



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Ecole doctorale : "Sciences et Génie de la Matière, de la Terre et de la Vie"



N° d'ordre : 03/2012

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée par :

SOUMYA EL ABED

(MASTER: BIOTECHNOLOGIE MICROBIENNE)

Spécialité : Microbiologie et Biotechnologie

SUJET DE THESE

**APPROCHE MICROBIOLOGIQUE ET PHYSICO-CHIMIQUE DE LA
BIOCONTAMINATION DU BOIS DE CEDRE.
DEVELOPPEMENT DE STRATEGIES DE PREVENTION PAR
LES HUILES ESSENTIELLES**

Thèse présentée et soutenue le 9 Juillet 2012 **Devant** le jury composé de :

MOHAMED BENLEMLIH	PES	Faculté des Sciences Dhar El Mehraz-FES	Président
MARIE-NOËLLE BELLON-FONTAINE	PES	AgroParisTech INRA, Paris- FRANCE	Rapporteur
ABDELKARIM FILALI-MALTOUF	PES	Faculté des Sciences-RABAT	Rapporteur
KAWTAR FIKRI BENBRAHIM	PES	Faculté des Sciences et Techniques-FES	Rapporteur
CHARKAOUI EL MODAFAR	PES	Faculté des Sciences et Techniques -MARRAKECH	Examineur
HASSAN LATRACHE	PES	Faculté des Sciences et Techniques -BENI MELLAL	Examineur
SAID JABBOURI	PES	Institut de Recherche pour le Développement-EGYPTE	Examineur
ABDELLAH HOUARI	PES	Faculté des Sciences et Techniques-FES	Examineur
MOSTAFA ELLOUALI	PES	Faculté des Sciences et Techniques -BENI MELLAL	Examineur
SAAD IBNSOUDA KORAICHI	PES	Faculté des Sciences et Techniques-FES	Directeur de thèse

Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne
Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques de FES

.....
Centre d'Etudes Doctorales : "Sciences et Génie de la Matière, de la Terre et de la Vie"

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES, Route d'Imouzzer B.P. 2202 — FES — MAROC
Tél. +212 (0) 535 60 80 14 – +212 (0) 535 60 96 35 – +212 (0) 535 60 29 53 – Fax : +212 (0) 535 60 82 14 ; Site web : www.fst-usmba.ac.ma

RESUME DE THESE

Le bois est un matériau traditionnellement utilisé pour les constructions des œuvres monumentales. Bien que pourvu de nombreuses qualités, toute essence forestière y compris le bois de cèdre est un matériau sensible aux agents biologiques de dégradation en particulier les microorganismes. La maîtrise et la connaissance approfondie des différents mécanismes d'organisation de la vie des microorganismes sur la surface du bois est donc un objectif prioritaire qui pourraient apporter des réponses pertinentes aux questionnements contemporains des conservateurs de ce matériau. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était d'étudier l'écologie microbienne à la surface du bois et la compréhension des mécanismes d'adhésion des microorganismes au bois de cèdre.

L'étude de l'écologie microbienne de la surface du bois de cèdre a mis en évidence la prédominance de la population fongique appartenant au genre *Penicillium* et *Aspergillus*. La population bactérienne a été aussi présent (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Oceanobacillus*). L'étude du comportement adhésif des microorganismes attachés à la surface du bois a montré l'adhésion de *Bacillus*, *Penicillium* et *Aspergillus* et la non adhésion de *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Oceanobacillus* et *P. chrysogenum* à la surface du bois de cèdre. La prédiction théorique de l'adhésion microbienne prouve sa capacité d'aide à la décision pour la sélection de la variété du bois peu propice à la colonisation microbienne dans les constructions. Les résultats expérimentaux prouvent également l'effet du pH et de la rugosité du bois de cèdre sur l'adhésion des spores de *P. expansum*.

En revanche, l'origine biologique du bois impose l'application de traitements pour le préserver et le stabiliser. De ce fait, le deuxième objectif de ce travail est d'évaluer l'effet de la vapeur des composés majoritaires des huiles essentiels sur l'adhésion des microorganismes à la surface du bois de cèdre. Cet effet a été démontré pour la souche modèle *P. expansum* à différents temps de traitement et à différentes concentrations. Le traitement de la surface du bois par ces composés majoritaires des HE a mis en évidence à la fois une efficacité antiadhésive et une activité antimicrobienne.

MOTS CLES : bois de cèdre, adhésion, microorganismes, pH, rugosité, composés des HE, antiadhésive, antimicrobienne.

