

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie Microbienne

Mémoire de projet de fin d'étude

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Evaluation de l'activité antibactérienne et anti-adhésive des
composés naturels contre *Staphylococcus aureus* et
*Pseudomonas aeruginosa***

Présenté par : **KHRIBICH Fatimaezzahrae**

Encadré par :

Pr. Saad IBNSOUDA KORAICHI

Soutenu Le 16 Juillet 2021 devant le jury composé de :

Pr. IBNSOUDA KORAICHI Saad

FST-Fès

Pr. GUISSI Sanae

FST-Fès

Pr. BOUKIR Abdellatif

FST-Fès

Faculté des Sciences et Techniques Fès

B.P. 2202, Route d'Imouzzer, FES

☎ 212 (35) 60 80 14 – 212 (35) 60 96 35 📠 212 (35) 60 82 14

www.fst-usmba.ac.ma

Résumé

Ces dernières décennies différentes approches ont été adoptées pour lutter contre les infections nosocomiales à biofilm. Dans cette étude, notre stratégie s'est basée sur le concept de développement des surfaces antiadhésives en mettant en jeu des molécules naturelles afin de prévenir l'adhésion bactérienne et la formation ultérieure du biofilm. Pour cela, l'activité antibactérienne de 12 métabolites secondaires a été évaluée contre *Staphylococcus aureus* CIP543154 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27653. Les mesures de l'angle de contact ont révélé un caractère hydrophobe pour le matériau de plastique ($\theta_w = 76,2^\circ$; $G_{iwi} = -23,37$) et hydrophile pour les deux souches étudiées ($\theta_w < 65^\circ$ et $\Delta G_{iwi} > 0$). Les observations au microscope électronique à balayage ont montré la capacité des deux souches à adhérer au plastique. L'évaluation de l'activité antibactérienne des composés par la méthode de la microdilution a indiqué que le carvacrol et le thymol sont très actifs contre les deux bactéries par rapport aux autres composés testés d'où leur choix pour le test d'anti-adhésion. Le traitement avec le carvacrol et le thymol a induit des modifications dans les propriétés physicochimiques du matériau et a rendu la surface hydrophile. Le carvacrol a entraîné une inhibition de l'adhésion de *P. aeruginosa* après 24 heures.

Mots clés : Activité antibactérienne, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, adhésion, matériau de plastique, carvacrol, thymol

Abstract

In the last decades, different approaches have been adopted to control nosocomial biofilm infections. In this study, our strategy was based on the concept of developing anti-adhesive surfaces by involving natural molecules to prevent bacterial adhesion and subsequent biofilm formation. For this purpose, the antibacterial activity of 12 secondary metabolites was evaluated against *Staphylococcus aureus* CIP543154 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27653. Contact angle measurements revealed hydrophobicity for the plastic material ($\theta_w = 76.2^\circ$; $G_{iwi} = -23.37$) and hydrophilicity for both strains studied ($\theta_w < 65^\circ$ and $\Delta G_{iwi} > 0$). Scanning electron microscope observations showed the ability of both strains to adhere to plastic. Evaluation of the antibacterial activity of the compounds by the microdilution method indicated that carvacrol and thymol were highly active against both bacteria compared to the other compounds tested hence their choice for the anti-adhesion test. Treatment with carvacrol and thymol induced changes in the physicochemical properties of the material and made the surface hydrophilic. Carvacrol caused an inhibition of *P. aeruginosa* adhesion after 24 hours.

Keywords: Antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, adhesion, plastic material, carvacrol, thymol.

Remerciements

Mes remerciements s'adressent à mon encadrant **M. Saad IBNSOUDA KORAICHI** directeur du laboratoire de Biotechnologie Microbienne (LBM) pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. J'aimerais exprimer ma reconnaissance pour sa grande qualité humaine et sa disponibilité ainsi que pour sa précieuse aide qui m'ont été d'un grand soutien pour avoir réalisé ce mémoire.

Je désire également **Elhassan elharchi** pour sa disponibilité, son aide tout au long de cette période de stage.

J'adresse mes chaleureux remerciement à **M.Abedellatif HAGGOUD** chef de la filière Master de Biotechnologie Microbienne à la FST de Fès, pour son enseignement enrichissant et laborieux, et d'avoir mis à notre disposition tous les moyens nécessaires au bon déroulement de notre formation.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes chers professeurs, **Mme sanae Guissi** et **M. Abdellatif Boukir**, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au doctorant **nouhayla zouin**, pour ses précieux conseils, son orientation, sa disponibilité constante et son aide dans la rédaction de ce rapport.

Mes profonds remerciements vont également à tous les doctorants de laboratoire Biotechnologie Microbienne de la FST de Fès, surtout **Safae Erraoun** , **sara.errahmanii** , **Badre errabiti** pour leur aide, et leur encouragement

Sommaire

Résumé	
Abstract	
Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Synthèse bibliographique	4
I. Les biofilms	4
1. Définition	4
2. Composition	4
3. Etapes de formation des biofilms.....	5
3.1. Adhésion.....	5
3.1.1. Adhésion réversible.....	5
3.1.2. Adhésion irréversible.....	5
3.2. Maturation	6
3.3. Dispersion	6
4. Facteurs influençant l'adhésion bactérienne	7
4.1. Caractéristiques du matériau	7
4.1.1. Rugosité de la surface	7

4.1.2. Charge de la surface	7
4.2. Influence des propriétés bactériennes.....	8
4.2.1. Caractère hydrophile/hydrophobe de la surface bactérienne.....	8
4.2.2. Motilité	8
4.3. Influence des facteurs environnementaux.....	8
II. Infections nosocomiales	9
1. Définition	9
2. Modes de transmission	9
2.1. Infection endogène	9
2.2. Infection exogène	9
3. Microorganismes responsables des infections nosocomiales	9
III. Résistance des biofilm aux antibiotiques.....	10
Matériel et méthodes.....	13
I. Souches bactériennes utilisées	13
II. Activité antibactérienne.....	13
1. Préparation de l'inoculum	13
2. Préparation des composés	13
3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	14
4. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	14
III. Caractérisation physicochimique de la surface du matériau du plastique (MP) et des souches bactériennes.....	15
1. Préparation des coupons.....	15
2. Préparation des souches bactériennes.....	15
3. Mesure de l'angle de contact	15
4. Calcul des paramètres physicochimiques de la surface.....	16

4.1. Calcul de l'énergie libre et ces composantes.....	16
4.2. Calcul de l'énergie libre totale	17
IV. Test de l'adhésion.....	17
1. Préparation et ajustement de la suspension bactérienne.....	17
2. Analyse de la surface du matériau de plastique (MP) par le microscope électronique à balayage (MEB)	17
V. Activité anti-adhésive.....	18
VI. Analyses statistiques	18
Résultats et discussion	20
I. Activité antibactérienne.....	20
1. Acide gallique (AG)	21
2. Thymol et carvacrol	22
3. Acide caféique (AC)	23
4. Quercétine	24
5. Acide tannique (AT)	25
6. Carvone	26
7. Apigénine	26
8. Epicatéchine gallate (ECG)	27
9. Eucalyptol.....	27
10. Coumarine.....	28
11. β -ionone	29
II. Hydrophobicité et énergie libre de surface.....	29
1. Caractérisation physicochimique des souches bactériennes et de la surface du matériau de plastique (MP) non traité.....	30
1.1. Propriétés physicochimiques de la surface du matériau MP.....	30
1.2. Propriétés physicochimiques de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1.3. Energie libre totale.....	32

2. Energie libre de surface et caractère hydrophobe du matériau MP traité avec le thymol et le carvacrol.....	32
III. Activité anti-adhésive.....	34
1. Analyse de la surface du matériau MP non traité par microscope électronique à balayage.....	34
2. Analyse de la surface du matériau MP traité par microscope électronique à balayage.....	40
2.1. Analyse morphologique de cellules de <i>Staphylococcus aureus</i> adhérees sur le matériau MP traité	40
2.2. Analyse morphologique de cellules de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> adhérees sur le matériau MP traité	45
Conclusion et perspectives.....	50
Références bibliographiques.....	52

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique d'un biofilm	4
Tableau 2. Caractéristiques énergétiques (mJ / m ²) des liquides utilisés pour mesurer les angles de contact (Van Oss, 1996)	16
Tableau 3: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des composés contre <i>Staphylococcus aureus</i> CIP543154 et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27653.	20
Tableau 4 : Valeurs des angles de contact et l'énergie libre de surface dans la surface de coupons en plastique MP non traitée.....	30
Tableau 5 : Valeurs des angles de contact et l'énergie libre de surface de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
Tableau 6: Valeurs de l'énergie libre d'interaction totale (ΔG^{tot}) (mJ/m ²)	32
Tableau 7: Propriétés physicochimiques du matériau de plastique après traitement avec le carvacrol et le thymol.....	33
Tableau 8 : Valeurs d'énergies libres totales du matériau après traitement.....	34

Liste des figures

Figure 1: Etapes de formation de biofilm	7
Figure 2. Représentation du modèle de Young, mesure de l'angle de contact liquide/solide	15
Figure 3 : Image au MEB du matériau du plastique : témoin (Gx1000)	35
Figure 4: Image au MEB de cellules de <i>P. aeruginosa</i> adhérees au matériau du plastique après 3h d'incubation (Gx2000 et 6000).	35
Figure 5: Image au MEB de cellules de <i>P. aeruginosa</i> adhérees au matériau du plastique pendant 5h (Gx2000 et 6000)	36
Figure 6: Image au MEB de cellules de <i>P.aeruginosa</i> adhérees au matériau du plastique pendant 10h (Gx2000 et 4000)	36
Figure 7: Image au MEB de cellules de <i>P.aeruginosa</i> adhérees au matériau du plastique pendant 24 h (Gx2000 et 6000)	37
Figure 8: Image au MEB de cellules de staphylococcus aureus adhérees au matériau du plastique pendant 3 h (Gx2000 et 6000)	37
Figure 9: Image au MEB de cellules de staphylococcus aureus adhérees au matériau du plastique pendant 5 h (Gx2000 et 6000)	38
Figure 10: Image au MEB de cellules de staphylococcus aureus adhéree au matériau du plastique pendant 10 h (Gx2000 et 6000)	38
Figure 11: Image au MEB de cellules de staphylococcus aureus adhéree au materiau du plastique pendant 24 h (Gx2000 et 4000)	39
Figure 12 : Image au MEB de cellules de <i>S. aureus</i> adhérees après incubation de 3h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 6000)	41
Figure 13 : Image au MEB de cellules de <i>S.aureus</i> adhérees après incubation de 5h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 4000)	41
Figure 14 : Image au MEB de cellules de <i>S.aureus</i> adhérees après incubation de 10h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 6000)	42
Figure 15 : Image au MEB de cellules de <i>S.aureus</i> adhérees après incubation de 24h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 4000)	42

Figure 16 : Image au MEB de cellules de <i>S.aureus</i> adhérees après incubation de 3h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 4000)	43
Figure 17 : Image au MEB de cellules de <i>S.aureus</i> adhérees après incubation de 5h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 6000)	43
Figure 18 : Image au MEB de cellules de <i>S.aureus</i> adhérees après incubation de 10h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 5000)	44
Figure 19 : Image au MEB de cellules de <i>S.aureus</i> adhérees après incubation de 24h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 6000)	44
Figure 20 : Image au MEB de cellules de <i>P.aeruginosa</i> adhérees pendant 3h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 1900).	45
Figure 21 : Image au MEB de cellules de <i>P.aeruginosa</i> adhérees pendant 5h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 6000)	46
Figure 22 : Image au MEB de cellules de <i>P.aeruginosa</i> adhérees pendant 10h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000et 4000)	46
Figure 23 : Image au MEB de cellules de <i>P.aeruginosa</i> adhérees pendant 24h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 4000)	47
Figure 24 : Image au MEB de cellules de <i>P.aeruginosa</i> adhérees pendant 3h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 4000)	47
Figure 25 : Image au MEB de cellules de <i>P.aeruginosa</i> adhérees pendant 5 h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 4000)	48
Figure 26 : Image au MEB de cellules de <i>P.aeruginosa</i> adhérees pendant 10h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 4000)	48
Figure 27 : Image au MEB de cellules de <i>P.aeruginosa</i> adhérees pendant 24 h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 4000)	49

Liste des Abréviations

AC : acide caféique

AG : acide gallique

AT : acide tannique

ATB : antibiotique

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMB : Concentration minimale bactéricide

DMSO : diméthylsulfoxyde

ECG : epicatéchine gallate

EVA : polyéthylène-co-vinylacétate

IN : infections nosocomiales

LB : Luria bertani

MEB : microscope électronique à balayage

MP : matériau du plastique

PVC : polychlorure de vinyle

QS : quorum sensing

SARM : *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline

Introduction

Les infections nosocomiales (IN) posent un véritable problème de santé publique du fait de leur fréquence, leur gravité, et aussi de leur coût socio-économique. En 2009, l'OMS estimait que 1,4 millions de personnes étaient malades dans le monde de suite d'infections contractées en milieu hospitalier (WHO, 2009). Dans les pays développés, ces infections représentent 7% alors qu'elles représentent 10% dans les pays en développement (Khan et al., 2017), et elles constituent également la troisième cause de mortalité (Kakupa et al., 2016). En effet, environ 60 à 70% des infections nosocomiales étaient attribuées à la formation de biofilm sur des dispositifs médicaux tels que les cathéters, les sondes endotrachéales et les prothèses (Rao et al., 2021). De plus 80% des infections microbiennes tels que l'endocardite, la mucoviscidose et la méningite chez l'homme sont liées à la formation du biofilm (Khatoon et al., 2018).

L'antibiothérapie était la solution la plus efficace pour traiter les infections à biofilm mais malheureusement avec l'émergence des souches multi-résistantes, ce traitement est devenue inadéquat en raison de la toxicité de la dose biocide élevée requise qui ne peut pas être administrée au patient (Gharbi et al., 2015). Ce problème a obligé la communauté scientifique de découvrir de nouveaux agents antimicrobiens plus performants que les antibiotiques. Après plusieurs années de recherche les composés des plantes se sont avérées comme une très bonne alternative naturelle vu leur abondance et leur diversité. En effet, il est estimée que le nombre total d'espèces végétales sur la planète est d'environ 25 000 à 500 000 (Zalegh et al., 2021). Ainsi les plantes sont connues pour leur capacité à produire une vaste gamme de composés phytochimiques (Simoes et al., 2009), tels que les tanins, les composés phénoliques et les flavonoïdes, et qui se sont avérés *in vitro* avoir des propriétés antimicrobiennes (Manandhar et al., 2019).

De nouvelles stratégies pour lutter contre les biofilm ont été également adoptées surtout préventives que curatives visant à abolir le premier contact cellule-surface, et survenant au cours des premiers stades du cycle de biofilm où l'adhésion est réversible et le biofilm détachable. Ces stratégies comprennent le revêtement et l'immobilisation des agents antimicrobiens sur les surfaces (Wang & Tang, 2018).

Dans le cadre de lutter contre le développement des biofilms liées aux infections nosocomiales s'inscrit l'objectif de notre étude qui a pour objectif d'évaluer l'activité antibactérienne de 12 composés naturels, d'étudier l'effet des composés naturels sur les propriétés physicochimiques

d'un matériau de plastique et de tester leur impact sur l'adhésion de *S. aureus* et *P. aeruginosa* au matériau de plastique.

Synthèse bibliographique

I. Les biofilms

1. Définition

Un biofilm est défini comme une communauté microbienne hétérogène adhérente à une surface inerte ou vivante et englobée dans une matrice de polymères extracellulaires (Costerton et al., 1978). En effet 99 % des microorganismes sur terre adoptent un mode de vie en biofilm (Mattei et al., 2017). Ce mode de croissance sessile permet aux microorganismes de se protéger des conditions environnementales défavorables telles que la dessiccation ainsi que des agents antimicrobiens (Clutterbuck et al., 2007).

2. Composition

Un biofilm est une combinaison de deux composantes : les microorganismes et la matrice extracellulaire. Les micro-organismes représentent 2 à 15 % du matériel du biofilm (Sutherland, 2001), alors que la matrice extracellulaire peut constituer jusqu' à 90 % de la masse organique carbonée d'un biofilm (Flemming & Wingender, 2010).

La matrice produite par les microorganismes du biofilm est fortement hydratée, elle comporte jusqu'à 97 % d'eau (Sutherland, 2001). La matrice extracellulaire est complexe, elle comprend une grande variété de macromolécules organiques comme les lipopolysaccharides, les glycolipides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques, les déchets métaboliques et d'autres composés inorganiques tels que les phosphates ou les sulfates issus du milieu externe (tableau 1) (Flemming & Wingender, 2010). La matrice a plusieurs fonctions : elle permet aux biofilms d'adhérer à une surface, elle protège les bactéries de l'environnement extérieur, et elle a également un rôle digestif car elle contient des enzymes qui métabolisent certains nutriments avant que les bactéries ne les ingèrent (Beech et al., 2000).

Tableau 1: Composition chimique d'un biofilm (Sutherland, 2001).

Composante	% de la matrix
Eau	Plus de 97 %
Cellules microbiennes	2-5%
Polysaccharides	1-2%
Protéines	1-2%
ADN et ARN	1-2%
Ions	Libre et liés

3. Etapes de formation des biofilms

La formation d'un biofilm sur une surface, est le résultat d'un ensemble de processus physique, chimique et biologique, et comprend plusieurs phases successives selon un modèle bien établi (figure 1).

3.1. Adhésion

L'adhésion initiale des microorganismes est gouvernée par la nature des molécules (acides humiques, polysaccharides, protéines...) déposées sur la surface qui va servir comme support de biofilm : c'est ce qu'on appelle un film conditionnant. Ce dernier peut modifier les propriétés de surface initiales du matériau (charge, l'hydrophobie, etc..) ce qui a pour conséquence soit, de prévenir l'attachement des microorganismes soit, au contraire, de créer un micro-environnement propice à l'adhésion des microorganismes (Garrett et al., 2008). Outre les caractéristiques du substrat, les caractéristiques de la surface de la cellule sont également importantes. Par exemple, la présence de flagelles, de pili, de fimbriae ou de glycocalyx peut avoir une incidence sur le taux d'attachement microbien (Teughels et al., 2006). Dans le cas d'organismes immobiles, le transport des cellules bactériennes vers la surface peut résulter de manière aléatoire, par le biais d'un mouvement brownien ou par l'écoulement du fluide en suspension. En revanche, les organismes mobiles peuvent atteindre la surface grâce à des appareils locomoteurs (pili, flagelles), guidés par une réponse chimiotactique, ou phototactique (Jain et al., 2007). L'adhésion d'une bactérie à un substrat se déroule en deux phases, une phase réversible, à laquelle succède une phase irréversible.

3.1.1. Adhésion réversible

Cette étape est courte et, met en jeu surtout des interactions physicochimiques non spécifiques et de faible énergie, ces interactions comprennent les forces de type Van der Waals, électrostatiques, hydrophobes/hydrophiles pouvant conduire à une attraction ou à une répulsion (Ploux et al., 2010). A ce stade, le biofilm est facilement détachable par des mouvements browniens.

3.1.2. Adhésion irréversible

Une fois la distance entre la bactérie et la surface devient très faible (<1,5 nm), les bactéries s'attachent de façon irréversible, et les interactions deviennent spécifiques (Percival et al., 2011). Ces interactions spécifiques sont généralement assurées par des couples récepteur/ligand, des lectines et/ou des adhésines, pouvant être portés par des éléments qui composent la surface des microorganismes comme certains appendices liés à la mobilité (flagelles, pili...) (Dunne, 2002).

Les appendices des bactéries (flagelles, fimbriae et pili) permettent aux bactéries de surmonter les forces électrostatiques de répulsion qui peuvent exister entre la surface bactérienne et la surface biotique ou abiotique (Garrett et al., 2008).

3.2. Maturation

Après avoir adhéré de façon irréversible, les cellules entament l'étape de la maturation qui se caractérise par une augmentation de la population microbienne engendrée par les divisions des cellules ainsi la production de la matrice polymère extracellulaire (Guzma et al., 2021).

Le développement et la maturation des biofilms dépend surtout de la disponibilité et la bonne diffusion des nutriments à travers cette matrice extracellulaire (Dunne, 2002; Garrett et al., 2008), ainsi il implique une communication entre les cellules formant le biofilm. Ce mécanisme de communication est appelé le « quorum sensing » (QS) ; un système de communication utilisé par de nombreuses bactéries pour synchroniser leur comportement à la densité de population (Mion et al., 2018).

QS module la taille de la population du biofilm et initie les phénomènes de dispersion et d'essaimage de bactéries planctoniques à partir du biofilm (Irie & Parsek, 2008). Le QS joue également un rôle dans le contrôle de l'épaisseur du biofilm (Clutterbuck et al., 2007) et il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases (Clutterbuck et al. 2007 ; Irie&Parsek 2008).

3.3. Dispersion

La dispersion signifie le retour à l'état planctonique, cet évènement peut se produire sous l'effet des perturbations mécaniques (abrasion..), carences nutritionnelles, dégradation enzymatique du substrat sur lequel le biofilm est attaché (Tremblay et al., 2014), ou par dégradation enzymatique de la matrice polymérique comme le cas d'*Escherichia coli* qui produit de la N -acétyl-héparosane lyase, et *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas fluorescens* qui produisent de l'alginate lyase (Jamal et al., 2017).

