

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

T H E S E

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2017 par

Mr DUPIN Alban

Né le 18/02/1994

à Feurs (42)

INTERETS DES HUILES ESSENTIELLES DANS LA LUTTE
CONTRE L'ANTIBIO-RESISTANCE INDUITE PAR LES
BIOFILMS

JURY

Mme DIJOUX-FRANCA Marie-Geneviève, Professeur

Mr Montreuil Laurent, Docteur en Pharmacie

Mr Michalet Serge, Maître de Conférences

Mme DOLEANS-JORDHEIM Anne, Maître de Conférences

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

• Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
• Présidence du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
• Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
• Vice-Président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLEE
• Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALIER

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTE

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : M. Gilles RODE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directrice : Mme Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directeur : M. Denis BOURGEOIS
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directrice : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Polytech Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE
Observatoire des Sciences de l'Univers	Directrice : Mme Isabelle DANIEL

**UNIVERSITE CLAUDE
BERNARD LYON 1
ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon**

**LISTE DES DEPARTEMENTS
PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET
PHARMACIE GALENIQUE**

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Madame Anne DENUZIERE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)
Monsieur Wael ZEINYEYEH (MCU)

- **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Madame Giovanna LOLLO (MCU)
Madame Jacqueline RESENDE DE AZEVEDO (MCU)
Monsieur Damien SALMON (MCU-PH)

- **BIOPHYSIQUE**

Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU-PH-HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ECONOMIE DE LA SANTE**
 Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
 Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
 Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)
- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**
 Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)
- **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**
 Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)
- **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**
 Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
 Madame Claire GAILLARD (MCU)
- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
 Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)
 Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)
 Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
 Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)
- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
 Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH-HDR)
 Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
 Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
 Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
 Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
 Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
 Madame Christelle MARMINON (MCU)
 Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
 Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THERAPEUTIQUE**
 Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
 Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)
 Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
 Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
 Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
 Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
 Madame Isabelle KERZAON (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)

Madame Florence RANCHON (MCU-PH)

Monsieur Teddy NOVAIS (AHU)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)

Madame Léa PAYEN (PU-PH)

Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH-HDR)

- **PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)

Madame Kiao Ling LIU (MCU)

Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

- **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Michel TOD (PU – PH)

Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)

Monsieur Roger BESANCON (MCU)

Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)

Madame Evelyne CHANUT (MCU)

Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)

Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

- **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**

Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)

Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)

Monsieur Sébastien VIEL (MCU-PH)
Madame Morgane GOSSEZ (AHU)

- **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Madame Sarah HUET (AHU)
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)

- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIE INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

- **BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEMBault (MCU)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Marie-Françoise KLUCKER (MCU-PAST)
Madame Valérie VOIRON (MCU-PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques (AHU)**
Monsieur Alexandre JANIN
- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**
Madame Camille ROZIER

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

Remerciements :

Aux membres de mon jury :

A ma présidente de thèse, Mme Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA, professeur au laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Lyon, pour avoir aimablement accepté de présider ma thèse. Je vous suis sincèrement reconnaissant de l'honneur que vous m'accordez.

A mon directeur de thèse, Mr Laurent MONTREUIL, pharmacien, pour avoir accepté de diriger ma thèse. Soyez assuré de ma pleine reconnaissance pour votre bienveillance, vos conseils, la facilité d'échanges ainsi que le temps que vous m'avez accordé qui, je sais, vous est pourtant très précieux.

A mon tuteur pédagogique, Mr Serge MICHALET, maître de conférences, pour l'intérêt que vous avez porté à l'encadrement de mon travail de thèse. Par votre expérience ainsi que votre rigueur incontestable, vous m'avez prodigué de précieux conseils tout au long de mon projet. Merci encore pour votre soutien, pour la pertinence de vos réflexions ainsi que pour votre disponibilité sans faille.

A Mme Anne DOLEANS-JORDHEIM, maître de conférences, pour avoir eu la gentillesse d'accepter de faire partie de mon jury. Soyez assurée de l'honneur que vous me faites.

A tous les membres de mon entourage :

A mes parents. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté depuis mon enfance, pour votre aide, pour votre soutien, pour vos efforts... Tout ce qui se passe aujourd'hui c'est grâce à vous. Merci maman d'avoir eu la gentillesse de relire ma thèse, merci papa également, même si tu n'as rien fait directement, je sais que le cœur y était.

A mon papi. Merci pour ta présence et pour ton soutien. Je sais que tu es toujours fier de tes petits-enfants, sache que nous, nous sommes fiers de notre grand-père, du haut de tes 92 ans, ta cuisine (certes pas très diététique), tes 40 kilomètres quotidiens à vélo, ta santé, tu es un exemple pour nous tous.

A mes frères Bastien et Emilien. Même si nous nous bagarrions tout le temps petits et que nous nous voyons actuellement peu, plus le temps passe, plus j'ai la sensation que rien n'est plus précieux qu'un frère.

A Marion ma chérie. Merci pour ton soutien permanent et pour avoir relu mon intro et ma conclusion. Que dire d'autre... ah si j'oubliais ! L'amour rend tellement aveugle que je ne me

rends même plus compte de la chance que j'ai, alors merci pour toutes ces années de bonheur en ta compagnie, que le temps passe vite, déjà 4 ans partagés à tes côtés ! J'ai hâte de réaliser tous les projets que nous nous sommes fixés, et bien d'autres encore, je t'aime.

A ma belle-famille. Merci à pour votre présence chaleureuse aujourd'hui, cela me fait énormément plaisir. Merci à vous ainsi qu'à ceux qui n'ont pu se déplacer pour les moments de bonheur partagés ensemble à Disney, Marly, Méribel-Mottaret, Morancé et Villeurbanne.

Aux copains de la musique, Alain, Christophe, Aymeric ainsi que tous les autres... Que de bons moments passés en votre compagnie, des heures de pratique, des sorties à ne plus compter, les esgourdes remplies de notes, et tout ceci toujours avec la même envie qu'à mes débuts. Mon absence n'est que temporaire, et je reviendrai très vite parmi vous, un cuivre en main.

A l'ensemble de l'équipe de la pharmacie des Collines. Merci pour votre accueil chaleureux et bienveillant, travailler avec vous a toujours été et reste un plaisir. Merci à vous Corinne, pour la confiance dont vous me faites preuve.

Aux amis de la Fac. Merci à tous pour votre bonne humeur ainsi que tous les moments partagés ensemble. Merci à Tressy pour les fous rires, la 5AHU a été moins longue grâce à ta présence, qui aime bien châtie bien... ;)

Table des matières :

TABLE DES MATIERES :	10
LISTE DES FIGURES :	13
LISTE DES TABLEAUX :	19
LISTE DES ABREVIATIONS :	20
INTRODUCTION GENERALE	22
1 LES BIOFILMS	23
1.1 QU'EST-CE QU'UN BIOFILM ?	23
1.2 ASPECTS HISTORIQUES	25
1.3 LA DIVERSITE DES BIOFILMS	26
1.3.1 <i>La diversité biologique :</i>	26
1.3.2 <i>La diversité de localisation</i>	28
1.3.3 <i>La diversité de configuration</i>	29
1.4 EPIDEMIOLOGIE DE L'IMPACT DES BIOFILMS DANS LE MILIEU MEDICAL	30
1.4.1 <i>Epidémiologie et impacts financiers</i>	30
1.4.2 <i>Facteurs de risques :</i>	32
1.4.3 <i>Exemples de pathologies liées à un biofilm</i>	34
1.4.3.1 <i>La parodontite :</i>	34
1.4.3.2 <i>La mucoviscidose :</i>	35
1.4.3.3 <i>Les plaies chroniques :</i>	36
1.4.3.4 <i>Les biofilms sur dispositifs médicaux implantables</i>	38
1.5 LES PARAMETRES MODULANT L'APPARITION DES BIOFILMS	41
1.6 L'ARCHITECTURE DES BIOFILMS	43
1.6.1 <i>Répartition des cellules au sein du biofilm :</i>	43
1.6.2 <i>La MEC</i>	49
1.6.2.1 <i>Les polysaccharides :</i>	50
1.6.2.2 <i>Les protéines :</i>	51
1.6.2.3 <i>L'ADN extracellulaire</i>	52
1.6.2.4 <i>Les lipides</i>	53
1.6.2.5 <i>Les canaux</i>	53
1.7 LES ETAPES DE FORMATION D'UN BIOFILM	54

1.7.1	<i>Attachement réversible :</i>	55
1.7.2	<i>Attachement irréversible :</i>	56
1.7.3	<i>Prolifération et production de la MEC</i>	57
1.7.4	<i>Maturation du biofilm :</i>	57
1.7.5	<i>Détachement et dispersion :</i>	58
1.8	LA COMMUNICATION INTER-CELLULAIRE	59
1.8.1	<i>Le QS</i>	59
1.8.1.1	Définition :	59
1.8.1.2	Les Acyl Homosérine Lactone chez les bactéries à Gram négatif :	61
1.8.1.3	Les auto-inducteurs peptidiques chez les bactéries à Gram positif :	63
1.8.1.4	Les auto-inducteurs de type 2 pour la communication inter-espèces :	64
1.8.1.5	Les voies annexes de QS :	66
1.8.1.6	Le QS chez les champignons :	68
1.8.1.7	La communication inter-règnes via le QS.	70
1.8.2	<i>Le Quorum Quenching (QQ)</i>	70
1.9	CONSEQUENCES DES BIOFILMS SUR LA PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE	73
1.9.1	<i>La tolérance aux antibiotiques</i>	73
1.9.1.1	Définition :	73
1.9.1.2	La tolérance intrinsèque :	74
1.9.1.3	La résistance acquise :	75
1.10	LES MOYENS DE LUTTE CONTRE LES BIOFILMS	76
1.10.1	<i>Les mesures préventives</i>	76
1.10.1.1	L'hygiène :	76
1.10.1.2	Les verrous sur cathéters :	76
1.10.1.3	Inhiber l'adhésion initiale	77
1.10.1.3.1	L'inhibition non spécifique :	77
1.10.1.3.2	L'inhibition spécifique :	77
1.10.1.4	Les vaccins	78
1.10.2	<i>Les mesures curatives</i>	78
1.10.2.1	L'ablation du dispositif	78
1.10.2.2	Induire la dispersion du biofilm.	78
1.10.2.3	La modulation du QS	79
1.10.2.4	Lutter contre les cellules persistantes	80
2	LA PLACE DES HE CONTRE LES BIOFILMS	81

2.1	LES HE.....	81
2.1.1	<i>Rappels succincts.....</i>	82
2.1.2	<i>Précautions d'emploi.....</i>	83
2.1.3	<i>Modes d'actions sur les cellules planctoniques.....</i>	84
2.2	AVANT PROPOS.....	85
2.3	ETUDE SUR UN EXEMPLE DE BACTERIE A GRAM NEGATIF : <i>ESCHERICHIA COLI</i>	85
2.3.1	<i>Généralités à propos d'E. coli et de son biofilm</i>	85
2.3.2	<i>Etude d'HE et/ou de leurs composants potentiellement intéressants contre les biofilms d'E. coli.....</i>	86
2.3.2.1	Etude 1 : Etude de concentrations sub-inhibitrices d'Allicine sur la formation de biofilm, l'adhésion et la mobilité d' <i>Escherichia coli</i> uropathogène : (85).....	86
2.3.2.2	Etude 2 : Etude de l'effet anti-biofilm du trans-cinnamaldéhyde sur des souches uropathogènes d' <i>E. coli</i> . (158)	95
2.3.2.3	Etude 3 : étude de l'impact du Trans-Cinnamaldéhyde (TC) sur l'attachement et l'invasion des cellules épithéliales du tractus urinaire par des souches uropathogènes d' <i>E. coli</i> (160)	99
2.3.2.4	Etude 4 : étude de l'impact de l'HE de cannelle de ceylan, de palmarosa, de tea tree ainsi que l'eugénol, le géraniol et le terpinène-4-ol sur des formes planctoniques et sessiles d' <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> . (163).....	103
2.3.2.5	Etude 5 : étude chez <i>E. coli</i> de l'activité anti-QS et de l'inhibition de la formation de biofilm par les HE de Sauge sclérée, de genévrier, de citron jaune et de marjolaine à coquilles ainsi que leurs composés principaux. (165).....	108
2.3.2.6	Etude 6 : étude des propriétés inhibitrices de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> libre ou encapsulée dans des nanoparticules de silice (NPS) sur la formation de biofilm par <i>E. coli</i> . (171)	114
2.3.2.7	Etude 7 : Etude des propriétés antibactériennes des HE de lemongrass, de tea tree et de cannelle de chine vis-à-vis de bactéries sessiles d' <i>E. coli</i> entéropathogène. (167).....	117
2.4	ETUDE SUR UN EXEMPLE DE BACTERIE A GRAM POSITIF : <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	121
2.4.1	<i>Généralités à propos de S. aureus et de son biofilm</i>	121
2.4.2	<i>Etude d'HE potentiellement intéressantes contre son biofilm</i>	122
2.4.2.1	Etude 1: Etudes de l'eugénol à l'encontre du biofilm de souches cliniques de <i>S. aureus</i> . (181).....	122
2.4.2.2	Etude 2 : étude des composés principaux de l'essence d'orange vis-à-vis de <i>S. aureus</i> impliqué dans les mammites bovines. (184).....	130

2.4.2.3	Etude 3 : effet du cinnamaldéhyde (TC) sur la croissance du biofilm et l'expression de sarA chez des souches de SARM. (188).....	135
2.5	ETUDE SUR UN EXEMPLE DE LEVURE : <i>CANDIDA ALBICANS</i>	140
2.5.1	Généralités à propos de <i>C. albicans</i> et de son biofilm.....	140
2.5.2	Etude d'HE potentiellement intéressantes contre son biofilm.....	141
2.5.2.1	Etude 1 : étude de l'effet du linalol vis-à-vis du biofilm de <i>C. albicans</i> . (193).....	141
2.5.2.2	Etude 2 : étude de l'effet de l'HE de tea tree aux CSI sur l'adhésion et la formation de biofilm par <i>C. albicans</i> . (175)	146
2.5.2.3	Etude 3 : étude de l'hinokitiol vis-à-vis de la formation de biofilm par des souches de <i>C. albicans</i> résistantes ou non au fluconazole. (201).....	150
2.6	DISCUSSION DE L'ENSEMBLE DES RESULTATS :	154
2.7	LES HE CONTRE LES CYSTITES RECIDIVANTES.....	159
2.8	ETUDE DE L'HYPOTHESE DE RESISTANCE AUX HE	161
2.9	INTERET DE L'ASSOCIATION DES HE AVEC LES ANTIBIOTIQUES	164
2.10	PERSPECTIVES D'UTILISATION DES HE	166
	CONCLUSION GENERALE.....	168
	BIBLIOGRAPHIE :	169
3	ANNEXES :	195
3.1	TABLEAU 8 : TABLEAU DE SYNTHESE DES HE ET COMPOSES POSSEDANT UNE ACTIVITE A L'ENCONTRE DES BIOFILMS D' <i>E. COLI</i>	195
3.2	TABLEAU 9 : TABLEAU DE SYNTHESE DES HE ET COMPOSES POSSEDANT UNE ACTIVITE A L'ENCONTRE DES BIOFILMS DE <i>S. AUREUS</i>	202
3.3	TABLEAU 10 : TABLEAU DE SYNTHESE DES HE ET COMPOSES POSSEDANT UNE ACTIVITE A L'ENCONTRE DES BIOFILMS DE <i>C. ALBICANS</i>	209

Liste des figures :

Figure 1 : un biofilm constituant la plaque dentaire. CC : Cocci ; FC : cellules filamenteuses	24
Figure 2 : un biofilm intestinal	24
Figure 3 : une canalisation recouverte par un biofilm	24
Figure 4 : un biofilm sur le septum d'un connecteur sans aiguille.....	24

Figure 5 : Avantages (en bleu) et inconvénients (en rouge) des biofilms dans les divers domaines.....	26
Figure 6 : composition taxonomique de l'ensemble de procaryotes retrouvés sur un échantillon de sables fluviaux.....	27
Figure 7 : composition taxonomique de l'ensemble des eucaryotes retrouvés sur le même échantillon de sables fluviaux.....	27
Figure 8 : exemple de biofilm de <i>B. subtilis</i> à l'interface liquide / air.	29
Figure 9 : Biofilm de <i>P. aeruginosa</i> dans un flux à 1 m/s de gauche à droite	30
Figure 10 : représentation schématique des infections à biofilm sur tissus natifs versus dispositif médical.....	33
Figure 11 : bactéries cliniquement importantes par classe d'âge	36
Figure 12 : exemple de formation d'un biofilm cristallin sur une sonde urinaire	39
Figure 13 : schématisation de la répartition spatiale des cellules au sein du biofilm.....	44
Figure 14 : schématisation du phénomène d'antagonisme (A). Schématisation du phénomène de coopération mutuelle ou unidirectionnelle (B, C).	45
Figure 15 : avantage compétitif de la sécrétion de « public goods ».....	46
Figure 16 : modélisation du phénomène d'antagonisme	46
Figure 17 : coopération versus compétition	47
Figure 18 : coopération versus compétition	47
Figure 19 : les différents facteurs à l'origine de la stratification cellulaire	48
Figure 20 : biofilm d' <i>A. fumigatus</i> montrant la MEC (flèche blanche) enveloppant les hyphes (flèche noire).....	50
Figure 21 : motif structural des polysaccharides d'adhésion intercellulaire	51
Figure 22 : Caractérisation des canaux d'un biofilm de <i>Bacillus subtilis</i>	53
Figure 23 : étapes de formation d'un biofilm	55
Figure 24 : phase d'attachement irréversible de bacilles sur des flacons d'irrigation nasale vue en microscopie électronique à balayage.	56
Figure 25 : production d'exopolysaccharides d'un jeune biofilm sur des flacons d'irrigation nasale vue en microscopie électronique à balayage.	57
Figure 26 : structure tridimensionnelle d'un biofilm de <i>P. aeruginosa</i> sur un épithélium respiratoire montrant la MEC ainsi qu'un canal aqueux (flèche blanche) vue en microscopie électronique à balayage.	58
Figure 27 : schématisation des étapes de formation d'un biofilm de <i>C. albicans</i>	59

Figure 28 : schématisation des comportements contrôlés par le QS	61
Figure 29 : Structure chimique des AHL.	62
Figure 30 : Réaction de synthèse des AHL par les LuxI synthases. Acyl-ACP : Acyl-Acyl Carrier Protein ; MTA : méthylthioadénosine.	62
Figure 31 : Cycle de synthèse du précurseur de AI-2.....	64
Figure 32 : réaction de cyclisation spontanée du DPD.....	65
Figure 33 : schématisation des modes d'action des AI-2	66
Figure 34 : Interconnexion des circuits de QS chez <i>P. aeruginosa</i>	67
Figure 35 : structure chimique du tyrosol.....	68
Figure 36 : structure chimique du phényléthanol	68
Figure 37 : structure chimique du farnésol.....	69
Figure 38 : structure chimique du tryptophol	69
Figure 39 : diversité des enzymes du QQ (en couleur) ainsi que les IQS (en noir).	72
Figure 40 : schéma explicatif de la notion de tolérance	73
Figure 41 : schéma de synthèse avec les différentes cibles thérapeutiques sur différents phénotypes bactériens.....	81
Figure 42 : croissance des formes planctoniques d' <i>E. coli</i> en fonction de concentrations croissantes d'allicine. $p < 0,05$ (*).	88
Figure 43 : Impact de l'allicine sur la formation (A/B) et la dispersion (C/D) du biofilm des souches CFT073 (A/C) et J96 (B/D) d' <i>E. coli</i>	89
Figure 44 : vue en microscopie électronique à balayage d'UPEC CFT073 en présence ou non d'allicine. Contrôle (A), 12 $\mu\text{g/mL}$ (B), 25 $\mu\text{g/mL}$ (C), 50 $\mu\text{g/mL}$ (D).	90
Figure 45 : Impact de l'allicine sur l'adhérence et la mobilité de CFT073 et J96.	91
Figure 46 : Impact de l'allicine sur l'expression du gène <i>fimH</i> codant pour la sous unité <i>fimH</i> des pilis de type 1 pour les souches CFT073 et J96.	92
Figure 47 : visualisation par docking de l'allicine cristallisée dans le domaine lectine du pili de type 1.	92
Figure 48 : Impact de l'allicine sur la voie BarA/UvrY/Csr de la souche CFT073.	93
Figure 49 : impact du TC sur la formation de biofilm d'UPEC ATCC 700415 sur microplaques de polystyrène (A) et cathéter urinaire (B) en présence de 0% (◆) ; 0,1% (■) ; 0,25% (●) ; 0,5% (▲) de TC.....	96
Figure 50 : impact du TC sur des biofilms d'UPEC ATCC 700415 préformés sur microplaques de polystyrène (A) et sur cathéters urinaires en latex (B) à 0% (colonne noire et	

♦) ; 1% (colonne hachurée et ■) ; 1,25% (colonne à tirets et ●) et 1,5% (colonne à pointillés et ▲).....	96
Figure 51 : observation microscopique de biofilms d'UPEC ATCC 700415 sans (A et C) et avec (B et D) traitement par TC. Coloration SYTO (A et C) et iodure de propidium (B et D).	97
Figure 52 : cinétique de croissance des souches d'UPEC en présence de TC à 0 µM (♦) ; 325 µM (■) ; 560 µM (▲) ; 750 µM (●).....	100
Figure 53 : impact des CSI de TC sur l'adhésion des UPEC (A) et sur l'invasion des cellules HTB-4 par les UPEC (B). 0 µM (noir) ; 325 µM (gris foncé) ; 560 µM (gris clair) ; 750 µM (blanc) de TC.....	100
Figure 54 : impact du TC sur l'expression chez les souches d'UPEC des gènes codant pour les adhésines correspondantes à 560 µM (gris foncé) et 750 µM (gris clair) de TC.....	101
Figure 55 : impact sur les formes planctoniques d' <i>E. coli</i> (A/C) et de <i>S. aureus</i> (B/D) des HE à différentes concentrations (A/B) ainsi que de leurs composés majoritaires à 1,56 % (C/D).	104
Figure 56 : Impact sur les bactéries du biofilm d' <i>E. coli</i> (A) et de <i>S. aureus</i> (B) ainsi que sur la biomasse des biofilms de <i>E. coli</i> (C) et de <i>S. aureus</i> (D) lors de l'incubation pendant 24 heures en présence d'HE à différentes concentrations.	105
Figure 57 : Impact des composants majoritaires des HE à la concentration de 1,56 % sur les bactéries du biofilm d' <i>E. coli</i> (A) et de <i>S. aureus</i> (C) ainsi que sur la biomasse des biofilms de <i>E. coli</i> (B) et de <i>S. aureus</i> (D) lors de l'incubation pendant 24 heures.	105
Figure 58 : effet des HE et de leurs composés sur la formation de biofilm d' <i>E. coli</i> à la concentration CMI/2.....	109
Figure 59 : effet des HE de citron (A), de marjolaine à coquille (B) et de cannelle (C) à différentes concentration sur la formation de biofilms mixtes composés d' <i>E. coli</i> et de <i>P. putida</i>	110
Figure 60 : observation microscopique de biofilms mixtes d' <i>E. coli</i> et de <i>P. putida</i> après 24 h d'incubation en l'absence d'HE (E/F), après 24 h d'incubation en présence d'HE de citron (G), et après 24 h d'incubation en présence d'HE de cannelle (H).	111
Figure 61 : visualisation des NPS par microscopie électronique à balayage.	114
Figure 62 : effet à 50 µl/ml de l'HE d' <i>E. globulus</i> libre ou encapsulée sur la croissance du biofilm d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 après 48 h d'incubation.	115

