.Ethnopharmacology : 418–428



- Cauliez N. (2007). **Les facteurs de dégradation des documents d'archives et leur conservation.** <http://www.archivesdefrance.culture.gouv.fr/static/4955>.
- Characklis,W.G (1983) **Processe analysis in microbial systems :biofilms as a case study in matematics in microbiology.**Bazin M.academic Press London:171-234.
- Characklis W.G., K.C. Marshall. (1990). **Biofilms.** John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.:265-340
- Characklis,W.G.,Mcfeters G.A., et K.C.Marshall(1990).**physiological ecology in biofilm systems.in biofilm.** John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y. :245-310
- Cioffi N, Ditaranto N, Torsi L, Picca RA, De Giglio E, Sabbatini L, Novello L, Tantillo G, Bleve-Zacheo T, Zanbonin PG. (2005). **Synthesis, analytical characterization and bioactivity of Ag and Cu nanoparticles embedded in poly-vinyl-methyl-ketone films.** Analytical and Bioanalytical Chemistry., 382: 1912-18.
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ. (1978). **How bacteria stick.** Scientific American:86-95.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999a). **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** Science : 1318-1322.
- Costerton JW. (1999b). **Introduction to biofilm.** International Journal of Antimicrobial Agents: 217-221.
- Cui F, Preston AF. (2006). **Emulsion compositions for wood protection.** US Patent Application :0057300 A1.
- [-D.Estivill,A.Arias,A.Torres-Lana,A.J.Carrillo-Munoz,M.P Arévalo\(2011\).Biofilm formation by five species of Candida on three clinical materials.Journal on microbiological methods :283-242.](#)
- Dalleau St'éphanie, Estelle Cateau , Thierry Berg`es , Jean-Marc Berjeaud, Christine Imbert (2008)**In vitro activity of terpenes against Candida biofilms** International Journal of Antimicrobial Agents : 572–576
- Davey M.E., G.A. O'Toole.(2000). **Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.**
- De Meijer M, Haemers S, Cobben W, Militz H. (2000). **Surface Energy Determinations of Wood: Comparison of Methods and Wood Species.** J.Langmuir.,: 9352-9359.
- [-Dick van der Kooij,Harm R.veenendaal,Cynthia Baars-Lorist,Daan W.van der Klift,Yvonne C.Drost.\(1995\)Biofilm formation on surfaces of glass and Teflon exposed to treated water.water Reseach :1655-1662.](#)
- Dommergues Y, Mangenot F. (1970). **Écologie microbienne du sol.** Masson & Cie, Paris., : 796, 180 figures, 101 tableaux.
- Eggins H.O.W., Oxley T.A. (2001). **Biodeterioration and biodegradation. International biodeterioration and biodegradation,** 48 : 12-15.
- El abed S, Hamadi F, Latrache H, Haggoud A, Ibsouda KS (2011a) **Quantification of Bacillus subtilis and Bacillus sp. adhesion on cedar wood.** J Adhesion Sci Technol 25:1507–1513.
- El abed S, Hamadi F, Latrache H, Iraqui MH, Ibsouda KS (2010) **Adhesion of Aspergillus niger and Penicillium expansum spores on Fez cedar wood substrata.** Ann Microbiol 60:377–382.



- El abed S, Hamadi F, Latrache H, Iraqui MH, Ibsouda KS (2010) **Adhesion of *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* spores on Fez cedar wood substrata**. Ann Microbiol 60:377–382.
- El abed S, Mostakim M, Berguadi F, Latrache H, Houari A, Hamadi F, Ibsouda KS (2011b) **Study of microbial adhesion on some wood species: theoretical prediction**. Microbiol 80:43–49.
- Filloux, A. & Vallet, I. (2003). **Biofilm: set-up and organization of a bacterial community**. Medical Science,: 77-83.
- Flemming HC. (1990). **Introduction: biofilm as a particular form of microbial life**. in Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. Stuttgart.
- Ganesh C. Kumar,S.K.Anand (1998).**Significance of microbial biofilms in food industry:a review**.international journal of food microbiology 42 : 9-27.
- Gavin R, S. Merino, M. Altarriba, R. Canals, J.G. Shaw, J.M. Tomás.(2003). **Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas* spp.** FEMS Microbiol. Lett. 224: 77-83.
- 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.
- GRAY E, NORTON PR, GRIFFITHS K. (2005). **Mechanism of adhesion of electroless-deposited silver on poly(ether urethane)**. Thin Solid Films., 484: 196-207
- Grulon F. (2005). « **Les détecteurs utilisés dans le microscope électronique à balayage** ». Ecole d'été GNMEBA, Grenoble.
- Guillier L, Stahl V, Hezard B, Notz E, Briandet R. (2008) **Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm microflora of smear cheese wooden shelves**. International Journal Food Microbiol., 128:51–57.
- Guyomard A, Jouanne T, Malandain JJ, Muller G, Glinel K. (2008). **Incorporation of a hydrophobic antibacterial peptide into amphiphilic polyelectrolyte multilayers : a bioinspired approach to prepare biocidal thin coatings**. Advanced Functional Materials., 18:758–765
- Haider K. (1992). «**Problems related to the humification processes in soils of temperate climates**». In : G. Stotzky & J.M. Bollag (éds.), Soil Biochemistry. Marcel Dekker New York., 7: 55-94.
- [-Hallam N.B,J.R West ,C.F Forster,J Simms \(2001\).the potential for biofilm growth in water distribution systems.water research 35 :4063-4071.](#)
- 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, 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., (2005b). **Effet des conditions environnementales sur les propriétés physicochimiques de la surface des bactéries et sur leur adhésion au verre. Rôle des différentes propriétés physico-chimiques dans le phénomène d'adhésion**. Thèse de l'université Cadi Ayyad.