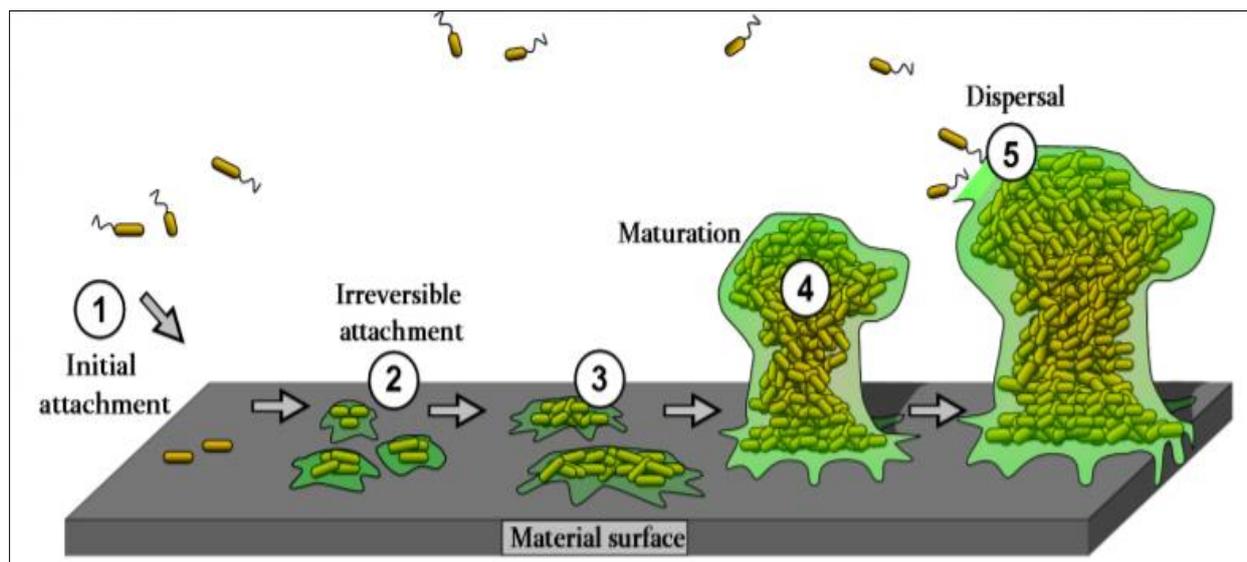


Figure 1: Etapes de formation de biofilm (Moriarty et al., 2014).

4. Facteurs influençant l'adhésion bactérienne

Une bonne compréhension de l'adhésion bactérienne ne peut pas être achevée sans prendre en considération plusieurs facteurs dont les propriétés de la surface bactérienne, les caractéristiques de surface du matériau cible et l'environnement (température, pH, composition du milieu ...).

4.1. Caractéristiques du matériau

4.1.1. Rugosité de la surface

Plusieurs auteurs ont étudié la relation entre la rugosité et l'adhésion bactérienne. Des travaux sur le polychlorure de vinyle (PVC) ont montré que, plus la surface est rugueuse plus l'adhésion bactérienne est favorisée (Wilson-nieuwenhuis et al., 2017). En effet, une surface rugueuse augmente la surface de contact entre le matériau et les cellules bactériennes. De plus, les irrégularités du matériau constituent des sites d'implantation bactérienne plus favorables, car moins exposée aux facteurs exogènes (courant d'air, d'eau...) (Baillif et al., 2010).

4.1.2. Charge de la surface

Les surfaces chargées positivement sont plus favorable à l'adhésion bactérienne que les surfaces chargées négativement. En effet, la majorité des bactéries possèdent une charge négative nette (Rijnaarts et al., 1999). Ainsi, des interactions attractives sont attendues entre les surfaces chargées positivement et les bactéries et des interactions répulsives si la surface est chargée négativement (Ploux et al., 2010).

4.2. Influence des propriétés bactériennes

4.2.1. Caractère hydrophile/hydrophobe de la surface bactérienne

L'hydrophobicité de la surface bactérienne joue un rôle important dans le processus d'adhésion bactérienne. Elle est influencée par le milieu environnant, l'âge et la structure de la bactérie. De plus, elle varie suivant les espèces bactériennes et selon les souches d'une même espèce (Baillif et al., 2010). En général, les bactéries hydrophobes préfèrent les surfaces hydrophobes et les bactéries hydrophiles, les surfaces hydrophiles (Koubali et al., 2021). En effet, Koubali et al., 2021 ont prouvé que *S. aureus* (hydrophile) à adhérer davantage au verre (hydrophile) qu'au polyéthylène (hydrophobe) (Koubali et al., 2021).

4.2.2. Motilité

L'influence de la motilité sur l'adhésion bactérienne a été prouvée par de nombreuses études. Il s'est avéré que le type sauvage flagellé de *Listeria monocytogenes* s'attache 10 fois plus à l'acier inoxydable dans les 4 premières heures que le mutant dépourvu de flagelles (Lemon et al., 2007), alors qu'une mutation dans l'opéron responsable de la synthèse du flagelle de *Bacillus cereus* empêchait l'adhésion des bactéries sur une surface en verre (Houry et al., 2010).

4.3. Influence des facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux peuvent affecter l'adhésion bactérienne et la formation d'un éventuel biofilm.

Les conditions de culture peuvent aussi impacter l'interaction bactérie-surface. En effet, *Escherichia coli* en absence de nutriments adhère moins au quartz qu'en leurs présence (Haznedaroglu et al., 2008). De plus, l'adhésion quantitative de staphylocoques sur le verre a montré que les cellules adhéraient fortement dans la plage de pH 4 à 6 et faiblement à un pH très acide (pH 2, pH 3) et alcalin (Hamadi et al., 2012).

La température est également un facteur influençant le processus d'adhésion. Ceci est prouvé par l'étude de Zeraik and Nitschke, 2012 qui a révélé que l'adhésion de la majorité des bactéries aux surfaces en polystyrène a diminué avec la diminution de la température. En effet, la température peut induire des altérations au niveau des propriétés de la surface bactérienne ce qui peut réduire l'efficacité de l'adhésion.

II. Infections nosocomiales

1. Définition

Les infections nosocomiales (IN) aussi appelé infections hospitalières ce sont des infections contractées dans un établissement de soins et qui n'étaient pas présentes à l'admission, ni en incubation au moment de l'hospitalisation. (Dia et al., 2008)

Les infections nosocomiales les plus fréquentes sont les infections urinaires, les pneumonies, les infections sur site opératoire et les bactériémies/septicémies, ces infections sont très fréquemment liées à des interventions invasives : sondage urinaire ou trachéal, cathéter veineux... (Carolina et al., 2015).

2. Modes de transmission

Les pathogènes des infections nosocomiales peuvent être d'origine endogène ou exogène.

2.1. Infection endogène

La flore endogène de l'homme représente une barrière naturelle renforçant ses défenses immunitaires ainsi le protégeant contre des germes potentiellement pathogènes. Cependant les bactéries de même flore peuvent parfois provoquer des infections graves si elles sont transférées vers une plaie tissulaire ou un site chirurgical. En effet, ces gestes invasifs peuvent déplacer des germes d'un endroit où ils sont inoffensifs vers un autre où ils se multiplient différemment et deviennent pathogènes (Khan et al., 2017).

2.2. Infection exogène

L'infection exogène est générée par des microorganismes provenant de la flore transitoire ou résidente du personnel soignant ou de visiteurs, de dispositifs médicaux et même de l'environnement et des locaux hospitaliers (Khan et al., 2017).

3. Microorganismes responsables des infections nosocomiales

Les infections nosocomiales peuvent être à l'origine de nombreux microorganismes, mais généralement les bactéries sont les agents les plus fréquents, elles sont responsable d'environ 90% des infections, tandis que les protozoaires, les champignons, les virus et les mycobactéries sont moins incriminés dans les infections hospitalières (Khan et al., 2015).

Les principales bactéries impliquées dans les IN sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Elles sont à l'origine de plus de la moitié des cas d'infections nosocomiales (Thiolet et al., 2007). En effet, *P. aeruginosa* contribue à 11% de toutes les infections nosocomiales, ce qui entraîne des taux de mortalité et de morbidité élevés (Khan et al., 2015).

Pseudomonas aeruginosa est une bacille à Gram négatif, elle est extrêmement résistante, omniprésente dans la nature, et capable de coloniser différentes surfaces (Moore & Flaws, 2011). Il s'agit d'une bactérie opportuniste qui cause des maladies, particulièrement chez les personnes immunodéprimées. Les sites de colonisation sont les reins, les voies urinaires et les voies respiratoires supérieures. C'est une cause d'infections chirurgicales, urinaires, de plaies, de pneumonie, de fibrose kystique et de bactériémie (Khan et al., 2015).

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram positif, elle est commensale de l'homme ; la bactérie est retrouvée au niveau de la peau ou des muqueuses externes. En effet, environ 30% de la population humaine est colonisée par *S. aureus* (Tong et al., 2015). De plus, *S. aureus* est un agent pathogène humain opportuniste, causant diverses pathologies communautaires et hospitalières, telles que la bactériémie-septicémie, l'endocardite, la pneumonie, l'ostéomyélite, et l'arthrite. Elle est également la principale cause d'infections de la peau et des tissus mous telles que les abcès (furoncles), les furoncles et la cellulite (Dayan et al., 2016). En outre, *S. aureus* est responsable de 19 % de l'ensemble des infections nosocomiales (Thiolet et al., 2007).

Escherichia coli est une bacille à Gram négatif, elle est responsable de 30 % des infections nosocomiales (Nagarjuna et al., 2015). Elle peut coloniser dans le tractus gastro-intestinal des êtres humains et d'autres animaux. *E. coli* est responsable d'un certain nombre de maladies, notamment les infections urinaires, la septicémie, la pneumonie, la méningite néonatale, la péritonite et la gastro-entérite (Khan et al., 2015).

III. Résistance des biofilm aux antibiotiques

Plus de 80% des infections bactériennes chez l'homme impliquent la formation de biofilms (Erdem et al., 2015) pire que ça, les infections à biofilm sont dangereuses et difficiles à traiter, vu que les biofilms bactériens sont caractérisés comme hautement résistants au traitement antibiotique et aux réponses immunitaires. En effet plusieurs études ont montrées des différences dramatiques dans la sensibilité des bactéries planctoniques et du biofilm aux ATB. : Ils ont trouvé que la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration bactéricide minimale (MBC) pour les cellules

bactériennes du biofilm étaient généralement beaucoup plus élevées (environ 10 à 1 000 fois) que les cellules bactériennes planctoniques. (Wu et al., 2015).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer la résistance des biofilms aux agents antimicrobiens, un de ces facteurs concerne la matrice polymérique qui agit comme barrière réduisant ou empêchant la diffusion des agents antimicrobiens aussi la proximité spatiale des bactéries au sein d'un biofilm mature plus le taux important de mutation que subissent les cellules du biofilm et qui est plus élevé par rapport à leurs homologues planctoniques favorise probablement le transfert horizontal de gènes et l'augmentation de la résistance aux antibiotiques. (Tremblay et al., 2014). L'état métabolique des bactéries associées au biofilm est une autre raison potentielle de la résistance aux antimicrobiens; les cellules des zones appauvries en nutriments et en oxygène dans le biofilm sont peu actives métaboliquement et elles se divisent très peu fréquemment et donc peuvent entrer dormance ce qui rend les bactéries insensibles aux antibiotiques. (Roy et al., 2018).

Matériel et Méthodes

Matériel et méthodes

I. Souches bactériennes utilisées

Pour mener cette étude, deux souches bactériennes bien connues pour leur implication dans les infections nosocomiales ont été sélectionnées: *Staphylococcus aureus* CIP543154 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27653.

II. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de 12 métabolites secondaires à savoir l'acide gallique, la quercétine, le thymol, la coumarine, le carvacrol, la carvone, le β -ionone, l'eucalyptol, l'acide caffeique, l'acide tannique, l'apigénine et l'épicatéchine gallate contre les souches choisis a été évaluée *in vitro* par la méthode de microdilution. Cette technique consiste à préparer aseptiquement une gamme d'antibiotique de concentrations décroissantes par dilutions successives de raison 1/2 à partir d'une solution mère du composé testé.

1. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture fraîche réalisée sur milieu LB solide, des colonies ont été prélevées et mise en suspension dans l'eau physiologique stérile (NaCl à 0.9 %) puis agitées au vortex jusqu'à obtenir une turbidité équivalente à celle de l'étalon de 0.5 McFarland qui correspond approximativement à $1 \cdot 10^8$ UFC/mL.

La suspension bactérienne ajustée à 0.5 McFarland a été diluée de 1/100 dans du milieu Luria bertani (LB) liquide composé de : 10g/L peptone, 10g/L NaCl, 5g/L extrait de levure, pour atteindre une concentration finale de 10^6 UFC/mL.

2. Préparation des composés

Les métabolites secondaires utilisés dans cette étude ont été obtenus de Sigma-Aldrich. La préparation de la solution mère de l'acide gallique, la quercétine, le thymol et la coumarine avec une concentration finale de 10 mg/mL a été réalisée par l'ajout de 10 mg de chaque composé sur 980 μ L du milieu LB et 20 μ L de diméthylsulfoxyde (2% DMSO), alors que celle du carvacrol, du carvone, du β -ionone et d'eucalyptol a été réalisée par l'ajout de 80 μ L de chaque composé sur 920 μ L du milieu LB mélangé avec 0.15% d'agar afin d'obtenir une concentration finale de 8%. Pour l'acide caféique, l'acide tannique et l'apigénine, une concentration finale de la solution mère de 2 mg/mL a été réalisée, alors qu'une concentration de 0.5 mg/mL a été préparée pour l'épicatéchine gallate.

3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

L'évaluation d'actif antimicrobien est conventionnellement effectuée par la mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des composés. La CMI est définie selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) comme la plus faible concentration de la substance antibactérienne/antifongique inhibant toute croissance visible d'une souche microbienne après un temps d'incubation de 18h à 24h (Clinical and Laboratory Standards Institut, 2018).

La gamme des composés a été préparée dans une microplaque de 96 puits à fond en U. Dont un volume de 50 µl du milieu LB a été distribué dans tous les puits à l'exception de ceux de la première ligne. Puis, 100µl des solutions mères des différents composés ont été ajoutés dans la première ligne. La réalisation des séries de dilution a été faite en prélevant 50 µl du premier puits de la première colonne et en l'ajoutant dans le deuxième puits appartenant à la même colonne, et ainsi de suite jusqu'à puits 10. L'inoculation a été réalisée par l'ajout de 50µl de la suspension bactérienne avec une concentration de 10^6 UFC/mL dans tous les puits sauf la première ligne. Les puits servant de contrôle négatif ne contiennent pas du composé, et ceux servant de contrôle positif contiennent le milieu de culture sans bactérie. Les plaques sont ensuite sellées et incubées à 37°C pendant 18h (Balouiri et al., 2016).

La révélation de la croissance microbienne est assurée par l'ajout d'un réactif indicateur de croissance microbienne ; c'est la résazurine (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one). La résazurine a été préparée à 0,015% en dissolvant 0,015 g, agitée au vortex et stérilisée par filtration (0,22 µm de filtre) et conservée à 4 °C (Elshikh et al., 2016). La CMI correspond au puits, contenant la plus faible concentration du composé, qui n'a montré aucune croissance bactérienne (Lekbach et al., 2018).

4. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est définie comme la plus faible concentration d'agent antimicrobien nécessaire pour tuer 99.9 % de l'inoculum final après 24h d'incubation à une température de 37 °C. Cette technique consiste à prélever à l'aide d'une anse les puits ne présentant pas de croissance bactérienne visible, puis chaque prélèvement est déposé en strie sur gélose LB. Les boîtesensemencées sont incubées à 37°C pendant 24h (Balouiri et al., 2016).

III. Caractérisation physicochimique de la surface du matériau du plastique (MP) et des souches bactériennes

1. Préparation des coupons

Le matériau du plastique (MP) a été découpé en morceaux de 1 cm². Avant chaque expérience les morceaux ont été stérilisés pendant 10 min dans une solution d'éthanol, et rincés à l'eau distillée stérile, puis séchés à l'air.

2. Préparation des souches bactériennes

Les deux souches ont été cultivées indépendamment en bouillon Luria Bertani (LB) à 37 °C pendant 24h, après la période d'incubation, les cellules ont été récupérées par centrifugation pendant 15 min à 5000 rpm puis, le culot a été lavé deux fois par une succession de deux centrifugations dans une solution stérile de KNO₃ (0,1 M) et remise en suspension dans la même solution. Les suspensions bactériennes ont été déposées ensuite sur un filtre d'acétate de cellulose de 0.45 µm et filtrées au moyen de la pression négative jusqu'à l'obtention d'une couche mince de cellules bactériennes. Enfin, les filtres humides ont été séchés à température ambiante pendant 30 min (Elabed et al., 2011).

3. Mesure de l'angle de contact

La caractérisation physicochimique de la surface du morceau du plastique (MP) et les 2 souches bactériennes a été réalisée par la méthode de l'angle de contact. En effet, quand 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 et est noté θ . Cet angle rend compte de l'aptitude d'un liquide à s'étaler sur une surface et dépend des interactions entre le liquide et le solide.

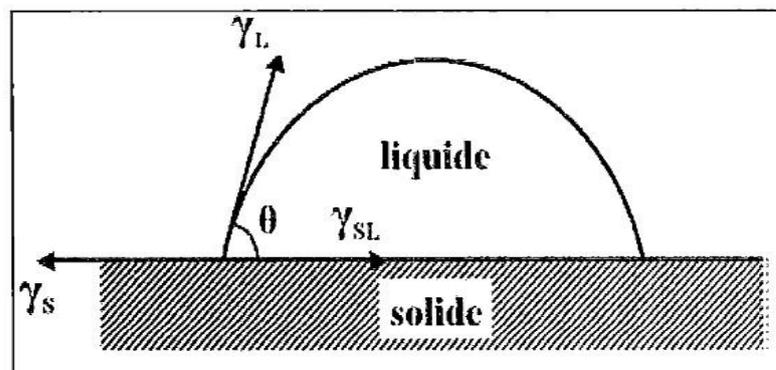


Figure 2. Représentation du modèle de Young, mesure de l'angle de contact liquide/solide (Rupp et al., 2014)

Les mesures de l'angle de contact ont été effectuées par la méthode de la goutte sessile en utilisant un goniomètre (GBX Instruments, France) (Blanco, 1997). Deux liquides polaires (eau et formamide) et un liquide non polaire (diiodométhane) ont été utilisés (tableau 1). Une goutte de 2 µl du liquide d'essai a été déposée sur l'échantillon. Les angles de contact ont été pris 15 secondes après le dépôt de la goutte. La température pour les mesures d'angle de contact était de 25 ± 2 °C. Trois mesures d'angle de contact sont réalisées sur chaque échantillon.

Tableau 2. Caractéristiques énergétiques (mJ / m²) des liquides utilisés pour mesurer les angles de contact (Van Oss, 1996)

Liquide	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)
Eau (H ₂ O)	21.8	25.5	25.5
Formamide (CH ₃ NO)	39	2.3	39.6
Diiodométhane (CH ₂ I ₂)	50.5	0	0

4. Calcul des paramètres physicochimiques de la surface

4.1. Calcul de l'énergie libre et ces composantes

Les mesures de l'angle de contact obtenus et l'approche de van Oss (van Oss, 1995) ont été exploitées pour évaluer le degré d'hydrophobicité. Selon cette approche, le degré d'hydrophobicité d'un matériau donné, est exprimé comme l'énergie libre d'interaction entre deux entités de ce matériau immergé dans l'eau (w): ΔG_{iwi} . Ce paramètre est calculé par la formule suivante:

$$\Delta G_{iwi} = -2 \gamma_{iw}$$

$$= -2 [((\gamma_i^{LW})^{1/2} - (\gamma_w^{LW})^{1/2})^2 + 2((\gamma_i^+ \gamma_i^-)^{1/2} + (\gamma_w^+ \gamma_w^-)^{1/2} - (\gamma_i^+ \gamma_w^-)^{1/2} - (\gamma_w^+ \gamma_i^-)^{1/2})]$$

Où (γ^{LW}) , représente la composante de Lifshitz-van der Waals de l'énergie libre de surface et (γ^+) , (γ^-) sont respectivement les paramètres accepteurs et donateurs d'électrons de la composante acide-base de Lewis γ^{AB} , avec :

$$(\gamma_s^{AB}) = 2(\gamma_s^- \gamma_s^+)^{1/2}$$

Les composantes γ^{LW} , γ^- et γ^+ sont calculés par l'équation de Young (van Oss, 1995):

$$\gamma_l (1 + \cos\theta) = 2. [(\gamma_s^{LW} \cdot \gamma_l^{LW})^{1/2}] + 2. [(\gamma_s^+ \cdot \gamma_l^-)^{1/2}] + 2. [(\gamma_s^- \cdot \gamma_l^+)^{1/2}]$$

Où les termes (S) et (L) désignent respectivement les phases de surface solide et liquide.