Figure 63 : observation microscopique de biofilm d' <i>E. coli</i> ATCC 25922 après 48 h d'incubation en l'absence d'HE (A), en présence d'HE libre (B), en présence d'HE encapsulée (C).	115
Figure 64 : Effet des HE à différentes concentration, cannelle + lemongrass (A), cannelle + tea tree (C), lemongrass + tea tree (E), cannelle + lemongrass + tea tree (G) vis-à-vis de biofilms d'EPEC préétablis sur polystyrène.....	118
Figure 65 : Effet des HE à différentes concentration, cannelle (A), lemongrass (C) et tea tree (E) vis-à-vis de biofilms d'EPEC préétablis sur polystyrène.	118
Figure 66 : effet sur la croissance de biofilms de SARM et de SASM en présence de différentes concentrations d'eugénol. Effet de l'eugénol sur la biomasse (A). Effet de l'eugénol sur la viabilité des bactéries sessiles (B). Vue en microscopie électronique à balayage de la croissance du biofilm de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 en l'absence d'eugénol (C) et en présence de 0,02 % (0,5 CMI) d'eugénol (D).....	124
Figure 67 : impact de l'eugénol à différentes concentration vis-à-vis de biofilms préétablis de SARM et de SASM. Effet de l'eugénol sur la biomasse (A). Effet de l'eugénol sur la viabilité des bactéries sessiles (B). Vue en microscopie électronique à balayage du biofilm préformé de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 en l'absence d'eugénol (C) et en présence de 0,04 % (=CMI) d'eugénol (D).....	125
Figure 68 : cinétique de l'effet bactéricide de l'eugénol sur un biofilm préformé de <i>S. aureus</i> ATCC 29213.	126
Figure 69 : Effet de l'eugénol sur la colonisation de l'oreille moyenne de rats par <i>S. aureus</i> ATCC 29213 pendant 1 semaine. (A) contrôle. (B) inoculation de DMSO seul. (C) inoculation de <i>S. aureus</i> et d'eugénol. (D) inoculation de <i>S. aureus</i> seul. (E) comptabilisation du nombre d'UFC présent sur la muqueuse de l'oreille moyenne dans les différents cas.	126
Figure 70 : visualisation microscopique de l'effet de l'eugénol sur la colonisation de <i>S. aureus</i> sur la muqueuse de l'oreille moyenne de rats. (A/B) contrôle. (C/D) inoculation de DMSO seul. (E/F) inoculation de <i>S. aureus</i> seul. (G/H) inoculation de <i>S. aureus</i> en présence d'eugénol.	127
Figure 71 : impact de l'association eugénol/carvacrol sur l'éradication de biofilms préformés de <i>S. aureus</i> après 6h de d'incubation.	128
Figure 72 : effet du citral et du linalol sur des biofilms préformés de <i>S. aureus</i>	131
Figure 73 : évaluation de la cytotoxicité relative du citral (A) et du linalol (B) à l'encontre des cellules épithéliales mammaires MAC-T.	131

Figure 74 : effet du citral et du linalol sur l'adhérence (A) et l'invasion (B) des cellules épithéliales mammaires MAC-T.	132
Figure 75 : variation d'expression des gènes impliqués dans la formation du biofilm après 24 h de croissance et après 24 h d'incubation en présence de citral ou linalol. Différences statistiques (*).	132
Figure 76 : variation d'expression des gènes impliqués dans la virulence de <i>S. aureus</i> 1h après l'infection des cellules MAC-T et 1 h encore après traitement par citral ou linalol Différences statistiques (*).	133
Figure 77 : Effet du TC sur la viabilité du biofilm (A) et des bactéries (B) après 24 h d'incubation en présence du TC sur des biofilms préformés depuis 24h. (□) Contrôle ; (▣) 0,5 CMI ; (■) CMI ; (■) 2,5 CMI ; (□) 5 CMI. Différences statistiques (**).	136
Figure 78 : images en microscopie électronique à balayage (x3000) de la souche JB-01 et de son biofilm en l'absence de traitement (A) et après 24 h d'incubation en présence de TC à 0,0625 % (B) ; 0,125 % (C) ; 0,313 % (D) et 0,625 % (E).	137
Figure 79 : images au microscope confocal à balayage LASER (x400) de biofilm de <i>S. aureus</i> après 24 h d'incubation en l'absence (A) ou en présence de TC à 0,0625 % (B) ; 0,125 % (C) ; 0,313 % (D) et 0,625 % (E).	137
Figure 80 : effet de concentrations sub-inhibitrices de TC après 24 h d'incubation sur l'expression de <i>sar A</i> chez <i>S. aureus</i> . (■) contrôle ; (▣) TC à 0,5 CMI. Différences statistiques (**).	138
Figure 81 : cinétique de l'effet fongicide du linalol vis-à-vis de <i>C. albicans</i> . (x) contrôle ; (▲) linalol 4 mM ; (●) linalol 8 mM ; (○) amphotéricine B 0,5 µg/mL ; (Δ) amphotéricine B 0,25 µg/mL.	142
Figure 82 : effet inhibiteur du linalol sur la formation de tube germinatif. MC : contrôle milieu ; SC contrôle solvant.	142
Figure 83 : effet du linalol sur la formation du biofilm 1h après l'adhésion (A), et sur des biofilms préformés depuis 24h (B).	143
Figure 84 : observation au microscope électronique à balayage x500. (A) image contrôle d'un biofilm de 24h. (B) Effet du linalol à 4 mM ajouté 1h après l'adhérence et incubation pendant 24h. (C) image contrôle d'un biofilm de 48h. (D) Effet du linalol à 16 mM sur un biofilm préformé depuis 24h et incubation pendant 24h.	143
Figure 85 : expression relative des ARNm. Gènes impliqués dans les voies de signaux de transduction des gènes spécifiques des hyphes (A). Gènes d'adhésines de surface (B). Gènes	

impliqués dans la formation et la maintenance des hyphes (C). (■) 0,25 mM linalol ; (▣) 1 mM linalol ; (□) 4 mM linalol.	144
Figure 86 : hydrophobicité relative de surface après différents temps de contact en présence d'HE de tea tree. (A) <i>C. albicans</i> ATCC 10231 ; (B) <i>C. albicans</i> 137548L.	148
Figure 87 : images au MEB x500. Formation de biofilm en l'absence d'hinokitiol (A/C) et en présence d'hinokitiol à 3,1 µg.mL ⁻¹ (B/D) chez <i>C. albicans</i> sensible au fluconazole (A/B) ou résistant au fluconazole (C/D).	151
Figure 88 : Effet de l'hinokitiol, du fluconazole et des 8 terpènes sur la viabilité des cellules souches humaines après 48 h d'incubation de ces dernières en présence de la CMI des levures planctoniques de chacun des composés.	152
Figure 89 : effet de l'hinokitiol sur l'expression de gènes associés à la formation d'hyphes chez <i>C. albicans</i> en présence de 0,8 µg.mL ⁻¹	152

Liste des tableaux :

Tableau 1 : principaux DM implantés annuellement aux USA et risques infectieux associés	40
Tableau 2 : synthèse des paramètres modulant l'adhésion cellulaire.....	42
Tableau 3 : valeurs de CMI en µL.mL ⁻¹ des HE ou de leurs composés contre <i>E. coli</i>	109
Tableau 4 : halo d'inhibition de croissance et halo décoloré du à l'effet anti-QS des HE et de leurs composés.....	111
Tableau 5 : Effet de l'HE de cannelle comparé à un ammonium quaternaire vis-à-vis du biofilm d'EPEC sur acier inoxydable.....	119
Tableau 6 : formation relative du biofilm par <i>C. albicans</i> en présence d'HE de tea tree quantifiée par la méthode au cristal violet (CV) ou aux sels de tétrazolium (XTT).	147
Tableau 7 : adhésion relative de <i>C. albicans</i> au polystyrène en présence d'HE de tea tree quantifié par le cristal violet.	148
3.1 Tableau 8 : tableau de synthèse des HE et composés possédant une activité à l'encontre des biofilms d' <i>E. coli</i>	195
3.2 Tableau 9 : tableau de synthèse des HE et composés possédant une activité à l'encontre des biofilms de <i>S. aureus</i>	202
3.3 Tableau 10 : tableau de synthèse des HE et composés possédant une activité à l'encontre des biofilms de <i>C. albicans</i>	209

Liste des abréviations :

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AHL : Acyl Homosérine Lactone

AI-2 : Auto-Inducteur de type 2

AIP : Auto-Inducteur Peptidique

BHI : Brain Heart Infusion agar

CDC : Center for Disease Control

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CMB : Concentration Minimale Bactéricide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMEB : Concentration Minimale Eradiquant le Biofilm

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMIB : Concentration Minimales Inhibant la croissance du Biofilm

CSI : Concentration Sub-Inhibitrice

DM : Dispositif Médical

DMSO : DiMéthylSulfOxyde

DPD : 4,5-Dihydroxy-2,3-PentaneDione

DSF : Diffusible Signal Factor

EDTA : Ethylène Diamine TétraAcétique

FDA : Food and Drug Administration

FICI : Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire

IQS : Inhibiteur du Quorum Sensing

Lsr : LuxS regulated

MEB : Microscope Electronique à Balayage

MEC : Matrice Extra Cellulaire

MTA : MéthylThioAdénosine

NIH : National Institutes of Health

NPS : NanoParticules de Silice

PQS : *Pseudomonas* Quinolone Signal

QQ : Quorum Quenching

QS : Quorum Sensing

RT-qPCR : PCR Quantitative après Transcription inverse

SAM : S-AdénosylMéthionine

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

SASM : *Staphylococcus aureus* Sensible à la Méricilline

TC : Trans-Cinnamaldéhyde

THMF : (2R,4S)-2-Méthyl-2,3,3,4-TétraHydroxyTétrahydroFurane

TSA : Trypocaséïne Soja Agar

UFC : Unités Formant Colonies

UPEC : *Escherichia coli* UroPathogène

WUWHS : World Union of Wound Healing Societies

Introduction générale

Depuis le début de son existence, l'Homme se bat pour sa survie dans un environnement où la compétition est rude et doit affronter des menaces, bien souvent invisibles à l'œil nu, conférées par de multiples agents infectieux. Pour cela, il est doté d'un système immunitaire dont l'efficacité est redoutable, mais il arrive parfois que ce dernier soit affaibli, ou submergé. Il a été pendant de nombreuses années admis, à tort, que les microorganismes responsables de ces infections se présentaient exclusivement sous forme libre et isolée dite planctonique, or, ce mode de vie ne serait que transitoire et ne correspondrait qu'à 1 % seulement du monde bactérien, 99 % des bactéries adopteraient en effet le mode de vie en communauté sous forme de biofilms. (1) Ce n'est que depuis peu de temps finalement que nous commençons à comprendre l'incroyable rôle des biofilms, ces derniers étant impliqués, de façon bénéfique ou néfaste, dans de multiples domaines tels que la santé, les biotechnologies, l'ingénierie navale, la métallurgie, l'industrie alimentaire, les réseaux de distribution d'eau... (2) Lutter contre ces biofilms est par conséquent un objectif majeur. Malheureusement, les antibiotiques classiques descendants directs de la pénicilline découverte par Fleming en 1928, s'ils s'avèrent actifs à l'encontre des formes planctoniques, deviennent bien souvent inefficaces aux doses usuelles contre les biofilms, obligeant l'utilisation de concentration 100 à 1000 fois plus élevée, ce qui les rend toxiques et donc pratiquement inutilisables pour l'Homme. (3) C'est principalement dans ce contexte d'impasse thérapeutique que les huiles essentielles (HE) pourraient avoir toute leur importance. En revanche, si l'activité des HE à l'encontre des formes planctoniques n'est plus à démontrer, qu'en est-il vis-à-vis des biofilms ? Les études sur ce sujet commencent à émerger, et les résultats semblent très prometteurs. Ainsi, par cette thèse, je tiens à mettre en avant le potentiel à mon sens certain que représentent les HE, ainsi que leurs nombreux avantages dans la lutte anti-biofilm. Pour cela, j'ai souhaité aborder dans un premier temps les biofilms dans leur globalité, afin de comprendre à quoi ils correspondent et leur impact, principalement dans le milieu médical. Puis, aborder la cinétique de formation des biofilms ainsi que leur organisation structurale me semblait nécessaire pour illustrer les phénomènes de résistances aux antibiotiques. Enfin, j'ai souhaité terminer cette première partie en abordant les solutions éventuelles pour lutter contre ces biofilms, en dehors de l'emploi des HE. La seconde partie quant à elle consiste à une revue de la littérature des HE potentiellement intéressantes contre les biofilms d'une bactérie à Gram négatif : *E. coli*, d'une bactérie à Gram positif : *S. aureus* et également à l'encontre des biofilms d'une levure : *C. albicans*. A partir de ces résultats, j'ai souhaité proposer une association d'HE afin de lutter contre les cystites récidivantes dues à *E. coli*. Pour terminer, il me semblait indispensable de

traiter l'hypothèse de résistance aux HE, mais également l'intérêt de l'association des HE avec les antibiotiques, ainsi que les perspectives de l'emploi des HE dans la lutte anti-biofilm.

1 Les biofilms

1.1 Qu'est-ce qu'un biofilm ?

Les biofilms sont définis comme des agrégats de microorganismes enrobés par une matrice extracellulaire (MEC) d'origine microbienne et associés à une surface. (4) Des querelles d'expert persistent pour savoir si oui ou non, doivent être considérés comme biofilms ceux en suspension qui ne sont pas associés à une surface (tels que les floccs en suspension dans les stations d'épuration à boues activées), ceux qui se forment aux interfaces (air / liquide par exemple) ainsi que les espèces ne produisant pas elles-mêmes leur MEC. (5) Nous considérerons durant le travail suivant l'ensemble des cas précédents (biofilms en suspension, ceux à l'interface air/eau...), comme correspondant à la dénomination de biofilms. La notion d'agrégat renvoie à la haute densité cellulaire des biofilms (de 10^8 à 10^{11} cellules par gramme) ce qui implique de nombreuses interactions physiques et sociales entre les communautés présentes dans ces biofilms. (4) Ces interactions, associées aux propriétés conférées par la MEC font émerger de nouvelles caractéristiques propres aux biofilms, qui ne sont pas prédictibles depuis l'étude de cellules isolées en suspension.

Dans l'environnement, les cellules ont la capacité d'alterner entre deux états distincts. L'état planctonique d'une part qui correspond aux cellules libres et isolées en suspension dans un milieu que l'on retrouve principalement en laboratoire, et l'état sessile qui correspond lui, aux cellules attachées vivant en communauté dans un biofilm. Il s'avère que la majorité des microorganismes vivent sous forme sessile. Chez les bactéries par exemple, plus de 99 % adopteraient ce mode de vie, et 1 % seulement se trouveraient sous forme planctonique, certains suggèrent qu'il s'agit simplement des bactéries en transition d'un biofilm à un autre. (1) Si la majorité des microorganismes adoptent le mode de vie en biofilms, cela veut dire que durant l'évolution, les bénéfices conférés par ces derniers sont largement supérieurs à la forme planctonique. En effet de l'union naît la force. De nouvelles propriétés sont intrinsèquement liées au biofilm telles que la résistance à la dessiccation, la capture de nutriments, la rétention d'enzymes extracellulaires à l'origine de capacités digestives décuplées, l'échappement au système immunitaire de l'hôte, la tolérance aux antibiotiques etc... (4) De l'omniprésence des biofilms en découlent de nombreux processus. Ils sont par exemple impliqués dans le cycle biogéochimique de la plupart des éléments de l'hydrosphère

et de la géosphère. Ils sont utilisés dans de nombreux processus de biotechnologie tels que la filtration de l'eau potable, le traitement des eaux usées, la bioremédiation des sols ainsi que dans les phénomènes de biocatalyse. (4) Ils sont en revanche impliqués dans les phénomènes de colmatage des filtres, de corrosion, de biocontamination de l'eau potable, d'encrassement des surfaces immergées (canalisations, pipelines, coques de bateau...) aussi appelé biofouling en anglais, et causent des milliards de dollars de dépenses supplémentaires chaque année. (6) Les biofilms ne colonisent pas seulement des surfaces abiotiques, ils peuvent aussi coloniser les organismes vivants pluricellulaires dont l'être humain. Si certains sont bénéfiques pour notre existence (au niveau de la peau, de la paroi vaginale, de la lumière du tractus digestif), d'autres causent à l'Homme bien des soucis et sont source d'échecs thérapeutiques. (3)

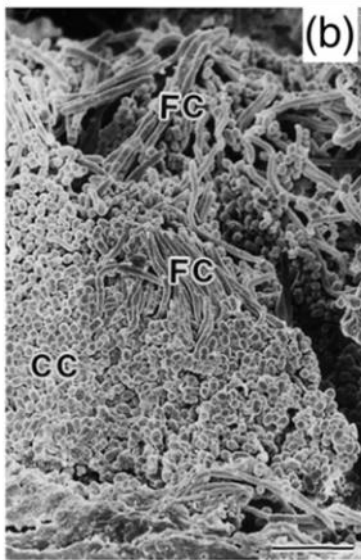


Figure 1 : un biofilm constituant la plaque dentaire. CC : Cocci ; FC : cellules filamenteuses (4)

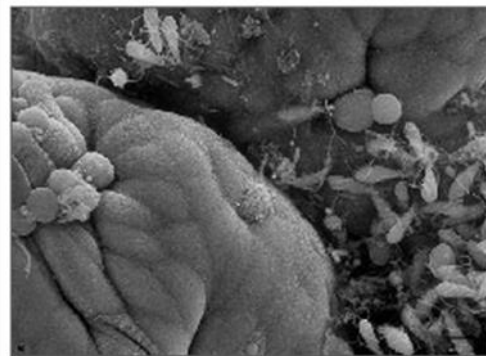


Figure 2 : un biofilm intestinal (3)



Figure 3 : une canalisation recouverte par un biofilm (5)

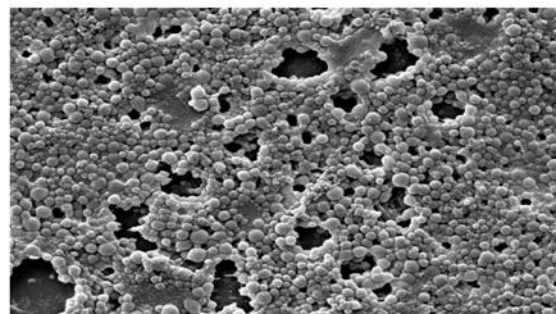


Figure 4 : un biofilm sur le septum d'un connecteur sans aiguille (6)

1.2 Aspects historiques

D'après les datations fossiles, les biofilms existaient depuis plus de 3,25 milliards d'années sur terre et pourraient correspondre à l'étape de transition du mode de vie unicellulaire vers un mode de vie pluricellulaire. (7) Ce n'est que depuis hier par rapport à l'âge de la terre que l'humanité commence à s'y intéresser. En effet, c'est Antonie van Leeuwenhoek le premier qui, grâce à l'invention de son microscope, observa en 1708 des agrégats de microbes provenant de la surface de ses dents et de sa langue, qui correspondaient en fait à des biofilms. (8) Puis, Pasteur en 1864 décrit « la mère de vinaigre » (à l'origine de la fermentation acétique de l'éthanol pour la fabrication du vinaigre) comme étant constituée d'agrégats bactériens de *Mycoderma aceti*. (8) Ensuite, durant une centaine d'années, les biofilms ne furent quasiment pas étudiés, semblant dénués d'intérêt pour les scientifiques, et inconnus en santé. Et ce, jusqu'en 1970-1972 où Niels Hoiby mit en évidence dans des crachats de patients atteints de mucoviscidose, des phénotypes mucoïdes de colonies de *P. aeruginosa*. (9) Le terme « biofilm » a été pour la première fois utilisé en 1981, puis en 1985 est étudiée la résistance intrinsèque des biofilms aux antibiotiques, il faudra attendre 2003 pour que la notion de tolérance aux antibiotiques soit abordée... (10) Ce n'est finalement que depuis les 30 dernières années que la recherche sur les biofilms s'est développée à en croire la base de données Pubmed, même si avant 1981 le mot biofilm n'était pas employé, il y avait cette année là 3 publications à leurs propos, 170 en en 1996, 34 580 publications cumulées au 1er janvier 2017 avec actuellement plus de 4500 publications annuelles, en augmentation exponentielle. (9) Le nombre conséquent de publications s'explique par les multiples domaines concernés par les biofilms, la santé, les biotechnologies, l'ingénierie navale, la métallurgie, l'industrie alimentaire, les réseaux de distribution d'eau etc... comme le met en évidence la figure 5.

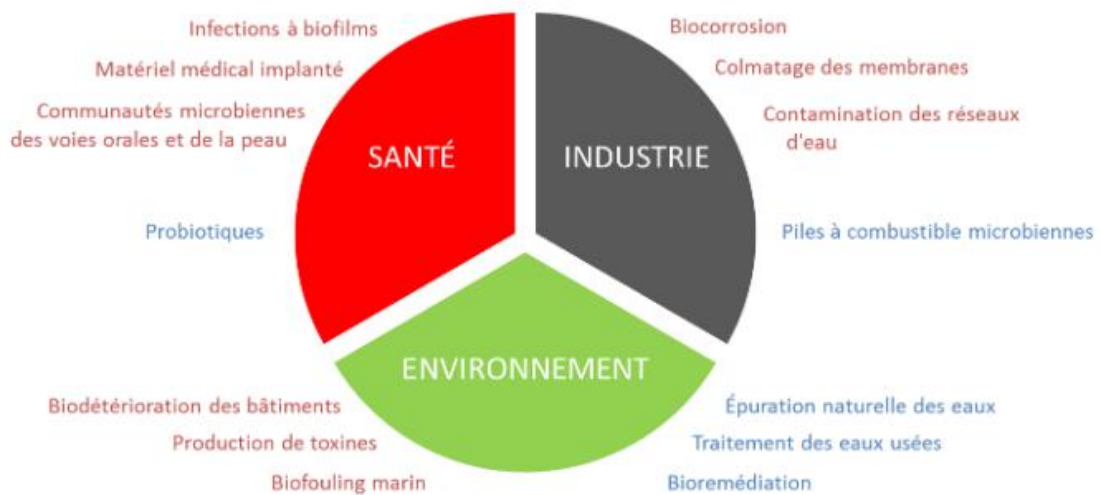


Figure 5 : Avantages (en bleu) et inconvénients (en rouge) des biofilms dans les divers domaines. (2)

1.3 La diversité des biofilms

Le terme biofilm est un terme générique qui décrit le mode de vie de plus de 90 % des microorganismes de la terre, tous localisés dans une pluralité impressionnante de niches écologiques. Cette multitude d'espèces et de localisations génère une diversité incroyable au sein des biofilms que ce soit en terme structural, biologique, métabolique... Certains comparent les biofilms à des organismes multi-cellulaires. En effet, ils sont capables de s'adapter à l'environnement, se remodeler constamment, croître, engendrer de nouveaux biofilms dans de nouvelles niches, développer une pseudo-circulation intra-biofilm avec leurs canaux etc... (5) Ils sont, de plus, tous uniques selon les espèces qu'ils hébergent et leur localisation. Cette biodiversité se décline sur plusieurs plans.