- Hamadi F, Latrache H, Mabrouki M, Elghmari A, Outzourhit A, Ellouali M, Chtaini A. (2005a). **Effect of pH on distribution and adhesion of Staphylococcus aureus to glass.** J Adhes Sci Technol., 19:73–85.
- Hamer JE, Howard RJ, Chumley FG, Valent B (1988) **A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus.** Science 239:288–290.
- Haynie SL, Crum GA, Doele BA. (1995). **Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy., 39: 301-307
- Henriques M, Azeredo J. et Oliveira R. (2004). **Adhesion of Candida albicans and Candida dubliniensis to acrylic and hydroxyapatite.** Colloids surf B. 33, 235-241
- Herzog T, Volz M, Natterer J, Schweitzer R, Collectif. (2005). **Editions Presses Polytechniques et Universitaires Romandes ISBN. 2880746027, 375p.**
- Honraet K., H.J. Nelis.(2006)**Use of the modified robbins device and fluorescent staining to screen plant extracts for the inhibition of S. mutans biofilm formation.** Journal of Microbiological Methods 64 :217– 224.
- Hyvonen A, Piltonen P, Niinimäki J. (2006). **Tall oil/water-emulsions as water repellents for scots pine sapwood.** Holz als Roh- und Werkstoff., 64: 68-73.
- Ishida K.T., P.R. Griffiths.(1990). **Adsorption of proteins and polysaccharides at aqueous-solid interfaces by infrared internal reflection spectrometry.** Acs. Symp. Ser. 447, 208-224.
- James, A. M. (1991). **In Microbial Cell Surface Analyses. Structural and physico-chemical Methods**, ed by VCH Publishers, New York 13:165–171.
- Jitra Limsong, E. Benjavongkulchai , Jintakorn Kuvatanasuchati(2004) **Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of Streptococcus mutans.** Journal of Ethnopharmacology 92 : 281–289.
- Katsikogianni M, Y.F. Missirlis, L. Harris, J. Douglas.(2004). **Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions.** Eur. Cell. Mater. 8: 37-57.
- Kirk TK, Farrell RL. (1987). **«Enzymatic “combustion” : the microbial degradation of lignin».** Ann. Rev. Microbiol., 41: 465-505.
- Lappin-Scott H.M., J.W. Costerton.(1995). **Microbial biofilms.** Cambridge University Press,Cambridge, England.
- Leban JM, Triboulot. (1994). **Défauts de forme et états de surface.** Chapitre 8 du livre “ Le Bois, Matériau d’ingénierie ” édité par ARBOLOR, Nancy :333-363.
- Lellouche J.,MSc,Alexandra Friedman,MSc,Jean Paul Lellouche,PhD,Aharon Gedanken,PhD,Ehud Banin,PhD.(2012)**Improved antibacterial and antibiofilm activity of magnesium fluoride nanoparticles obtained by water-baser ultra sound chemistry.**Nanomedicine:nanotechnology,biology,and medicine 8: 702-711.
- Licitra G, Ogier JC, Parayre S, Pediliggieri C, Carnemolla TM, Falentin H, Madec MN, Carpino S, Lortal S. (2007)**Variability of Bacterial Biofilms of the “Tina” Wood Vats Used in the Ragusano Cheese-Making Process.** Applied and Environmental Microbiol: 6980–6987.