4.2. Calcul de l'énergie libre totale

L'énergie libre totale d'interaction entre la cellule microbienne (M) et le substratum (S) à travers l'eau (W) est calculé comme la somme des interactions LW et AB comme proposé par Van Oss (Carel J. van Oss, 1995)(Bayouduh et al., 2006).

$$\Delta G^{\text{Total}} = \Delta G^{\text{LW}} + \Delta G^{\text{AB}}$$

Où

$$\Delta G^{\text{LW}} = ((\gamma_M^{\text{LW}})^{1/2} - (\gamma_S^{\text{LW}})^{1/2})^2 - ((\gamma_M^{\text{LW}})^{1/2} - (\gamma_L^{\text{LW}})^{1/2})^2 - ((\gamma_S^{\text{LW}})^{1/2} - (\gamma_L^{\text{LW}})^{1/2})^2$$

et

$$\Delta G^{\text{AB}} = 2 [(\gamma_L^+)^{1/2} ((\gamma_M^-)^{1/2} + (\gamma_S^-)^{1/2} - (\gamma_L^-)^{1/2}) + (\gamma_L^-)^{1/2} ((\gamma_M^+)^{1/2} + (\gamma_S^+)^{1/2} - (\gamma_L^+)^{1/2}) - (\gamma_L^- \gamma_S^+)^{1/2} - (\gamma_L^+ \gamma_S^-)^{1/2}]$$

Thermodynamiquement, si $\Delta G^{\text{tot}} < 0$, l'adhésion est favorable et, si $\Delta G^{\text{tot}} > 0$, l'adhésion est défavorable.

IV. Test de l'adhésion

1. Préparation et ajustement de la suspension bactérienne

Les deux souches ont été cultivées indépendamment en bouillon LB à 37 °C pendant 24h, après la période d'incubation, les cellules ont été récoltées par centrifugation pendant 15 min à 5000 rpm puis, le culot a été lavé deux fois par une succession de deux centrifugations dans une solution stérile de KNO₃ (0,1 M) et remise en suspension dans la même solution.

La suspension bactérienne préparée de chaque souche a été ensuite ajustée à une DO de 0.4 dans une solution stérile de KNO₃ (0,1 M) (Hamadi et al. 2013).

2. Analyse de la surface du matériau de plastique (MP) par le microscope électronique à balayage (MEB)

La morphologie du biofilm sur la surface du matériau de plastique (MP) a été examinée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB). Pour cela, les coupons du matériau (MP) ont été immergés et mis en contact pendant 3, 5, 10 et 24h à 25 °C avec chaque suspension bactérienne préalablement préparée. Ensuite, les bactériens non adhérents ont été

éliminées en rinçant manuellement et délicatement les substrats trois fois avec de l'eau distillée stérile. Enfin, les échantillons ont été analysés au MEB (Hamadi et al. 2012).

IV. Activité anti-adhésive

Les essais de l'activité anti-adhésive, en conditions statiques, ont été réalisés à 25 °C selon le protocole décrit par EL Abed et al. (2010). En effet, après traitement de la surface du matériau MP avec un volume de 10 µl du composé pendant 20 min, les échantillons du plastique ont été immergés et mis en contact pendant 10h avec chaque suspension bactérienne préalablement préparée. Ensuite, les bactéries non adhérentes ont été éliminées en rinçant les substrats trois fois avec de l'eau distillée stérile. Enfin, les échantillons ont été analysés au MEB.

La caractérisation physicochimique des morceaux de MP traités avec les composés a été également réalisée. En effet, trois mesures d'angle de contact ont été prises à la surface des coupons pour trois liquides : l'eau, le formamide et le diiodométhane.

V. Analyses statistiques

Trois mesures ont été réalisées pour chaque test réalisé et les résultats ont été exprimés sous la forme suivante : moyenne \pm écartype en utilisant le logiciel GraphPad Prism 8.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

I. Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne *in vitro* de 12 métabolites secondaires contre *Staphylococcus aureus* CIP543154 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27653 déterminés par la méthode de microdilution sont illustrés dans le tableau 3.

Tableau 3: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des composés contre *Staphylococcus aureus* CIP543154 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27653.

Composés	Souches			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Quercetine	0.625 mg/mL	-	-	-
Acide gallique	0.039 mg/mL	0.078 mg/mL	0.156 mg/mL	2.5 mg/mL
Thymol	0.039 mg/mL	0.156 mg/mL	0.039 mg/mL	0.19 mg/mL
Carvacrol	$7.8 \times 10^{-3} \%$	0.01562%	$7.629 \times 10^{-6} \%$	$3.05 \times 10^{-5} \%$
Carvone	-	-	0.0312%	0.5 %
β -ionone	2 %	-	0.0156%	0.125%
Eucalyptol	4 %	-	2 %	-
Acide cafeique	1 mg/mL	-	-	-
Acide tannique	0.25 mg/mL	-	0.0625 mg/mL	-
Epicatechine gallate	0.125 mg/mL	-	0.125 mg/mL	-
Apigénine	-	-	-	-
Coumarine	2.5 mg/mL	-	5	-

- : concentration non déterminée

Le critère de classification de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un composé pur est très strict. Selon Kuete et al., 2010, l'activité antibactérienne est significative si la CMI <10 µg/mL, modérée si $10 < \text{CMI} \leq 100$ µg / mL et faible ou négligeable si CMI > 100 µg/mL. En se basant sur ces critères de classification, le carvacrol et le thymol ont présenté une activité modérée contre les deux souches testées. Alors que la coumarine, l'épicatéchine gallate, l'acide caféique, l'eucalyptol, la carvone, le β -ionone et l'apigénine ont montré un effet antibactérien faible contre les deux souches.

Une activité modérée contre *Pseudomonas aeruginosa* et négligeable contre *Staphylococcus aureus* a été observée pour l'acide gallique, un effet opposé à celui de l'acide gallique a été exercé par l'acide tannique. Dans ce sens, certaines études suggèrent que la différence de sensibilité aux agents antimicrobiens entre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives peut être attribuée à la structure et à la composition de l'enveloppe cellulaire (membrane cytoplasmique et/ou membrane externe et paroi cellulaire). Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi cellulaire est plus complexe. Il est constitué d'une fine couche de peptidoglycane adjacente à la membrane cytoplasmique et d'une membrane externe composée de phospholipides et de lipopolysaccharides (LPS). Le passage à travers cette membrane est régulé par la présence de canaux hydrophiles, appelés porines, qui excluent généralement l'entrée de substances hydrophobes. D'autre part, les bactéries Gram-positives n'ont pas une membrane externe, mais la paroi cellulaire est formée d'une couche de peptidoglycane plus épaisse qui confère une rigidité aux cellules et rend difficile la pénétration des antimicrobiens. Cette caractéristique peut être une explication de la faible activité de la coumarine et l'acide gallique contre *S. aureus* (Lopez-romero et al., 2015).

1. Acide gallique (AG)

L'acide gallique (AG) est un composé polyhydroxyphénolique de faible poids moléculaire qui est largement présent dans le règne végétal sous forme libre ou faisant partie de tanins (Sharma et al., 2011). L'AG s'obtient par l'hydrolyse de l'acide tannique avec un hydrolyse alcaline et/ou acide ou avec des tannases microbiens (Singh et al., 2019).

Les valeurs de CMI ainsi de CMB de l'acide gallique pour *Pseudomonas aeruginosa* était supérieures à celles de *Staphylococcus aureus*, ces résultats sont cohérent avec ceux obtenus par Borges et al., 2013 où les bactéries Gram-négative dont *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* étaient moins résistantes que les bactéries Gram-positives dont *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* à l'activité de l'acide gallique. Les CMI/CMB en µg/mL pour

P. aeruginosa et *E. coli* étaient de 500/500 et 1500/5000 , respectivement, tandis que pour *S. aureus* et *L. monocytogenes* , elles étaient de 1750 /5250 et 2000/5500 , respectivement (Borges et al., 2013).

L'acide gallique était efficace contre plusieurs souches de *Trichophyton* et de *Candida* et l'activité antifongique était médiée par un mécanisme ciblant la biosynthèse l'ergostérol. Ce dernier est un stérol nécessaire à la croissance et au fonctionnement normal de la membrane cellulaire fongique (Li et al., 2017). En plus de l'activité antibactérienne et l'activité antifongique, l'AG a été rapportée d'avoir d'autres activités biologiques dont l'activité antioxydante, anticancéreuse, antifongique, antivirale, anti-inflammatoire et antidiabétique (Choubey et al., 2018).

2. Thymol et carvacrol

Le carvacrol et son isomère le thymol sont deux phénols monoterpéniques produits par diverses plantes aromatiques. Ces composés sont des constituants majeurs de l'origan, du thym et du basilic (Sakkas & Papadopoulou, 2017). Dans notre étude, le thymol et le carvacrol ont montré une activité antibactérienne élevée contre *P. aeruginosa* par rapport à *S. aureus*. De même, Pesavento et al. (2015) ont démontré que l'effet antimicrobien des huiles essentielles de thym et d'origan étaient plus prononcés contre les bactéries Gram-négatives. Ces résultats diffèrent de ceux obtenu par Dzamic et al., (2015) où *S. aureus* était plus sensible au thymol et au carvacrol (CMI = 25 µg /mL) que *P. aeruginosa* (CMI = 100 et 50 µg /mL, respectivement).

Dans ce travail, nos résultats ont indiqué que le thymol a exercé un effet antibactérien plus important que le carvacrol contre *P. aeruginosa*. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Miladi et al., 2016, où la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 s'est avérée plus sensible au thymol qu'au carvacrol avec des valeurs de CMI de 64 et 256 µg/mL, respectivement. Les travaux de Silveira et al., (2020) ont également montrés des résultats similaires pour la souche *S. aureus* IS-58 avec des CMI de 72 et 256 µg/mL pour le thymol et le carvacrol, respectivement. Lambert et al., (2001) ont observée des valeurs de CMI de thymol et du carvacrol pour *S. aureus* ATCC 6538 de 0,140 mg/ml et 0,175 mg/ml, respectivement. Ces résultats peuvent être justifiés par la différence isométrique existant entre les deux composés. En effet dans l'étude d'Andrade-choa et al., (2015), ils ont attribué la différence d'activité antibactérienne du thymol et du carvacrol contre des mycobactéries à la position du groupe hydroxyle par rapport à la chaîne aliphatique. Le thymol a le groupe hydroxyle en position méta tandis que le carvacrol le possède en position ortho. Le principal mécanisme

d'action du thymol et carvacrol est basé sur la déstabilisation des membranes bactériennes, en effet grâce à leur nature hydrophobe ces deux composés peuvent facilement s'intégrer dans les membranes cellulaires et perturber la fraction lipidique des membranes plasmiques bactériennes, provoquant des altérations de la perméabilité des membranes et entraînant une libération accrue des constituants intracellulaires (Kachur & Suntres, 2020).

De plus, Markovic et al., (2011) ont démontré que le thymol et le carvacrol ont un potentiel antifongique remarquable. En effet, le carvacrol était le composé le plus actif contre *Aspergillus spp.* et *Penicillium spp.* De plus une diminution de l'ergostérol a été observée dans les membranes cellulaires de *Candida* et de *Cryptococcus* traités avec du thymol, ce qui a provoqué une perturbation de l'intégrité, ainsi des dommages importants de la membrane (Kowalczyk et al., 2020).

3. Acide caféique (AC)

L'acide caféique (AC) est un métabolite communément synthétisés par plusieurs espèces végétales. C'est un polyphénol présent dans de nombreuses sources alimentaires comme le café, le thé, le vin, les myrtilles, les pommes, le cidre, le miel et la propolis. L'AC possède un potentiel antimicrobien contre plusieurs microorganismes dont *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *M. Luteus*, *L. monocytogenes* et *C. albicans* souches (Keça et al., 2018). En outre, Luís et al., (2014) ont démontré que l'AC possède également une activité antibiofilm contre *S. aureus*. En effet, une concentration de 4 mg/mL a entraîné une réduction de 60 % dans la biomasse du biofilm formé en 24 h.

Dans notre étude, l'AC n'a montré aucun effet sur *S. aureus*. Cependant, Pinho et al., (2014) ont obtenu des valeurs de CMI et CMB de 0.625 et 1.25 mg/mL pour *S. aureus*. En effet, selon Stead, (1993), il existe des microorganismes capables de tolérer et même de métaboliser les acides hydroxycinnamiques par réduction de leur chaîne latérale pour produire les acides 2-hydroxyphénylpropioniques, qui peuvent ensuite être décarboxylés en *p*-éthylphénols substitué. C'est peut-être la raison pour laquelle l'acide caféique n'a pas affecté la croissance de *S. aureus*. Par contre, Il a été rapporté que l'AC peut exercer une synergie avec plusieurs antibiotiques. Un effet synergique a été observé lorsqu'il est associé à la Norfloxacin, la CMI a été réduite de 156,3 à 15,5 µg/mL pour *S. aureus*. Une synergie avec deux antibiotiques (la gentamicine et l'imipénem) contre *P. aeruginosa* a été également démontré avec une réduction de la CMI de 625 à 24,61 µg/mL et de 1250 à 78,13 µg/mL, respectivement (Lima

et al., 2016). De plus, l'association de l'acide caféique avec la rifampicine et l'érythromycine a significativement réduit la prolifération de *P. aeruginosa* et l'inhibition s'est produite à des niveaux inférieurs à la CMI de la rifampicine et de l'érythromycine ; dans cette étude l'AC a montré une capacité remarquable comme agent perméabilisant en facilitant l'entrée d'antibiotiques hydrophobes dans les cellules de *P. aeruginosa* et en améliorant la perméabilité de la membrane externe de cette bactérie (Perumal et al., 2017).

Dans la littérature, l'acide gallique et l'acide caféique ont montré le même mécanisme antibactérien, vue leur structure similaire. Le potentiel antibactérien de ces deux acides phénoliques est reliée à leurs capacité à induire une hyperacidification de la membrane plasmique via don de protons et acidification du cytosolique intracellulaire ; ce pH bas peut inhiber l'enzyme H^+ -ATPase nécessaire à la production d'ATP (Pinho et al., 2014).

4. Quercétine

Dans notre étude la quercétine a inhibé la croissance de *P. aeruginosa* à une CMI de 625 $\mu\text{g/mL}$. Cependant, une CMI de 80 $\mu\text{g/ml}$ était suffisante pour inhiber la croissance de *P. aeruginosa* dans l'étude menée par Gopu et al., (2015). Dans une autre étude, Wang et al., (2018) ont démontré que l'effet bactériostatique de la quercétine était plus forte sur les bactéries gram-positives que sur les bactéries gram-négatives. Les CMI pour *E. coli*, *S. enterica* sérovar *Typhimurium*, *S. aureus* et *P. aeruginosa* étaient respectivement de 0,0082, 0,0072, 0,0068 et 0,0085 $\mu\text{mol/mL}$.

Le mécanisme antibactérien de la quercétine comprend principalement la destruction de la paroi cellulaire des bactéries et la modification de la perméabilité cellulaire. En effet, le traitement d'*E. coli* (à $50 \times \text{MIC}$) et *S. aureus* (à $10 \times \text{MIC}$) avec de la quercétine a endommagé les parois cellulaires et les membranes de ces bactéries (Wang et al., 2018). La quercétine peut agir également par inhibition de l'activité d'ADN gyrase (Plaper et al., 2003).

L'activité antibiofilm de la quercétine a été signalée dans plusieurs travaux. Lee et al., (2013) ont confirmé la capacité de la quercétine à inhiber la formation de biofilm de *S. aureus*, ainsi d'exercer un effet répresseur sur les gènes liés à l'adhésion bactérienne. Dans une autre étude, la quercétine a montré une réduction de 80% de la biomasse du biofilm de *P. aeruginosa* par une concentration de 80 $\mu\text{g/ml}$. De plus, il a entraîné une réduction significative dans la production d'exopolysaccharides (EPS) et d'alginate d'une manière dépendante de la concentration, et il a entraîné également une inhibition de motilité (Gopu et al., 2015).

5. Acide tannique (AT)

L'acide tannique (AT) est un tanin naturel qui fait partie du groupe des acides phénoliques, il se compose d'une unité centrale de glucose et de dix molécules d'acide gallique qui lui sont attachées. Il peut être isolé à la fois des types de plantes herbacées et ligneuses (Kaczmarek, 2020).

Notre étude a démontré que l'acide tannique a présenté un effet bactériostatique sur les 2 bactéries testées. Il était plus actif sur *Staphylococcus aureus* (CMI= 0.0625 mg/mL) que sur *Pseudomonas aeruginosa* (0.25 mg/mL). De nombreuses études ont rapporté l'activité antibactérienne de la quercétine. Dans une étude menée par Mandal et al., (2017), les résultats ont démontré que la quercétine exerce une activité modérée contre *P. aeruginosa* avec une valeur de CMI de 32 µg/mL, alors que Diniz-Silva et al., (2016) ont signalé une CMI de 512 µg/mL pour *S. aureus*. De même, Kirmusaoğlu, (2019) ont trouvé que la CMI et CMB de l'acide tannique étaient respectivement 64 et 128 µg/mL contre les isolats de SARM.

L'association de l'acide tannique à l'antibiotique norfloxacine a montré un effet synergique puissant, puisqu'il a considérablement réduit la CMI de cet antibiotique. Cette synergie a été attribuée à l'inhibition de la pompe d'efflux NorA chez *S. aureus*. Cette pompe est responsable de la résistance modérée aux fluoroquinolones de *S. aureus* (Tintino et al., 2016). Chung et al., (1998) ont signalé que les tanins peuvent agir par complexation avec des enzymes ou protéines, altérations de la perméabilité membranaire ou par chélation des ions. Ils ont rapporté également que l'effet inhibiteur de l'acide tannique sur la croissance des bactéries intestinales peut être causé par sa forte capacité de fixation du fer.

L'étude de Zhang et al., (2020) a montré que l'acide tannique peut être utilisé dans la construction des matériaux à des fins biomédicales ; L'incorporation de l'acide tannique à du cellulose bactérienne a considérablement amélioré l'activité antimicrobienne et a doté le matériau résultant d'une forte activité antibiofilm puisque le traitement avec ce matériau a conduit à une réduction de ~ 80% et ~ 87% de biofilm de 24 h de *S. aureus* et *P. aeruginosa*, respectivement. En outre, Il a été prouvé que l'acide tannique peut inhiber la formation de biofilm de *S. aureus* en supprimant l'expression des gènes, qui sont associés au quorum et à l'adhésion intercellulaire (Boles & Horswill, 2011), comme il peut également inhiber la formation de biofilm de *P. aeruginosa* en réduisant l'EPS (Siddiqui et al., 2015).

6. Carvone

La carvone est un monoterpène que l'on trouve comme principal composant actif de plusieurs huiles essentielles, telles que la menthe (*Mentha spicata* L.), l'aneth (*Anethum graveolens* L.), le carvi (*Carum carvi* L.) et la citronnelle (*Lippia alba*) (Porfírio et al., 2017). Znini et al., (2011) ont rapporté que la carvone est l'un des agents antimicrobiens les plus efficaces de plusieurs plantes, avec un mécanisme d'activité antibactérienne impliquant la déstabilisation de la structure des phospholipides et l'interaction avec les protéines membranaires (Aggarwal et al., 2002).

Notre étude a montré que la carvone n'a pas d'effet sur *Pseudomonas aeruginosa*. Par contre, un effet bactériostatique (CMI= 0.0312%) et bactéricide (CMB= 0.5 %) a été observé sur *Staphylococcus aureus*. Mun et al., (2014) ont rapporté que les CMI de carvone contre six souches différentes de *S. aureus* ont été compris entre 500 et 1 000 µg/ml. De plus il a été démontré que la combinaison de la carvone avec la gentamicine a produit un effet synergique. Dans une autre étude menée par Porfírio et al., (2017), la carvone a révélé une activité antibactérienne faible contre *Staphylococcus aureus* (CMI= 2 mg/mL), contrairement au huile essentielle (HE) de *L. alba* dont le carvone fait partie de ses composés majeurs qui a présenté une concentration inhibitrice 4 fois plus faible. Ce qui prouve que l'action bactériostatique et bactéricide de cette HE est due à la synergie entre ses composants et pas seulement à l'activité du composant majoritaire.

7. Apigénine

L'apigénine était le seul composé qui n'a démontré aucun effet antibactérien sur les deux souches testées. Des résultats similaires ont été obtenus par Su et al., (2014) où l'apigénine était pratiquement inactif (CMI >4000 µg/mL) contre les 34 souches de *S. aureus* testées. De même, l'apigénine isolée du *Portulaca oleracea* L. a montré une CMI > 4000 µg/mL contre *P. aeruginosa* (Nayaka et al., 2014). Dans une autre étude l'apigénine a montré une activité modérée contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* et les CMI étaient respectivement de 62.5 et 31.25 µg/mL (Liu et al., 2013). De plus, Banerjee et al., (2015) ont montré que l'encapsulation de l'apigénine a amélioré son activité antibactérienne. En effet l'apigénine liposomale a montré des CMI plus faibles que l'apigénine libre; Les CMI d'*E. coli*, *S. aureus* et *B. subtilis* ont été réduits de 75% et de 50%. Pour *P. aeruginosa*, il a été conclu que l'encapsulation de l'apigénine augmente son interaction avec les membranes des bactéries testées.