1.3.1 La diversité biologique :

Les biofilms peuvent héberger une seule ou plusieurs espèces de microorganismes, on parle alors respectivement de biofilms homogènes ou de biofilms hétérogènes. (11) A ce jour, il semblerait que toutes les espèces bactériennes ainsi que la plupart des champignons (levures et champignons filamenteux) puissent former des biofilms. (12,13) Si les biofilms homogènes sont surtout étudiés en laboratoire, en réalité la plupart des biofilms sont hétérogènes et sont composés d'espèces variées. Les biofilms de l'environnement sont probablement les plus complexes en termes de diversité d'espèces, c'est ce que mettent en évidence les figures 6 et 7 présentant l'analyse de sables fluviaux de plusieurs cours d'eau au Danemark.

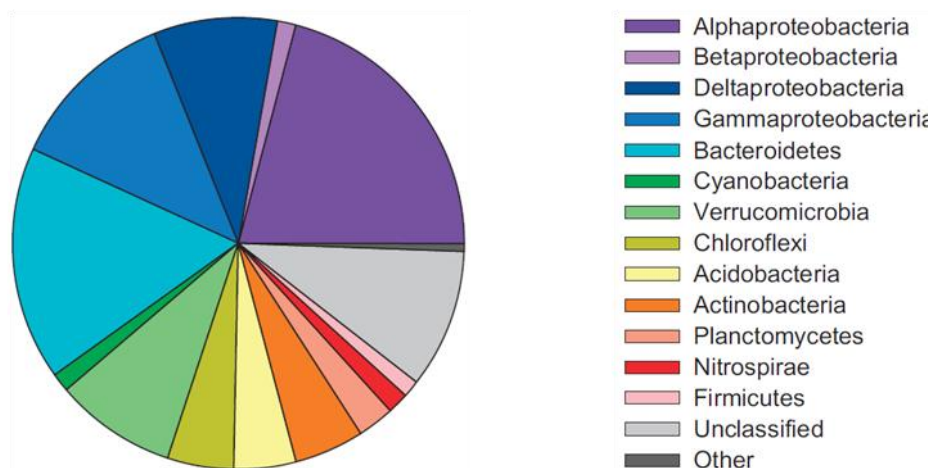


Figure 6 : composition taxonomique de l'ensemble de procaryotes retrouvés sur un échantillon de sables fluviaux (7)

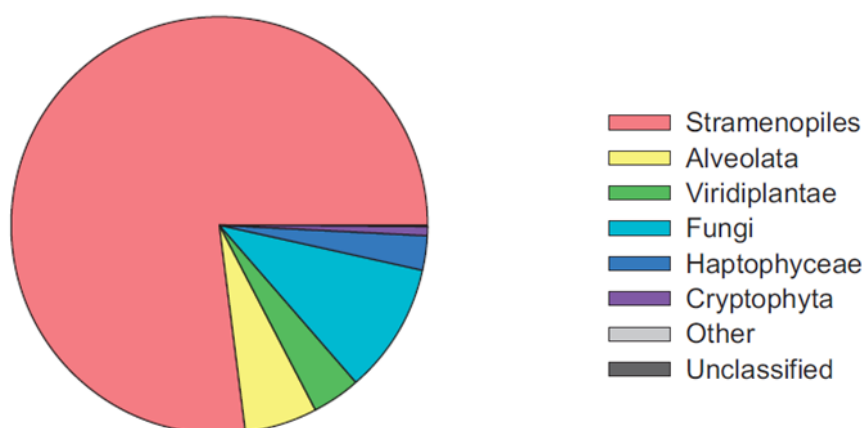


Figure 7 : composition taxonomique de l'ensemble des eucaryotes retrouvés sur le même échantillon de sables fluviaux (7)

D'autre part, la présence de certaines espèces dans les biofilms est influencée par les conditions environnementales. Par exemple les biofilms exposés à la lumière contiennent majoritairement des organismes dits phototrophes (cyanobactéries et algues) capables d'effectuer la photosynthèse en produisant de la matière organique en utilisant l'énergie lumineuse. En revanche les biofilms formés dans des milieux obscurs sont principalement constitués d'organismes hétérotrophes (qui utilisent de la matière organique pour synthétiser leur biomasse) et chimiotrophes (qui oxydent des substances minérales pour synthétiser leur biomasse). (11) Selon le taux de dioxygène environnemental, le biofilm sera plus ou moins riche en espèces aérobies, aérobies facultatives ou anaérobies. En outre, l'âge du biofilm peut être déterminé par les caractéristiques des cellules incluses, un jeune biofilm est majoritairement composé de cellules métaboliquement très actives, alors que les biofilms plus âgés contiennent de nombreuses cellules faiblement ou métaboliquement inactives (des

cellules viables mais non cultivables, des cellules mortes, des cellules dormantes qui sont un type de cellules persistantes...)

La composition de la MEC (protéines, lipides, ADN, polysaccharides...) dépend quant à elle non seulement des microorganismes du biofilm (certains composés étant spécifiques de certaines espèces) mais aussi des conditions environnementales. Par exemple, la composition et la distribution de la MEC est modulée par la vitesse d'écoulement du fluide si le biofilm est immergé. Lorsque le biofilm est au contact d'un fluide à vitesse d'écoulement élevée, les polysaccharides et protéines sont produits de façon plus importante en quantité et de façon plus homogène et l'épaisseur du biofilm est amoindrie. Ceci afin de renforcer la cohésion du biofilm pour résister aux forces hydrodynamiques. (14) D'autres part, le taux de production de la MEC serait stimulé par des phénomènes de compétition entre espèces, et également par l'exposition à des concentrations sublétales d'antibiotiques. (15)

1.3.2 La diversité de localisation

Les biofilms sont partout, dans le sol, au contact de l'air ambiant, immergés dans l'eau, en présence ou non de lumière... En pratique, à partir du moment où coexistent une surface (ou interface), des éléments nutritifs, de l'eau et des microorganismes, un biofilm est susceptible de se former. (5) La quantité d'eau, sa température et même sa forme physique importent peu car on retrouve des biofilms aussi bien dans des flaques d'eau que dans des océans, aussi bien dans les fosses hydrothermales que dans l'eau gelée en altitude ou aux pôles, et aussi bien dans l'eau liquide que dans l'eau gazeuse puisque des biofilms sont retrouvés à plus de 70 Km d'altitude. (5) Les nutriments, aussi divers et variés qu'ils puissent être peuvent être source d'énergie. Ce peut être des aliments, tels que le biofilm fongique de *Penicillium roquefortii* sur le roquefort, mais bien d'autres biofilms existent sur les saucissons, le vinaigre etc... Ou bien ce peut être des résidus alimentaires comme dans la plaque dentaire. Les fluides biologiques (sang, urine...), riches en composés nutritifs sont également idéals. (5) Enfin des hydrocarbures peuvent représenter des sources nutritives, c'est le cas par exemple pour *Pseudomonas putida* qui est capable d'utiliser comme source exclusive de carbone et d'énergie des composés aromatiques de type toluène, benzène, éthylbenzène... (16) De tels microorganismes sont utilisés pour la bioremédiation des sols. Enfin concernant la nature de la surface, peu importe, l'important c'est de se fixer. Comme nous le présente la figure 8, certains biofilms sont mêmes capables de se former à l'interface air/liquide. (17)



Figure 8 : exemple de biofilm de *B. subtilis* à l'interface liquide / air. (18)

Le substrat peut être d'une part, un tissu vivant, comme la peau ainsi que les muqueuses du tractus digestif, des cavités oropharyngées, du vagin... qui sont des niches écologiques hébergeant des microorganismes sous forme de biofilm et constituent la flore commensale, à l'origine du maintien de l'homéostasie. Parfois les biofilms sont pathogènes, les plaies chroniques en sont un exemple. (3) Les biofilms peuvent également être associés aux plantes dans la rhizosphère dont la fonction principale est de dégrader la matière organique en nutriments pour eux-mêmes mais aussi pour les plantes. La fixation annuelle de 135 millions de tonnes d'azote par les biofilms du genre *Rhizobium* permet leur symbiose avec les Fabacées (anciennement légumineuses) et favorise le développement de la flore terrestre. (5) D'autre part, les biofilms sont retrouvés sur des substrats abiotiques quels qu'ils soient (canalisation, fonds marins, rochers, pièces de monnaie, téléphone portable, claviers d'ordinateur... les surfaces des salles de bains de par leur humidité étant de véritables incubateurs à biofilm). Enfin certains biofilms n'ont pas vraiment de support, c'est le cas des floccs qui correspondent à des agglomérations de bactéries en suspension que l'on retrouve dans les stations d'épuration à boues activées pour traiter les eaux usées. (5)

1.3.3 La diversité de configuration

La forme de biofilm la plus communément étudiée jusqu'alors correspond à une structure dite en champignon. Elle a primitivement été décrite lors de l'étude de *P. aeruginosa* dans les années 90. (19) Cependant à chaque espèce correspond son biofilm. Si généralement les biofilms ont une épaisseur moyenne de 30 μm , certaines espèces sont à l'origine de biofilms aplatis, soit homogènes soit troués (et donc plus ou moins poreux) ou bien en forme de ruban ou d'algue. D'autres, comme chez certaines espèces de *Bacillus*, peuvent acquérir une épaisseur très conséquente allant jusqu'à 350 μm . (5) Même au sein d'une unique espèce,

l'aspect du biofilm peut être différent selon les souches. Enfin, l'épaisseur du biofilm dépend de sa maturité, les très jeunes biofilms sont constitués d'une seule couche alors que des stratifications apparaissent chez les plus anciens. Cependant la majorité des biofilms sont multi-espèces, cette biodiversité est également un facteur augmentant l'épaisseur du biofilm. (20) Par ailleurs, la forme du biofilm et sa rugosité dépendent de son environnement (nutriments, température, forces hydrodynamiques...). Les forces de cisaillement par exemple module le biofilm, plus elles sont fortes, plus la densité du biofilm augmente, et moins le biofilm est épais. (21) La figure 9 nous montre l'impact de ces forces de cisaillement sur l'expansion du biofilm en termes de superficie, majoritairement dans le sens d'écoulement du fluide selon sa vitesse de déplacement. (22)

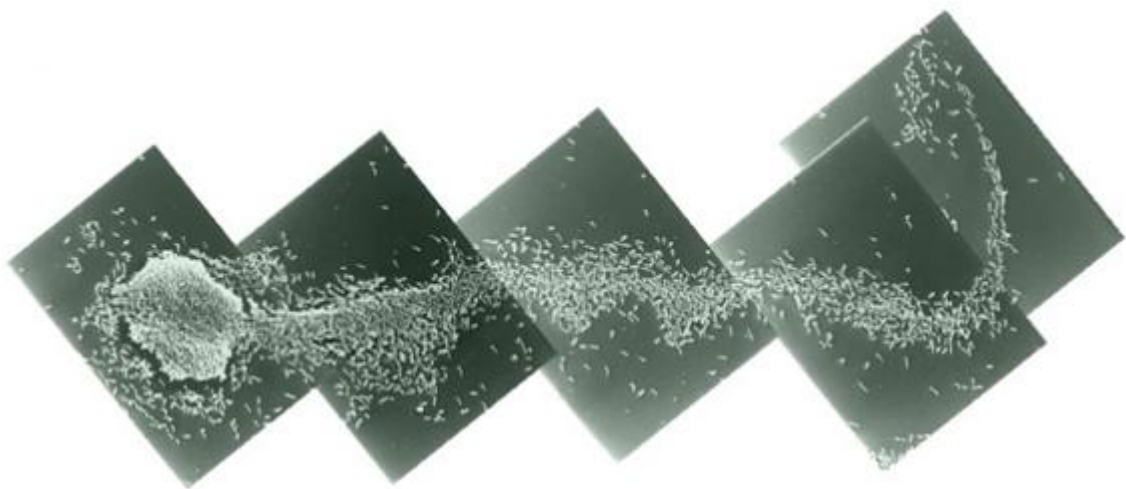


Figure 9 : Biofilm de *P. aeruginosa* dans un flux à 1 m/s de gauche à droite (23)

1.4 Epidémiologie de l'impact des biofilms dans le milieu médical

1.4.1 Epidémiologie et impacts financiers

Les infections aiguës bactériennes et fongiques, causées par des cellules planctoniques, ont largement été étudiées durant les dernières décennies voire siècle. Même si elles tuent encore, le nombre de décès leurs étant attribué a considérablement diminué grâce aux progrès des antibiotiques, vaccins et mesures de prévention. Cependant, suite à l'utilisation massive d'antibiotiques, la médecine est confrontée à 2 défis de taille qui sont d'une part l'augmentation de la résistance aux antibiotiques et d'autre part la récurrence des infections chroniques difficilement traitables, toutes deux liées de façon plus ou moins directe aux biofilms. (24) Tout d'abord, concernant la résistance aux antibiotiques, elle serait à l'origine entre autres en Europe de 25 000 morts annuelles, 23 000 aux Etats Unis, 38 000 en Thaïlande, 58 000 nourrissons en Inde... (25) Au niveau mondial, un rapport adressé à David Cameron en 2015 rédigé par l'ancien économiste Jim O'Neill faisait état de 700 000 morts

par an liés à une résistance aux antibiotiques, mais faisait également une estimation à 10 millions de morts en 2050 dans le monde si rien n'est fait actuellement. (26) De plus, l'augmentation croissante du nombre de bactéries multi-résistantes, mais également hautement résistantes, laissait planer l'angoisse de l'apparition de bactéries résistantes à l'ensemble de l'arsenal thérapeutique, et ce, jusqu'en septembre 2016 date à laquelle une patiente de 70 ans est finalement décédée des suites d'une infection à *Klebsiella pneumoniae* résistante à 26 antibiotiques différents (incluant tous les aminosides, les polymyxines, les carbapénèmes ainsi que la tigécycline). (27) Quant aux infections chroniques, ce serait environ 17 millions de personnes aux Etats Unis qui seraient affectées chaque année, entraînant plus de 500 000 morts. (3) Quelle est alors la place des biofilms dans toutes ces problématiques ? Selon le WUWHS (World Union of Wound Healing Societies), les biofilms seraient impliqués dans 60 à 100 % des plaies chroniques. (28,29) De façon plus générale, selon le CDC (Center for Disease Control), 65 % des infections auraient pour origine un biofilm, le NIH (National Institutes of Health) lui, avancerait des chiffres plutôt autour des 80 %. Enfin, les biofilms sont responsables d'un certain nombre d'infections nosocomiales. En France, d'après une étude de l'Institut National de Veille Sanitaire de 2012, c'est environ 5 % des patients hospitalisés qui subissent une infection nosocomiale, soit approximativement 750 000 infections par an, à l'origine de 4000 décès directement liés. (30) L'incidence varie selon le type d'établissement, le type de séjour (fréquence des gestes invasifs), la durée du séjour (le risque augmentant avec la durée), et enfin selon le profil du patient (les âges extrêmes, les immunodéprimés...étant plus fragiles). (30) En Europe c'est 7,1 %, soit environ 4,1 millions de patients qui sont victimes d'une infection associée aux soins (ne tenant pas compte du lieu d'acquisition à la différence des infections nosocomiales) dont 37 000 morts sont directement liées, et contribue également à 110 000 décès additionnels. (31) Les études actuelles suggèrent que les biofilms seraient responsables à hauteur de 65 % de ces infections nosocomiales. (32,33) Enfin, selon le programme européen BALI (biofilm alliance), chez l'ensemble des patients recevant un implant (implant dentaire, prothèse, broches, vis et plaques lors de fractures etc...), c'est approximativement 3 % de ces patients qui développent une infection associée à un biofilm. (34)

L'impact financier global est relativement difficile à établir, en tout état de cause, il s'élève à plusieurs dizaines de milliards de dollars ou d'euros. Par exemple, en 2007 aux Etats Unis, le CDC estimait que 1,7 millions d'infections annuelles étaient attribuables à des biofilms et engendraient 11 milliards de dollars de dépenses supplémentaires de frais de santé, et que les infections impliquant des biofilms étaient à l'origine d'un coût annuel non officiel de 94

milliards de dollars. (35) Autre exemple, au Royaume Uni, il y aurait 200 000 patients qui souffrent de plaies chroniques, à l'origine de 2 à 3 milliards de livres de dépenses annuelles, soit pas moins de 3 % du budget annuel de la santé. Par ailleurs, en 2011 aux USA, Sohail et son équipe ont analysé sur une année la mortalité et les dépenses de santé d'une cohorte de 200 219 patients possédant un dispositif médical électronique cardiovasculaire implantable (pacemaker, dispositifs de resynchronisation etc...). (36) Il a été relevé 5 817 complications infectieuses (soit 2,9 %) avec une mortalité à l'admission allant de 4,6 à 11,3 %, et une mortalité à long terme allant de 26,5 à 35,1 %. Les coûts individuels par complication infectieuse allant de 28 676 \$ à 53 349 \$ selon le type de DM, la durée d'hospitalisation etc... Enfin, Klouche et son équipe en France en 2010 ont évalué le coût de la prise en charge d'une prothèse totale de hanche infectée par un biofilm. (37) Il s'avère que cette reprise coûte environ 32 500 €, soit 3,6 fois plus que la pose initiale de la prothèse (environ 9 000 €). Ces chiffres ne prennent pas en compte les journées de travail perdues ainsi que l'altération de la qualité de vie. Enfin, concernant l'Europe, en 2008 une méta-analyse à propos des infections systémiques liées aux cathéters dans les unités de soins intensifs de France, Allemagne, Italie et Royaume-Uni a mis en évidence des dépenses annuelles allant de 35,9 à 163,9 millions d'euros. L'amplitude de variation étant due à l'hétérogénéité d'une part de la qualité des études épidémiologiques, et d'autres parts aux pratiques cliniques nationales. (38)

1.4.2 Facteurs de risques :

Ce qui explique ces taux importants de pathogénicité des biofilms, c'est leurs capacités à se développer de façon ubiquitaire, sur des surfaces et des localisations anatomiques très diversifiées, aussi bien sur les matériaux synthétiques des dispositifs médicaux, que sur des tissus vivants. La figure 10 nous donne un aperçu des localisations possibles sur lesquelles des biofilms peuvent être retrouvés.

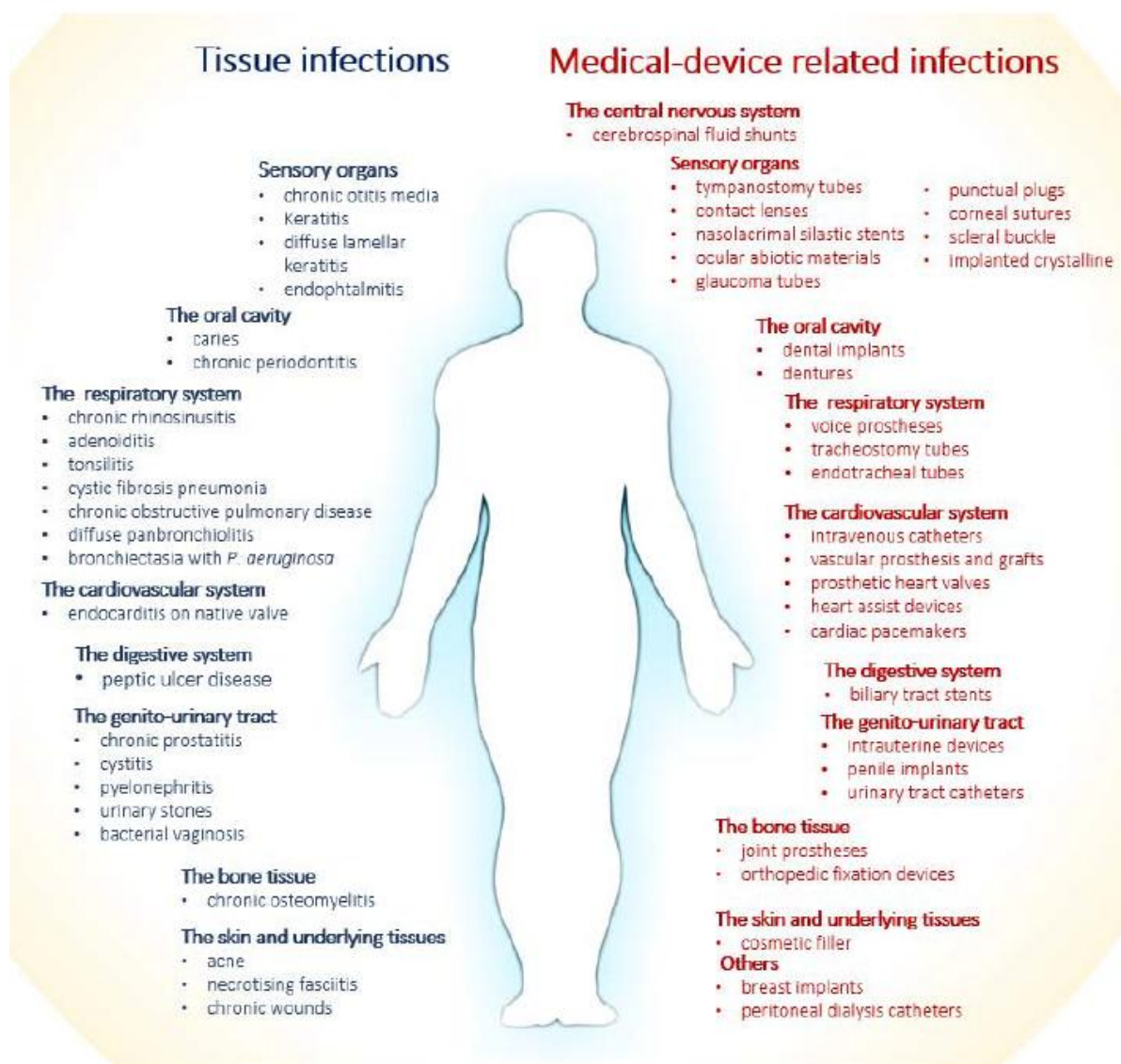


Figure 10 : représentation schématique des infections à biofilm sur tissus natifs versus dispositif médical (3)

Il existe des facteurs de risques favorisant les infections à biofilm. Tout d'abord des facteurs intrinsèques aux patients, notamment les personnes âgées et ceux présentant une altération de leurs défenses immunitaires. Certaines catégories de patients immunocompétents avec une prédisposition génétique (comme pour la mucoviscidose) ou des altérations vasculaires (ulcères veineux ou artériel, pieds diabétique, escarres...) sont également défavorisés. (3) Les biofilms ont la faculté de pouvoir se développer sur les tissus de quasiment l'ensemble du corps humain, et sont fréquemment associés à des maladies chroniques, telle que dans la cavité orale (parodontite, caries...), le tractus respiratoire (rhinosinusite chronique, mucoviscidose, broncho-pneumopathie obstructive...), le système cardiovasculaire (endocardite sur valve native), le tractus génito-urinaire (prostatite chronique, cystites récidivantes, calculs rénaux...), sur les organes sensoriels (otites chroniques, kératites...), sur la peau et les tissus sous cutanés (l'acné, les blessures chroniques) et ainsi de suite... (3)

Ensuite des facteurs extrinsèques aux patients augmentent les risques d'infection à biofilm. Sont concernés tous les dispositifs médicaux et particulièrement ceux destinés à être implantés sur le long terme. Nous retrouvons alors les mêmes localisations anatomiques, mais sur matériel synthétique : la cavité buccale (les implants dentaires, les dentiers), le tractus respiratoire (les tubes endotrachéaux et autres dispositifs), le système cardiovasculaire (les cathéters veineux périphériques ou centraux, les chambres implantables, les valves cardiaques mécaniques, les stents...), le tractus génito-urinaire (les sondes à demeure...), sur les organes sensoriels (les lentilles de contact, les embouts des flacons, les aérateurs tympaniques...), toutes les prothèses osseuse etc... (3) Bien souvent, le patient s'infecte via sa propre flore commensale ou digestive. Si en revanche certains biofilms peuvent être délétères, d'autres sont très largement bénéfiques, c'est le cas sur la muqueuse digestive et vaginale, ainsi que sur l'épiderme. (3)