TABLE DES MATIERES

DEDICACES.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE.....	iii
RESUME.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES ABREVIATIONS.....	vii
INTRODUCTION GENERALE.....	1

PARTIE I: SYNTHESE BIOBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: DEGRADATION DU BOIS PAR LES MICRO-ORGANISMES

I. Place du cèdre dans les œuvres monumentales marocaines.....	5
1.1. Historiques de l'exploitation humaine du bois de cèdre.....	5
1.2. Propriétés du bois de cèdre exploité.....	5
II. Les micro-organismes sources majeure de dégradation du bois: Etat de l'art.....	8
2.1. Composition chimique du bois.....	8
2.1.1. Cellulose.....	9
2.1.2. Hémicellulose.....	10
2.2.3. Lignine.....	10
1.2. Les micro-organismes impliqués dans la biodégradation du bois.....	11
1.2.1. Bactéries du bois.....	11
1.2.2. Champignons du bois.....	12
1.2.3. Principaux mécanismes enzymatiques impliqués dans la dégradation des constituants du bois....	13
1.2.3.1. Dégradation enzymatique de la cellulose et des hémicelluloses.....	13
1.2.3.2. Dégradation de la lignine.....	14
III. Dégradation du bois des œuvres monumentales.....	14
IX. Axe de recherche des biofilms sur le bois.....	15
4.1. Définition.....	16
4.2. Formation des biofilms.....	16
4.3. Etapes de la formation des biofilms aux surfaces.....	18
4.3.1. Transfert des bactéries vers le support.....	18
4.3.2. Conditionnement de la surface par le milieu.....	18

4.3.4. Croissance et maturation du biofilm	20
4.4. Revue sur les axes de recherches des biofilms sur le bois.....	20
V. Préservation du bois et lutte contre les biofilms	22
5.1. Préservation du bois	22
5.1.1. Goudrons et les huiles.....	22
5.1.2. Composés organiques	22
5.1.3. Composés hydrosolubles	23
5.2. Moyens de lutte contre les biofilms.....	23
5.2.1. Développement de surfaces antiadhésives	23
5.2.2. Élaboration de surfaces à revêtements antimicrobiens	24
5.2.2.1. Incorporation d'espèces inorganiques et/ou chargées	24
5.2.2.2. Incorporation d'agents antimicrobiens.....	25

CHAPITRE II: MODELES PREDICTIFS DE L'ADHESION DES MICRO-ORGANISMES AUX SURFACES

I. Approches théoriques de l'adhésion des micro-organismes aux surfaces.....	27
1.1. Approche DLVO	27
1.2. Approche thermodynamique	29
1.2.1. Calcul des énergies de surface des trois entités (micro-organisme, support, milieu de suspension)	30
1.2.2. Calcul de ΔG_{adh}	31
1.3. Théorie de DLVO développée par Van Oss (Extended DLVO)	31
II. Revue des différents paramètres influençant l'adhésion des micro-organismes sur un support.....	32
2.1. Caractéristiques des cellules microbiennes	33
2.1.1. Propriétés physico-chimiques de la surface microbienne	33
2.1.2. Mode et le milieu de culture	34
2.2. Caractéristiques du support	34
2.2.1. Caractéristiques énergétiques des surfaces solides.....	34
2.2.2. Rugosité des surfaces solides.....	35
2.2.3. Film organique.....	35
2.2.4. Nettoyage des surfaces.....	35
2.3. Caractéristiques du milieu environnant	35

CHAPITRE III: TECHNIQUES ANALYTIQUES UTILISEES POUR L'ETUDE DU PHENOMENE D'ADHESION ET LA FORMATION DES BIOFILMS AUX SURFACES

I. Revue des techniques microscopiques et spectroscopiques utilisées pour l'étude du phénomène de l'adhésion et la formation des biofilms.....	38
II. Microscopie Electronique à Balayage Environnemental : outils pour l'étude du phénomène de l'adhésion et la formation des biofilms	39

PARTIE II:TECHNIQUES ET METHODES EXPERIMENTALES

I. Prospections et échantillonnage.....	56
II. Méthodologie de prélèvement du biofilm attaché aux bois de cèdre.....	57
III. Repiquage et conservation et cryoconservation des souches	57
IV. Identification moléculaire des souches par amplification et séquençage	57
4.1. Extraction de l'ADN génomique	58
4.2. Amplification de l'ADNr 16S (bactéries) et 5.8S (champignons)	58
4.2.1. Amorces	58
4.2.2. Réactifs de la PCR.....	59
4.2.3. Amplification	59
4.3. Electrophorèse sur gel d'agarose	59
4.3.1. Préparation du gel.....	60
4.3.2. Dépôt des produits d'amplification	60
4.3.3. Migration et visualisation.....	60
4.4. Séquençage des ADN amplifiés	60
4.4.1. Purification des produits PCR par les billes magnétiques	60
4.4.2. Lavages.....	61
4.4.3. Réaction de séquence	61
4.4.3.1. Programme de séquençage.....	62
4.4.4. Purification du produit de séquence par les billes magnétiques	62
4.4.3.2. Analyse bioinformatiques des séquences.....	63
4.4.3.3. Numéro d'accession des souches	63
V. Caractérisations physico-chimiques de la surface des micro-organismes et du bois de cèdre par angle de contact.....	63
5.1. Principe.....	63
5.2. Caractérisation physico-chimiques des micro-organismes.....	65
5.2.1. Souches bactériennes et conditions de culture.....	65
5.2.2. Souches fongiques et conditions de culture	65