8. Epicatéchine gallate (ECG)

Les résultats de notre étude ont démontré que l'épicatéchine gallate (ECG) exerce une activité faible contre les deux souches testées avec une CMI de 0.125 mg/mL. En effet, selon la littérature l'ECG tout seul n'a pas démontré une activité bactérienne pertinente, par contre sa combinaison avec des antibiotiques a donné de bons résultats (Taylor, 2013). Dans une étude réalisée par Gibbons et al., (2004), l'épicatéchine gallate a diminué la CMI de la norfloxacine 4 fois contre *S. aureus*. Dans une autre étude, Perumal, et al., (2017) a démontré que l'ECG peut également faciliter l'entrée d'antibiotiques hydrophobes dans les cellules de *P. aeruginosa* en augmentant la perméabilité de sa membrane (Perumal, et al.,2017).

L'épicatéchine gallate (ECG) est l'un des constituants majeurs du thé vert japonais (*Camellia sinensis*). Ce composé est connu pour sa capacité à moduler la résistance aux β -lactamines du SARM (Stapleton & Taylor, 2002). En effet ECG a entraîné une diminution significative (> 64 fois) de la CMI de l'oxacilline contre trois souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) (Stapleton et al., 2004). L'ECG est capable de perturber la sécrétion d'effecteurs liés à la virulence comme l'alpha toxine chez *S. aureus* (Shah et al., 2008) et de réduire sa halotolérance (Stapleton et al., 2006). En effet, L'ECG pénètre profondément dans le noyau hydrophobe de la palissade lipidique de la bicouche staphylococcique pour induire une reconfiguration complète de l'architecture membranaire fournissant un environnement sous-optimal pour la biosynthèse de la paroi cellulaire et machines de division (Stevens et al., 2015).

9. Eucalyptol

L'eucalyptol ou 1,8-cinéole est un monoterpène naturel, également connu sous le nom d'eucalyptol. C'est un composé majeur de nombreuses huiles essentielles végétales, notamment l'huile essentielle d'eucalyptus (Schürmann et al., 2019), il possède des propriétés antibactériennes et également antifongiques (Morcia et al., 2012).

Dans notre étude, l'eucalyptol a exercé une faible activité antibactérienne contre les deux souches étudiées, avec une résistance plus prononcée chez *P. aeruginosa*. Des résultats similaires ont été obtenus par Vuuren & Viljoen, (2007), la CMI était de 8 mg/mL pour *Staphylococcus aureus* et 4 mg/mL pour *Pseudomonas aeruginosa*. Dans une étude, l'1,8-cinéole combiné à la chlorhexidine -un antiseptique couramment utilisée pour les soins et le nettoyage de la peau, des mains et des plaies- a été étudiée. Les résultats de cette étude ont montré une interaction synergique de ces 2 composés contre *Staphylococcus*

aureus, SARM, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans*, alors que pour *P. aeruginosa* un effet d'indifférence a été observé (Şimşek, & Duman, 2017). De plus 1,8-cinéole renforce l'effet antimicrobien des antibiotiques. En effet, l'association de 1,8-cinéole et la gentamicine a montré un effet synergique contre *Staphylococcus aureus* (CMI a été réduit de 4 fois) (Hriouech et al., 2020). 1,8-cinéole a montré également un effet antibactérien, antibiofilm, et anti-quorum sensing contre des souches de SARM (Merghni et al., 2018, Şimşek, & Duman, 2017).

10. Coumarine

La coumarine est un composé phénolique d'origine végétale et ses dérivés sont connus pour leurs activités anti-tumorales et anti-inflammatoires (Fylaktakidou et al., 2004). La coumarine a été décrite comme un inhibiteur du QS chez *P. aeruginosa* et plusieurs autres bactéries gram-négatives. Il a été démontré qu'il inhibe la formation de biofilm, la production de phénazine et la motilité dans la souche PA14 de *P. aeruginosa* (Gutiérrez-barranquero et al., 2015).

Une très faible activité contre les deux souches a été notée dans notre étude (CMI= 2.5 et 5 mg/mL pour *P. aeruginosa* et *S.aureus*, respectivement). Des valeurs de CMI (500 ug/mL) plus faible ont été obtenu par Souza et al., (2005) pour les deux souches testées. Les mêmes valeurs de CMI ont été rapporté par (Kayser & Kolodziej, 1999) qui ont souligné que le caractère lipophile ainsi la structure plane des coumarines sont nécessaires pour des effet antibactériennes élevées, puisqu'il semble que l'activité antimicrobienne des coumarines soit due au mécanisme de diffusion passive. Ces caractéristiques peuvent faciliter la pénétration cellulaire.

Les dérivés de la coumarine se sont avérées aussi capable d'exercer un effet antibactérien contre les bactéries a gram-positives et les bactéries à gram-négatives (Qin et al., 2020). Un des dérivée testé a montré une forte activité contre *Staphylococcus aureus* avec une CMI de 2.5 ug/mL (Chavan et al., 2018).

11. β -ionone

La β -ionone est un composé terpénoïde cyclique présent dans de nombreux fruits, légumes et céréales, ce composé a montré un large spectre d'activités physiologiques et pharmacologiques, notamment anti-inflammatoire, anticancéreuse (Yang et al., 2020).

Dans notre étude *P. aeruginosa* était moins sensible à l'action antibactérienne de la β -ionone par rapport au *S.aureus*. Un comportement similaire a été observée dans l'étude d'El abed et al., (2011) où cette bactérie était plus résistante à l'action de la β -ionone par rapport aux autres composés testés. En effet, les CMI variaient entre 0,02 et 0,05 % (v/v) pour l'eugénol, le carveol et la carvone alors que la β -ionone a présenté une CMI de 0,5 % (v/v). De plus la β -ionone (0,5 MIC) a entraîné une réduction de 43% du biofilm de *P. aeruginosa* (El abed et al., 2011), et a pu également réduire l'adhésion des spores *Penicillium expansum* à la surface du bois de cèdre (Barkai et al., 2016). Dans une autre étude la β -ionone a présenté une activité antibactérienne importante contre *Streptococcus mutans* avec une CMI de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Kubo et al., 1993).

La différence de CMI et de CMB dans notre étude avec les valeurs rapportées dans la littérature peut être justifiée par la diversité des méthodes appliquées dans chaque travail. Par exemple, El-gammal & Mansour, (1986) ont décrit que la CMI de la quercétine pour *S. aureus* était de 37 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tandis que fattouch et al., (2007) ont atteint une CMI de 10 mg/mL pour les mêmes bactéries. En effet, fattouch et al., (2007) ont utilisé la méthode de microdilution, cependant, El-gammal & Mansour, (1986) ont utilisé une méthode dépendante de la capacité de diffusion des composés. En outre, d'autres facteurs tels que la taille de l'inoculum, le volume de bouillon ou de gélose, le type de bouillon ou de gélose, la taille des puits, taille des disques de papier, souches bactériennes utilisées (clinique ou standard), période d'incubation, source du composé (naturel ou commercial) peuvent contribuer à la divergence des résultats (Cushnie & Lamb, 2020).

III. Hydrophobicité et énergie libre de surface

Les propriétés acido-basiques et l'énergie libre de surface du matériau de plastique (MP) non traité et traité avec le thymol et le carvacrol ont été évaluées à l'aide de mesures d'angle de contact. Le calcul a été effectué selon l'approche de van Oss. L'angle de contact avec l'eau (θ_w) peut être utilisé comme une indication qualitative de l'hydrophobicité du matériau de surface. Selon Vogler (1998), la surface est considérée comme hydrophobe si θ_w est supérieur à 65° alors qu'elle est hydrophile lorsque θ_w est inférieure à 65° . En outre le degré d'hydrophobie du matériau peut être déterminé quantitativement en se basant sur l'équation ΔG_{iwi} (Van Oss et al., 1988). Le matériau est considéré comme hydrophobe si $\Delta G_{iwi} < 0$, à l'inverse, il est hydrophile à $\Delta G_{iwi} > 0$.

1. Caractérisation physicochimique des souches bactériennes et de la surface du matériau de plastique (MP) non traité

1.1. Propriétés physicochimiques de la surface du matériau MP

D'après les résultats présentés dans le tableau 4, la surface du matériau MP présente un caractère hydrophobe révélé par la valeur de l'angle de contact avec l'eau ($\theta_w = 76,2^\circ$) qui est supérieure à 65° , et par la valeur négative de l'énergie libre du matériau ($G_{iwi} = -23,37 < 0$).

Tableau 4 : Valeurs des angles de contact et l'énergie libre de surface dans la surface de coupons en plastique MP non traitée

	Angles de contact ($^\circ$)		Énergie de surface: composants et paramètres (mJ / m ²)				
	Θ_w	Θ_f	Θ_D	γ^{LW}	γ^+	γ^-	G_{iwi}
Matériau MP	76.2± 0.05	67.9± 0.11	34.4± 0.36	42.21±0.15	1.06±0.09	15.93±0.21	-23,77

Il faut noter que l'énergie libre de surface donne une indication quantitative de l'hydrophobicité de la surface du substrat, tandis que l'angle de contact avec l'eau permet une évaluation qualitative de l'hydrophobicité. Sur la base de ces données, le matériau MP est caractérisé comme quantitativement et qualitativement hydrophobe.

Le caractère donneur d'électrons du matériau était significativement plus élevé que le caractère accepteur d'électrons: $\gamma^- = 48.23$ mJ/m², $\gamma^+ = 1.33$ mJ / m² et le caractère de Lifshitz van der Waals était de 48,37 mJ/m². En effet les surfaces qui présentent une valeur de (γ^-) supérieure à 27,9 mJ/m² sont considérées comme hydrophiles cependant quand la valeur de (γ^-) est inférieure à 27,9 mJ/m², elles sont supposées hydrophobes (Oss & Giese, 1995). Il a été rapporté que le caractère hydrophile des matériaux est attribuée à la présence des groupements chargés et polarisés capables de former des liaisons hydrogène dans l'eau (Choi et al., 2016).

1.2. Propriétés physicochimiques de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*

Selon les résultats du tableau 5, les deux souches se sont avérées quantitativement et qualitativement hydrophile avec des valeurs de $\theta_w < 65^\circ$ et $\Delta G_{iwi} > 0$. De plus, leurs surfaces

présentent un caractère donneur d'électrons largement supérieurs au caractère accepteur d'électrons. En effet, une valeur de la base de Lewis (γ^-) élevée et une valeur de l'acide de Lewis (γ^+) faible sont des caractéristiques typiques des bactéries hydrophiles.

Tableau 5 : Valeurs des angles de contact et l'énergie libre de surface de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*

	Angles de contact (°)		Énergie de surface: composants et paramètres (mJ / m ²)				
	Θ_W	Θ_F	Θ_D	γ^{LW}	γ^+	γ^-	G_{iwi}
<i>P. aeruginosa</i>	0± 0	0± 0	43.9± 0.11	37.53±0.06	1.93±0.01	54.92±0	30.25
<i>S. aureus</i>	9.8± 0.35	16.4± 0.50	57.7± 0.65	29.85±0.37	3.41±0.16	55.67±0.33	29.60

Plusieurs auteurs ont montré que l'hydrophobicité est directement corrélée avec le rapport élevé des concentrations de N/C et inversement corrélée avec celui des concentrations de O/C. Cela indique que l'origine de l'hydrophobicité est les groupements contenant l'azote et l'origine de l'hydrophilicité est les groupements contenant l'oxygène (Hamadi et al., 2012).

L'hydrophilicité des bactéries est liée à la présence de polysaccharide et l'hydrophobicité est liée à la présence des hydrocarbures. De plus Latrache et al., (2002) ont montré également que l'hydrophilicité d'*E. coli* est liée à la présence des polysaccharides, alors que l'hydrophobicité est liée à la présence des protéines.

1.3. Energie libre totale

Les résultats de l'énergie libre totale ont montré des valeurs négatives pour les deux souches testées ce qui implique que l'adhésion sur ce matériau de point de vue thermodynamique serait défavorable (tableau 6). D'autre part, le matériau a présenté un caractère hydrophobe tandis qu'un caractère hydrophile a été observé pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ce qui confirme de plus que l'adhésion de point de vue physicochimique serait impossible, vu que les bactéries hydrophobes adhèrent plus fortement aux surfaces

hydrophobes, tandis que les cellules hydrophiles adhèrent fortement aux surfaces hydrophiles (Koubali et al., 2021).

Tableau 6: Valeurs de l'énergie libre d'interaction totale (ΔG^{tot}) (mJ/m^2)

Souches	Énergie libre d'interaction (mJ/m^2)		
	Matériau de plastique (MP)		
	ΔG^{LW}	ΔG^{GAB}	ΔG^{TOT}
<i>Staphylococcus aureus</i>	-2.90	31	28.07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-5.25	32.31	27.05

2. Energie libre de surface et caractère hydrophobe du matériau MP traité avec le thymol et le carvacrol

Afin d'étudier l'effet de thymol et de carvacrol sur les propriétés physicochimiques du matériau MP, les paramètres d'hydrophobie et de tension superficielle ont été évalués. Après un traitement de 20 min au thymol (0.039 mg/mL) et carvacrol ($7.8 \times 10^{-3} \%$ et $7.6 \times 10^{-6} \%$), les propriétés physicochimiques des surfaces des coupons en plastique ont été modifiées de façons remarquables (tableau 7). En effet, les valeurs des angles de contact ont chuté après traitement ainsi une augmentation remarquable dans les valeurs de γ^- et G_{iwi} a été observé. Cependant γ^{LW} n'a pas presque changé par rapport au control et demeurer stable.

Après traitement, le matériau MP est devenu qualitativement et quantitativement hydrophile ($\theta_w < 65^\circ$; $G_{\text{iwi}} > 0$), ce changement peut être dû aux groupements hydroxyles du thymol et du carvacrol.

Des études antérieures ont prouvé que le carvacrol induit des modifications dans les propriétés physicochimiques de différentes surfaces. Hassan et al., (2015) ont révélé que le bois de cèdre présentait des caractéristiques initiales de surfaces hydrophobes ($\theta_w = 89^\circ$; $\Delta G_{\text{iwi}} = -67,93 \text{ mJ}/\text{m}^2$) ainsi de faibles valeurs dans le caractère donneur /accepteur d'électrons ($\gamma^- = 0,28 \text{ mJ}/\text{m}^2$; $\gamma^+ = 3,03 \text{ mJ}/\text{m}^2$). Après le traitement au carvacrol, la surface est devenue hydrophile ($\theta_w = 42,2 \pm 0,3^\circ$; $\Delta G_{\text{iwi}} = 11,29 \text{ mJ}/\text{m}^2$), le caractère accepteur d'électrons est rendu presque nulle ($\gamma^+ = 0,18 \text{ mJ}/\text{m}^2$) tandis que le caractère donneur d'électrons a considérablement augmenté ($\gamma^- = 36,82 \text{ mJ}/\text{m}^2$). Nostro et al., (2012) ont également démontré que l'incorporation

du carvacrol à du polyéthylène-co-vinylacétate (EVA) entraîne une diminution dans les valeurs des angles de contact.

Tableau 7: Propriétés physicochimiques du matériau de plastique après traitement avec le carvacrol et le thymol

	Angles de contact (°)			Énergie de surface: composants et paramètres (mJ/m ²)			
	Θ_W	Θ_F	Θ_D	γ^{LW}	γ^+	γ^-	G_{iwi}
Control	76.2± 0.05	67.9± 0.11	34.4± 0.36	42.21±0.15	1.06±0.09	15.93±0.21	-23,77
Matériau traité avec thymol (0.039mg/mL)	45.6±0.17	55.8±0.07	42.9±0.40	38,05±0.13	0,39±0.33	52,06±0.04	33.76
Matériau traité avec carvacrol (7.8x 10 ⁻³ %)	51.4±0.18	54.3±0.30	37±0.13	40,99±0.45	0,31±0.12	40,83±0.41	18.01
Matériau traité avec carvacrol (7.6x10 ⁻⁶ %)	66±0.21	55.3±0.16	36.5±0.43	41,22±0.05	0,045±0	21,22±0.22	14.76

Les morceaux de plastiques traitées par le carvacrol ou par le thymol ont présentées des valeurs négatives de l'énergie libre totale. Par conséquent, l'adhésion bactérienne serait normalement défavorable. Ainsi les deux souches ont un caractère donneur d'électrons très proche du matériau ce qui suggère que les répulsions électrostatiques seraient importantes. Ce qui confirme de plus que l'adhésion n'aura pas lieu sur ce matériau.

Tableau 8 : Valeurs d'énergies libres totales du matériau après traitement

	Energie libre total (mJ/m ²)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Control	28.07	27.05
Matériau traité avec thymol (0.039mg/mL)	32.27	32.32
Matériau traité avec carvacrol (7.8x 10 ⁻³ %)	27.46	25.92
Matériau traité avec carvacrol (7.6x 10 ⁻⁶ %)	17.71	14.86

III. Activité anti-adhésive

1. Analyse de la surface du matériau MP non traité par microscope électronique à balayage

Les résultats de l'adhésion expérimentale de *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* au matériau du plastique obtenus par microscope électronique à balayage (MEB) sont mentionnés dans figures ci en dessous.

Les observations au MEB ont montré la capacité des deux souches a adhéree sur les matériaux de plastique ainsi leur adhésion était rapide puisque une durée de 3 heures était suffisante pour déclencher ce processus, en effet les micro-organismes se fixent plus rapidement aux surfaces hydrophobes et non polaires telles que le téflon et d'autres plastiques qu'aux matériaux hydrophiles tels que le verre. De plus il a été démontré que les matériaux hydrophiles sont plus résistants à l'adhésion bactérienne que les matériaux hydrophobes (Fletcher & Loeb, 1979).



Figure 3 : Image au MEB du matériau du plastique : témoin (Gx1000)

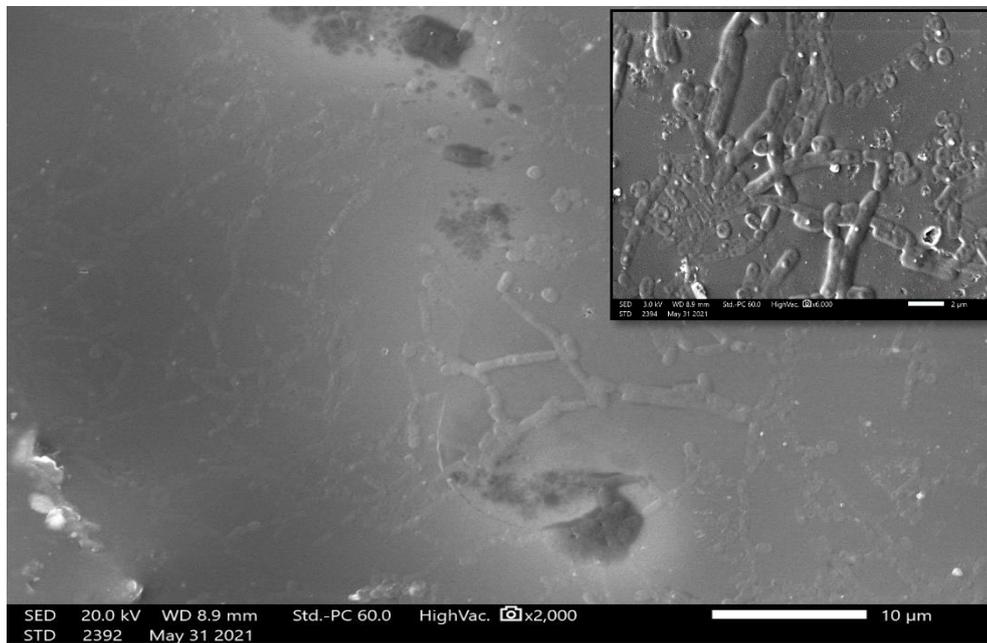


Figure 4: Image au MEB de cellules de *P. aeruginosa* adhérentes au matériau du plastique après 3h d'incubation (Gx2000 et 6000).