1.4.3 Exemples de pathologies liées à un biofilm

1.4.3.1 La parodontite :

La parodontite est l'une des affections inflammatoires chroniques la plus fréquente chez l'Homme. Selon l'union française pour la santé bucco-dentaire, plus de 50 % des européens souffriraient de parodontite, dont plus de 10 % auraient une forme sévère à l'origine du déchaussement des dents. La prévalence de la maladie parodontale pouvant grimper entre 70 et 85 % dans la tranche d'âge 60-65 ans. (39)

L'origine du problème est due à un biofilm. Effectivement, lors de l'arrêt de toute hygiène dentaire, un biofilm commence à se former dès les premières 24 heures avec tout d'abord l'adhésion réversible de certaines bactéries sur la pellicule salivaire qui recouvre les dents et les muqueuses. Puis s'enchainent logiquement les autres étapes (adhésion irréversible, recrutement d'autres bactéries ou levures, production de la MEC...). (3) Après environ 48 heures, le biofilm commence à devenir difficile à éliminer, néanmoins, un brossage de dents dans cet intervalle permet de maintenir un taux d'agents pathogènes compatible avec une relative bonne santé gingivale. Après 7 à 9 jours, le biofilm dentaire commence à se minéraliser pour se transformer en tartre et devient hautement adhérent, entraînant dans un premier temps une gingivite marquée par des gencives tuméfiées, saignant au moindre contact. C'est le premier stade de la maladie parodontale. A ce stade, le problème est réversible car l'os et le tissu conjonctif des dents ne sont pas encore atteints. Seulement, avec le temps, la gencive se rétracte et se décolle peu à peu de la dent, les agents pathogènes peuvent alors se propager plus profondément au contact de l'os, entraînant une réaction

inflammatoire, c'est la parodontite, elle correspond au second stade de la maladie parodontale. En cas d'inflammation persistante, une perte progressive du support osseux conduit au déchaussement dentaire qui correspond au dernier stade. (3)

Outre les complications dentaires, la maladie parodontale peut être à l'origine de complications pulmonaires (par inhalation de germes), d'endocardites infectieuses (par dissémination systémique et atteinte des valves), et d'athérosclérose (par induction d'inflammation systémique). Enfin, les diabétiques sont victimes d'un cercle vicieux car ces derniers ont davantage de manifestations sévères de parodontite, et ceux atteints de parodontite présentent plus de difficultés à contrôler leurs taux de glycémie, augmentant les risques de complication. (3)

1.4.3.2 La mucoviscidose :

La mucoviscidose pour rappel, est une maladie génétique autosomale récessive causée par une mutation du gène du canal chlore CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). (3) Plusieurs dizaines de mutations existent, la plus courante étant la délétion delta F508. Selon le type de mutation, l'expression clinique de la mucoviscidose est très polymorphe, il existe 6 classes selon les caractéristiques de la protéine CFTR (non synthétisée, non fonctionnelle, à demie vie réduite etc...) L'altération de ce canal chlore conduit à une diminution de sécrétion des ions chlorure associée à une augmentation d'absorption de sodium et d'eau ce qui a pour conséquence de produire un mucus déshydraté, épais et visqueux. Trop épais, le mucus pulmonaire stagne et crée un environnement propice aux infections, notamment bactériennes. (40) La prise en charge des épisodes d'exacerbation s'effectue entre autre par une antibiothérapie agressive, mais avec le temps, l'efficacité devient limitée à cause de la formation de biofilms qui favorisent des résistances aux antibiotiques. La colonisation des bactéries devient chronique grâce à la protection du biofilm, ce qui provoque une inflammation qui conduit progressivement à la destruction des tissus pulmonaires et une dégradation de la fonction respiratoire, ce qui représente la principale cause de décès (80-95 % des patients décédés).

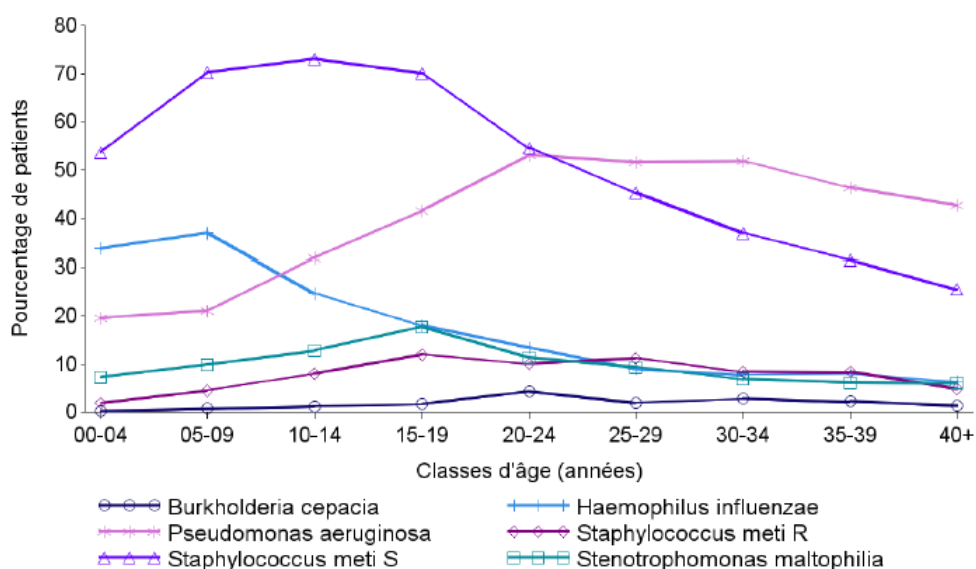


Figure 11 : bactéries cliniquement importantes par classe d'âge (41)

La figure 11 nous présente les bactéries cliniquement responsables de cette dégradation pulmonaire. *S. aureus* et *H. influenzae* sont majoritairement présents dans l'enfance, puis chez l'adulte, c'est *P. aeruginosa* qui est principalement retrouvé.

1.4.3.3 Les plaies chroniques :

Une plaie devient chronique lorsqu'aucun signe de cicatrisation n'apparaît après 4 à 12 semaines malgré une prise en charge appropriée. Les causes sont principalement une artériopathie oblitérante des membres inférieurs à l'origine des ulcères artériels, une insuffisance veineuse chronique favorisant les ulcères veineux, une pression chronique notamment chez les patients alités entraînant l'apparition d'escarres, et enfin des troubles métaboliques comme le diabète avec le malheureux pied du diabétique et son mal perforant plantaire. (3) D'autres plaies chroniques existent comme les plaies tumorales, ainsi que les moignons d'amputation. Même si les données épidémiologiques sont limitées, ce serait environ 6,5 millions d'américains, 200 000 anglais, et plus de 2 millions de français qui souffriraient de plaies chroniques. (3,42) Ces plaies sont sources d'inconfort, de douleur, d'altération de la qualité de vie ainsi que de l'autonomie, de porte d'entrée d'agents infectieux et parfois de honte. Devant le caractère persistant, il peut exister une part de découragement chez les soignants et les patients. De plus, devant l'augmentation des taux de patients diabétiques, de la sédentarité, et du vieillissement de la population, la prévalence des plaies chroniques ne cesse d'augmenter. La guérison d'une plaie est un processus dynamique qui comprend un enchaînement successif de 3 principales étapes. La phase inflammatoire qui ne dure que quelques jours, suivie d'une phase de prolifération tissulaire (apparition d'un tissu de granulation, angiogénèse, bourgeonnement, re-épithélialisation) et enfin d'une réorganisation

tissulaire. La physiopathologie de la chronicité d'une plaie est essentiellement due à la persistance d'une inflammation locale provoquée par la rémanence d'un biofilm. (3) La persistance d'un biofilm cause en effet le blocage du processus de cicatrisation en phase inflammatoire via la formation d'un infiltrat leucocytaire. Cette réaction inflammatoire a pour but d'éliminer le biofilm, en sécrétant de grandes quantités d'espèces activées de l'oxygène ainsi que des protéases pour rompre les liens entre le tissu et le biofilm. Cependant, ces composés ne sont pas spécifiques et attaquent les tissus sains. L'hypothèse avancée est que la réponse inflammatoire serait bénéfique pour le biofilm, car d'une part elle est inefficace car le biofilm permet de protéger les cellules en son sein, et d'autre part elle stimulerait la production d'exsudat, offrant un flux continu de nutriments pour le biofilm. (43). Les microorganismes les plus fréquemment rencontrés sont : le genre *Staphylococcus* (*aureus* et *epidermidis*), *P. aeruginosa*, et *E. faecalis*. (3) Si les biofilms ne sont pas l'unique raison des plaies chroniques, ils n'en sont pas moins responsables puisque ils sont retrouvés, selon les études, entre 60 et 100 % des plaies chroniques, et seulement dans 6 % des plaies aiguës. (44) Cependant, la présence de bactéries dans le lit de la plaie n'est pas forcément négatif, la colonisation bactérienne faisant partie intégrante du processus de cicatrisation, il faut respecter l'écosystème bactérien de la plaie. En effet lors de la phase de détersion de la plaie, il y a une disparition des cocci à Gram positif au profit des bacilles à Gram négatif. Puis lors de la phase de prolifération tissulaire, les cocci à Gram positif commencent à réapparaître, pour au final, durant la cicatrisation redevenir majoritaires. (45) Le meilleur moyen de guérison d'une plaie due à un biofilm passe d'une part par la limitation de la charge du biofilm par débridement fréquents et d'autre part par des mesures de prévention (lavage des mains, port de masque, pansements fermés...) afin de prévenir la reconstitution du biofilm. L'utilisation des antiseptiques au long cours est controversée, et serait plutôt déconseillée car ils pourraient retarder le processus de cicatrisation en exerçant un effet cytotoxique sur les kératinocytes ainsi que sur les fibroblastes. Ils sont également responsables d'intolérances, d'allergies et ils sont contre indiqués avec plusieurs types de pansements (les alginates, hydrocolloïde, hydrocellulaire et pansements à l'argent). Actuellement, il existe un fort consensus de la part d'experts de diminuer voire supprimer l'usage d'antiseptiques lors de la prise en charge des plaies chroniques. L'antisepsie est davantage préconisée lors de la période initiale de la plaie afin de supprimer la flore résiduelle, et surtout d'éliminer les contaminations exogènes. (46)

1.4.3.4 Les biofilms sur dispositifs médicaux implantables

Les infections associées aux soins, dues aux dispositifs médicaux implantables représentent un fardeau pour les équipes médicales avec une morbidité et une mortalité significative. Immédiatement après l'insertion du dispositif médical (DM), les composés tissulaires recouvrent rapidement la surface du DM (protéines, plaquettes, fibres de collagène...) formant un film conditionnant sur lequel les microorganismes vont adhérer de façon réversible dans un premier temps. (3) Cette phase est probablement la plus importante car plus les microorganismes vont avoir de facilité à adhérer sur le DM plus le risque de biofilm mature ultérieur est grand. Les propriétés physicochimiques de surfaces sont donc essentielles (forces électrostatiques, liaisons de Van der Waals, propriétés hydrophobes...) ce qui induit actuellement beaucoup de recherche sur de nouveaux nanomatériaux pour fabriquer les DM limitant la formation de biofilms. Enfin, les caractéristiques du liquide ou tissu auquel est exposé le DM influence la formation de biofilm. Une fois mature, d'autres facteurs influencent le biofilm (température locale, taux de nutriments, concentration de substances toxiques, forces de cisaillement...). Enfin, la pérennité du biofilm est favorisée par le DM lui-même car les leucocytes de l'hôte ne peuvent intervenir que sur la surface du biofilm, et leur capacité de phagocytose reste très limitée à cause de la MEC. (47) La fréquence des complications sur DM est très variable selon le type de DM et de la localisation. Parmi toutes les causes d'infection à biofilm liée à un DM, les infections du tractus respiratoire profond des patients sous assistance ventilatoire représentent 22,8 % des cas. En seconde position se placent les infections à biofilms sur sonde urinaire qui représentent 17,2 % des cas. (3) De façon plus détaillée, dans les 2 premières semaines, près de 50 % des sondes urinaires sont colonisées par un biofilm. (48) En plus des risques de pyélonéphrite et de septicémie, la figure 12 nous montre le risque éventuel d'obstruction de la sonde par formation d'un biofilm dit cristallin.



Figure 12 : exemple de formation d'un biofilm cristallin sur une sonde urinaire (48)

En effet, certaines bactéries, comme *Proteus mirabilis*, possèdent des uréases qui transforment l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone. L'ammoniac ainsi libéré provoque une augmentation du pH aux alentours du biofilm, ce qui induit la formation de cristaux qui risquent d'obstruer la sonde. De plus les cristaux peuvent s'enclaver dans le biofilm, d'où leur nom de biofilm cristallin. (49)

Tableau 1 : principaux DM implantés annuellement aux USA et risques infectieux associés (12)

	Nombre de dispositifs implantés par an	Incidence ou prévalence de l'infection
Cathéters urinaires	> 30 000 000	5 % par jour de sondage
Cathéters vasculaires	5 000 000	
• Cathéters de longue durée	> 500 000	
Chambres implantables	400 000	0,5/1 000 jours
Cathéters d'hémodialyse	> 250 000	2/1 000 jours
Cathéters tunnellisés	> 100 000	1-2/1 000 jours
• Cathéters de courte durée		
Cathéters périphériques	ND	0,5/1 000 jours
Cathéters veineux centraux	> 4 000 000	1/1 000 jours
Dispositifs orthopédiques		
Matériels d'ostéosynthèse	2 000 000	5 à 10 %
Prothèses articulaires	600 000	1 à 2 %
Implants dentaires	1 000 000	5 à 10 %
Matériel intracardiaque		
Stimulateurs/défibrillateurs	300 000	1 à 2 %
Valves cardiaques mécaniques	85 000	1 à 3 %
Assistance circulatoire	700	Jusqu'à 50 %
Prothèses vasculaires	450 000	1 à 10 %
Implants mammaires	130 000	1 à 2 %
Matériel neurochirurgical		
Dérivation ventriculaire externe	122 000	~10 %
Dérivation ventriculo-péritonéale	18 000	25 %
Stimulateur intracérébral	ND	4 %

Enfin, les infections à biofilm suite à un acte chirurgical (plaie chirurgicale, prothèses, valves cardiaques...) représentent 15,7 % des cas. Les microorganismes les plus fréquemment impliqués sont des bactéries à Gram positif (*S. aureus*, *S. epidermidis* et *E. faecalis*), des bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* et *P. aeruginosa*) ainsi que des levures (particulièrement *C. albicans*). (50) Outre l'effet néfaste local du biofilm, le détachement de cellules peut être à l'origine d'infections systémiques, en particulier si le système immunitaire de l'hôte est altéré. Par ailleurs, il subsiste le risque de formation d'embolies par détachement de fragments entier de biofilm et de tissus. C'est le cas lors de certaines endocardites infectieuses par exemple, lorsqu'un fragment d'une végétation d'une valve se détache et part se bloquer dans une artère cérébrale. (3)

La prise en charge la plus appropriée d'infection à biofilm sur DM reste l'excision du DM impliqué, lorsque cela reste possible. Compte tenu de l'impact financier de ces infections, ne

nombreuses recherches sont menées avec différentes stratégies pour éviter la formation de ces biofilms liés à l'utilisation de DM.

1.5 Les paramètres modulant l'apparition des biofilms

L'apparition d'un biofilm semble inévitable à partir du moment que sont réunis : des micro-organismes, des éléments nutritifs, de l'eau ainsi qu'une surface (ou interface). (5) Les phases précoces de formation du biofilm (notamment l'adhésion) sont probablement les plus importantes car une fois initié, le développement du biofilm suit logiquement sa croissance, devenant avec le temps de plus en plus résistant, protégé par sa MEC. Ainsi, de nombreuses recherches actuelles portent sur la fabrication de biomatériaux altérant la formation de biofilms à leur surface.

Trois grands paramètres influencent le développement d'un biofilm (51) : tout d'abord le phénotype cellulaire (selon le genre, l'espèce, la souche, l'expression de certains gènes codant pour des adhésines par exemple est cruciale) ainsi que le métabolisme bactérien (une cellule métaboliquement inactive qui ne produit donc pas d'adhésine spécifique ni de MEC ne pourra pas à elle seule former de biofilm car le processus s'arrêtera au stade de l'adhésion réversible). Le deuxième est directement lié au type de surface, et surtout sa rugosité. En effet, plus la surface est rugueuse, plus sa superficie potentielle pour un biofilm est importante, et moins les forces mécaniques pourront, dans les anfractuosités, détacher ce biofilm. Il semblerait que la rugosité affecte uniquement le nombre de cellules dans le biofilm, et non pas le type d'espèces présentes. (52) Cette problématique est entre autres très présente en odontologie, des colles et des implants dont la rugosité est suffisamment faible doivent être utilisés afin que le brossage dentaire puisse éliminer les cellules qui ont adhéré quelques heures auparavant. En pratique, la profondeur du motif de rugosité à 0,2 μm correspond à la valeur seuil de la rétention cellulaire. En dessous de cette valeur, il n'y a pas de diminution de l'adhésion, alors qu'au dessus, il y a une augmentation de l'adhésion corrélée à l'accroissement de la rugosité. (52) Enfin le dernier grand paramètre est lié à l'environnement biologique et physico-chimique immédiat. En suspension aqueuse, il est possible de prédire le comportement cellulaire à partir de différentes théories prenant en compte la cinétique du fluide si elle n'est pas nulle, mais aussi la sédimentation, les interactions électrostatiques, les forces de Van der Waals, les interactions hydrophobes, ainsi que les liaisons hydrogènes. La théorie DLVO (des initiales de ses inventeurs Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek) permet d'étudier en partie l'adhésion des micro-organismes. Elle détermine le potentiel total d'interaction entre 2 particules résultant de la somme du potentiel attractif (lié aux forces de Van der Waals) et du potentiel répulsif de double couche électrique (lié aux forces

électrostatiques). La version mise à jour de cette théorie prend en compte d'autres potentiels d'interaction à très court rayon d'action tel que les réactions acide / base de Lewis. (53) Finalement, à quelques exceptions près, les surfaces les plus rugueuses et hydrophobes seront les plus à même d'induire la formation d'un biofilm. (54) Cependant, la situation se complique lorsque l'on considère une surface placée dans un fluide (que ce soit l'océan, la circulation sanguine ou encore le tractus urinaire), car diverses particules en solution ou suspension, tel que des protéines, vont former en quelques secondes une couche recouvrant le dispositif médical. Cette couche (essentiellement protéique) est parfois dénommée film conditionnant. (53) Sur les tissus natifs, elle est présente en permanence. Ce film conditionnant a pour conséquence de masquer et modifier les propriétés de surfaces du biomatériau sous-jacent ce qui rend beaucoup plus compliquée l'étude de l'ensemble des interactions. Les ions dans l'environnement peuvent également moduler l'adhésion. (55) Par exemple les cations divalents favorisent les interactions cellules / substrat, chargés souvent négativement. Le cation forme un pont inter-moléculaire entre le substrat et la cellule via l'interaction électrostatique attractive. Par ailleurs, les forces électrostatiques répulsives sont influencées par la concentration ionique du milieu. L'augmentation de la concentration ionique a pour effet de diminuer les forces électrostatiques répulsives, ce qui réduit alors la distance entre les cellules et le substrat, favorisant ainsi l'adhésion. Une synthèse des facteurs de variation modulant l'apparition des biofilms est présentée sur le tableau 2.

Tableau 2 : synthèse des paramètres modulant l'adhésion cellulaire (56)

Surface morphometry	Macroporosity Microporosity Micro-roughness Nano-roughness
Physico-chemical properties	Surface energy Hydrophilicity/superhydrophilicity Hydrophobicity/superhydrophobicity Hydrophobic functional groups Polar functional groups Charged functional groups Functional groups with specific activities Degree of hydration
Environmental conditions	Electrolytes pH Temperature Host proteins/host adhesins Shear rate/fluid viscosity Fluid flow rate
Pathogen	Gram-positive/Gram-negative Genus/Species Bacterial shape Surface energy Strain type and specific set of expressed adhesins

1.6 L'architecture des biofilms

1.6.1 Répartition des cellules au sein du biofilm :

De par la proximité des cellules du biofilm, de nombreuses interactions influencent les caractéristiques de chaque colonie par l'intermédiaire de ce que l'on peut appeler le « phénotype social ». Nous pouvons définir le phénotype social comme étant tout phénotype qui exerce une action, positive ou négative, sur le développement et la croissance d'autres individus, et qui évolue en partie grâce aux conséquences de son action sur les individus de son entourage. (57) Ces interactions, dites sociales, peuvent être de plusieurs ordres.

Le premier type de relation sociale peut être une forme de coopération. Il peut par exemple exister une sécrétion de « public goods » en anglais, qui correspondent à des molécules sécrétées par une lignée cellulaire, dont les bienfaits ne sont pas uniquement destinés à cette dernière. Ces molécules en question peuvent correspondre à des chélateurs de nutriments, des molécules de signal, des polysaccharides extracellulaires, des enzymes de digestions, etc... qui sont bénéfiques pour la lignée cellulaire qui a sécrété un de ces composés, mais aussi pour les autres cellules du voisinage, si elles sont capables de les utiliser. Ces dernières peuvent être génétiquement identiques à la lignée sécrétrice, ou bien peuvent correspondre à une autre souche ou espèce ou phylum bactérien ou encore fongique. Pour illustrer ceci nous pouvons prendre pour exemple le fer. Le fer est un élément indispensable au développement d'un grand nombre de bactéries, et est souvent retrouvé en quantité limitée dans l'environnement. Pour le capter, certaines bactéries sont capables de produire des peptides de bas poids moléculaires appelées sidérophores, qui permettent de se complexer aux ions Fe^{3+} et d'être ensuite internalisés par la ou les cellules qui en sont capables. (57) Les cellules qui mettent en jeu ce genre de coopération sont logiquement plus aptes que les cellules solitaires, à croître ensemble, à une vitesse supérieure au sein du biofilm et à résister aux menaces et agressions extérieures.

Les relations sociales peuvent également être compétitives lorsque les cellules qui se retrouvent ensemble n'expriment pas de relations harmonieuses. L'évolution a permis la mise en place d'un certain nombre de stratégies compétitives, en allant de phénomènes de croissance et d'assimilation de nutriments de façon plus efficace, jusqu'à la production d'antibiotiques. Certaines souches bactériennes sont capables d'attaquer directement les cellules ennemies, en injectant les antibiotiques dans les cellules adjacentes. (57)

La figure 13 nous présente les conséquences de ces mécanismes de coopération ou compétition qui remodelent la structure du biofilm et impactent la répartition des cellules du

biofilm. Il en résulte une balance entre d'une part la formation de lignées séparées, mais d'autre part la formation d'une mixité au sein de la communauté encastrée dans le biofilm.