- Limsong J. , E. Benjavongkulchai , Jintakorn Kuvatanasuchati(2004) **Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*** Journal of Ethnopharmacology 92 : 281–289.
- Lin J, Qiu S, Lewis K, Klibanov AM. (2002). **Bactericidal properties of flat surfaces and nanoparticles derivatized with alkylated polyethylenimines.** Biotechnology Progress, 18: 1082-86
- Liu Y, Yang SF, Li Y, Xu H, Qin L, Tay JH (2004).**The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment.** J Biotechnol 110:251–256.
- Manifield M, De Nys R, Kumar N, Read R, Givskov M, Steinberg P, Kjelleberg S (1999). **Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL) mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein.** Microbiology, 145 : 283-91
- M'hirit O, BENZYANE M. (2006). **Le cèdre de l'Atlas : Mémoire du temps**, Éd. Mardaga. 245.
- Manuel S. ,Lucia C.Simoes,Maria J.Vieira.A (2010). **review of current and emergent biofilm control strategies.**LWT-Food science and technology 43:573-583.
- Mariani C, Briandet R, Chamba J-F, Notz E, Carnet-Pantiez A, Eyoug RN, Oulahal N (2007). **Biofilm Ecology of Wooden Shelves Used in Ripening the French Raw Milk Smear Cheese Reblochon de Savoie.** Journal Dairy Science, 90 :1653–1661.
- Marias F, Puiggali JR, Flamant G. (2001). **Modeling for simulation of fluidized-bed incineration process.** AIChE J., 47(6): 1438-1460.
- Marshall,K.C.(1986).**Adsorption and adhesion processes in microbial growth at interfaces.**Adv.Colloid.Interface.Eci.,25 :59-86.
- Marzouk B. , Z. Marzouk , R. Décor , L. Mhadhebi , N. Fenina , M. Aouni (2010) .**Antibacterial and antifungal activities of several populations of Tunisian Citrullus colocynthis Schrad. immature fruits and seeds. journal de mycologie médicinale :10.1016.**
- McBride J.S..(2001). **Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces.** *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 49-75.
- McEldowney S, Fletcher M. 1986. **Variability of the influence of physicochemical factors affecting to polystyrene substata.**Appl. Journal Environ. Microbiol 52: 460.
- Meylheuc Thierry , Christophe Methivier, Margareth Renault, Jean-Marie Herry, Claire-Marie Pradier, Marie Noëlle Bellon-Fontaine (2006).**Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*.** journal *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 128–13: 847-867
- Monlar S. (1997). **Performance of preservative-treated wood exposed out of ground contact.**Thèse, Spécialité : Biologie, Imperial College of Science, technology and Medecine, London,UK.
- NakagawaA N, Yashiro N, Nakajima Y, Barnhart WH, Wakabayashi M. (1994). **Hydrogel-coated glide catheter: experimental studies and initial clinical experience.** American Journal of Roentgenology., 163: 1227-29.



- Nicholas DD, Kadir A, Williams AD, Preston AF. (2000). **Water repellency of wood treated with alkylammonium compounds and chromated copper arsenate**. International Research Group on Wood Preservation. Doc. No. IRG/WP :00-30231.
- Nostro A, Gernamo M.p., D'Angelo V., Marino a Cannatelli (2000): **extractions methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity**. Letter en microbiologie appliqué. 30(5):379.
- Nostro A., Andrea Sudano Roccaro, Giuseppe Bisignano, Andreana Marino, Maria A. Cannatelli, Francesco C. Pizzimenti, Pier Luigi Cioni, Francesca Procopio and Anna Rita Blanco (2007). **Effects of oregano, carvacrol and thymol on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms**. Journal of Medical Microbiology 56:519–523
- Oulahal N, Adt I, Mariani C, Carnet-Pantiez A, Notz E, Degraeve P. (2009). **Examination of wooden shelves used in the ripening of a raw milk smear cheese by FTIR spectroscopy**. Food Control., 20:658–663.
- Oulahal-Lagsir N, Martial-Gros A, Bonneau M, Blum JL. (2003). **"Escherichia coli-milk" biofilm removal from stainless steel surface : synergism between ultrasonic waves and enzymes**. Biofouling 19: 159-168.
- 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.
- Razieh Yazdanparast, Leila Shahriyary. (2008) **Comparative effects of Artemisia druncunclus, Satureja hortensis and Organum majorana on inhibition of blood platelet adhesion aggregation and secretion**. Vascular pharmacology 48 : 32-37.
- Richard J. (1997) **Utilisation du bois comme matériau au contact des produits laitiers**. C.R. Acad. Agric. 83:27-34.
- Rogers J., D.I Norkett, P. Bracegirdle, A.B. Dowsett, J.T. Walker, T. Brooks, C.W. Keevil (1996). **Examination of biofilm formation and risk of infection associated with the use of urinary catheters with leg bags** Journal of Hospital Infection, Volume 32:105-115.
- Sailer MF, van Nieuwenhuijzen EJ, Knolb W. (2010). **Forming of a functional biofilm on wood surfaces**. Ecological Engineering., 36:163–167.
- Sandasi M., C.M. Leonard, S.F. Van Vuuren, A.M. Viljoen (2011). **Peppermint (Mentha piperita) inhibits microbial biofilms in vitro**. South African Journal of Botany 77 : 80–85
- Sjollema 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. Adhesion. Sci. Technol., 4: 765- 777.
- Stanley N.R., B.A. Lazazzera, R.A. Britton, A.D. Grossman. (2003). **Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by Bacillus subtilis by use of DNA microarray**. J. Bacteriol. 185:1951-1957.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002). **Biofilms as complex differentiated communities**. Annu Rev Microbiol. 56:187-209.
- Stoodley P., K. Sauer, D.G. Davies, J.W. Costerton. (2002). **Biofilms as complex differentiated communities**. Annu. Rev. Microbiol. 56:187-209.
- Stoodley P., Yang S., Lappin-Scott H., Lewandowski Z. (1997). **Relationship between mass transfer coefficient and liquid flow velocity in heterogeneous biofilms using microelectrodes and confocal microscopy**. Biotechnology and Bioengineering 56 (6): 681-688.