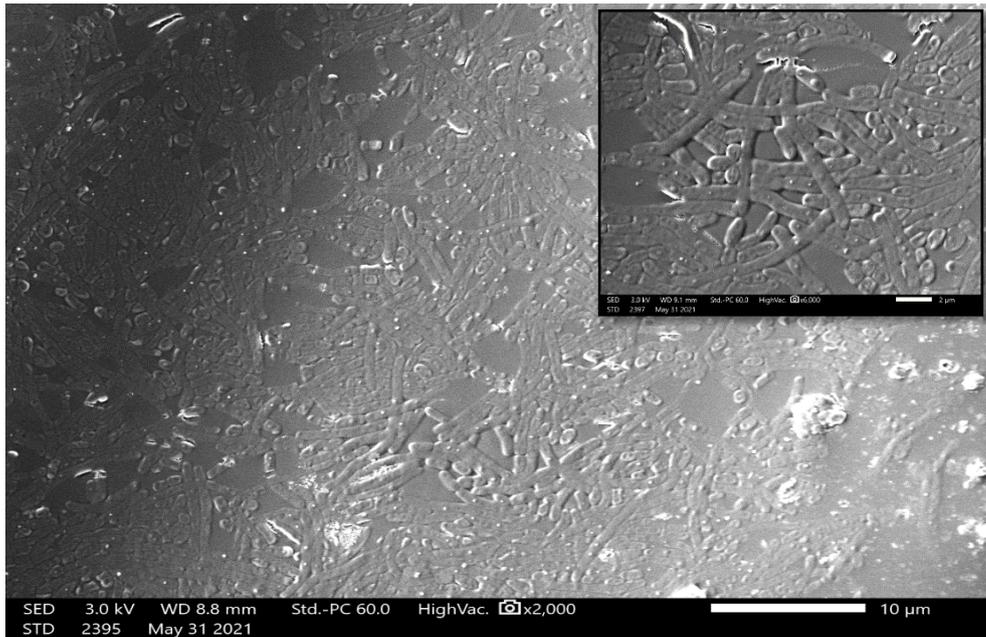


Figure 5: Image au MEB de cellules de *P. aeruginosa* adhérees au matériau du plastique pendant 5h (Gx2000 et 6000)

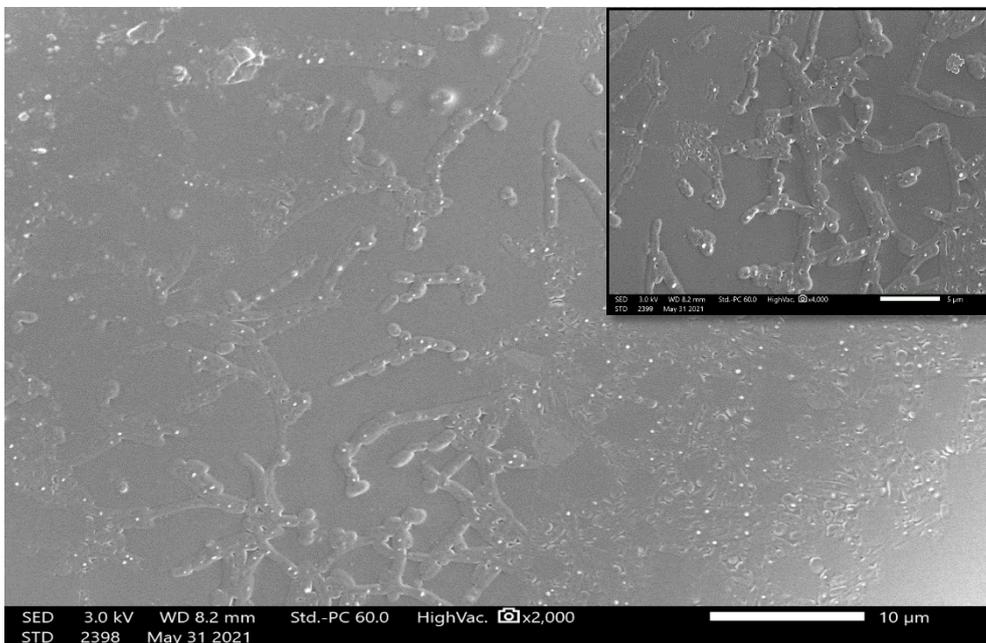


Figure 6: Image au MEB de cellules de *P.aeruginosa* adhérees au matériau du plastique pendant 10h (Gx2000 et 4000)

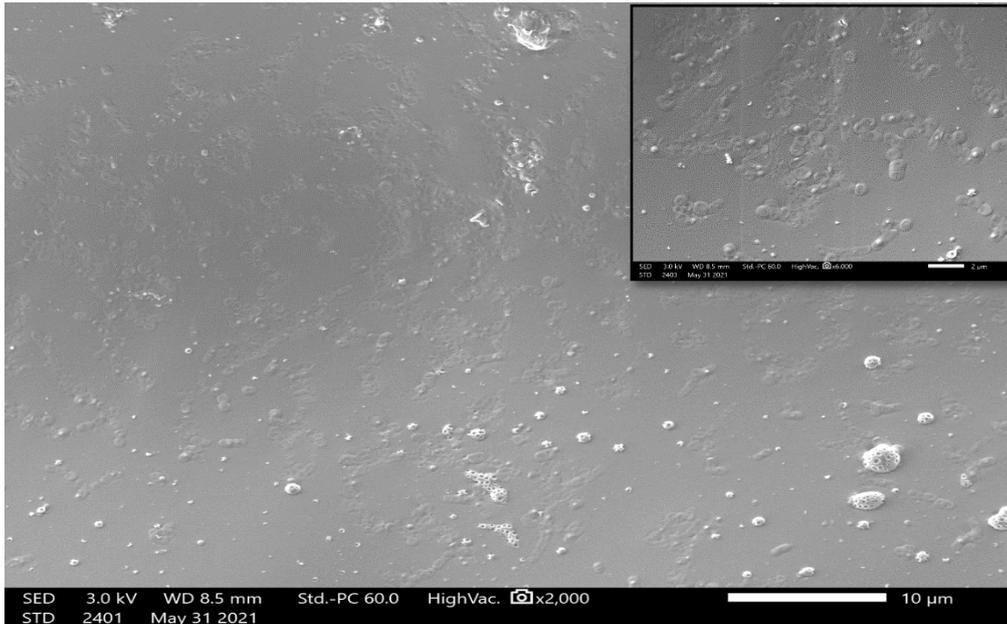


Figure 7: Image au MEB de cellules de *P.aeruginosa* adhérentes au matériau du plastique pendant 24 h (Gx2000 et 6000)

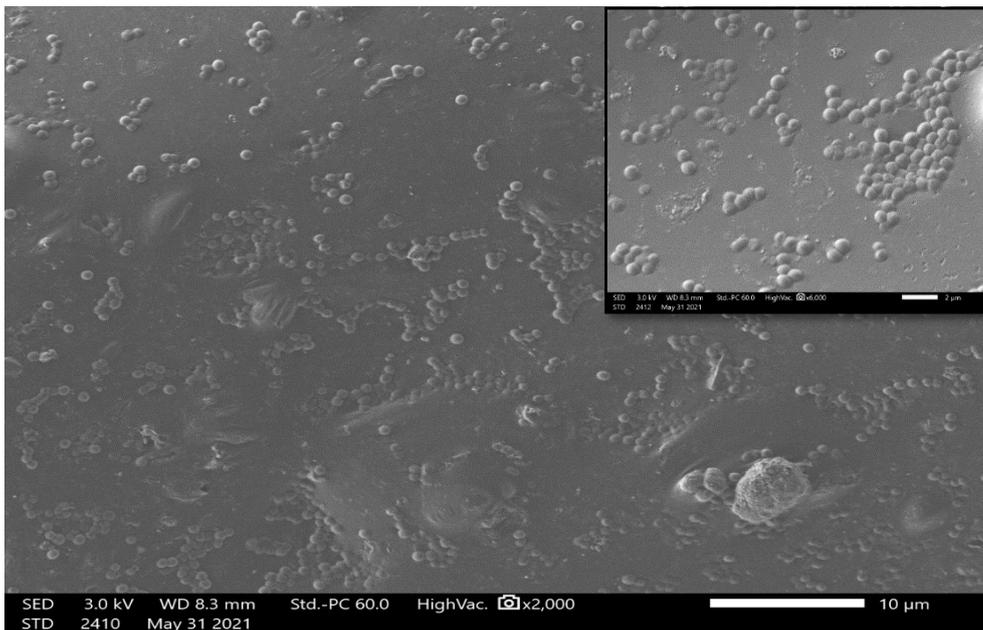


Figure 8: Image au MEB de cellules de staphylococcus aureus adhérentes au matériau du plastique pendant 3 h (Gx2000 et 6000)

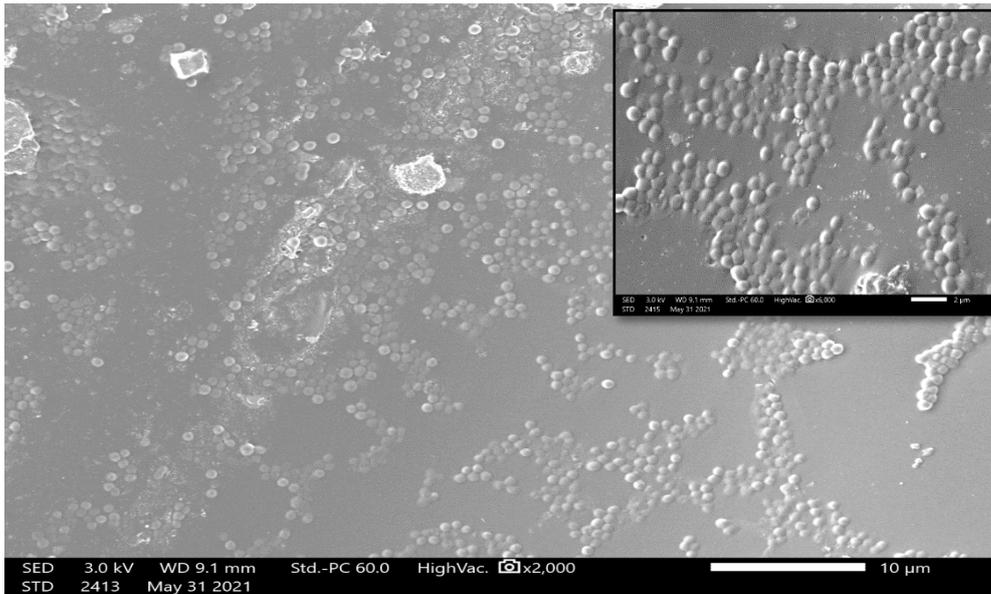


Figure 9: Image au MEB de cellules de staphylococcus aureus adhérees au matériau du plastique pendant 5 h (Gx2000 et 6000)

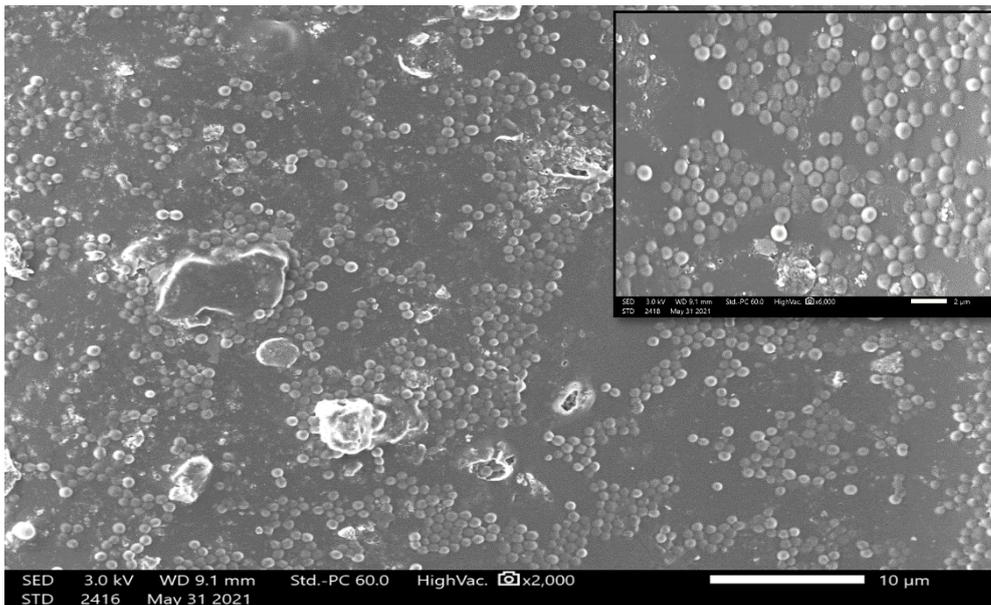


Figure 10: Image au MEB de cellules de staphylococcus aureus adhéree au matériau du plastique pendant 10 h (Gx2000 et 6000)

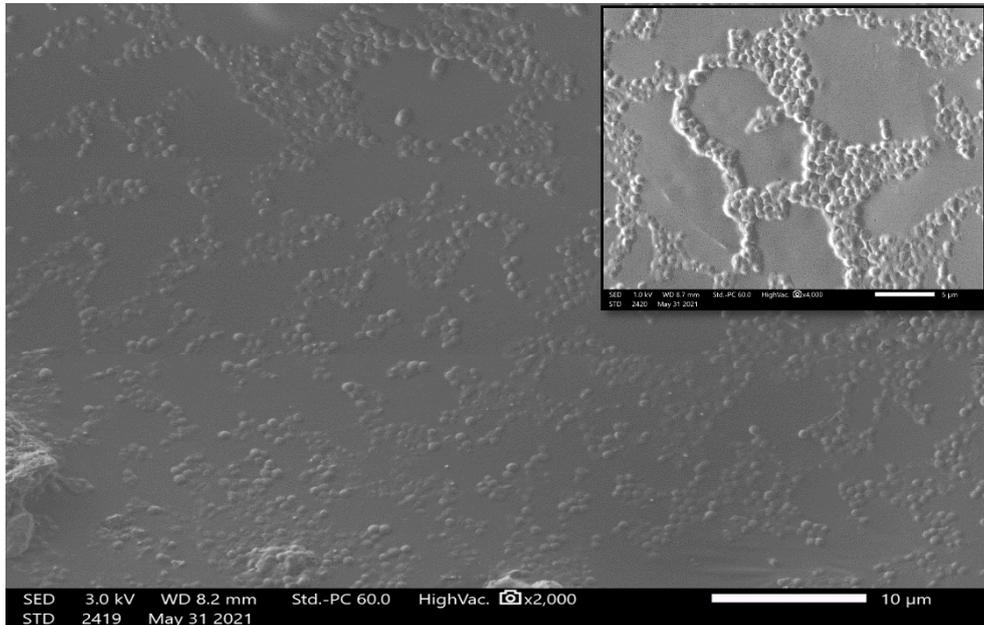


Figure 11: Image au MEB de cellules de staphylococcus aureus adhéree au matériau du plastique pendant 24 h (Gx2000 et 4000)

Les résultats de MEB ont également révélées des changements morphologiques pour *Pseudomonas aeruginosa* ; les cellules étaient allongées pour l’adhésion de 3h mais après 24 h elles sont devenues courtes. Il faut noter que l’adhésion altère le phénotype des bactéries (Wilson, 2001) ; à l’état sessile, les bactéries peuvent exprimer différents gènes, modifier leur morphologie, modifier leurs taux de croissance ou produire de grandes quantités de substances polymères extracellulaires (CH et al., 2006). Dans une étude menée par Prigent-combaret et al., (1999), la transcription de 38 % des gènes ont été altérées au sein des biofilms de *E. coli* (Prigent-combaret et al., (1999).

Les essais expérimentaux ont montré la capacité des deux souches à s’adhérer sur le matériau, ce qui est en contradiction avec la prédiction thermodynamique. Cela prouve que cette approche n’est pas suffisante pour expliquer le processus d’adhésion et que l’adhésion fait intervenir des mécanismes biologiques comme l’expression des andésines, des pili ; ses structures permettent de surmonter les répulsions électrostatiques.

L’adhésion bactérienne est un processus complexe et multifactoriel qui peut être influencée par divers facteurs et paramètres dont la dureté du matériau. En effet, Cai et al.,

(2019) a indiqué que la quantité de bactéries qui adhéraient aux plastiques était positivement corrélée avec la dureté de leur surface. Cela indique que les plastiques avec une faible dureté de surface (matériau mou) sont plus favorables à l'adhérence bactérienne par rapport aux plastiques avec une dureté de surface élevée (matériau dur).

(Pasmore et al., 2002) ont observé une augmentation linéaire de l'adhésion bactérienne lorsque la rugosité de la surface augmentait, de 0,1 à 3,4 μm . Ils ont suggéré que la rugosité fournit non seulement une surface accrue pour la fixation, mais également des zones à faible cisaillement.

La nature chimique du matériau peut également influencer l'adhésion bactérienne. En effet, la majorité des matériaux métalliques est notamment caractérisée par une forte énergie de surface associée à une charge de surface fortement négative. Ces dernières sont à l'origine de la création d'une barrière énergétique et de l'induction de forces de répulsion qui contribuent à défavoriser l'adhésion bactérienne. À l'inverse les matériaux organiques sont principalement caractérisés par une faible énergie de surface et une charge de surface négative plus faible (An et Friedman, 1998) qui tendent à favoriser l'adhésion bactérienne.

2. Analyse de la surface du matériau MP traité par microscope électronique à balayage

Le carvacrol et le thymol ont été sélectionnés pour réaliser le test d'anti-adhésion, vu qu'ils ont présenté une activité antibactérienne élevée par rapport aux autres composées testées contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

2.1. Analyse morphologique de cellules de *Staphylococcus aureus* adhérentes sur le matériau MP traité

D'après les résultats d'observation sur le microscope électronique à balayage, aucun effet de thymol et de carvacrol n'a été observé sur l'adhésion de *Staphylococcus aureus* au matériau de plastique. Plusieurs études ont été menées dans ce contexte, elles ont montré un fort potentiel de ces deux composées phénoliques dans l'inhibition d'adhésion ainsi de formation des biofilm de plusieurs bactéries. Walczak et al., (2021) ont signalé que le thymol a réduit la quantité de biofilm de *Staphylococcus aureus* de 52 à 75 % alors que le carvacrol a inhibé la formation de biofilms de *Staphylococcus aureus* avec des pourcentages variant de 86 à 100 % (Walczak et al., 2021). Le thymol était capable d'inhiber la formation de biofilm et éliminer

les biofilms matures de SARM en inhibant la production d'adhésive intracellulaire polysaccharidique (PIA) (Yuan et al., 2020).

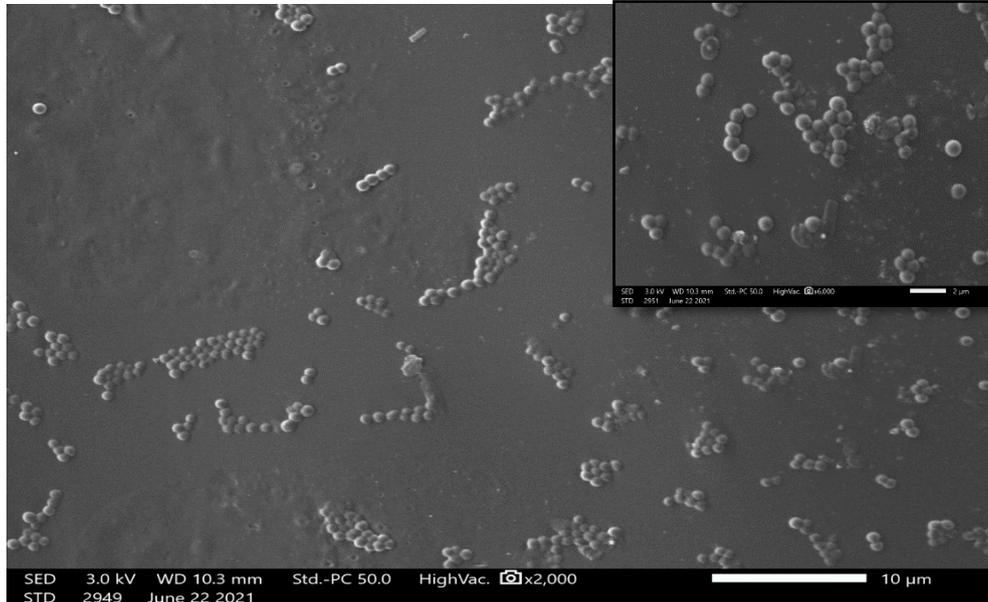


Figure 12 : Image au MEB de cellules de *S. aureus* adhérees après incubation de 3h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 6000)

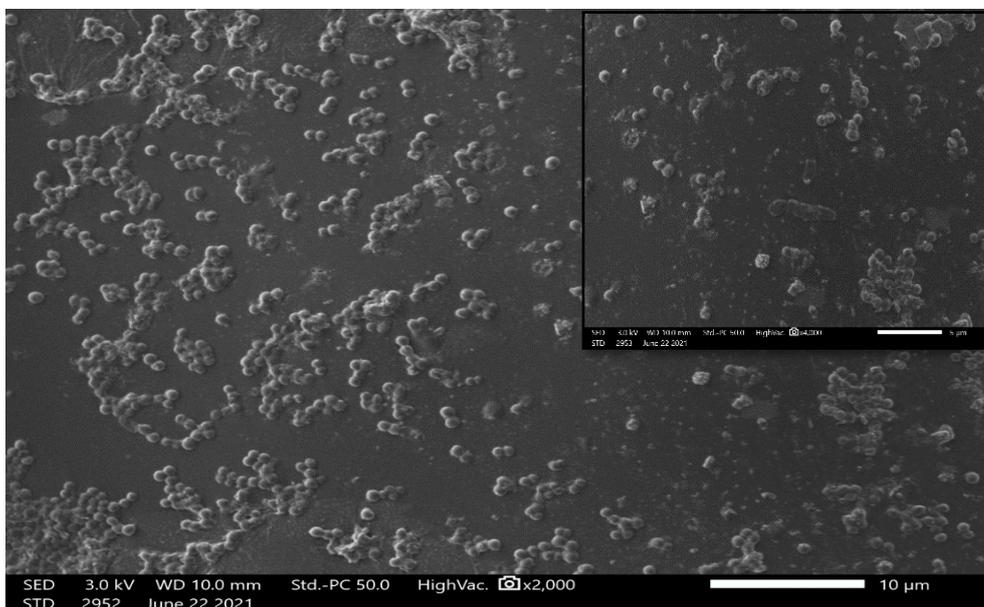


Figure 13 : Image au MEB de cellules de *S.aureus* adhérees après incubation de 5h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 4000)