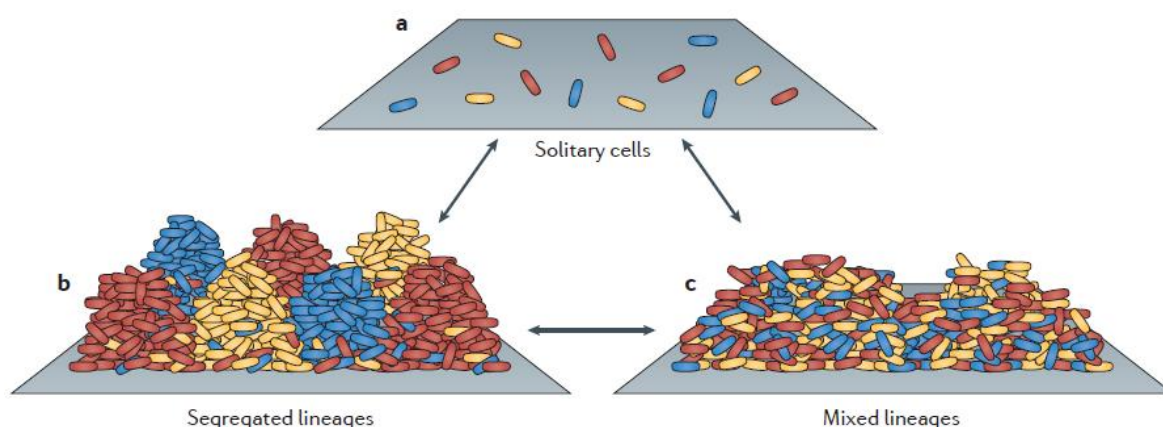


Figure 13 : schématisation de la répartition spatiale des cellules au sein du biofilm (57)

Avant d'aborder l'impact des relations sociales sur la répartition cellulaire, le premier facteur favorisant la ségrégation des lignées cellulaires est dû simplement à la division cellulaire. En effet la division cellulaire mère / fille entraîne une expansion par formation de clusters de cellules côtes à côtes. Ceci est d'autant plus favorisé par l'absence de forces de cisaillement au sein du biofilm, qui pourraient fragiliser les communautés cellulaires encastrées. (57) Dans un second temps, entrent en jeu les relations compétitives via le phénomène d'antagonisme entre espèces, qui favorise la ségrégation des lignées. Ceci peut se dérouler lorsqu'une lignée cellulaire est productrice d'une toxine par exemple, qui lui confère un atout par rapport à toutes les autres espèces et parvient ainsi à prendre l'avantage sur la répartition spatiale et démographique. Vont résister les cellules qui possèdent l'antidote nécessaire à l'inactivation de la toxine mais aussi les cellules éloignées dans le biofilm qui ne seront pas impactées par la toxine à cause de l'existence d'un gradient dégressif de concentration. C'est un des facteurs qui influence la formation de lignées cellulaire distinctes. (57)

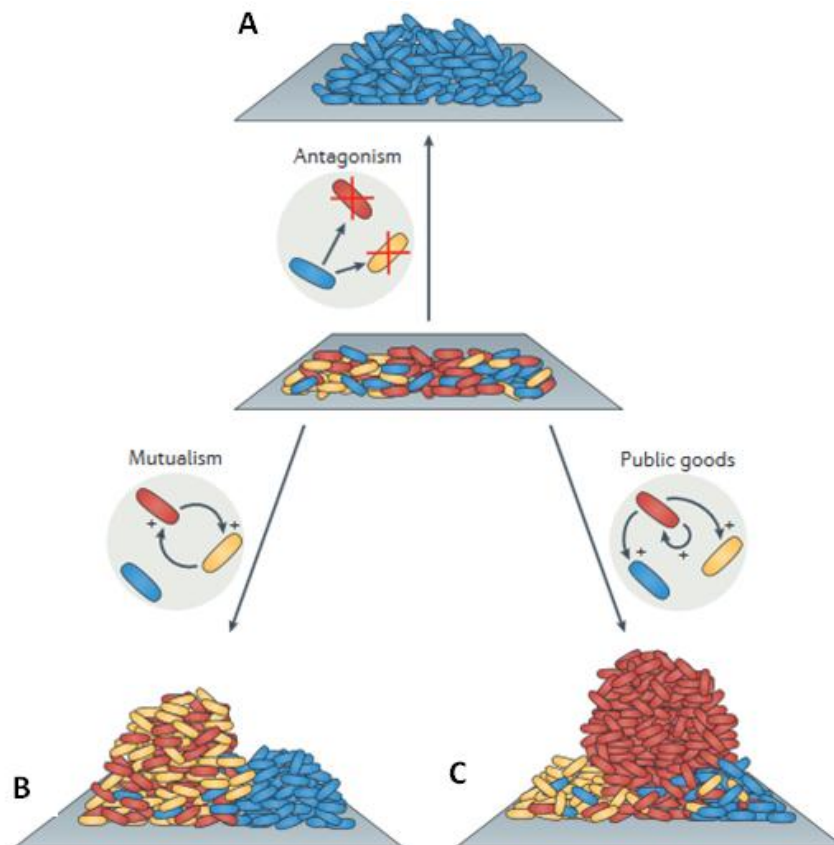


Figure 14 : schématisation du phénomène d'antagonisme (A). Schématisation du phénomène de coopération mutuelle ou unidirectionnelle (B, C). (57)

Comme le montre la figure 14, même si le phénomène d'antagonisme est fréquent, il s'avère que pour la majorité des biofilms, les relations seraient plutôt coopératives, (4) favorisant ainsi la mixité spatiale au sein des biofilms afin de recevoir des avantages de la part des autres microorganismes, via la sécrétion des « public goods ». Plusieurs options sont alors possibles pour illustrer ceci. Il peut exister une symbiose lorsque deux organismes auxotrophes (qui sont incapables de synthétiser un composé organique nécessaire à leur croissance) produisent chacun, un métabolite qui permet de compléter l'autre avec le nutriment indispensable. Les deux lignées cellulaires vont croître ensemble, l'une ne pouvant se passer de l'autre, le bénéfice est mutuel. (57) Il peut exister cependant des avantages unidirectionnels lorsqu'une lignée cellulaire produit un métabolite qui confère un avantage au développement des autres lignées cellulaires voisines, mais qui ne reçoit rien en échange. Ce métabolite en question peut être un déchet produit par la lignée cellulaire principale, qui peut se révéler être une source de carbone pour les lignées adjacentes ce qui va favoriser leur croissance. Dans certains cas, ce mécanisme permet la détoxification de l'environnement facilitant tout de même en retour une meilleure croissance de la lignée principale. (58) Si en revanche le métabolite produit destiné en premier lieu à la lignée cellulaire principale, s'avère être coûteux énergétiquement à produire, et que d'autres lignées cellulaires en profitent sans rien donner en retour, ces

dernières sont alors considérées comme des tricheuses, ou parasites (« cheating strain » en anglais).

Des modélisations informatiques permettent de représenter la répartition cellulaire au sein du biofilm, dans certaines situations qui ont été obtenues expérimentalement. (57)

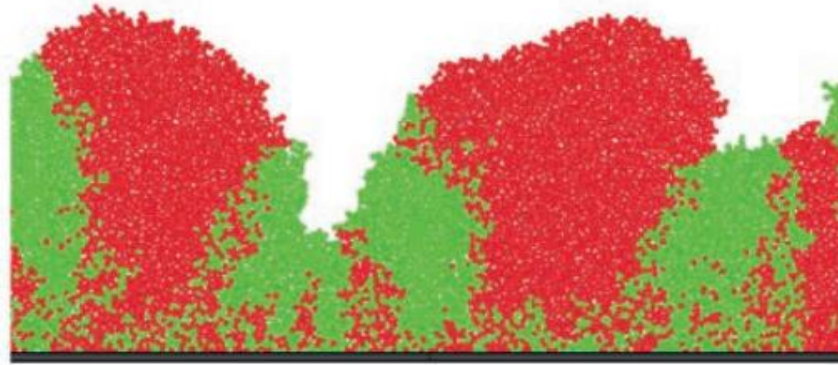


Figure 15 : avantage compétitif de la sécrétion de « public goods » (57)

La figure 15 met en évidence l'avantage compétitif conféré par la sécrétion de « public goods » produits par la lignée cellulaire rouge par rapport à la lignée cellulaire verte qui n'est pas productrice, et qui ne possède pas le système adéquate pour en tirer bénéfice. En bas du schéma, les lignées vertes et rouges sont en quantité équivalente, mais nous observons clairement l'avantage spatial et démographique de la lignée rouge au cours de son développement (vers le haut du schéma).



Figure 16 : modélisation du phénomène d'antagonisme (57)

La figure 16 met en évidence la coexistence au sein du biofilm de lignées cellulaires sécrétant des toxines (en noir) avec des cellules sensibles à ces toxines (en orange) ainsi que des cellules quiescentes en gris. On observe ici un phénomène d'antagonisme puisqu'effectivement la lignée orange est capable de proliférer uniquement lorsque la lignée

sécrétrice de toxine ne se situe pas dans le proche entourage ce qui provoque la ségrégation des lignées. D'autre part les cellules se trouvant à l'état quiescent ne sont pas impactées par la toxine puisque leur fonctionnement cellulaire est au repos, elles correspondent aux cellules dormantes que l'on retrouve nichées au fond des biofilms.

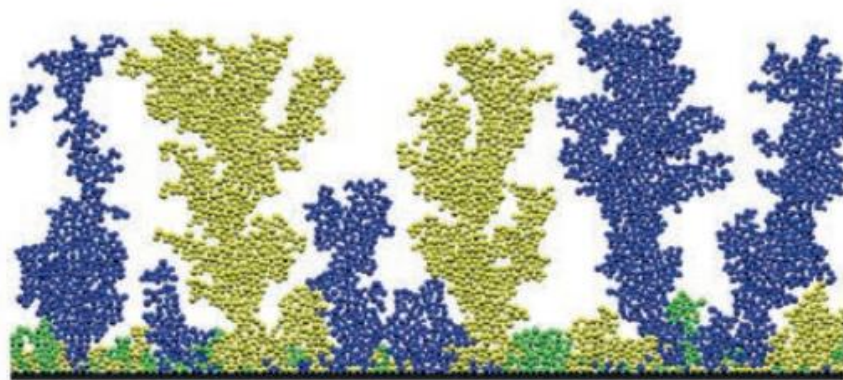


Figure 17 : coopération versus compétition (57)

La figure 17 met en évidence l'impact de la balance entre coopération et compétition. Les lignées bleues et jaunes possèdent un mécanisme de coopération faible par rapport à l'antagonisme qui existe entre ces deux lignées. La lignée verte n'est pas capable d'exprimer des signaux pouvant induire un phénomène de coopération. Lorsque le phénomène de compétition est plus fort, on observe une séparation des lignées aux extrémités de la zone de croissance (vers le haut du schéma) alors que la lignée verte est complètement étouffée par les deux autres lignées cellulaires, ceci grâce à la coopération cellulaire entre la lignée bleue et jaune, qui, même étant faible, est suffisante pour prendre l'avantage sur la lignée verte.

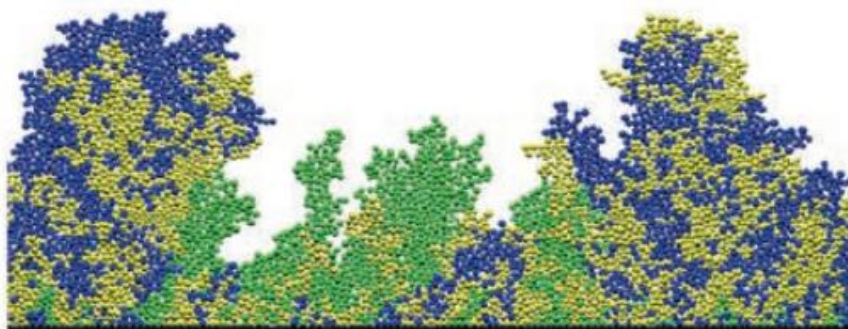


Figure 18 : coopération versus compétition (57)

La figure 18 montre également l'impact de la balance entre coopération et compétition, mais à l'inverse de la précédente le phénomène de coopération entre les lignées bleues et jaunes a plus d'importance que le phénomène de compétition ce qui induit la mixité cellulaire. Ainsi,

nous observons que les lignées cellulaires qui expriment entre elles un phénomène de coopération s'associent mutuellement dans l'espace, en excluant les lignées qui ne possèdent pas de mécanisme de coopération jusqu'à les submerger.

Ces hypothèses expliquant les mécanismes de répartition des cellules au sein des biofilm sont sans cesse contre balancées les unes par rapport aux autres, d'autant plus que les modèles représentés ici sont simplistes par rapport à la réalité puisque bien souvent les biofilms sont composés d'un nombre bien plus important de lignées cellulaires. (11) Les remaniements sont constants, modifiant les relations existantes entre les communautés cellulaires.

Par ailleurs, en plus de la mixité et de la ségrégation des lignées cellulaires, il existe une stratification de la répartition cellulaire au sein du biofilm, qui est facilement explicable par les différents gradients qui peuvent coexister, tels qu'ils peuvent être représentés sur la figure 19.

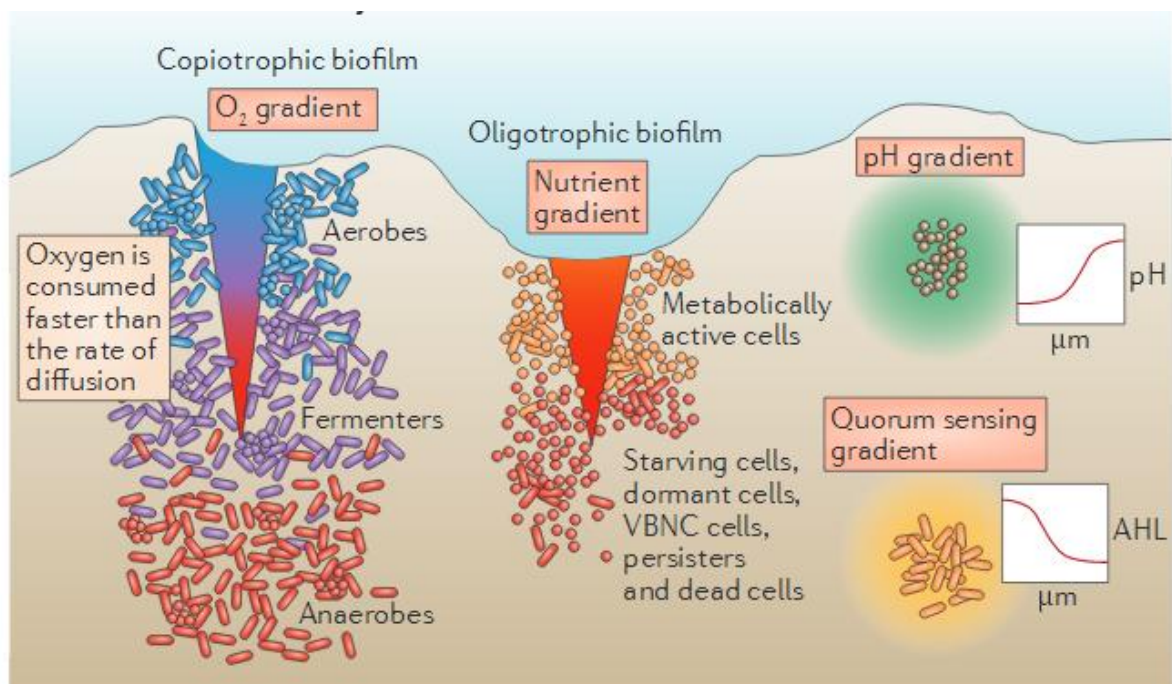


Figure 19 : les différents facteurs à l'origine de la stratification cellulaire (4)

La MEC du biofilm altère la diffusion des solutés et crée ainsi des gradients de concentration relativement stables à l'origine de différents habitats dans le biofilm. Sur la gauche du schéma est représenté un biofilm dont l'abondance des nutriments n'est pas un facteur limitant de la croissance, à l'inverse du dioxygène. En effet, ce dernier diffuse dans l'épaisseur du biofilm, mais la vitesse de diffusion est plus lente que sa vitesse de consommation par les cellules. Ainsi, les cellules aérobies se répartissent plutôt à la surface du biofilm, puis lorsque la respiration cellulaire devient très limitée, les cellules utilisent la fermentation comme système

de production d'énergie. Enfin au fond du biofilm là où le dioxygène est absent, se retrouvent des cellules anaérobies. De façon similaire dans un biofilm où ce sont les nutriments qui sont en quantité limitée, un gradient est inévitablement créé, conduisant à une déplétion de nutriments dans les couches profondes du biofilm. Ainsi, les cellules proches de la surface vont posséder une activité enzymatique intense, alors que plus profondément se trouvent des cellules avides de nutriments, certaines se mettent dans un état de dormance, d'autres sont viables mais non cultivables, enfin certaines sont mortes. D'autres gradients influencent ces phénomènes de stratification comme les gradients de pH, de molécules de signalisation du Quorum Sensing (QS), de déchets cellulaires etc...

1.6.2 La MEC

La MEC est un mélange complexe de composés en solution ou en suspension dans le composant majoritaire de la matrice, qu'est l'eau. En effet l'eau, présente à plus de 97 %, joue le rôle de solvant. (4) Les communautés microbiennes sécrètent alors d'une part des composés hydrosolubles, telles que des substances polymériques comme certains polysaccharides permettant entre autre de gélifier la phase continue, des protéines ainsi que de l'ADN, ou bien des substances non polymériques comme des ions. Des composés insolubles se retrouvent également en suspension comme des fibres amyloïdes, de la cellulose, pili (ou fimbriae), ou encore flagelles. (59) Au milieu de tout ceci se trouvent des canaux permettant de faciliter les échanges au sein du biofilm. Cependant la composition de la MEC est très variable et dépend des microorganismes présents dans le biofilm, des phénomènes de coopération et compétition, des gradients de concentration de divers solutés, des forces de cisaillement etc...

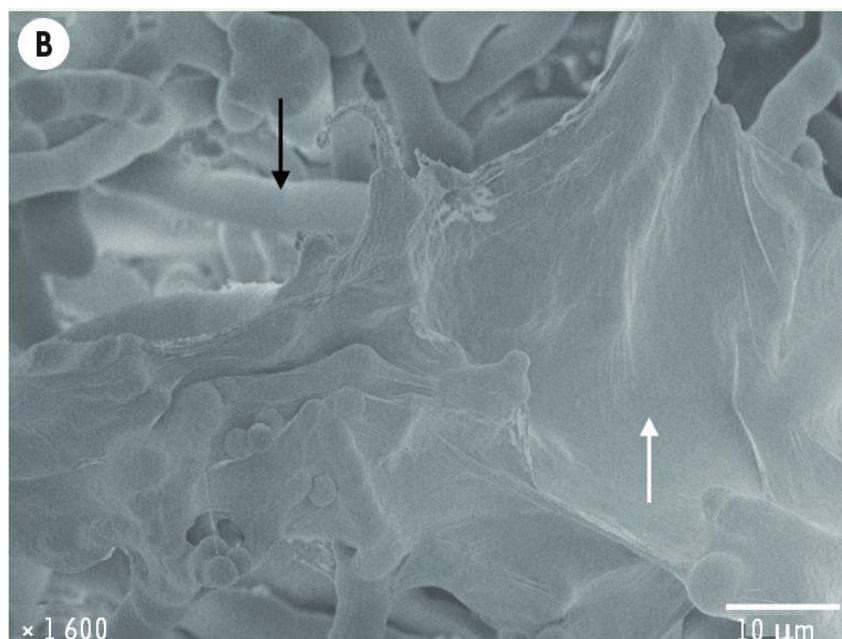


Figure 20 : biofilm d'*A. fumigatus* montrant la MEC (flèche blanche) enveloppant les hyphes (flèche noire) (60)

1.6.2.1 Les polysaccharides :

Les différents polysaccharides que l'on retrouve dans la MEC sont nombreux et possèdent diverses caractéristiques physicochimiques capables de fournir plusieurs avantages aux cellules du biofilm. Beaucoup de ces polysaccharides sont polyanioniques mais certains sont neutres ou polycationiques. Ce sont des homo ou hétéro polymères composés d'une longue chaîne carbonée à motifs répétés allant de $0,5$ à $2,0 \times 10^6$ Da. (61) Nous pouvons différencier trois principaux avantages fournis par les polysaccharides, le premier étant de favoriser l'adhésion au sens général en jouant le rôle de « glue », que ce soit lors de la phase d'attachement initial des cellules, ou bien par la formation d'un hydrogel stabilisant les interactions cellulaires dans le biofilm, ou bien lors de la phase de détachement durant laquelle la désorganisation de ces polysaccharides permet de libérer des cellules dans l'environnement pour former un biofilm plus loin. (62) Chez la plupart des espèces bactériennes étudiées, les polysaccharides permettant l'adhésion comportent le même homopolymère (β -1-6 2-amino-2-désoxy-d-glucopyranosyl) présenté sur la figure 21, avec des degrés de N-acétylation, O-succinilation et des poids moléculaires variables.

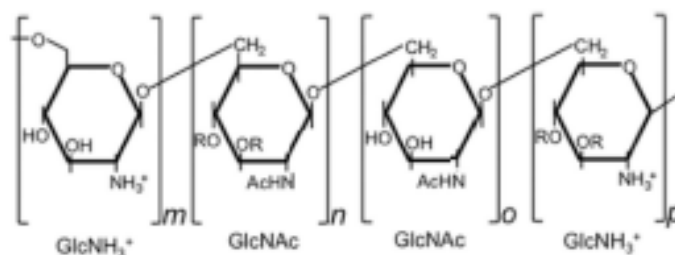


Figure 21 : motif structural des polysaccharides d'adhésion intercellulaire (62)

Le deuxième avantage induit par les polysaccharides consiste en la protection contre les menaces extérieures. En effet, les fibres polymériques formant un maillage tridimensionnel, la diffusion des antibiotiques est altérée voire complètement stoppée pour certains. D'autre part, les polysaccharides permettent de diminuer la détectabilité des organismes du biofilm par le système immunitaire, mais également altèrent le phénomène de phagocytose ainsi que l'action du système du complément de l'hôte. (63) Enfin, par leurs propriétés humectantes, les polysaccharides permettent de retenir de grandes quantités d'eau, protégeant ainsi la communauté cellulaire de la dessiccation. (4)

Enfin le dernier avantage est médié par le rôle architectural des polysaccharides. En effet, ils permettent de créer des gradients de concentration de nutriments, de dioxygène, de signaux de communication, de déchets cellulaires ou encore de pH ce qui induit une hétérogénéité des habitats possibles, provoquant une stratification des populations cellulaires dans le biofilm comme nous l'avons vu précédemment.

1.6.2.2 Les protéines :

Elles sont constamment produites et dégradées en réponse aux changements de conditions dans le biofilm. Dans la MEC, nous retrouvons des protéines sécrétées par les cellules, des protéines qui sont issues de la lyse cellulaire, mais aussi des protéines associées aux membranes de vésicules de sécrétion. (64) Ces protéines peuvent revêtir de multiples rôles.

- Ce peut être des enzymes, capables d'assimiler des nutriments, qui sont parfois considérées comme un système digestif extracellulaire commun à plusieurs cellules voisines. Si les substrats de ces enzymes sont des fibres de collagène ou d'élastine, alors ces enzymes peuvent jouer le rôle de facteur de virulence, en induisant une digestion des tissus de l'hôte associée à une réaction inflammatoire.