5.2.3.	Protocol expérimental pour la caractérisation physico-chimiques des micro-organismes	65
5.3.	Caractérisation physico-chimiques du bois de cèdre.....	66
VI.	Calcul de l'énergie libre d'interaction totale.....	66
VII.	Adhésion microbienne sur le bois de cèdre	67
7.1.	Préparation des suspensions bactériennes et fongiques.....	67
7.2.	Test de l'adhésion.....	67
VIII.	Observation du comportement adhésif des micro-organismes par microscopie Electronique à Balayage Environnemental	67
8.1.	Principe de Fonctionnement	67
8.2.	Description de l'équipement : Microscopie Electronique à Balayage Environnemental	69
8.3.	Optimisation des paramètres d'acquisition.....	70
IX.	Quantification de l'adhésion des micro-organismes au bois de cèdre par le Logiciel Matlab®	71
X.	Mesures topographiques : Rugosité du bois de cèdre.....	71
XI.	Effet du pH du milieu de suspension	72
XII.	Effet du vapeur des composés majoritaires des HE sur les propriétés physico-chimiques du bois de cèdre	72

PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION

I.	Dénombrement des micro-organismes «cultivables» attachés à la surface du bois.....	75
II.	Caractérisation moléculaire des isolats.....	76
2.1.	Identification de la communauté fongique	76
2.2.	Identification de la communauté bactérienne	79
III.	Microbiologie de surface: Caractérisation des micro-organismes attachés à la surface du bois de cèdre par la méthode d'angle de contact.....	82
3.1.	Détermination de l'hydrophobicité de la surface des micro-organismes	82
3.2.	Détermination du caractère donneur d'électrons et accepteur d'électrons de la surface des micro-organismes.....	84
IV.	Caractérisation physico-chimiques du bois de cèdre.....	86
V.	Classification physico-chimique des différentes variétés du bois utilisées dans les constructions.....	87
5.1.	Classification des essences du bois selon l'hydrophobicité	87
5.2.	Classification des essences de bois selon le caractère accepteur-donneur d'électrons.....	89
VI.	Sélection de la variété du bois à utiliser dans les constructions: apport de la prédiction théorique.....	90
VII.	Adhésion expérimentale des micro-organismes au bois de cèdre: observation microscopique.	93
7.1.	Optimisation des conditions opératoires sous microscope	93

7.1.1.	Optimisation de la distance de travail	93
7.1.2.	Taille de sonde	93
7.1.3.	Filtrage du bruit de fond	94
7.1.4.	Tension d'accélération et pression dans la chambre	94
7.2.	Observation de l'adhésion des micro-organismes au bois de cèdre	95
VIII.	Quantification de l'adhésion sur la surface du bois.....	98
IX.	Corrélation entre les propriétés physico-chimiques et les résultats de l'adhésion expérimentales.....	99
9.1.	Souches bactériennes.....	99
9.2.	Spores fongiques.....	100
X.	Etude de l'effet de la rugosité sur l'adhésion des micro-organismes au bois de cèdre	101
10.1.	Effet de la rugosité sur les propriétés physico-chimiques du bois de cèdre	102
10.1.1.	Influence de la rugosité sur l'hydrophobicité du bois de cèdre	102
10.1.2.	Influence de la rugosité sur le caractère donneur-accepteur d'électrons du bois de cèdre	103
10.2.	Effet de la rugosité sur le comportement adhésif des spores de <i>Penicillium expansum</i> à la surface du bois de cèdre	104
10.3.	Effet de la rugosité sur l'adhésion quantitative des spores de <i>Penicillium expansum</i> à la surface du bois de cèdre	105
XI.	Etude de l'effet du pH du milieu de suspension sur l'adhésion des micro-organismes au bois de cèdre.....	108
11.1.	Effet du pH du milieu de suspension sur les propriétés physico-chimiques du bois de cèdre	108
11.1.1.	Influence du pH du milieu de suspension sur l'hydrophobicité du bois de cèdre	108
11.1.2.	Influence du pH du milieu de suspension sur le caractère donneur accepteur d'électron du bois de cèdre	109
11.2.	Effet de pH sur le comportement adhésif des spores de <i>Penicillium expansum</i> à la surface du bois de cèdre	110
11.3.	Effet du pH sur l'adhésion quantitative des spores de <i>Penicillium expansum</i> à la surface du bois de cèdre	111
XII.	Mise au point du bois antiadhésif\antimicrobien en contact avec la vapeur des composés majoritaires des huiles essentiels.....	113
12.1.	Effet du temps de contact des composés majoritaires des huiles essentielles sur les propriétés physico-chimiques du bois de cèdre avec volume fixe	113
12.2.	Effet du volume des composés majoritaires des huiles essentielles sur les propriétés physico-chimiques du bois de cèdre.....	116
	CONCLUSION GENERALE ET PESPECTIVES.....	119
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	123
	ANNEXES	146