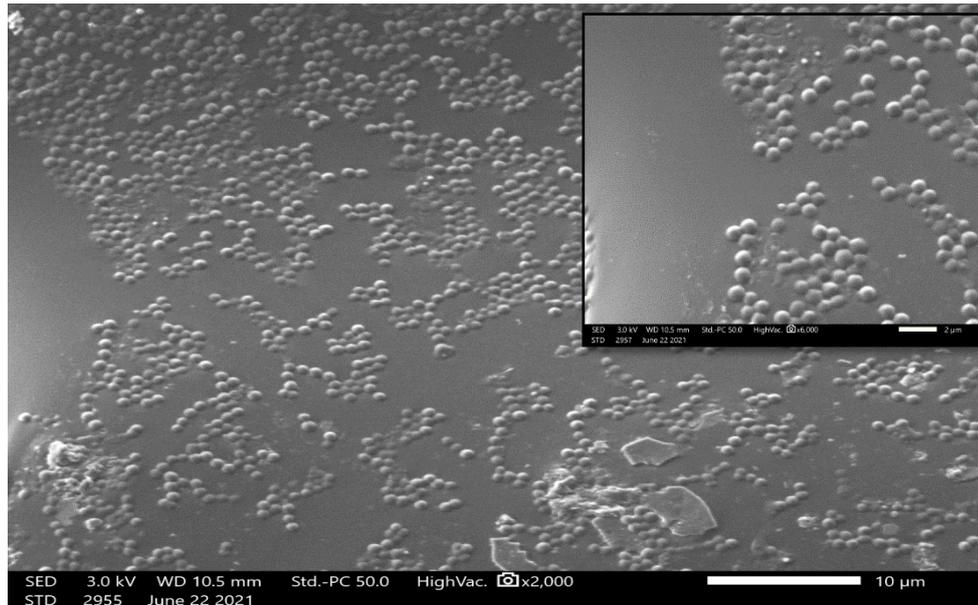


Figure 14 : Image au MEB de cellules de *S.aureus* adhérees après incubation de 10h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 6000)

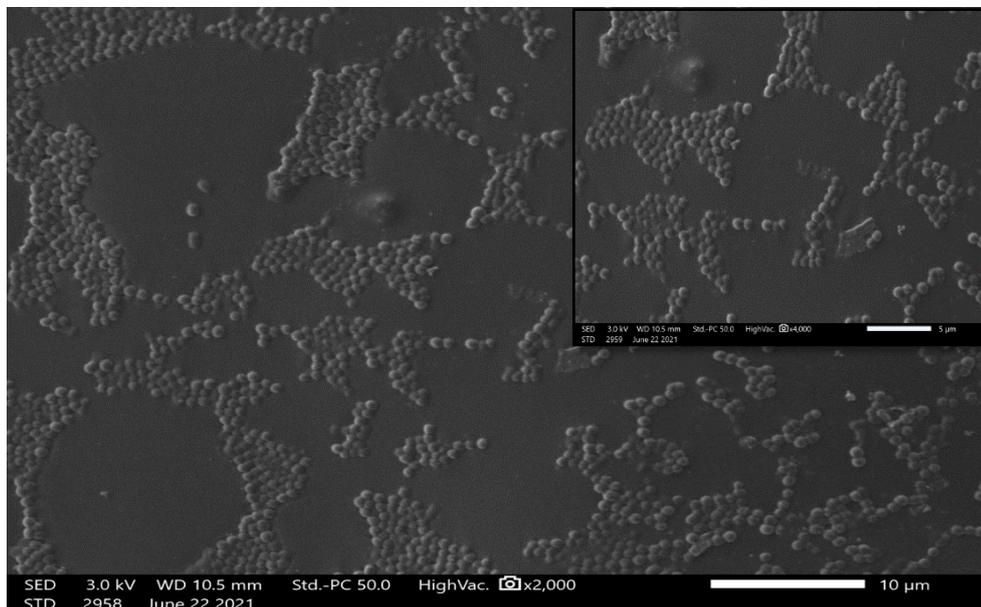


Figure 15 : Image au MEB de cellules de *S.aureus* adhérees après incubation de 24h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 4000)

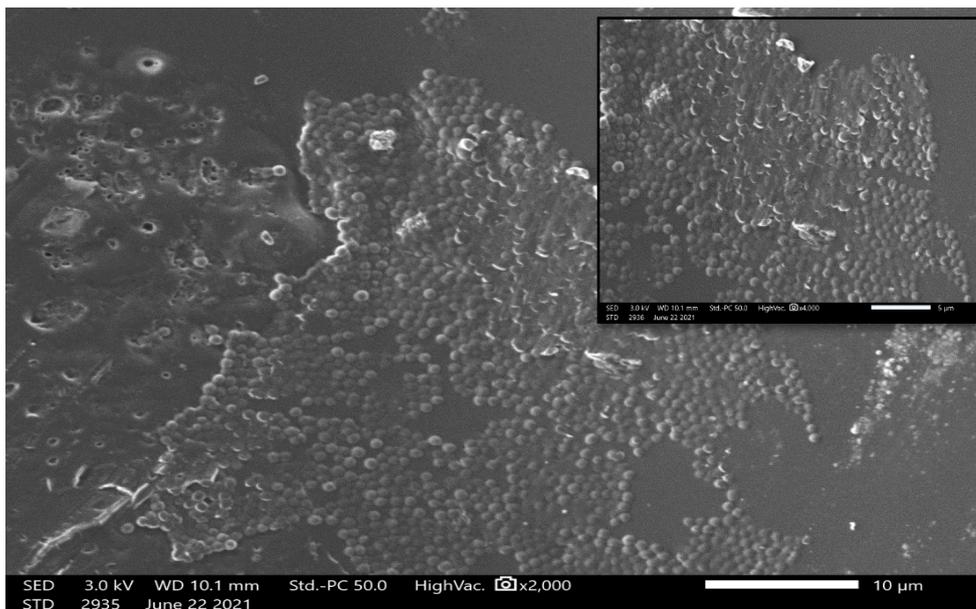


Figure 16 : Image au MEB de cellules de *S.aureus* adhérees après incubation de 3h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 4000)

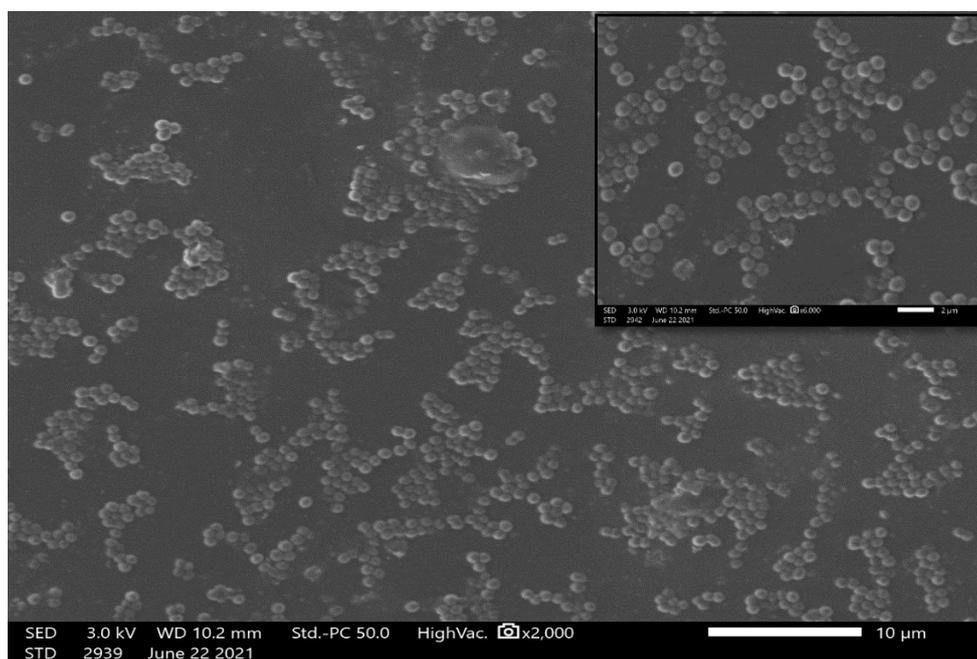


Figure 17 : Image au MEB de cellules de *S.aureus* adhérees après incubation de 5h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 6000)

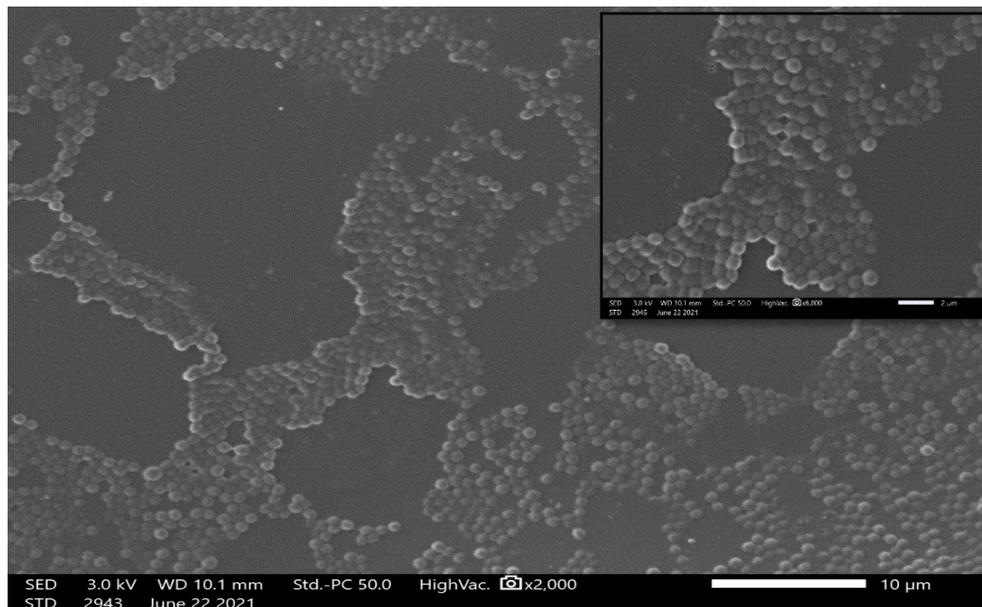


Figure 18 : Image au MEB de cellules de *S.aureus* adhérees après incubation de 10h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 5000)

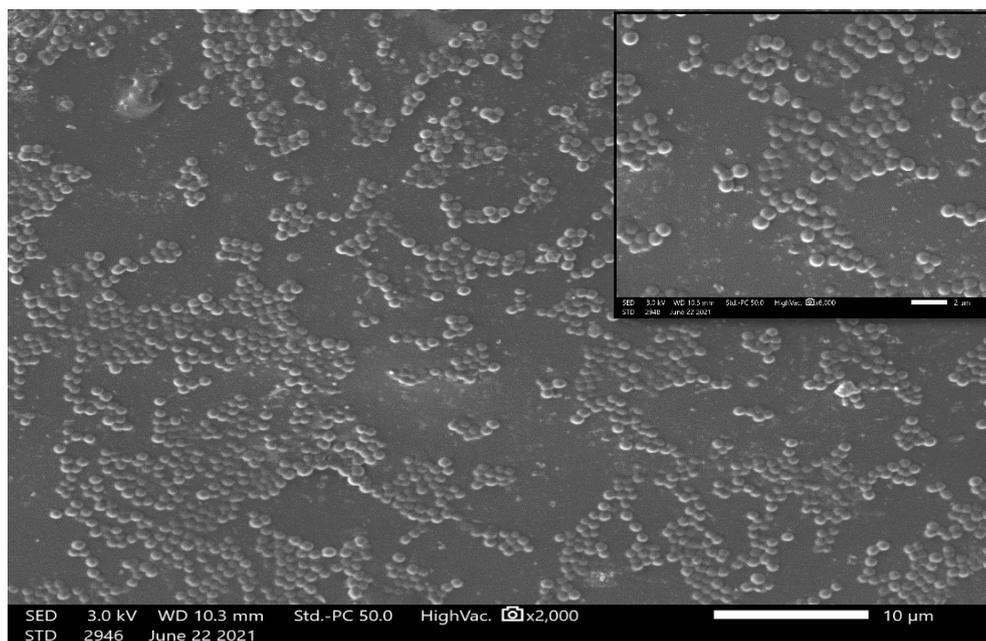


Figure 19 : Image au MEB de cellules de *S.aureus* adhérees après incubation de 24h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 6000)

2.2. Analyse morphologique de cellules de *Pseudomonas aeruginosa* adhérentes sur le matériau MP traité

Les observations au MEB des morceaux de plastique traités par le thymol et le carvacrol sont illustrées sur les figures 8, 9 et 10. Avec une concentration minimale inhibitrice du carvacrol de $7.8 \times 10^{-3} \%$, la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* est empêchée après 24 heures d'incubation. Cela est remarqué par l'absence totale des cellules bactériennes, sur la surface de plastique. Cependant, pour l'adhésion de 3,5 et 10 heures aucune inhibition n'a été remarquée. Walczak et al., (2021) ont signalé que le thymol a réduit la quantité de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'intervalle de 70 à 77 % et que le carvacrol a inhibé la formation de biofilms jusqu'à 74 à 88 %

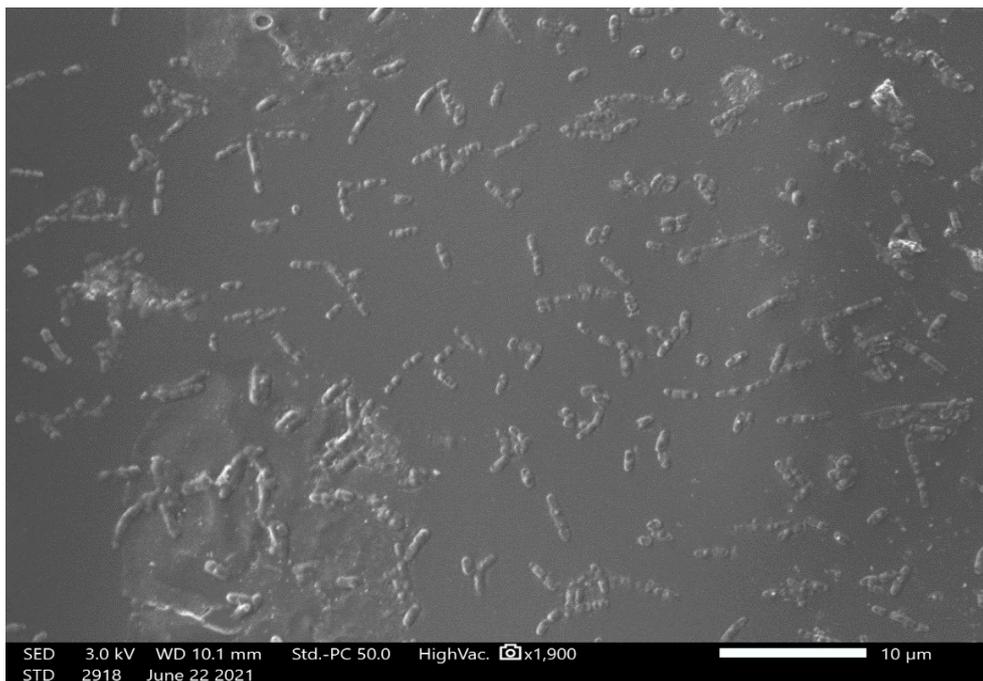


Figure 20: Image au MEB de cellules de *P.aeruginosa* adhérentes pendant 3h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 1900).

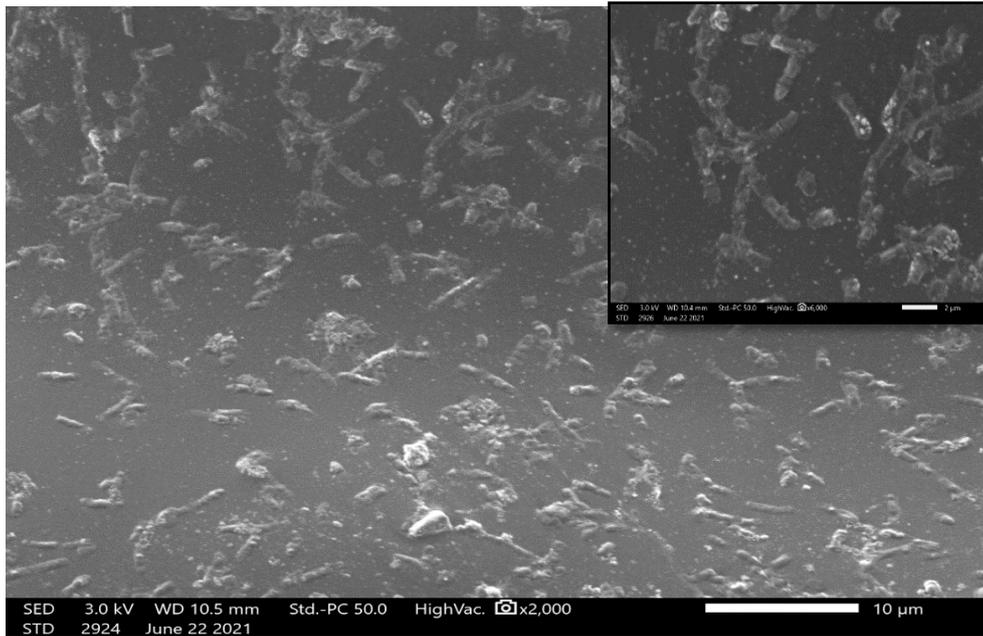


Figure 21: Image au MEB de cellules de *P.aeruginosa* adhérees pendant 5h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 6000)

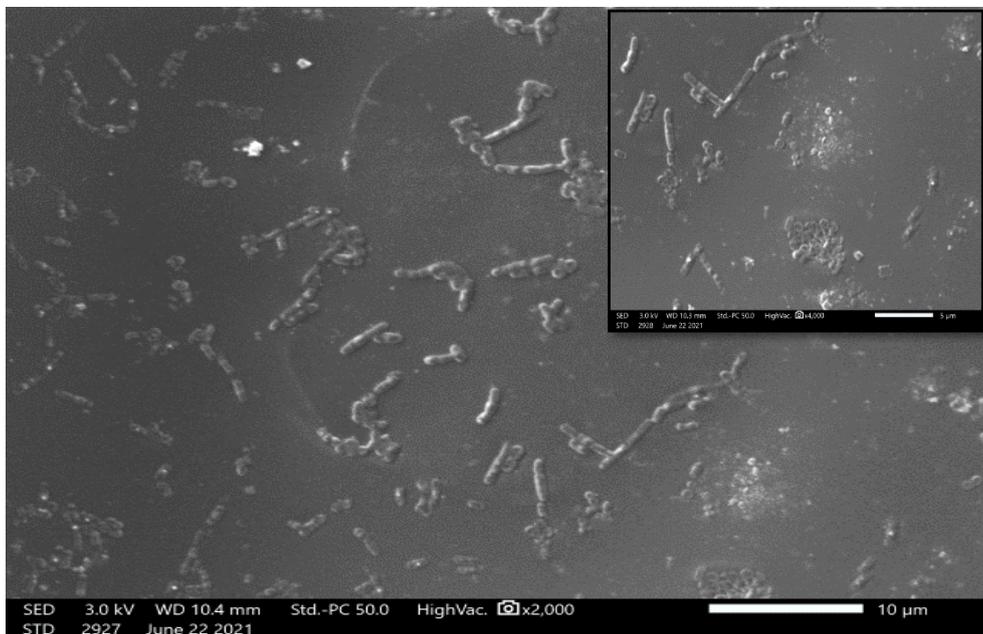


Figure 22: Image au MEB de cellules de *P.aeruginosa* adhérees pendant 10h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000et 4000)

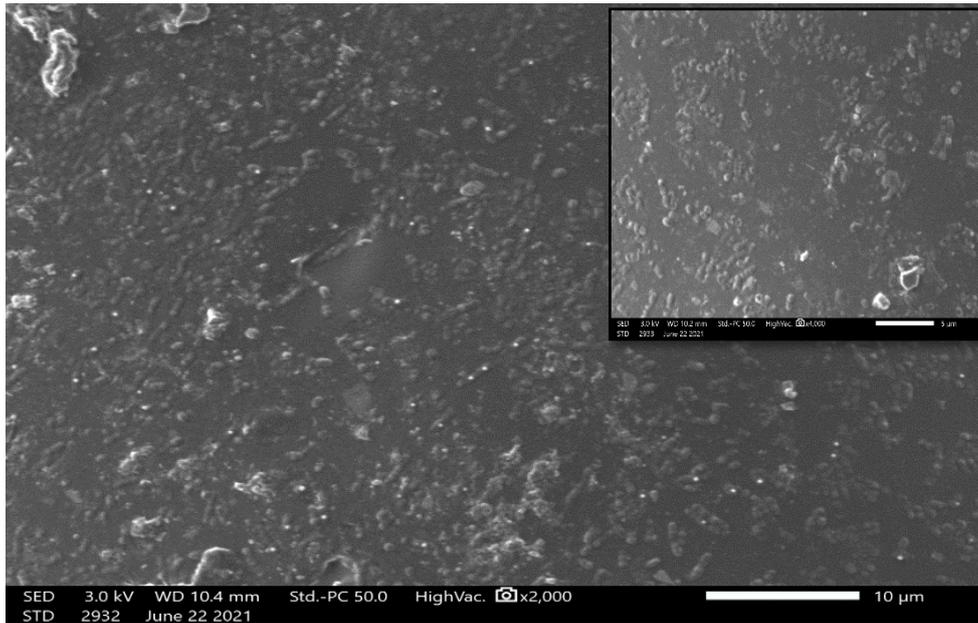


Figure 23: Image au MEB de cellules de *P.aeruginosa* adhérees pendant 24h au matériau du plastique traité au thymol (Gx 2000 et 4000)