- Une autre propriété des protéines est la possibilité de formation de liaisons électrostatiques avec certains polymères de la MEC, augmentant ainsi la robustesse des fibres, ce qui induit une résistance à la digestion enzymatique, à la dessiccation et à la dénaturation thermique. Ces phénomènes ont été observés entre autres chez *Pseudomonas aeruginosa*. (65)
- Dans certains biofilms, les protéines peuvent également s'agglomérer pour former des fibres amyloïdes insolubles et hautement résistantes aux protéases.
- Enfin, les protéines peuvent entrer en jeu lors de la communication intercellulaire, notamment dans des phénomènes de « QS » qui nécessitent la libération de signaux chimiques, certains pouvant être peptidiques. (66) La communication peut également se dérouler à l'aide de signaux électriques, où des électrons peuvent circuler dans la MEC via des pili formant des nanofilaments protéiques capables d'assurer leur transport. (67,68)

1.6.2.3 L'ADN extracellulaire

L'ADN extracellulaire, composant important de la pathogénésie des biofilms a d'abord été mis en évidence chez *P. aeruginosa*, *S. intermedius*, *S. mutans* puis chez *E. faecalis* et le genre *Staphylococcus*. (69) Cet ADN extracellulaire est principalement issu de l'auto lyse des cellules du biofilm, mais peut également provenir de la lyse cellulaire lors de phénomènes de compétition. De façon surprenante, la présence d'ADN extracellulaire a été mise en évidence dans un jeune biofilm d'*E. faecalis* (<4h post inoculation) qui ne peut avoir pour origine la lyse cellulaire. (70) Une fois dans la MEC, l'ADN peut être capté par les cellules environnantes. Un système enzymatique de recyclage composé de désoxyribonucléases peut alors mettre à profit cette source de phosphore, carbone et énergie, tel qu'il a pu l'être observé chez *P. aeruginosa*. (71) En revanche, l'ADN peut être capté tel quel sous forme de plasmides par les cellules voisines, ceci afin de récupérer l'information génétiques, à l'origine des transferts horizontaux de gènes. Cette acquisition d'information génétique est responsable entre autre de l'acquisition de certaines antibiorésistances par des espèces auparavant sensibles. (72) Enfin, L'ADN extracellulaire peut être impliqué dans l'intégrité de la structure du biofilm. En effet, l'ADN étant chargé négativement, des liaisons électrostatiques peuvent se former avec des polymères cationiques, ce qui renforce positivement le maillage de la MEC. (73)

1.6.2.4 Les lipides

Les lipides sont retrouvés en faible quantité dans la MEC par rapport aux autres composants, de l'ordre de 1 % (74). Leur composition et leurs rôles précis ont été jusqu'à présent peu étudiés. Nous pouvons tout de même retrouver des familles de lipides, tel que des phospholipides, des glycolipides ou des lipides dits neutres sans propriétés tensioactives. Le taux de phospholipides et de sphingolipides par gramme de biomasse est supérieur dans la forme sessile par rapport à la forme planctonique. D'autre part, la proportion de lipides varie en fonction de l'état de développement du biofilm. (75) Il semblerait que les lipides aient un rôle durant la première étape de formation du biofilm, en favorisant l'adhérence sur des surfaces hydrophobes.

1.6.2.5 Les canaux

L'observation par microscopie électronique des biofilms a permis de mettre en évidence la présence de canaux entre les cellules, formant un véritable réseau capable de maintenir un flux continu de nutriments jusqu'au centre du biofilm. Ces canaux servent aussi pour l'élimination des déchets. Des particules de plusieurs micromètres de diamètres peuvent être transportées ainsi. (76)

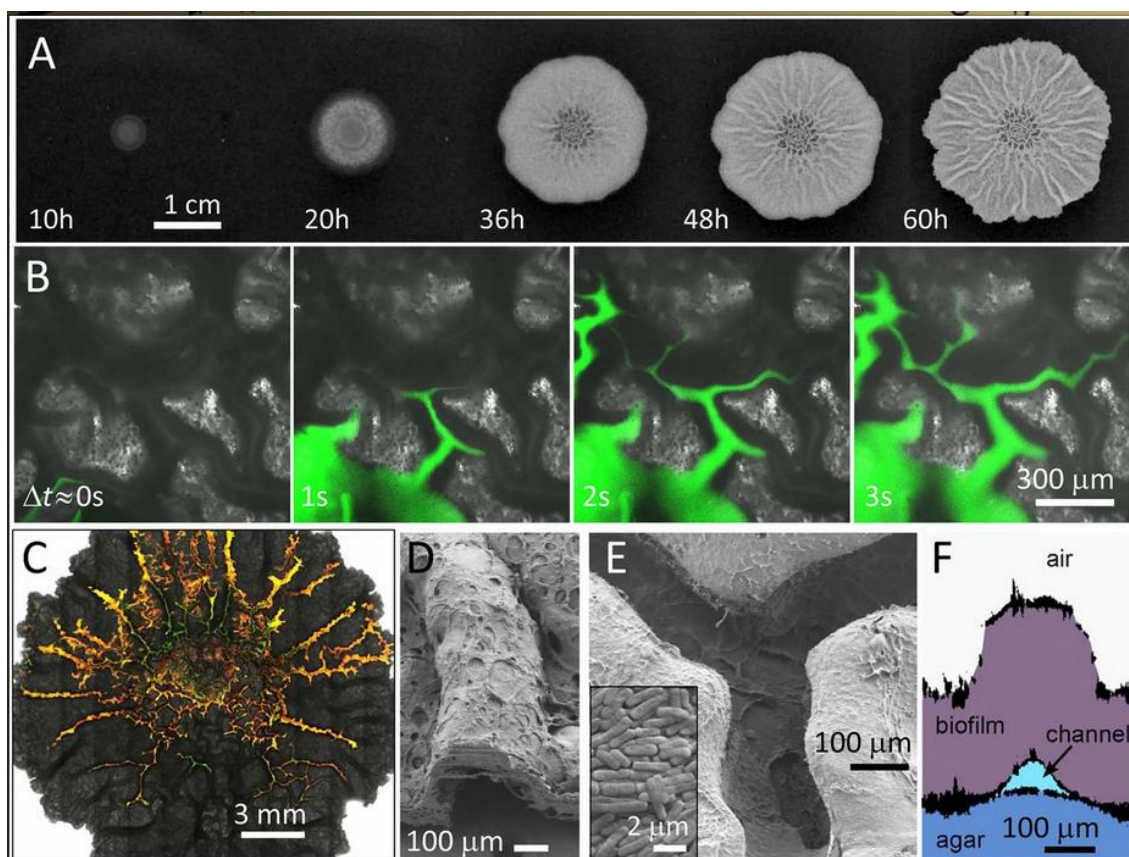


Figure 22 : Caractérisation des canaux d'un biofilm de *Bacillus subtilis* (77)

Sur l'encadré A de la figure 22, nous pouvons observer la croissance d'un biofilm de *B. subtilis* sur un gel d'agar contenant de l'eau et des nutriments. Lorsque le biofilm effectue sa maturation (plusieurs centaines de micromètres d'épaisseur et plusieurs centimètres de diamètre), il forme des rides qui sont à l'origine de la formation des canaux. L'encadré B nous montre une série d'images en microscopie dans une région proche du centre, au moment de l'injection d'un colorant aqueux et plusieurs secondes après l'injection, mettant en évidence le réseau de canaux. L'encadré C nous montre de façon similaire, une vision depuis le dessus du biofilm après injection du colorant. L'encadré D permet d'observer une coupe transversale d'un canal, alors que dans l'encadré E nous pouvons visualiser la même image vue de dessous. Enfin, une représentation transversale d'une partie de biofilm est schématisée en F.

En plus de toutes les fonctions vues précédemment, la MEC permet de capturer de façon plus efficiente les ressources nutritives présentes hors du biofilm par rapport aux cellules planctoniques. (4) Ces ressources peuvent provenir de la phase aqueuse surnageant le biofilm, ou bien de la surface colonisée par celui-ci si elle est biodégradable. Les substances polymériques extracellulaires agissent de façon passive telle une éponge en absorbant et adsorbant les nutriments, gaz et autres molécules via des mécanismes d'échanges anioniques et cationiques non spécifiques, ce qui permet aux biofilms de croître dans des milieux très appauvris en nutriments. (78) La rétention de composés n'est pas spécifique, ce qui veut dire que l'on retrouve un nombre conséquent et varié de molécules qui s'accumulent dans le biofilm, non seulement des nutriments, mais aussi des toxiques, et même de façon surprenant des composés fortement hydrophobes (benzène, xylène, toluène...). (79) Si ces substances ne sont pas dégradées, elles sont libérées ultérieurement vers la phase aqueuse si le gradient de concentration y est favorable. Ainsi, les biofilms peuvent se comporter à la fois comme des éboueurs mais aussi comme des sources de contaminants.

La production de la MEC est donc un processus dynamique qui dépend de nombreux facteurs. Cependant, sa production implique un coût énergétique important pour les communautés microbiennes, et si l'évolution a conservé ce phénomène, c'est que l'intérêt de la MEC est essentiel pour les fonctions du biofilm. (80)

1.7 Les étapes de formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm est régie par de multiples facteurs, tels que des facteurs environnementaux, des changements phénotypiques, l'utilisation du QS ainsi que des molécules effectrices. Ciofu et son équipe ont montré que la formation des biofilms était principalement gouvernée par des réponses adaptatives plutôt que par des programmes

génétiques spécifiques. (81) Les étapes de formation du biofilm ont été décrites pour des biofilms divers et variés. Il existe des différences qui dépendent d'une part des conditions environnementales (type de surface, localisation anatomique, forces de cisaillement...) mais aussi des espèces microbiennes qui s'associent pour former un biofilm. Cependant il peut être dégagé 5 étapes principales :

- 1) Attachement réversible
- 2) Attachement irréversible
- 3) Prolifération et production de la MEC
- 4) Maturation
- 5) Détachement et dispersion

Ces étapes sont également schématisées sur la figure 23.

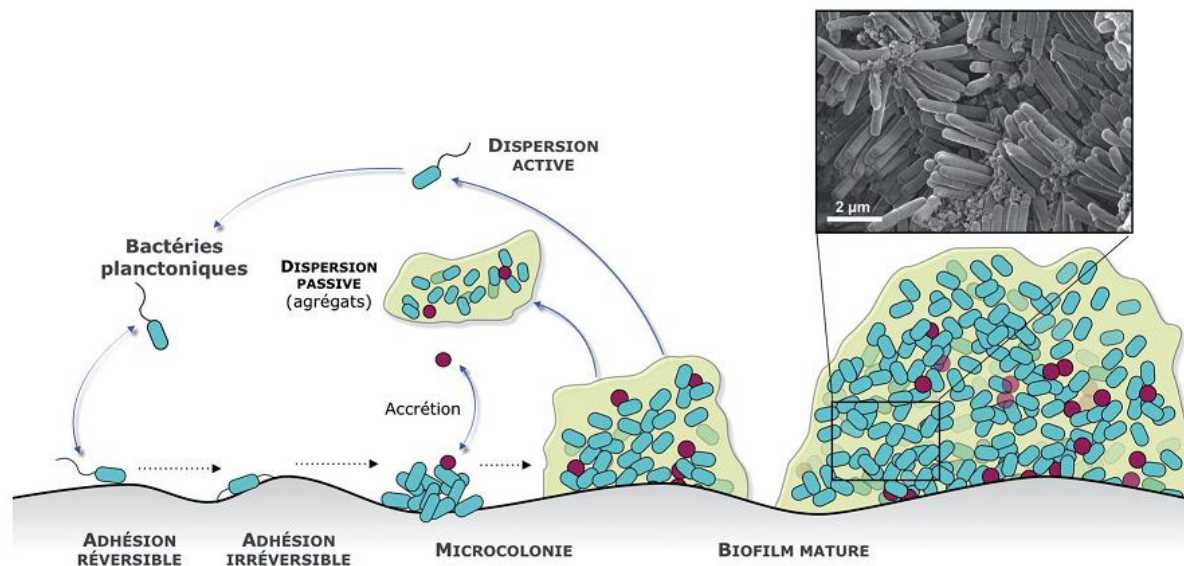


Figure 23 : étapes de formation d'un biofilm (12)

Un biofilm peut se former en peu de temps, de quelques heures à quelques jours. L'exemple frappant étant la plaque dentaire. (82)

1.7.1 Attachement réversible :

La première étape de formation d'un biofilm consiste en l'adsorption passive, réversible et non spécifique des cellules sur une surface (organique ou inorganique, biotique ou abiotique), influencée par des paramètres physico-chimiques que nous avons vus précédemment ainsi que par les nutriments et le chimiotactisme. (83) Il se trouve que les bactéries flagellées mobiles possèdent un avantage compétitif en ayant la possibilité de surmonter les forces hydrodynamiques grâce à leur(s) flagelle(s). Ceci a été mis en évidence

entre autre chez *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *Vibrio cholerae* et *E. coli*. (84) De plus, l'adsorption peut être stabilisée par des appendices extracellulaires (pili ou fimbriae) présents au préalable à l'adhésion. A ce stade, les cellules peuvent se désorber d'elles mêmes et retourner sous forme planctonique sous l'influence de gradients de nutriments ou de chimiotactisme, mais elles peuvent également se faire désorber par des forces hydrodynamiques ou répulsives si ces forces sont supérieures à leurs forces attractives. Cette étape d'attachement réversible se déroule sur un temps très court, de l'ordre de quelques minutes. (43)

1.7.2 Attachement irréversible :

L'attachement est irréversible lorsque les cellules sont capables de résister aux forces de cisaillement environnementales et d'adhérer de façon constante sur la surface. C'est un phénomène actif et spécifique qui est médié par les organelles filamenteux appendus aux microorganismes (fimbriae ou pili interagissant avec les structures moléculaires à la surface des cellules). Chez *E. coli* cette fonction est supportée par les pili de type 1 qui possèdent à leur apex une adhésine FimH qui a toute son importance dans la colonisation du tractus urogénital lors d'infections urinaires par exemple (Cf partie 2). (85) Chez *P. aeruginosa*, l'adhésion irréversible repose principalement sur les pili de type 4. A partir de cet instant, une action mécanique ou chimique est nécessaire pour rompre l'adhésion des cellules. Cette étape d'attachement irréversible est présentée sur la figure 24, elle survient généralement 2 à 4 heures après l'étape initiale. (43)



Figure 24 : phase d'attachement irréversible de bacilles sur des flacons d'irrigation nasale vue en microscopie électronique à balayage. (86)

1.7.3 Prolifération et production de la MEC

Les contacts de surface déclenchent des réponses entraînant des changements d'expression des gènes, favorisant entre autre la production de la MEC. Sa production est croissante et débute rapidement après les premiers contacts cellule/surface. La MEC permet de renforcer les liens cellule/surface mais aussi cellule/cellule grâce à ses propriétés gélifiantes, facilitant ainsi l'agrégation inter-cellulaire rendant possible le recrutement d'autres espèces fongiques ou bactériennes au sein du biofilm naissant, par phénomène d'accrétion. (62) De plus, certaines adhésines permettant de rendre irréversible l'attachement, peuvent également servir à la co-adhésion et la co-agrégation (le recrutement d'autres espèces dans le biofilm), participant ainsi à l'expansion du biofilm. D'autre part chez *C. albicans*, durant cette phase, les levures filamentent pour former des pseudo-hyphes. En pratique, l'apparition de ces pseudo-hyphes est un marqueur quasi pathognomonique d'un biofilm dans lequel la levure est impliquée. (87) La production de la substance polymérique extracellulaire survient généralement dans les 6 à 12 heures suivant l'attachement des microorganismes, à ce stade, la croissance du biofilm se fait de façon monocouche en surface. (43) Cette étape de prolifération et de production de la MEC est visualisée sur la figure 25.

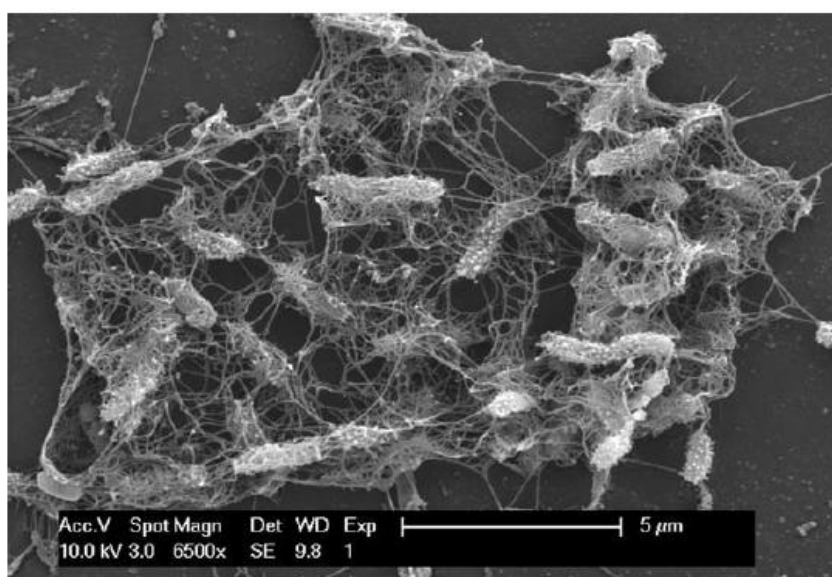


Figure 25 : production d'exopolysaccharides d'un jeune biofilm sur des flacons d'irrigation nasale vue en microscopie électronique à balayage. (86)

1.7.4 Maturation du biofilm :

Lors de sa croissance, le biofilm acquiert une structure tridimensionnelle multicouche avec la présence de cellules qui se multiplient de façon exponentielle pour former des colonies en son sein. La MEC est produite en quantité importante et peut alors occuper

jusqu'à 90 % du volume. (3) Avec l'épaississement du biofilm, des gradients de concentration commencent à apparaître (dioxygène, nutriments, déchets cellulaires...) et sont à l'origine comme vu précédemment de la répartition et de la stratification cellulaire. L'arrangement tridimensionnel conduit également à l'apparition de canaux aqueux facilitant l'apport de sources carbonées, dioxygène et l'élimination des déchets. Enfin, à ce stade, les cellules commencent pour certaines à subir les événements de mort cellulaire, entraînant leur lyse et la libération de leur contenu au sein du biofilm. L'apparition d'un biofilm complètement mature, résistant aux biocides et libérant des cellules planctoniques survient généralement dans les 2 à 4 jours selon les différentes espèces du biofilm et selon les conditions de croissance. (43) Un exemple d'un tel biofilm est présenté sur la figure 26.

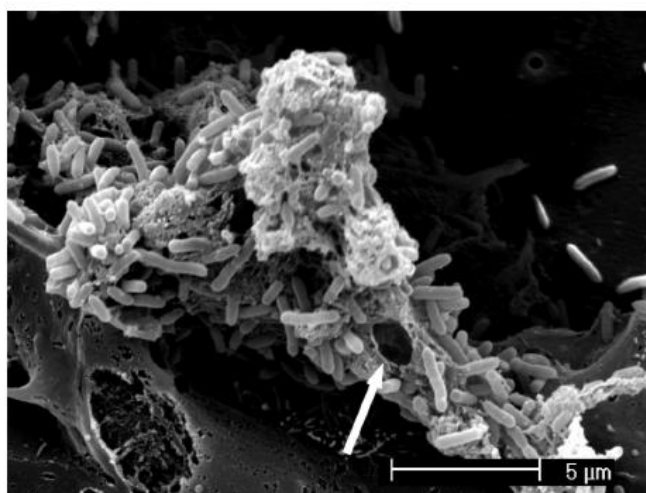


Figure 26 : structure tridimensionnelle d'un biofilm de *P. aeruginosa* sur un épithélium respiratoire montrant la MEC ainsi qu'un canal aqueux (flèche blanche) vue en microscopie électronique à balayage. (88)

1.7.5 Détachement et dispersion :

Lorsque le biofilm est mature, certaines cellules peuvent se détacher pour retourner sous leur forme planctonique. Mais bien souvent, elles rebasculent de nouveau sous forme sessile, afin d'engendrer un biofilm à distance pour profiter de nouveau des avantages conférés par le mode de vie de ce dernier. Parfois, des fragments entiers du biofilm (contenant cellule et MEC) sont relargués dans le milieu et peuvent alors former un nouveau biofilm à distance sans repasser par la phase planctonique. Le détachement de certaines cellule du biofilm peut être causé par les cellules elles même via plusieurs mécanismes : la dégradation enzymatique de la MEC, la dissolution des adhésines par des protéases, nucléases... (4) mais aussi via des phénomènes médiés par le QS. (89) Les changements environnementaux sont à l'origine de la dispersion cellulaire (concentration en nutriments,

variations du taux de dioxygène, augmentation de la concentration de toxiques, stress divers...) Cette dispersion promeut la pérennité des lignées cellulaires en leur permettant d'aller coloniser d'autres niches écologiques. D'autre part, le détachement peut également être induit de façon extrinsèque via des forces de cisaillement, des phénomènes de corrosion et via l'intervention de l'Homme. (90) Concernant les biofilms incluant des formes hyphales de *C. albicans*, comme nous le montre la figure 27, les cellules fongiques relarguées du biofilm se présentent sous forme levure. La pseudofilamentation est donc réversible, mais les levures relarguées présentent un phénotype différent des phénotypes planctoniques car elles possèdent des propriétés d'adhérence, de filamentation et de pathogénicité bien supérieures. C'est pourquoi les levures issues d'un biofilm sont probablement prédestinées à former un nouveau biofilm potentiellement pathogène. (87). Enfin, après une perturbation mécanique, les biofilms sont capables de former de nouveau des biofilms matures en l'espace de 24 heures. (43)

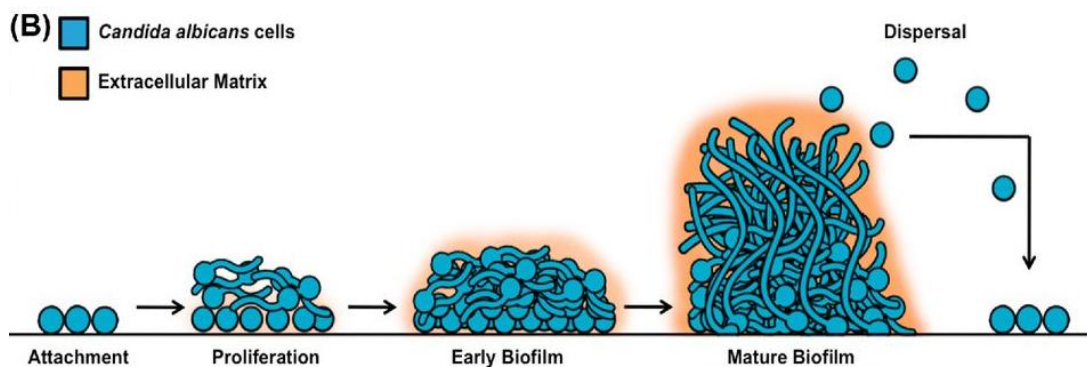


Figure 27 : schématisation des étapes de formation d'un biofilm de *C. albicans* (87)

1.8 La communication inter-cellulaire

1.8.1 Le QS

1.8.1.1 Définition :

L'utilisation des antibiotiques exerce une pression de sélection sur les agents pathogènes favorisant ainsi l'émergence d'espèces multi-résistantes. Le manque de nouvelles molécules pousse la recherche dans d'autres directions, sur le QS par exemple. Le QS correspond à un des processus de communication inter-cellulaire. Ce phénomène a d'abord été mis en évidence chez une bactérie marine bioluminescente dénommée *Aliivibrio fischeri*. (91) Cette bactérie est symbiotique d'*Euprymna scolopes*, un petit calamar de l'océan Pacifique central. Cette dernière permet d'émettre une bioluminescence à l'intérieur du corps du céphalopode, qui le protège des prédateurs situés dans les eaux profondes en évitant de

créer une ombre à la surface de l'eau. La luminescence provient de photons émis par la luciférine lorsqu'elle retourne à un état stable après avoir été excitée par oxydation via la luciférase en présence d'Adénosine triphosphate (ATP) et de dioxygène. (91,92) L'émission de lumière dépend de l'expression du gène de la luciférase et de la densité cellulaire, ces deux facteurs étant liés par la sécrétion de signaux chimiques appelés auto-inducteurs. (93) Ces auto-inducteurs, comme leur nom l'indique, sont capables d'induire une réaction sur les cellules qui ont elles-mêmes sécrété ces molécules. Cependant, ces signaux auto-inducteurs n'agissent pas immédiatement, ils s'accumulent dans le milieu extracellulaire dont la concentration est proportionnelle au nombre de cellules sécrétrices. Ce n'est qu'au-delà d'un certain seuil de concentration en auto-inducteurs que les cellules vont déclencher une réponse, via la liaison des auto-inducteurs à leurs récepteurs. (66) Le changement physiologique des cellules ayant un coût énergétique important, ce n'est donc qu'une fois le quorum cellulaire atteint que toutes ensemble, les cellules vont de façon coordonnée déclencher une réponse, car, unies, les cellules d'une espèce donnée ont beaucoup plus de chance de résister aux différents stress environnementaux en mettant en commun leurs atouts. Effectivement, isolées ou en faible nombre, les mêmes cellules qui déclencheraient une réponse aux auto-inducteurs serait coûteuse énergétiquement, inefficace, et délétère pour leur survie.