- Swaffield CH, Scott JA, Jarvis B. (1997). **Observations on the microbial ecology of traditional alcoholic cider storage vats.** Food Microbiol., 14:353–361.
- Taweechaisupapong S.,P. Ngaonee, P. Patsuk, W. Pitiphat, W. Khunkitti (2012).**Antibiofilm activity and post antifungal effect of lemongrass oil on clinical Candida dubliniensis isolate** South African Journal of Botany 78 (2012) 37–43
- Van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder ABJ. (1987a). **The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion.** App. Environ. Microbiol., 53: 1893-1987.
- Van Loosdrecht MCM, Norde W, Zehnder AJB. (1987b). **Influence of cell surface characteristics on bacterial adhesion to solid supports.** Proceedings. 4th European. Congress. Biotechnology., p.227.
- Van Oss,C.J.(1996), **Interfacial Forces in Aqueous Media**,New York:Dekker,1996.
- Vasanthha Isaak Abraham sybiya packiavathy,Selvam Priya,Shunmugiah Karutha Pandian,Arumugam Veera Ravi(2012).**inhibition of biofilm developpement of uropathogens by curcumin-An anti-quorum sensing agent from curcuma longa.**Food chemistry.
- Vergnault, H., (2004). **Etude et amélioration de la chromatographie en lit expansé.** Thèse de l'Université Paul Sabatier.
- Vogler, E.A.(1998). **Structure and Reactivity of Water at Biomaterial Surfaces,** Adv. Colloid. Interface. Sci 74: 69–117.
- White.J Thomas Michael A.Innis,David H.Gelfand,John J Sninsky (1990).**PCRprotocols A guide to methods and applications:** 978-0-12-372180-8
- Wittschier Nicole, Gerhard Faller, A. Hensel, (2009).**Aqueous extracts and polysaccharides from Liquorice roots (Glycyrrhiza glabra L.)inhibit adhesion of Helicobacter pylori to human gastric mucosa.** Journal of Ethnopharmacology 125:218–223
- Woese C.R,B,Debrunner-Vossbrinck,L.Mandelco,J.A Studier,H.Oyaizu (1987)**the green non sulfur Bacteria.A deep branching in the eubacterial line of descent.**Systematic and applied microbiology:53.
- 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.
- Yamada Y, Isoki T, Katsumi S. (1998). **Anticorrosive durable wood preservatives free from arsenic, chromine and organic solvents.** JP 10235612 A2.
- Yatsuda R., P.L. Rosalen,J.A. Cury, R.M. Murata, V.L.G. Rehder, L.V. Melo, H. Koo (2005)**Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci** .Journal of Ethnopharmacology 97 (2005) 183–189
- Zobell, C. E. (1943). **The effect of solid surfaces upon bacterial activity.** Journal of Bacteriology, 46, 39–56.
- Zyani M, Mortabit D, Mostakim M, Iraqui M, Haggoud A, Ettayebi M, Ibsouda KS (2009) **Cellulolytic potential of fungi in wood degradation from an old house at the medina of Fez.** Ann Microbiol 59:1–6.



ANNEXE

Composition des milieux de culture :

Tableau 1: Composition du milieu LB (Luria Bertoni)

Constituant	Quantité
Peptone	10g
NaCl	10g
Extrait de levure	5g
Eau distillée q.s.p	1000 ml

Tableau2 : Composition du milieu EM (Extrait de Malt)

Constituant	Quantité
Extrait de Malt	47g
Eau distillée q.s.p	1000ml