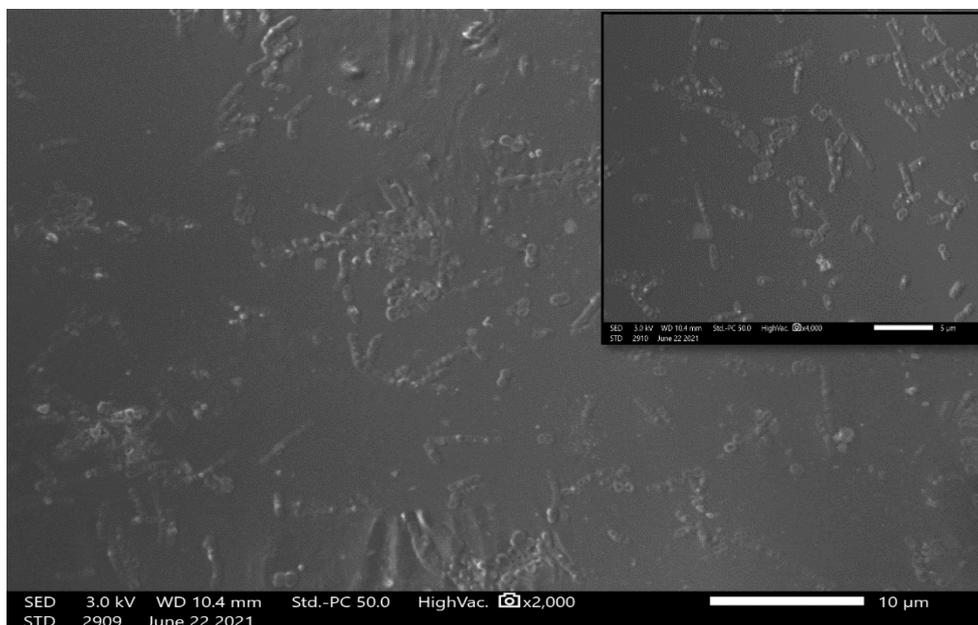


Figure 24: Image au MEB de cellules de *P.aeruginosa* adhérees pendant 3h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 4000)

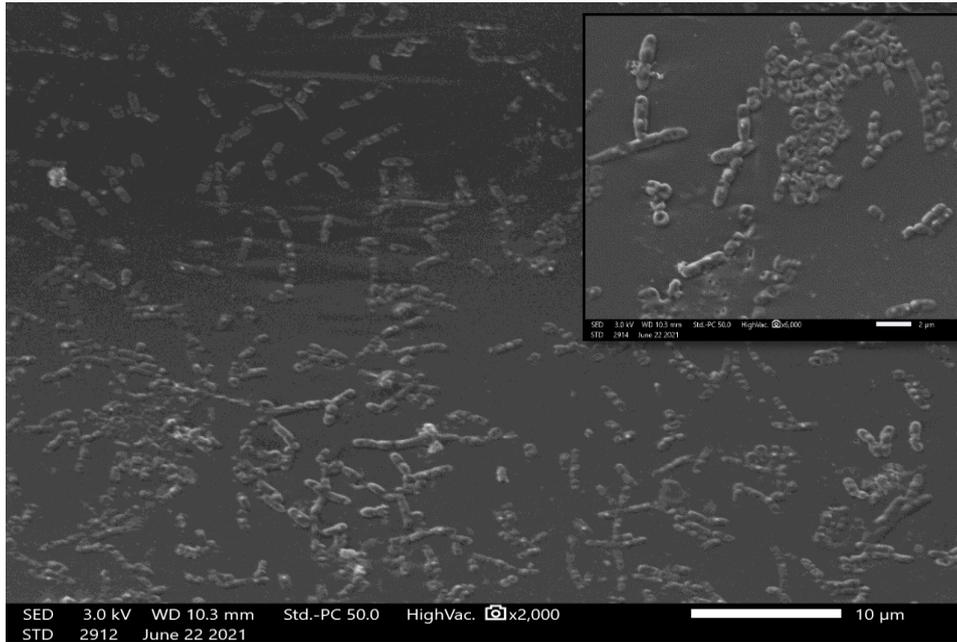


Figure 25: Image au MEB de cellules de *P.aeruginosa* adhérentes pendant 5 h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 4000)

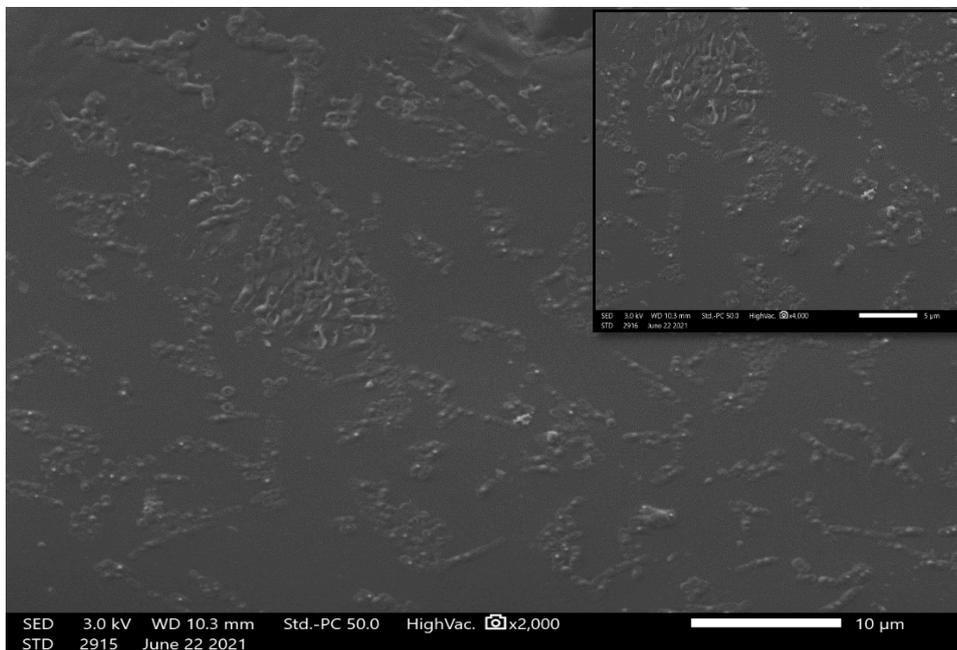


Figure 26 : Image au MEB de cellules de *P.aeruginosa* adhérentes pendant 10h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 4000)

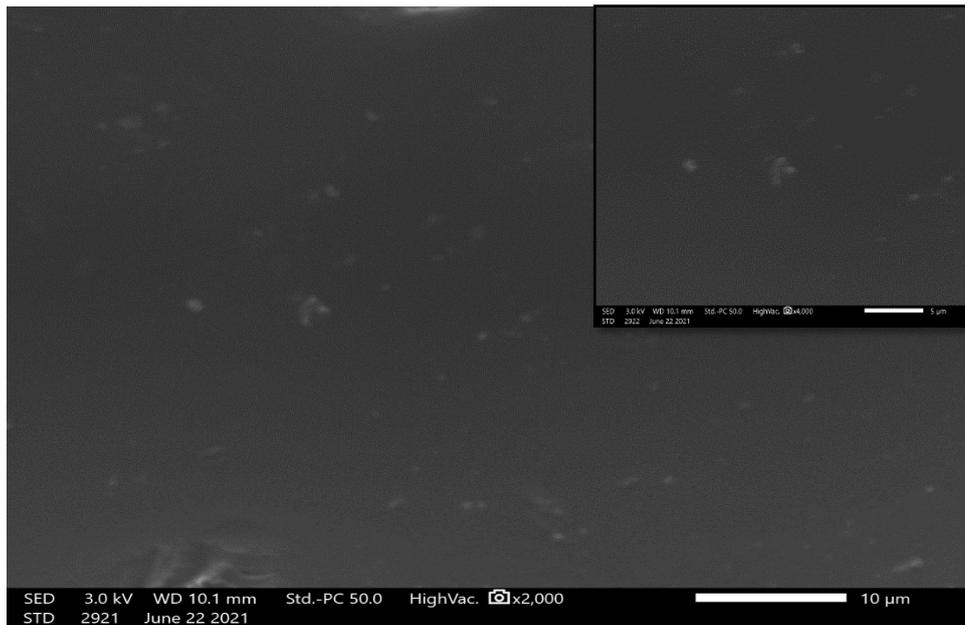


Figure 27 : Image au MEB de cellules de *P.aeruginosa* adhérees pendant 24 h au matériau du plastique traité au carvacrol (Gx 2000 et 4000)

Conclusion et perspectives

Dans le cadre de lutter contre le développement des biofilms liées aux infections nosocomiales, notre étude s'est focalisée sur l'emploi des molécules naturelles présentant un potentiel antibactérien pour agir au niveau de l'étape initial du processus de formation du biofilm à savoir l'étape de l'adhésion des bactéries aux surfaces abiotiques. Pour cela le matériau de plastique MP et les souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*) ont été caractérisées pour leurs propriétés de surface. La caractérisation physicochimique a révélé un caractère hydrophobe pour le matériau de plastique ($\theta_{\text{water}} = 76,2^\circ$; $G_{\text{wi}} = -23,37 \text{ mJ/m}^2$) et hydrophile pour *S.aureus* ($\theta_{\text{water}} = 9.8^\circ$; $G_{\text{wi}} = 29.60 \text{ mJ/m}^2$) et *P.aeruginosa* ($\theta_{\text{water}} = 0^\circ$; $G_{\text{wi}} = 30.25 \text{ mJ/m}^2$). L'observation au microscope électronique à balayage a montré que les deux souches sont capables d'y adhérer.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de 12 composés a été faite dans le but de cribler les composés présentant un pouvoir antibactérien élevé pour mener le test d'anti-adhésion. Cette évaluation a indiqué que le carvacrol et le thymol sont les composés les plus actifs. Les CMI du carvacrol pour *S.aureus* et *P.aeruginosa* était respectivement, $7.629 \times 10^{-6} \%$ et $7.8 \times 10^{-3} \%$. Le thymol a présenté une CMI de 0.039 mg/mL pour les deux bactéries testées.

La suite de ce travail a été consacrée pour évaluer le pouvoir antiadhésif des deux composés sélectionnés. Le traitement du matériau de plastique MP par ces deux composés a changé ses caractéristiques physicochimiques et a rendu le matériau hydrophile. Le thymol et le carvacrol n'ont manifesté aucun effet inhibiteur sur l'adhésion de *S.aureus*. Alors que le carvacrol (CMI= $7.8 \times 10^{-3} \%$) a inhibé l'adhésion de *P. aeruginosa* au matériau de MP.

La présente étude nous a démontré que la modification des propriétés des surfaces peut être considérée comme une option intéressante et prometteuse pour limiter la colonisation microbienne et surtout pour surmonter le problème des biofilms dans le domaine médical.

C'est dans ce sens que davantage de collaborations multidisciplinaires doivent être intensifiées et davantage de recherches doivent être menées pour concevoir des matériaux avec des propriétés antimicrobiennes et antiadhésives intrinsèques.

La continuité de ce travail consiste par exemple à :

- Faire une caractérisation du matériau plus approfondie en étudiant la rugosité, la charge, la composition chimique...

- Etudier l'effet combiné des composés sur l'adhésion bactérienne au matériau du plastique
- Etudier l'effet du carvacrol et du thymol sur d'autres matériaux présentant une application médicale

Références bibliographiques

Abed, S.E., Hamadi, F., Latrache, H., Iraqui, H., & Ibsouda, K.S. (2010). Adhesion of *Aspergillus niger* and *Penicillium expansum* spores on Fez cedar wood substrata. *Annals of Microbiology*, 60, 377-382.

Aggarwal, K.K., Khanuja, S., Ahmad, A., Kumar, T., Gupta, V.K., & Kumar, S. (2002). Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 59-63.

An, Y. H., & Friedman, R. J. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of biomedical materials research*, 43(3), 338–348. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199823\)43:3<338::aid-jbm16>3.0.co;2-b](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199823)43:3<338::aid-jbm16>3.0.co;2-b)

Baillif, S., Hartmann, D., Freney, J., & Kodjikian, L. (2010). Implant intraoculaire et adhésion bactérienne : influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. *Journal francais d'ophtalmologie*, 33(3), 210–221. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2010.01.016>

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Banerjee, K., Banerjee, S., Das, S., & Mandal, M. (2015). Probing the potential of apigenin liposomes in enhancing bacterial membrane perturbation and integrity loss. *Journal of colloid and interface science*, 453, 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.030>

Bayouhd, S., Othmane, A., Bettaieb, F., Bakhrouf, A., Ouada, H. Ben, & Ponsonnet, L. (2006). Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Materials Science and Engineering C*, 26(2–3), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.10.045>

Beech, I., Bergel, A., Mollica, A., Flemming, H. C., Scotto, V., & Sand, W. (2000). Simple methods for the investigation of the role of biofilms in corrosion, Brite Euram Thematic Network on MIC of Industrial Materials, Task Group1, Biofilm Fundamentals, Brite Euram Thematic Network No. ERB BRRT-CT98-5084. *Septembre*, 2000.

Blanco, M. T., Blanco, J., Sanchez-Benito, R., Pérez-Giraldo, C., Morán, F. J., Hurtado, C., & Gómez-García, A. C. (1997). Incubation temperatures affect adherence to plastic of *Candida albicans* by changing the cellular surface hydrophobicity. *Microbios*, 89(358), 23–28.

Boles, B. R., & Horswill, A. R. (2011). Staphylococcal biofilm disassembly. *Trends in microbiology*, 19(9), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.06.004>

Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 19(4), 256–265. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>

- Cai, L., Wu, D., Xia, J., Shi, H., & Kim, H. (2019). Influence of physicochemical surface properties on the adhesion of bacteria onto four types of plastics. *Science of The Total Environment*, 671, 1101-1107.
- Carel J. van Oss, M. dekker. (1995). Interracial Forces in Aqueous Media. *POWDER TECHNOLOGY*, 82, 209–210.
- Carolina, M., Vilela, N., Ferreira, G. Z., Sérgio, P., Pepe, N., & Rezende, M. De. (2015). Oral care and nosocomial pneumonia : a systematic review. *Einstein*, 13(2), 290–296. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RW2980>
- Chae, M. S., Schraft, H., Truelstrup Hansen, L., & Mackereth, R. (2006). Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food microbiology*, 23(3), 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.04.004>
- Chavan, R. R., Hosamani, K. M., Kulkarni, B. D., & Joshi, S. D. (2018). Molecular docking studies and facile synthesis of most potent biologically active N-tert-butyl-4-(4-substituted phenyl)-2-((substituted-2-oxo-2H-chromen-4-yl)methylthio)-6-oxo-1,6-dihydropyrimidine-5-carboxamide hybrids: An approach for microwave-assisted syntheses and biological evaluation. *Bioorganic chemistry*, 78, 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.03.007>
- Choi, S. Y., Habimana, O., Flood, P., Reynaud, E. G., Rodriguez, B. J., Zhang, N., Casey, E., & Gilchrist, M. D. (2016). Material- and feature-dependent effects on cell adhesion to micro injection moulded medical polymers. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 145, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.04.032>
- Choubey, S., Goyal, S., Varughese, L. R., Kumar, V., Sharma, A. K., & Beniwal, V. (2018). Probing Gallic Acid for Its Broad Spectrum Applications. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(15), 1283–1293. <https://doi.org/10.2174/1389557518666180330114010>
- Chung, K. T., Wong, T. Y., Wei, C. I., Huang, Y. W., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(6), 421–464. <https://doi.org/10.1080/10408699891274273>
- Clinical and Laboratory Standards Institut. (2018). M100 performance standards for antimicrobial Susceptibility Testing. In *Clinical and Laboratory Standards Institut*.
- Clutterbuck, A. L., Woods, E. J., Knottenbelt, D. C., Clegg, P. D., Cochrane, C. A., & Percival, S. L. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 121(1-2), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.12.029>
- Clutterbuck, A. L., Woods, E. J., Knottenbelt, D. C., Clegg, P. D., Cochrane, C. A., & Percival, S. L. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology*, 121(1-2), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.12.029>
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86–95. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>
- Cushnie, T. P., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 343–356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>

Dayan, G. H., Mohamed, N., Scully, I. L., Cooper, D., Begier, E., Eiden, J., Jansen, K. U., Gurtman, A., & Anderson, A. S. (2016). Staphylococcus aureus: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert review of vaccines*, 15(11), 1373–1392. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1179583>

Dia, N. M., Ka, R., Dieng, C., Diagne, R., Dia, M. L., Fortes, L., Diop, B. M., Sow, A. I., & Sow, P. S. (2008). Prevalence of nosocomial infections in a university hospital (Dakar , Senegal). *Médecine et Maladies Infectieuses*, 38(5), 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2007.11.001>

Dia, N. M., Ka, R., Dieng, C., Diagne, R., Dia, M. L., Fortes, L., Diop, B. M., Sow, A. I., & Sow, P. S. (2008). Prevalence of nosocomial infections in a university hospital (Dakar , Senegal). *Médecine et Maladies Infectieuses*, 38(5), 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2007.11.001>

Diniz-Silva, H. T., Cirino, I. C., Falcão-Silva, V., Magnani, M., de Souza, E. L., & Siqueira-Júnior, J. P. (2016). Tannic Acid as a Potential Modulator of Norfloxacin Resistance in Staphylococcus Aureus Overexpressing norA. *Chemotherapy*, 61(6), 319–322. <https://doi.org/10.1159/000443495>

Dunne W. M., Jr (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 155–166. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002>

Džamić, A. M., Nikolić, B. J., Giweli, A. A., Mitić-Ćulafić, D. S., Soković, M. D., Ristić, M. S., Knežević-Vukčević, J. B., & Marin, P. D. (2015). Libyan Thymus capitatus essential oil: antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and colon pathogen adhesion-inhibition properties. *Journal of applied microbiology*, 119(2), 389–399. <https://doi.org/10.1111/jam.12864>

El abed, S., Houari, A., Latrache, H., Remmal, A., & Koraichi, S. I. (2011). In vitro Activity of Four Common Essential Oil Components against Biofilm-producing Pseudomonas aeruginosa. *Research Journal of Microbiology*, 6(4), 394–401

El-Gammal, A. A., & Mansour, R. M. (1986). Antimicrobial activities of some flavonoid compounds. *Zentralblatt fur Mikrobiologie*, 141(7), 561–565. [https://doi.org/10.1016/s0232-4393\(86\)80010-5](https://doi.org/10.1016/s0232-4393(86)80010-5)

Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*, 38(6), 1015–1019. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>

ements for biological activity. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 54(3-4), 169–174. <https://doi.org/10.1515/znc-1999-3-405>

Erdem, S. A., Nabavi, S. F., Orhan, I. E., Daglia, M., Izadi, M., & Nabavi, S. M. (2015). Blessings in disguise: a review of phytochemical composition and antimicrobial activity of plants belonging to the genus Eryngium. *Daru : journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 23, 53. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0136-3>

Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C., Angioni, A., Dessì, S., Marzouki, N., & Cabras, P. (2007). Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3), 963-9.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

Fletcher, M., & Loeb, G. I. (1979). Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 37(1), 67–72. <https://doi.org/10.1128/aem.37.1.67-72.1979>

Fylaktakidou, K. C., Hadjipavlou-Litina, D. J., Litinas, K. E., & Nicolaidis, D. N. (2004). Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities. *Current pharmaceutical design*, 10(30), 3813–3833. <https://doi.org/10.2174/1381612043382710>

Garrett, T. R., M. Bhakoo, Z. Zhang. (2008). Adhérence bactérienne et biofilms sur les surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049-1056. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>

Gharbi, A., Legigan, T., Humblot, V., Papot, S., & Berjeaud, J. M. (2015). Surface functionalization by covalent immobilization of an innovative carvacrol derivative to avoid fungal biofilm formation. *AMB Express*, 5, 9. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0091-2>

Gibbons, S., Moser, E., & Kaatz, G. W. (2004). Catechin gallates inhibit multidrug resistance (MDR) in *Staphylococcus aureus*. *Planta medica*, 70(12), 1240–1242. <https://doi.org/10.1055/s-2004-835860>

Gopu, V., Meena, C. K., & Shetty, P. H. (2015). Quercetin Influences Quorum Sensing in Food Borne Bacteria: In-Vitro and In-Silico Evidence. *PloS one*, 10(8), e0134684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134684>

Gutiérrez-Barranquero, J. A., Reen, F. J., McCarthy, R. R., & O'Gara, F. (2015). Deciphering the role of coumarin as a novel quorum sensing inhibitor suppressing virulence phenotypes in bacterial pathogens. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(7), 3303–3316. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6436-1>

Guzmán-Soto, I., McTiernan, C., Gonzalez-Gomez, M., Ross, A., Gupta, K., Suuronen, E. J., Mah, T. F., Griffith, M., & Alarcon, E. I. (2021). Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in *in vitro* and *in vivo* biofilm models. *iScience*, 24(5), 102443. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102443>

Hamadi, F., Latrache, H., Asserne, F., Elabed, S., & Zahir, H. (2013). Quantitative Adhesion of *Staphylococcus aureus* on Stainless Steel Coated with Milk. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 299–304.