Pour résumer, nous pouvons donc définir le QS comme étant un processus de communication inter-cellulaire qui permet aux espèces bactériennes ou fongiques de modifier de façon collective et coordonnée leur comportement en réponse à leur nombre dans le milieu. Ce processus nécessite quatre étapes successives (93) : tout d'abord la production de petites molécules chimiques appelées auto-inducteurs, puis une étape de sécrétion extracellulaire, suivie de leur liaison à leurs récepteurs respectifs qui entraînent en dernier lieu une modification du niveau d'expression d'un ou plusieurs gènes. Les gènes et fonctions contrôlés par le QS peuvent être classés en 4 catégories fonctionnelles : la maintenance et prolifération cellulaire (via la production de sidérophores, d'exoenzymes, de sporulation...), le transfert horizontal de gènes (par transformation de cellules dites compétentes, par conjugaison), le comportement cellulaire (adhésion, formation de biofilm et dispersion, motilité...) et les interactions avec les autres micro-organismes ou l'hôte (production d'exopolysaccharides, de facteurs de virulence, d'antibiotiques, de bioluminescence...) (94) Certains de ces comportements médiés par le QS sont représentés sur la figure 28.

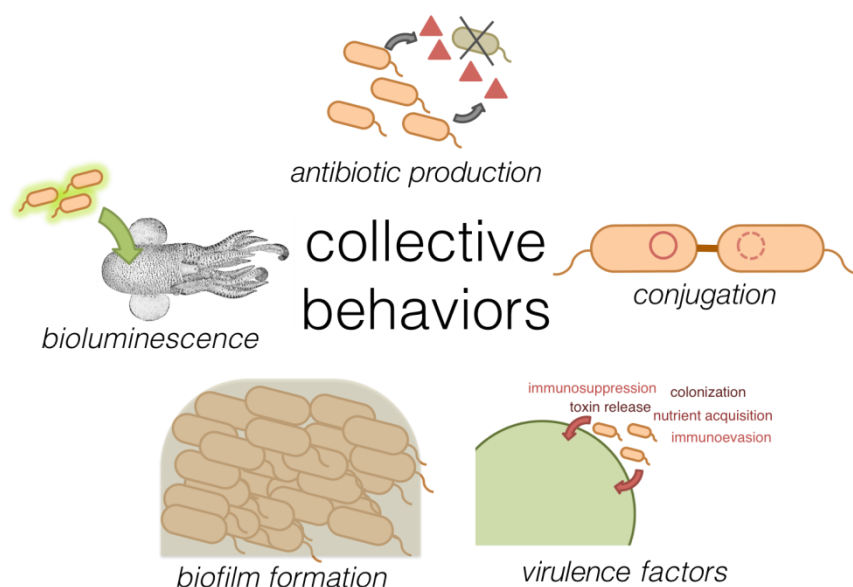


Figure 28 : schématisation des comportements contrôlés par le QS (95)

Le QS en plus d'être un processus de synchronisation d'expression génique concentration dépendant, peut également être décrit comme un moyen pour les cellules d'explorer l'environnement. Cette autre théorie connue sous le nom de « diffusing sensing » (perception de la diffusion) propose que les cellules, via la production d'auto-inducteurs, sont capables de percevoir la densité cellulaire, la distribution spatiale ainsi que la limitation de la diffusion des auto-inducteurs, et que selon les résultats obtenus, les cellules décident ou non de produire des molécules plus coûteuses en énergie. En tout état de cause il est clair que cette théorie ne doit pas être opposée au QS, mais doit être considérée comme complémentaire. (96)

Les auto-inducteurs utilisés sont variés. Les molécules chimiques employées sont plus ou moins propres à certains règnes, genres, voire espèces.

1.8.1.2 Les Acyl Homosérine Lactone chez les bactéries à Gram négatif :

Quatre caractéristiques sont retrouvées dans la majorité des bactéries à Gram négatif utilisant le QS. (97) La première concerne le type d'auto-inducteur utilisé. Même si plusieurs auto-inducteurs différents peuvent être employés par une même espèce, le groupe des Acyl Homosérine Lactones (AHL) est le plus fréquemment retrouvé chez l'ensemble des bactéries à Gram négatif utilisant le QS. La figure 29 nous présente le motif structural de ces molécules, qui possèdent toutes un noyau N acyl homosérine lactone associé à une chaîne carbonée allant de 4 à 18 carbones pouvant contenir des substitutions.

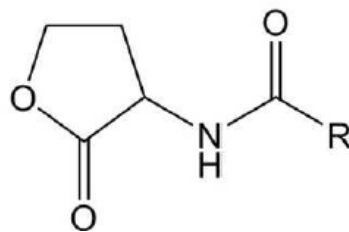


Figure 29 : Structure chimique des AHL. (66)

La synthèse de ces AHL est présentée sur la figure 30. Le cycle lactone est issu de la S-adénosylméthionine (SAM) et la chaîne carbonée provient d'un acide gras. La synthèse de l'ensemble des AHL est médiée par les enzymes de type LuxI (I pour inducteur) qui sont des N-acyl homoserine lactone synthase. (97) Les enzymes de type LuxR (R pour récepteur) permettent la synthèse des récepteurs des AHL.

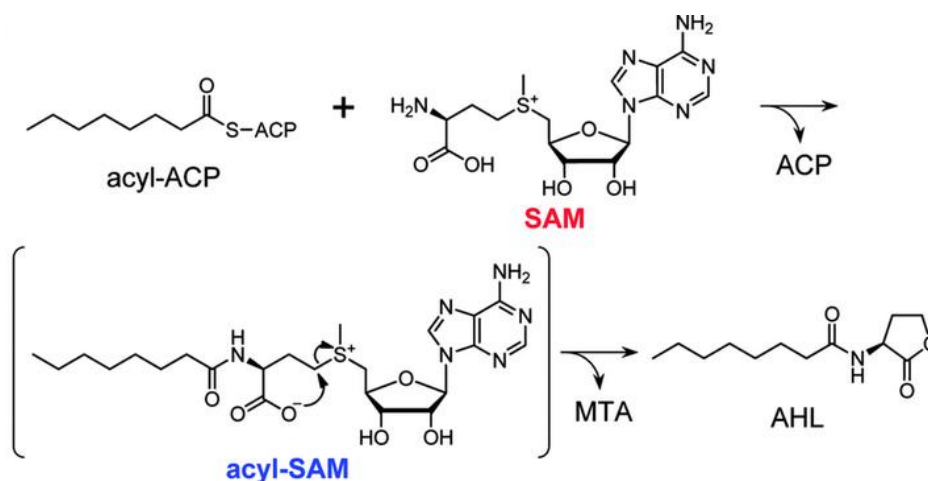


Figure 30 : Réaction de synthèse des AHL par les LuxI synthases. Acyl-ACP : Acyl-Acyl Carrier Protein ; MTA : méthylthioadénosine. (98)

Ces molécules ayant une chaîne carbonée relativement longue, possèdent des propriétés lipophiles. A faible concentration, les AHL sont sécrétées dans le milieu extracellulaire par des transporteurs actifs, alors qu'à forte concentration, l'émission des AHL a lieu de façon passive par diffusion transmembranaire.

La deuxième caractéristique concerne la liaison des AHL. (97) Elle s'effectue sur des récepteurs spécifiques de type LuxR essentiellement situés dans le cytoplasme. Ce sont des protéines contenant deux domaines fonctionnels : l'extrémité N terminale sert à la liaison de l'AHL, et l'extrémité C terminale contient un site de liaison à l'ADN. En l'absence de liaison des auto-inducteurs sur leurs récepteurs, ces derniers sont dégradés. En revanche lorsqu'il y a formation du couple LuxR-AHL, cette liaison stable, induit une dimérisation du récepteur avant de se lier à l'ADN pour agir en tant que facteur transcriptionnel. (97) Nous pouvons

cependant noter que certaines AHL peuvent se lier spécifiquement sur des récepteurs membranaires de type LuxN qui existent entre autre chez certaines espèces de *Vibrio*. Ils correspondent à des récepteurs histidine kinase qui, après liaison de l'AHL correspondante, se dimérisent, et par cascades phosphorylative permettent de modifier le niveau d'expression de certains gènes. (99)

La troisième caractéristique est due à la capacité qu'a le QS de moduler l'expression de plusieurs dizaines voire centaines de gènes impliqués dans tous les facteurs de virulence, de biofilm etc... (97)

Enfin la dernière caractéristique est due à l'activation d'une boucle d'amplification de la production des auto-inducteurs une fois le seuil d'activation franchi, de telle manière à promouvoir la synchronisation de l'expression génique de l'espèce concernée. (100)

Enfin, au-delà de leur fonction de signal, certaines AHL à longue chaîne peuvent également agir en tant que tensioactif, mais aussi antibiotiques. (101)

1.8.1.3 Les auto-inducteurs peptidiques chez les bactéries à Gram positif :

Chez les bactéries à Gram positif, les auto-inducteurs du QS sont essentiellement des oligopeptides de 5 à 17 acides aminés. (94) Leur synthèse est classique, les ribosomes cellulaires produisent un précurseur peptidique, qui subit des modifications pour atteindre son état mature. L'oligopeptide est ensuite sécrété dans le milieu extracellulaire via un transporteur ABC (Adénosine TriPhosphate Binding Cassette). Ces auto-inducteurs peptidiques (AIP) s'accumulent donc dans le milieu extracellulaire, et, lorsque leur concentration atteint un certain niveau, ils permettent de stimuler les systèmes à deux composants (TCS) présents sur la membrane cellulaire. Ces TCS sont constitués d'une part d'une histidine kinase qui possède à son extrémité N-terminale un domaine senseur extracellulaire, et à son extrémité C-terminale un domaine à activité kinase qui une fois activé, s'autophosphoryle puis transfère son groupement phosphate au régulateur de réponse qui forme le deuxième composant du système, et par cascade enzymatique modifie l'expression de certains gènes. (102)

Plus récemment, il a été mis en évidence une nouvelle voie de signalisation des AIP dans laquelle ces derniers doivent être activement transportés à l'intérieur de la cellule réceptrice avant de pouvoir interagir avec leurs récepteurs. (103)

1.8.1.4 Les auto-inducteurs de type 2 pour la communication inter-espèces :

L'enzyme LuxS responsable de la synthèse des auto-inducteurs de type 2 (AI-2) est présente dans plus de 500 espèces bactériennes, aussi bien à Gram positif qu'à Gram négatif, ce qui rend ce type de QS le plus communément réparti dans le monde bactérien à ce jour. (104) La synthèse de ces AI-2 est présentée sur la figure 31.

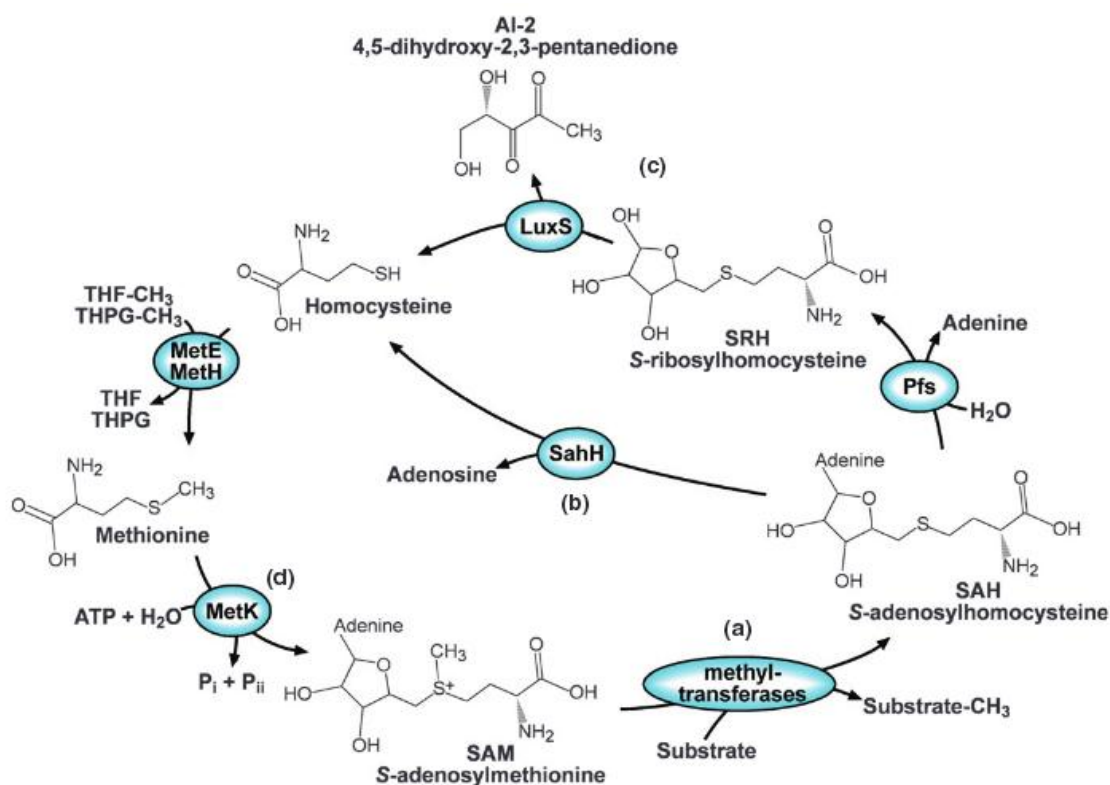


Figure 31 : Cycle de synthèse du précurseur de AI-2 (104)

Le point de départ est le même que pour les AHL (figure 38), la SAM est déméthylée pour être transformée en S-adénosylhomocystéine. L'enzyme Pfs est une nucléosidase qui permet d'éliminer l'Adénine à la S-ribosylhomocystéine. Enfin l'enzyme clef LuxS permet d'obtenir le 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD). Les étapes suivant la formation du DPD sont présentées sur la figure 32. Le DPD est hautement réactif et se cyclise spontanément pour former le (2R,4S)-2-méthyl-2,3,3,4-tétrahydroxytétrahydrofurane (THMF). En présence d'ions borate, la cyclisation spontanée conduit au (2S,4S)-2-méthyl-2,3,3,4-tétrahydroxytétrahydrofurane-borate. Le THMF boraté ou non sont regroupé sous le terme AI-2. (104)

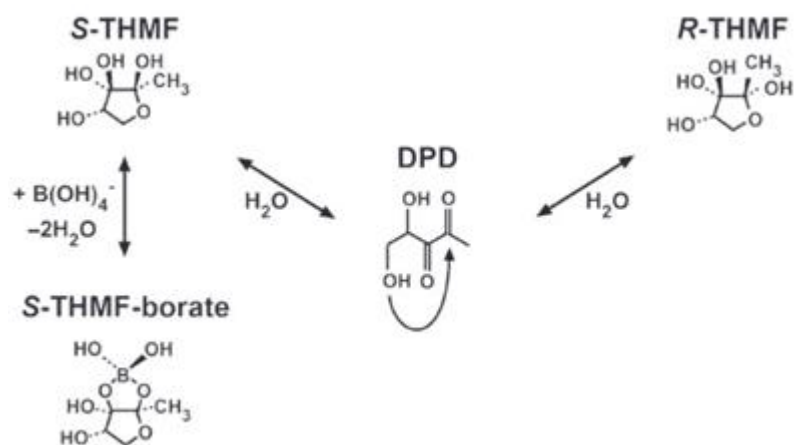


Figure 32 : réaction de cyclisation spontanée du DPD (104)

Certaines espèces bactériennes sont capables de détecter les AI-2 boratés comme *V.harveyi*, ainsi que les espèces du genre *Salmonella*, alors que *E. coli* utilise des AI-2 non boratés. (105) Cependant ceci est contrebalancé par l'interconversion possible des différentes formes de THMF, ce qui rend donc possible une communication inter-cellulaire. Par ailleurs, certaines espèces comme *Pseudomonas aeruginosa* n'expriment pas l'enzyme LuxS et par conséquent ne produisent pas d'AI-2. (106) En revanche, elles sont capables pour certaines de détecter des AI-2 produits par les autres cellules de l'environnement, et de modifier le niveau d'expression de certains de leurs gènes. C'est un moyen de détecter des cellules compétitrices dans les environs ce qui peut conduire par exemple à désactiver la sécrétion de « public goods » qui pourraient profiter aux cellules dites ennemies. (106)

La figure 33 nous présente les récepteurs des AI-2. A ce jour, deux classes de récepteurs spécifiques ont été mises au jour. (97) Il existe d'une part les récepteurs LuxP typiquement présents chez le genre *Vibrio* qui sont capables de reconnaître les AI-2 boratés et fonctionnent de manière similaire aux récepteurs des AIP. D'autre part, chez les entérobactéries, les AI-2 non boratés sont importés dans le cytoplasme de la cellule via des transporteurs ABC après reconnaissance de l'AI-2 par LsrB (LuxS regulated B). Ensuite LsrK phosphoryle l'AI-2 cytoplasmique, qui peut ensuite se lier au répresseur LsrR, ce qui rompt sa liaison du promoteur *lsr* afin de permettre l'expression de l'opéron *lsrACDBFGE*. Cet opéron code entre autres pour un transporteur ABC capable d'internaliser les AI-2 non boratés, mais code aussi pour une enzyme de dégradation des AI-2 non boratés. (97,107) Selon les différentes phases de croissance cellulaire (exponentielle ou stationnaire), l'équilibre production versus import et destruction des AI-2 varie.

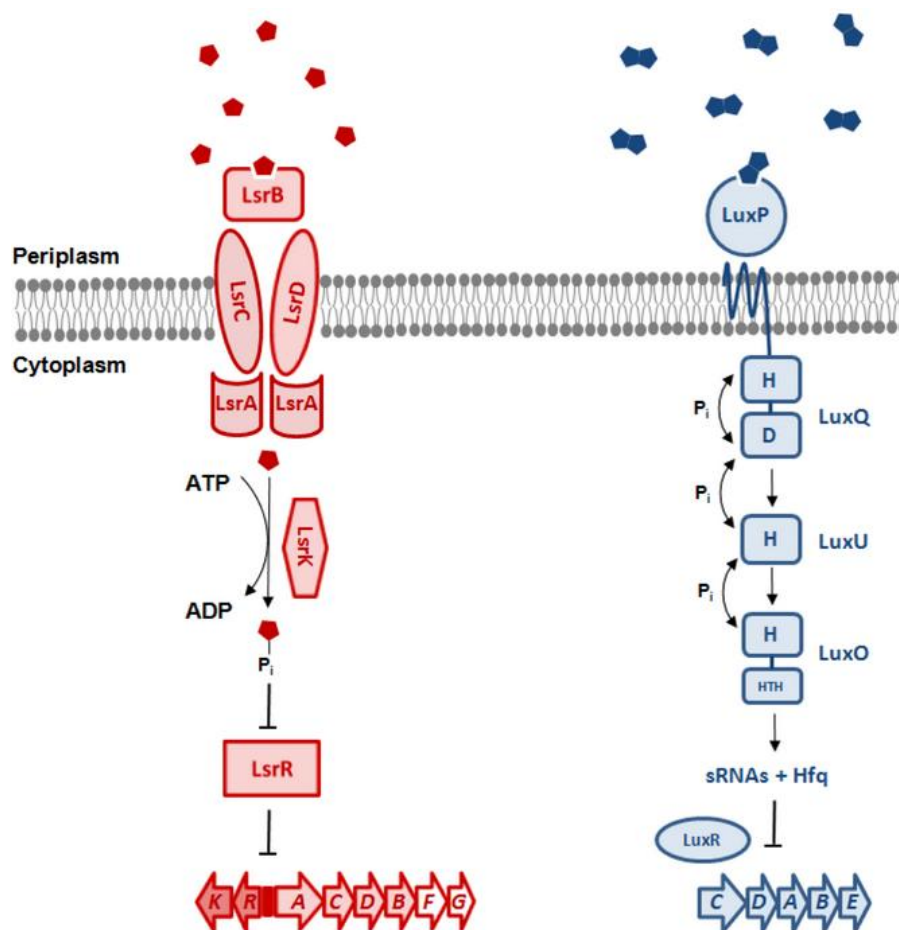


Figure 33 : schématisation des modes d'action des AI-2 (107)

De cette manière, certaines bactéries entériques comme *E. coli* ou encore *S. typhimurium* sont capables de manipuler le taux extracellulaire d'AI-2 via un comportement ambivalent. En phase de croissance exponentielle, ces deux bactéries sécrètent une quantité importante d'AI-2, susceptible d'enclencher des réponses chez leurs congénères, alors qu'en phase de croissance stationnaire elles activent une fonction d'import et de destruction d'AI-2, susceptible dans ce cas de supprimer la signalisation inter-cellulaire avec des espèces du voisinage, ce qui leur confère alors un avantage dans la lutte avec des espèces concurrentes. (108)

L'utilisation ubiquitaire des AI-2 dans les différents genres bactériens est une stratégie clé de la régulation de l'homéostasie des communautés poly-microbiennes que l'on peut retrouver dans le tractus gastro-intestinal de l'Homme par exemple.

1.8.1.5 Les voies annexes de QS :

Il existe également d'autres systèmes de QS moins répandus, nous pouvons citer par exemple les auto-inducteurs de la famille des DSF (diffusible signal factor). (94) Ce sont des acides gras de configuration *Cis* possédant une insaturation en position 2 dont la longueur et

les substitutions peuvent varier. Les DSF se retrouvent entre, entre autre, chez *Xanthomonas campestris*, *Burkholderia cenocepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* ou encore *P. aeruginosa*. (109) Ces auto-inducteurs sont également impliqués dans la communication inter-espèces et inter-règnes. Par exemple l'acide *Cis* 2-décénoïque induit la dispersion du biofilm chez de nombreuses bactéries à Gram positif ou négatif qui ne sont pourtant pas capables de produire ce type d'auto-inducteur et l'acide *Cis* 2-dodécénoïque lui, est capable de moduler la formation d'hyphes chez *C. albicans*. (110) Compte tenu du nombre important de gènes régulés par le QS, il existe une variabilité des structures au sein des familles de QS étudiées jusqu'alors avec une spécificité des récepteurs, mais il existe également d'autres familles dont le rôle n'est pas encore clairement établi.

Il est important de noter que bien souvent, au sein de chaque espèce, le QS n'est pas médié par un seul type d'auto-inducteurs et qu'il existe de nombreuses interrelations. La figure 24 met en évidence ces interrelations chez *P. aeruginosa*.