Hamadi, F., Latrache, H., Mabrouki, M., Elghmari, A., Outzourhit, A., Chtaini, A., Outzourhit, A., Ellouali, M., & Chtaini, A. (2012). Effect of pH on distribution and adhesion of *Staphylococcus aureus* to glass. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 19(1), 73–85. <https://doi.org/10.1163/1568561053066891>

Hassan, B., Moulay, S., Soumya, E., Hassan, E., Saïd, B., Ibnsouda, & Saad, K. (2015). The Effect of Carvacrol and Carvone Treatments on the Cedar Wood Surface Physico-chemical Properties. *International Journal of Scientific & Engineering*

Research, 6(6), 767–771.

Haznedaroglu, B. Z., Bolster, C. H., & Walker, S. L. (2008). The role of starvation on *Escherichia coli* adhesion and transport in saturated porous media. *Water research*, 42(6-7), 1547–1554. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.10.042>

Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., & Gohar, M. (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology (Reading, England)*, 156, 1009–1018. <https://doi.org/10.1099/mic.0.034827-0>

Hriouech, S., Akhmouch, A.A., Mzabi, A., Chefchaou, H., Tanghort, M., Oumokhtar, B., Chami, N., & Remmal, A. (2020). The Antistaphylococcal Activity of Amoxicillin/Clavulanic Acid, Gentamicin, and 1,8-Cineole Alone or in Combination and Their Efficacy through a Rabbit Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Osteomyelitis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2020.

Irie, Y., & Parsek, M. R. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Current topics in microbiology and immunology*, 322, 67–84. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_4

Jain, A., Gupta, Y., Agrawal, R., Khare, P., & Jain, S. K. (2007). Biofilms a microbial life perspective: a critical review. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 24(5), 393–443. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v24.i5.10>

Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 81(1), 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>

Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(18), 3042–3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>

Kaczmarek B. (2020). Tannic Acid with Antiviral and Antibacterial Activity as A Promising Component of Biomaterials-A Minireview. *Materials (Basel, Switzerland)*, 13(14), 3224. <https://doi.org/10.3390/ma13143224>

Kakupa, D. K., Muenze, P. K., Byl, B., & Wilmet, M. D. (2016). Etude de la prévalence des infections nosocomiales et des facteurs associés dans les deux hopitiaux universitaires de Lubumbashi, République Démocratique du Congo: cas des Cliniques Universitaires de Lubumbashi et l'Hôpital Janson Sendwe [Study of the prevalence of nosocomial infections and associated factors in the two university hospitals of Lubumbashi, Democratic Republic of Congo]. *The Pan African medical journal*, 24, 275. <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.24.275.7626>

Kayser, O., & Kolodziej, H. (1999). Antibacterial activity of simple coumarins: structural requirements for biological activity. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 54(3-4), 169–174. <https://doi.org/10.1515/znc-1999-3-405>

Kępa, M., Mikłasińska-Majdanik, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., Korzeniowski, K., Smoleń-Dzirba, J., & Wąsik, T. J. (2018). Antimicrobial Potential of Caffeic Acid against *Staphylococcus aureus* Clinical Strains. *BioMed research international*, 2018, 7413504. <https://doi.org/10.1155/2018/7413504>

Khan, H. A., Ahmad, A., & Mehboob, R. (2015). Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(7), 509–514.

<https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.001>

Khan, H. A., Baig, F. K., & Mehboob, R. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>

Khatoun, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F., & Alarcon, E. I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, 4(12), e01067. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01067>

Kirmusaoğlu S. (2019). Sensitizing of β -lactam resistance by tannic acid in methicillin-resistant *S. aureus*. *World journal of microbiology & biotechnology*, 35(4), 57. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2637-6>

Koubali, H., El, M., Zahir, H., Soufiani, S., & Mabrouki, M. (2021). Physicochemical characterization of glass and polyethylene surfaces treated with different surfactants and their effects on bacterial adhesion. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 104. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2020.102754>

Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and Thyme Essential Oil-New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(18), 4125. <https://doi.org/10.3390/molecules25184125>

Kubo, I., Muroi, H., & Kubo, A. (1993). Antibacterial Activity of long chain alcohols against *Streptococcus mutans*. 2447–2450.

Kuete V. (2010). Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta medica*, 76(14), 1479–1491. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250027>

Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x>

Latrache, H., El, G. A., Karroua, M., Hakkou, A., Ait, M. H., El, B. A., & Bourlioux, P. (2002). Relations between hydrophobicity tested by three methods and surface chemical composition of *Escherichia coli*. *The new microbiologica*, 25(1), 75–82.

Lee, J. H., Park, J. H., Cho, H. S., Joo, S. W., Cho, M. H., & Lee, J. (2013). Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*, 29(5), 491–499. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.788692>

Lekbach, Y., Li, Z., Xu, D., El Abed, S., Dong, Y., Liu, D., Gu, T., Koraichi, S. I., Yang, K., & Wang, F. (2019). *Salvia officinalis* extract mitigates the microbiologically influenced corrosion of 304L stainless steel by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 128, 193–203. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.04.006>

Lemon, K. P., Higgins, D. E., & Kolter, R. (2007). Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 189(12), 4418–4424. <https://doi.org/10.1128/JB.01967-06>

Li, Z. J., Liu, M., Dawuti, G., Dou, Q., Ma, Y., Liu, H. G., & Aibai, S. (2017). Antifungal Activity of Gallic Acid In Vitro and In Vivo. *Phytotherapy research : PTR*, 31(7), 1039–1045. <https://doi.org/10.1002/ptr.5823>

Lima, V. N., Oliveira-Tintino, C. D., Santos, E. S., Morais, L. P., Tintino, S. R., Freitas, T. S., Geraldo, Y. S., Pereira, R. L., Cruz, R. P., Menezes, I. R., & Coutinho, H. D. (2016). Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microbial pathogenesis*, 99, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.004>

Liu, R., Zhang, H., Yuan, M., Zhou, J., Tu, Q., Liu, J. J., & Wang, J. (2013). Synthesis and biological evaluation of apigenin derivatives as antibacterial and antiproliferative agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(9), 11496–11511. <https://doi.org/10.3390/molecules180911496>

Lopez-Romero, J. C., González-Ríos, H., Borges, A., & Simões, M. (2015). Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2015, 795435. <https://doi.org/10.1155/2015/795435>

Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A. P., & Domingues, F. (2014). Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling*, 30(1), 69–79. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.845878>

Maataoui, H., Barkai, H., & Sadiki, M. (2014). Physicochemical characterization of actinomycetes isolated from decayed cedar wood : contact angle measurement. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 28(20), 2046–2053. <https://doi.org/10.1080/01694243.2014.943341>

Maataoui, H., Barkai, H., & Sadiki, M. (2014). Physicochemical characterization of actinomycetes isolated from decayed cedar wood : contact angle measurement. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 28(20), 2046–2053. <https://doi.org/10.1080/01694243.2014.943341>

Manandhar, S., Luitel, S., & Dahal, R.K. (2019). In Vitro Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Tropical Medicine*, 2019.

Mandal, S. M., Dias, R. O., & Franco, O. L. (2017). Phenolic Compounds in Antimicrobial Therapy. *Journal of medicinal food*, 20(10), 1031–1038. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0017>

Marković, T., Paschalina, C., Jovana, Š., M., N., Jasmina, G., Ana, Ć., & Marina, S. (2011). Chemical Analysis and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of *Satureja thymbra* L. and *Thymbra spicata* L. and their main components. *Archives of Biological Sciences*, 63(2), 457–464. <https://doi.org/10.2298/ABS1102457M>

Mattei, M. R., Frunzo, L., D'Acunto, B., Pechaud, Y., Pirozzi, F., & Esposito, G. (2018). Continuum and discrete approach in modeling biofilm development and structure: a

review. *Journal of mathematical biology*, 76(4), 945–1003. <https://doi.org/10.1007/s00285-017-1165-y>

Merghni, A., Noumi, E., Hadded, O., Dridi, N., Panwar, H., Ceylan, O., Mastouri, M., & Snoussi, M. (2018). Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of Eucalyptus globulus essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. *Microbial pathogenesis*, 118, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.006>

Miladi, H., Zmantar, T., Chaabouni, Y., Fedhila, K., Bakhrouf, A., Mahdouani, K., & Chaieb, K. (2016). Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. *Microbial pathogenesis*, 99, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.008>

Mion, S., Rémy, B., Plener, L., Chabrière, E., & Daudé, D. (2018). Empêcher les bactéries de communiquer : diviser pour mieux soigner. *Annales pharmaceutiques francaises*, 76(4), 249–264. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2018.02.004>

Moore, N. M., & Flaws, M. L. (2011). Epidemiology and pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa infections. *Clinical laboratory science : journal of the American Society for Medical Technology*, 24(1), 43–46.

Morcia, C., Malnati, M., & Terzi, V. (2012). In vitro antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxigenic plant pathogens. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 29(3), 415–422. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.643458>

Moriarty, T. F., Grainger, D. W., & Richards, R. G. (2014). Challenges in linking preclinical anti-microbial research strategies with clinical outcomes for device-associated infections. *European cells & materials*, 28, 112–128. <https://doi.org/10.22203/ecm.v028a09>

Mun, S. H., Kang, O. H., Joung, D. K., Kim, S. B., Choi, J. G., Shin, D. W., & Kwon, D. Y. (2014). In vitro anti-MRSA activity of carvone with gentamicin. *Experimental and therapeutic medicine*, 7(4), 891–896. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1498>

Nagarjuna, D., Mittal, G., Dhanda, R. S., Verma, P. K., Gaiind, R., & Yadav, M. (2015). Faecal Escherichia coli isolates show potential to cause endogenous infection in patients admitted to the ICU in a tertiary care hospital. *New microbes and new infections*, 7, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.05.006>

Nayaka, H. B., Londonkar, R. L., Umesh, M. K., & Tukappa, A. (2014). Antibacterial Attributes of Apigenin, Isolated from Portulaca oleracea L. *International journal of bacteriology*, 2014, 175851. <https://doi.org/10.1155/2014/175851>

Nostro, A., Scaffaro, R., D'Arrigo, M., Botta, L., Filocamo, A., Marino, A., & Bisignano, G. (2012). Study on carvacrol and cinnamaldehyde polymeric films: mechanical properties, release kinetics and antibacterial and antibiofilm activities. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(4), 1029–1038. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4091-3>

Oss, C.J. (1995). Hydrophobicity of biosurfaces — Origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 5, 91–110.

- Oss, C.J., & Giese, R.F. (1995). The Hydrophilicity and Hydrophobicity of Clay Minerals. *Clays and Clay Minerals*, 43, 474-477.
- Pasmore, M., Todd, P., Pfiefer, B., Rhodes, M., & Bowman, C. (2002). Effect of Polymer Surface Properties on the Reversibility of Attachment of *Pseudomonas aeruginosa* in the Early Stages of Biofilm Development. *Biofouling*, 18, 65 - 71.
- Percival, S. L., Malic, S., Cruz, H., & Williams, D. W. (2011). *Introduction to Biofilms Introduction to Biofilms*. May 2014. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-21289-5>
- Perumal, S., Mahmud, R., & Ismail, S. (2017). Mechanism of Action of Isolated Caffeic Acid and Epicatechin 3-gallate from *Euphorbia hirta* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacognosy magazine*, 13(Suppl 2), S311–S315. https://doi.org/10.4103/pm.pm_309_15
- Pesavento, G., Calonico, C., Bilia, A. R., Barnabei, M., Calesini, F., Addona, R., Mencarelli, L., Carmagnini, L., Martino, M. C. Di, & Nostro, A. Lo. (2015). Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54, 188–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.045>
- Pinho, E., Ferreira, I. C., Barros, L., Carvalho, A. M., Soares, G., & Henriques, M. (2014). Antibacterial potential of northeastern Portugal wild plant extracts and respective phenolic compounds. *BioMed research international*, 2014, 814590. <https://doi.org/10.1155/2014/814590>
- Ploux, L., Ponche, A., Anselme, K. (2010). Bacteria/ Material Interfaces: Role of the Material and Cell Wall Properties. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 13-14 (24), 2165-2201. <http://dx.doi.org/10.1163/016942410X511079>
- Porfírio, E. M., Melo, H. M., Pereira, A., Cavalcante, T., Gomes, G. A., de Carvalho, M. G., Costa, R. A., & Júnior, F. (2017). In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of *Lippia alba* Essential Oil, Citral, and Carvone against *Staphylococcus aureus*. *TheScientificWorldJournal*, 2017, 4962707. <https://doi.org/10.1155/2017/4962707>
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., & Lejeune, P. (1999). Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 181(19), 5993–6002. <https://doi.org/10.1128/JB.181.19.5993-6002.1999>
- Qin, H., Zhang, Z., Ravindar, L., & Rakesh, K.P. (2020). Antibacterial activities with the structure-activity relationship of coumarin derivatives. *European journal of medicinal chemistry*, 207, 112832 .
- Rao, H., Choo, S., Rajeswari Mahalingam, S. R., Adisuri, D. S., Madhavan, P., Md Akim, A., & Chong, P. P. (2021). Approaches for Mitigating Microbial Biofilm-Related Drug Resistance: A Focus on Micro- and Nanotechnologies. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(7), 1870. <https://doi.org/10.3390/molecules26071870>
- Rijnaarts, H., Norde, W., Lyklema, J., & Zehnder, A. (1999). DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 14, 179-195.
- Rijnaarts, H., Norde, W., Lyklema, J., & Zehnder, A. (1999). DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids and*

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522–554. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>

Rupp, F., Gittens, R. A., Scheideler, L., Marmur, A., Boyan, B. D., Schwartz, Z., & Geis-Gerstorfer, J. (2014). A review on the wettability of dental implant surfaces I: theoretical and experimental aspects. *Acta biomaterialia*, 10(7), 2894–2906. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.040>

Sakkas, H., & Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(3), 429–438. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>

Schürmann, M., Oppel, F., Gottschalk, M., Büker, B., Jantos, C. A., Knabbe, C., Hütten, A., Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., & Sudhoff, H. (2019). The Therapeutic Effect of 1,8-Cineol on Pathogenic Bacteria Species Present in Chronic Rhinosinusitis. *Frontiers in microbiology*, 10, 2325. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02325>

Sharma, A., Gautam, S. P., & Gupta, A. K. (2011). Surface modified dendrimers: synthesis and characterization for cancer targeted drug delivery. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(11), 3341–3346. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.04.046>

Siddiqui, M., Rzechowicz, M., Oh, H., Saeidi, N., Hui, L., Winters, H., Fane, A., & Chong, T.H. (2015). The efficacy of tannic acid in controlling biofouling by *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on nutrient conditions and bacterial density. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 74-82.

Silveira, Z., Macêdo, N. S., Sampaio Dos Santos, J. F., Sampaio de Freitas, T., Rodrigues Dos Santos Barbosa, C., Júnior, D., Muniz, D. F., Castro de Oliveira, L. C., Júnior, J., Cunha, F., Melo Coutinho, H. D., Balbino, V. Q., & Martins, N. (2020). Evaluation of the Antibacterial Activity and Efflux Pump Reversal of Thymol and Carvacrol against *Staphylococcus aureus* and Their Toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(9), 2103. <https://doi.org/10.3390/molecules25092103>

Simões, M., Bennett, R. N., & Rosa, E. A. (2009). Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural product reports*, 26(6), 746–757. <https://doi.org/10.1039/b821648g>

Şimşek, M., & Duman, R. (2017). Investigation of Effect of 1,8-cineole on Antimicrobial Activity of Chlorhexidine Gluconate. *Pharmacognosy research*, 9(3), 234–237. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.210329>

Singh, A., Dutta, P., Kumar, H., Kureel, A.K., & Rai, A. (2019). Improved antibacterial and antioxidant activities of gallic acid grafted chitin-glucan complex. *Journal of Polymer Research*, 26.

Souza, S. M., Delle Monache, F., & Smânia, A., Jr (2005). Antibacterial activity of coumarins. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 60(9-10), 693–700. <https://doi.org/10.1515/znc-2005-9-1006>

Stapleton, P. D., & Taylor, P. W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science progress*, 85(Pt 1), 57–72.
<https://doi.org/10.3184/003685002783238870>

Stapleton, P. D., Gettert, J., & Taylor, P. W. (2006). Epicatechin gallate, a component of green tea, reduces halotolerance in *Staphylococcus aureus*. *International journal of food microbiology*, 111(3), 276–279. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.005>

Stead, D. (1993). The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 75, 135–141.

Stevens, C. S., Rosado, H., Harvey, R. J., & Taylor, P. W. (2015). Epicatechin gallate, a naturally occurring polyphenol, alters the course of infection with β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in the zebrafish embryo. *Frontiers in microbiology*, 6, 1043.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01043>

Su, Y., Ma, L., Wen, Y., Wang, H., & Zhang, S. (2014). Studies of the in vitro antibacterial activities of several polyphenols against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(8), 12630–12639.
<https://doi.org/10.3390/molecules190812630>

Sutherland I. W. (2001). The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, 9(5), 222–227. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02012-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02012-1)

Taylor P. W. (2013). Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. *International journal of antimicrobial agents*, 42(3), 195–201.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.05.004>

Teughels, W., Van Assche, N., Slipen, I., & Quirynen, M. (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical oral implants research*, 17 Suppl 2, 68–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>

Thiolet, J., Lacavé, L., Jarno, P., Metzger, M., Tronel, H., Gautier, C., Hériveau, F. L., Coignard, B. (2007). Prévalence des infections nosocomiales, France, 2006. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 429–432

Tintino, S. R., Oliveira-Tintino, C. D., Campina, F. F., Silva, R. L., Costa, M., Menezes, I. R., Calixto-Júnior, J. T., Siqueira-Junior, J. P., Coutinho, H. D., Leal-Balbino, T. C., & Balbino, V. Q. (2016). Evaluation of the tannic acid inhibitory effect against the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. *Microbial pathogenesis*, 97, 9–13.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.003>

Tong, S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G., Jr (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603–661.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>

Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 78(2), 110–116.

Van Oss, C. J., Chaudhury, M. K., & Good, R. J. (1988). Interfacial Lifshitz-van

- der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews*, 88(6), 927–941. <https://doi.org/10.1021/cr00088a006>
- Vuuren, S., & Viljoen, A. (2007). Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 540-544.
- Walczak, M., Michalska-Sionkowska, M., Olkiewicz, D., Tarnawska, P., & Warzyńska, O. (2021). Potential of Carvacrol and Thymol in Reducing Biofilm Formation on Technical Surfaces. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(9), 2723. <https://doi.org/10.3390/molecules26092723>
- Wang, M., & Tang, T. (2018). Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning. *Journal of orthopaedic translation*, 17, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.09.001>
- Wang, M., & Tang, T. (2018). Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning. *Journal of orthopaedic translation*, 17, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.09.001>
- Wang, S., Yao, J., Zhou, B., Yang, J., Chaudry, M. T., Wang, M., Xiao, F., Li, Y., & Yin, W. (2018). Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative In Vivo and Its Antibacterial Mechanism In Vitro. *Journal of food protection*, 81(1), 68–78. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-214>
- WHO. (2009). *on Hand Hygiene in Health Care First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care.*
- Wilson M. (2001). Bacterial biofilms and human disease. *Science progress*, 84, 235–254. <https://doi.org/10.3184/003685001783238998>
- Wilson-Nieuwenhuis, J., Dempsey-Hibbert, N., Liauw, C. M., & Whitehead, K. A. (2017). Surface modification of platelet concentrate bags to reduce biofilm formation and transfusion sepsis. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 160, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.09.019>
- Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., & Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International journal of oral science*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65>
- Yang, J., Mu, W., Cao, Y., & Liu, G. (2020). Synthesis and biological evaluation of β -ionone oriented proapoptosis agents by enhancing the ROS generation. *Bioorganic chemistry*, 104, 104273.
- Yuan, Z., Dai, Y., Ouyang, P., Rehman, T., Hussain, S., Zhang, T., Yin, Z., Fu, H., Lin, J., He, C., Lv, C., Liang, X., Shu, G., Song, X., Li, L., Zou, Y., & Yin, L. (2020). Thymol Inhibits Biofilm Formation, Eliminates Pre-Existing Biofilms, and Enhances Clearance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a Mouse Peritoneal Implant Infection Model. *Microorganisms*, 8(1), 99. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010099>
- Zalegh, I., Akssira, M., Bourhia, M., Mellouki, F., Rhallabi, N., Salamatullah, A. M., Alkaltham, M. S., Khalil Alyahya, H., & Mhand, R. A. (2021). A Review on *Cistus* sp.: Phytochemical and Antimicrobial Activities. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(6), 1214. <https://doi.org/10.3390/plants10061214>
- Zeraik, A. E., & Nitschke, M. (2012). Influence of Growth Media and Temperature on

Bacterial Adhesion to Polystyrene Surfaces. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(4), 569–576. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000400012>

Zhang, Z. Y., Sun, Y., Zheng, Y. D., He, W., Yang, Y. Y., Xie, Y. J., Feng, Z. X., & Qiao, K. (2020). A biocompatible bacterial cellulose/tannic acid composite with antibacterial and anti-biofilm activities for biomedical applications. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 106, 110249. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110249>

Znini, M., Bouklah, M., Majidi, L., Kharchouf, S., Aouniti, A., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Costa, J., & Al-Deyab, S. (2011). Chemical Composition and Inhibitory Effect of Mentha Spicata Essential Oil on the Corrosion of Steel in Molar Hydrochloric Acid. *International Journal of Electrochemical Science*, 691-704.