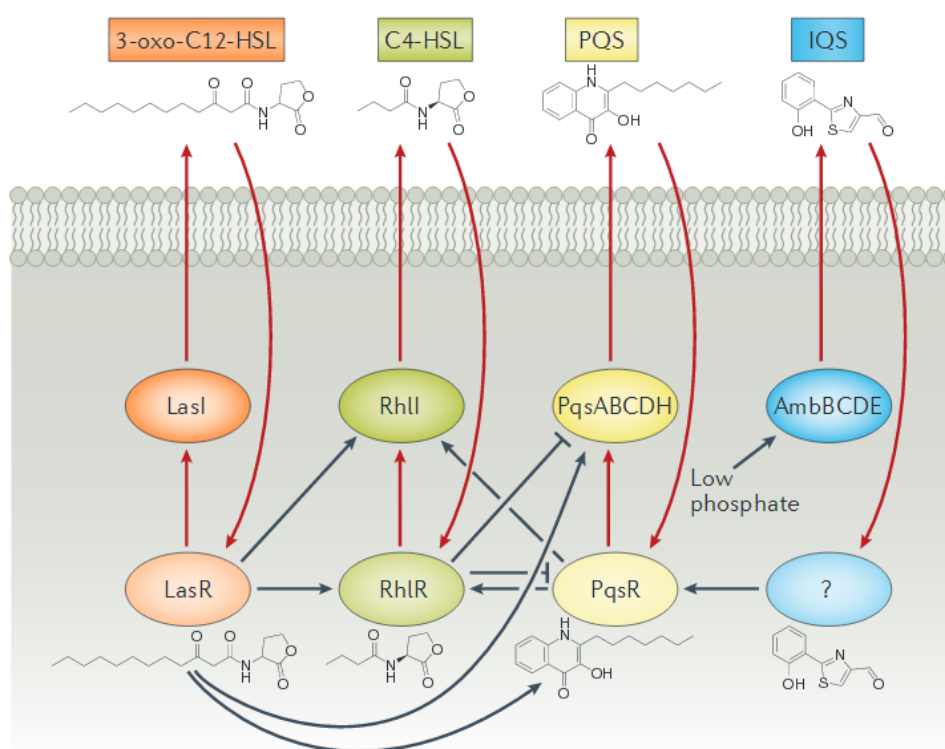


Figure 34 : Interconnexion des circuits de QS chez *P. aeruginosa* (97)

La figure 34 nous présente les principaux types d'auto-inducteurs utilisés par *P. aeruginosa* découverts à ce jour. Comme chez la majorité des bactéries à Gram négatif, nous retrouvons la grande famille des AHL. LasR, LasI ainsi que RhIR et RhII qui sont des homologues de LuxR et LuxI. Ce circuit est hiérarchisé avec au sommet du système, le récepteur de la 3-oxo-C12-HSL qui est LasR, le complexe ainsi formé active les gènes sous jacents permettant une

boucle d'amplification via la production de la LasI synthase, l'enzyme responsable de la synthèse de la 3-oxo-C12-HSL. Le complexe LasR-3-oxo-C12-HSL permet également d'activer le second circuit de QS via l'expression du couple RhlR et RhlI respectivement récepteur et enzyme de synthèse de la C4-HSL, mais active aussi le couple PqsR et PqsABCDH respectivement récepteur et enzyme de synthèse de la PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) un autre type d'auto-inducteur, retrouvé chez *P. aeruginosa*. Ces deux couples fonctionnent de façon similaire à LasR/LasI avec une boucle d'amplification. D'autre part, le couple PqsR/PqsABCDH est capable d'activer le couple RhlR/RhlI, qui en retour exerce un rétrocontrôle négatif, ce qui permet d'affiner précisément le taux d'auto-inducteurs sécrétés. Enfin, chez les patients atteints de mucoviscidose, *P. aeruginosa* possède fréquemment une mutation sur LasR. L'auto-inducteur additionnel IQS (Integrated Quorum sensing System) produit par l'enzyme AmBCDE, permet de contourner cette mutation, cette enzyme est induite par une teneur abaissée en phosphate, condition de stress souvent rencontrée par les bactéries lors d'infections. (111)

Ainsi, ces hauts degrés d'interconnexions mettent en évidence la façon dont les signaux intra et inter-cellulaires sont intégrés pour moduler la réponse au QS. Certains mécanismes peuvent paraître redondants, mais ils permettent de faire face à d'éventuelles mutations génétiques qui peuvent altérer une voie entière de QS.

1.8.1.6 Le QS chez les champignons :

Ce n'est qu'après les bactéries que le QS chez les champignons a été étudié car pendant longtemps, il a été suspecté que le QS était une caractéristique intrinsèque des procaryotes. (112) Les auto-inducteurs sont structurellement différents. Nous retrouvons principalement le farnesol qui est un alcool sesquiterpénique que l'on retrouve également dans certaines HE de plantes, ainsi que des alcools aromatiques comme le tyrosol, le phényléthanol, le tryptophol etc... (113)

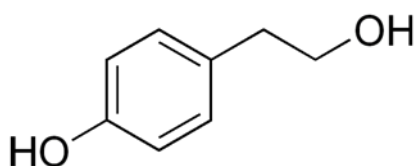


Figure 35 : structure chimique du tyrosol

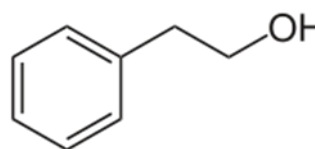


Figure 36 : structure chimique du phényléthanol

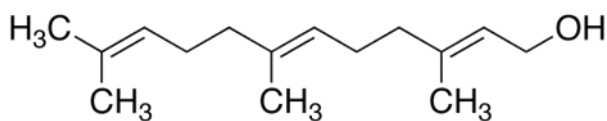


Figure 37 : structure chimique du farnésol

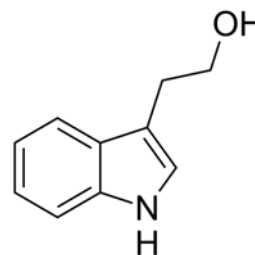


Figure 38 : structure chimique du tryptophol

Il existe quelques exceptions comme chez *Cryptococcus neoformans*, chez lequel il a été récemment découvert l'utilisation d'un oligopeptide formé de 11 acides aminés dénommé Qsp1 utilisé en tant qu'auto-inducteur pour le QS. (114) Les mécanismes d'actions des ces molécules sont encore actuellement peu connus et sont en cours d'élucidation. Quelques données ont été obtenues sur les voies de signalisation impliquées par le farnésol, notamment en inhibant la voie de l'AMP cyclique via l'inhibition de l'adénylate cyclase Cyr1p de *C. albicans*, mais aussi en ayant une action sur NRG1, un répresseur transcriptionnel. (115) Néanmoins, comme dans le monde bactérien, le QS permet de réguler un nombre considérable de gènes. Par exemple l'analyse par micropuce à ADN d'un biofilm formé par *C. albicans* après exposition au farnésol a mis en évidence un changement de réponse de 274 gènes, 104 étant sur-exprimés et 170 sous-exprimés. (116) En règle générale, le farnésol a plutôt tendance à induire des effets répresseurs en inhibant par exemple le passage de la forme levure à la forme filamenteuse et en inhibant la formation de biofilm chez *C. albicans*, en inhibant la conidiation chez des champignons filamenteux comme *Aspergillus niger* ou encore en induisant l'apoptose chez de nombreux champignons. (113) D'un autre côté, le tyrosol possède un effet inverse en stimulant la formation de tube germinatif et d'hyphes chez *C. albicans*, mais possède un effet inhibiteur sur la formation de son biofilm, le tyrosol est capable également de diminuer le pouvoir cytotoxique des polynucléaires neutrophiles en altérant la sécrétion d'espèces réactives oxygénées. (117) Il est intéressant de noter que le fait de combiner certains de ces auto-inducteurs (tyrosol, farnésol) à des antifongiques renforce l'action de ces derniers en abaissant considérablement leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI). (118) Par conséquent, le QS chez les champignons est également un processus central dans tous les phénomènes de morphologie, développement, apoptose, et pathogénicité. La complexité des interactions et des mécanismes d'actions sont du même ordre que chez les bactéries, beaucoup de résultats expérimentaux nécessitent encore d'être approfondis.

1.8.1.7 La communication inter-règles via le QS

Au-delà de la communication inter-espèce, il a été montré que des organismes issus de règles différents étaient capables de communiquer entre eux via le QS. L'exemple le plus frappant se situe dans le tractus gastro-intestinal de certains mammifères. Par exemple, l'exposition de cellules de mammifères aux AI-2 favorise une production d'interleukine 8 responsable d'une inflammation, aussi, les AI-2 produits par *P. aeruginosa* sont capables d'entraîner l'apoptose de certains types de cellules de mammifères. (119) Inversement, certaines bactéries entériques sont capables de détecter des hormones, exemple : l'adrénaline ou la noradrénaline via des récepteurs à activité kinase et à domaine senseur de type QseC et QseE respectivement mais cela ne répond pas vraiment au principe même du QS. (120) En revanche, il a plus récemment été découvert que certaines cellules épithéliales de mammifères sont capables d'activer le QS d'un certain nombre de bactéries via la sécrétion de molécules similaires aux AI-2 bactériens, suite à l'altération des jonctions serrées inter-cellulaires ou bien en réponse aux bactéries. Ces molécules homologues sont détectées par les récepteurs aux AI-2, LuxP ou LsrB, ce qui a pour conséquence la modulation d'expression de gènes sous-jacents gouvernés par le QS. (97) Ainsi, ces phénomènes pourraient éventuellement expliquer pourquoi lors d'un déséquilibre de l'hôte, un organisme saprophyte peut alors devenir pathogène. Il en est de même entre bactéries et champignons. En effet, des études ont montré que *C. albicans* est capable, via la production de farnésol, d'inhiber la sécrétion du PQS présent chez *P. aeruginosa*, le PQS étant impliqué entre autre dans la production de facteurs de virulence comme la pyocyanine. (121) Le farnésol est en outre capable d'altérer la réponse immunitaire de l'hôte lors d'une infection en modulant la différenciation et la sécrétion de cytokines des cellules immunitaires ainsi qu'en induisant un stress oxydatif chez les macrophages conduisant à leur apoptose via l'activation de la voie NF- κ B. (122)

Comme nous pouvons le constater, les phénomènes de QS sont complexes, diversifiés et les conséquences multiples. Ce qui est certain c'est l'importance qu'a le QS pour l'homéostasie des biofilms, ce qui laisse entrevoir de nouvelles pistes thérapeutiques pour les années à venir.

1.8.2 Le Quorum Quenching (QQ)

Le QQ fait référence à l'ensemble des processus impliqués dans la perturbation du QS. Les molécules effectrices du QQ sont variées dans leurs modes d'action (destruction ou inhibition compétitive des auto-inducteurs du QS), dans leurs natures (enzymes, molécules chimiques...), ainsi que dans leurs cibles (toutes les étapes du processus de QS peuvent être une cible potentielle que ce soit la synthèse, la diffusion, l'accumulation ainsi que la

perception des auto-inducteurs). (94) En pratique les Inhibiteurs du Quorum Sensing (IQS) font seulement référence aux composés chimiques, les enzymes ne sont pas concernées par cette dénomination.

Tout d'abord, le QQ peut être la conséquence de contraintes physico chimiques. En effet, l'ouverture du cycle lactone des AHL peut survenir spontanément en solution aqueuse. Ceci est fortement favorisé à haute température et sous pH alcalin, mais peut être réversible en solution acide. Par exemple la demi-vie de la N-hexanoyl-homosérine lactone peut varier entre 21 jours (à 4°C et pH à 5,5) et moins de 30 minutes (à 37°C et pH à 8,5). (94) Ces paramètres semblent importants pour contrôler la demi-vie des auto-inducteurs, d'autant plus que les hôtes végétaux ou animaux sont capables d'élever leur température et leur pH pour lutter durant une infection.

Ensuite, la dégradation du QS peut être enzymatique. Ces enzymes peuvent être regroupées en 4 classes catalytiques : les lactonases qui rompent le cycle lactone, les amidases (aussi appelée acylases) qui clivent la fonction amide des AHL relargant un acide gras et une homosérine lactone, les réductases qui convertissent les 3-oxo-AHL en 3-hydroxyl-AHL, et enfin les cytochromes oxydases qui catalysent l'oxydation de la chaîne acyl. Ces réactions enzymatiques sont possibles chez l'ensemble des bactéries, archées ainsi que chez les eucaryotes. (94)

Le rôle biologique de ces enzymes est varié. Premièrement, certaines lactonases sont produites pour contrer la toxicité médiée par certaines AHL. En effet, la molécule 3-oxo-C12-HSL a été décrite comme possédant des propriétés antibactériennes à l'encontre de nombreuses bactéries à Gram positif, mais en aucun cas chez des à Gram négatif. Or, de nombreuses souches du genre *Bacillus* sont insensibles à cette AHL. Bien qu'étant à Gram positif et n'utilisant pas les AHL comme auto-inducteurs, il a été retrouvé chez les souches insensibles correspondantes la lactonase AiiA. Cette dernière est capable d'hydrolyser de nombreux substrats avec une chaîne acyl allant de 4 à 12 atomes de carbone. (94) Chez les mammifères également, des enzymes dont le but est similaire existent, elles appartiennent au groupe des paraoxonases. (94) Ensuite, certaines enzymes sont produites dans un but de recyclage des auto-inducteurs, qui sont sources de carbone et d'azote. *P. aeruginosa* possède par exemple plusieurs amidases et lactonases à cette fin. Parfois, la dégradation des auto-inducteurs par la cellule sécrétrice fait partie intégrante du processus de développement afin de synchroniser les différentes étapes. En effet, *Agrobacterium tumefaciens*, durant les étapes précoces de l'infection des plantes, utilise des lactonases afin de prévenir le transfert du

plasmide Ti médié par le QS, en dégradant les AHL. Dans ce cas, le but principal correspond à une fonction de nettoyage plutôt qu'à une fonction de recyclage. (94)

En ce qui concerne les IQS, ils sont produits par de nombreuses espèces (bactéries, champignons, plantes et animaux), mais relativement peu de composés sont documentés. Leur nature biochimique est très variée et hétérogène (excepté les analogues structuraux agissant comme inhibiteur compétitif des auto-inducteurs), et il n'existe pas de corrélation directe entre les structures moléculaires ou fonctions chimiques de ces IQS et leur cible dans le processus de QS. La figure 39 donne un aperçu des enzymes du QQ et des IQS retrouvés chez différentes espèces du monde vivant.

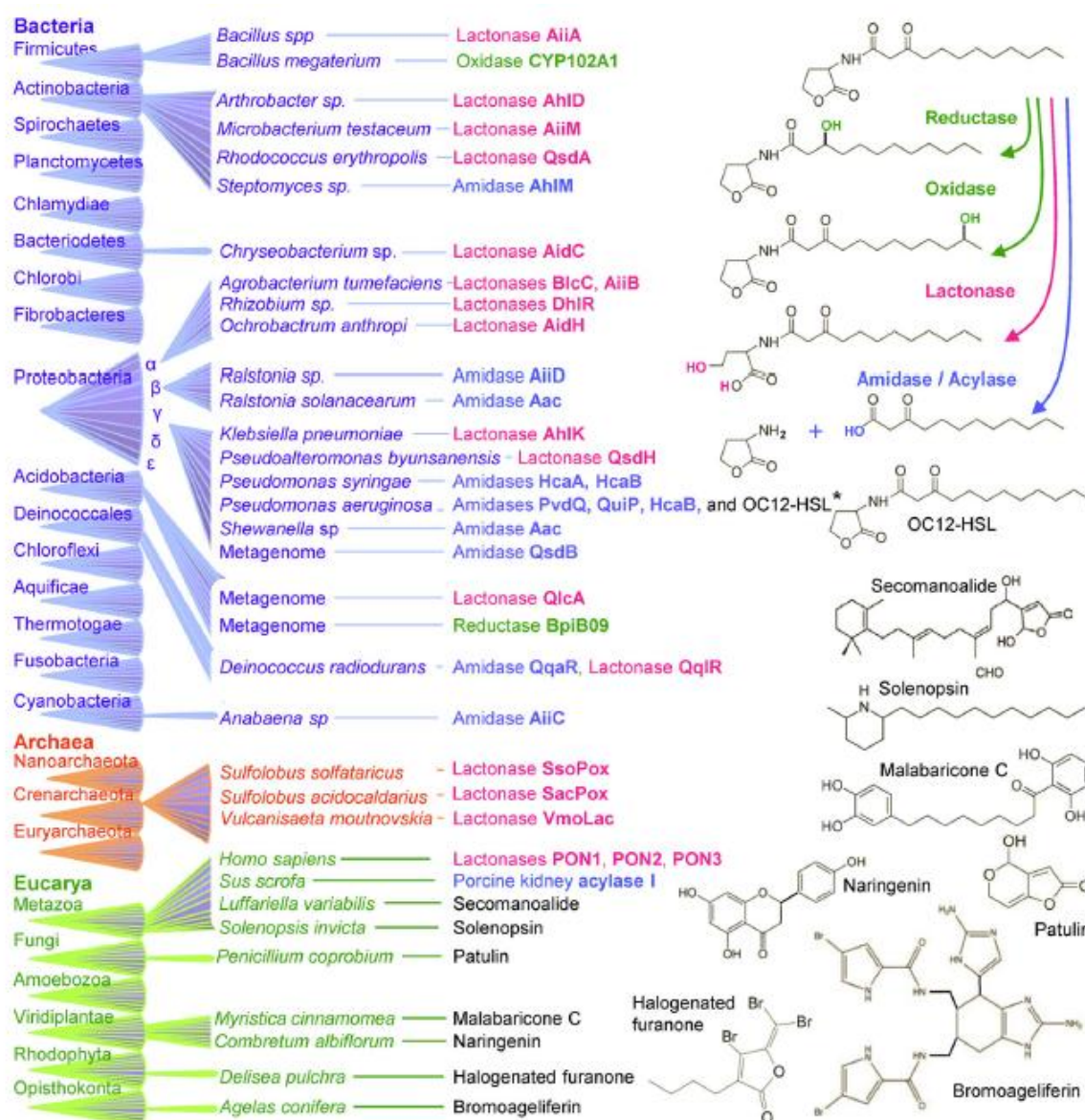


Figure 39 : diversité des enzymes du QQ (en couleur) ainsi que les IQS (en noir). (94)

Finalement, même si beaucoup de notions restent inconnues, la diversité des mécanismes représente autant de potentialité et de perspectives pour de nouvelles molécules anti-infectieuses ultérieures.

1.9 Conséquences des biofilms sur la prise en charge thérapeutique

1.9.1 La tolérance aux antibiotiques

1.9.1.1 Définition :

La tolérance aux anti-infectieux est une caractéristique intrinsèque des biofilms. C'est elle qui est responsable de l'élévation considérable des CMI des antibiotiques vis-à-vis des biofilms, allant parfois jusqu'à plus de 1 000 fois la CMI des cellules planctoniques. (3) Elle est à différencier de la résistance aux antibiotiques. En effet, la résistance aux antibiotiques est une propriété qui, une fois acquise, est héréditaire au sein d'une lignée cellulaire, car l'information est codée génétiquement. Cette information génétique peut être obtenue par mutation spontanée, ou par échange de matériel génétique. Ainsi, même dispersées hors du biofilm, la résistance aux anti-infectieux persiste. A contrario, la tolérance aux antibiotiques est intrinsèquement liée au biofilm et ne peut survenir uniquement lorsque les cellules se trouvent sous forme sessile dans le biofilm. Si ces dernières basculent à nouveau sous forme planctonique hors d'un biofilm, la tolérance aux antibiotiques disparaît, les cellules redeviennent alors sensibles aux agents anti-infectieux. (123)

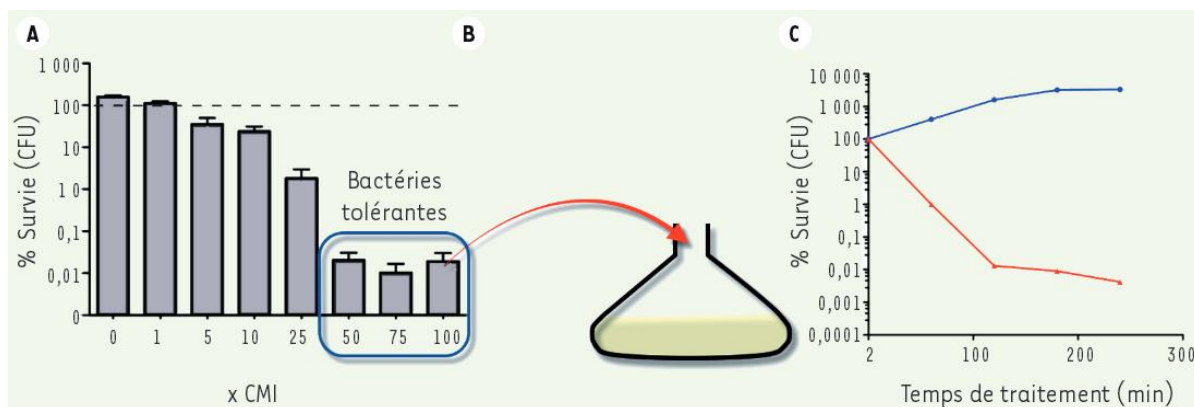


Figure 40 : schéma explicatif de la notion de tolérance (60)

En effet, comme nous pouvons le visualiser sur l'encadré A de la figure 43, le traitement de bactéries d'un biofilm par un antibiotique a pour conséquences qu'au-delà de certaines concentrations d'antibiotiques, la quantité de bactéries ne diminue plus, celles qui restent sont soit des bactéries résistantes à l'antibiotique soit des bactéries tolérantes. Le fait de remettre sous forme planctonique ces bactéries, présenté sur l'encadré B de la figure 43, et ensuite de les traiter de nouveau par le même antibiotique, présenté sur l'encadré C de la figure 43, met

en évidence 2 courbes : la bleue correspond aux bactéries résistantes qui sont capables de se multiplier en présence de l'antibiotique, la courbe rouge quant à elle correspond aux bactéries tolérantes du biofilm qui, lorsqu'elles rebasculent sous forme planctonique, redeviennent sensibles à l'antibiotique. La tolérance aux anti-infectieux est un phénomène uniquement observé dans les biofilms. Voyons dès à présent les mécanismes de tolérance et résistance aux antibiotiques des biofilms.

1.9.1.2 La tolérance intrinsèque :

La tolérance aux agents anti-microbiens dépend de deux causes principales, la première étant induite par les propriétés de la MEC du biofilm. Il est en effet logique de penser que la MEC agit comme une barrière de diffusion à l'encontre des anti-infectieux, comme nous avons pu le voir de façon similaire pour les nutriments, le dioxygène... Plusieurs mécanismes participent à cette barrière limitant la diffusion, tel que des phénomènes d'adsorption, de réaction, de dégradation enzymatique, de chélation, de complexation et de précipitation. (4) Cependant, certains agents anti-microbiens perdent leur efficacité vis-à-vis des biofilms malgré le fait qu'ils aient la capacité de diffuser facilement à travers ce dernier, n'interagissant pas avec la MEC, telle que la vancomycine à travers des biofilms de *S. aureus*. (124) Ce qui veut donc dire que l'altération de la diffusion des antibiotiques ne suffit pas, à elle seule, à expliquer ce phénomène de tolérance. Du fait de multiples gradients au sein du biofilm, l'hypothèse proposée est que beaucoup de cellules ne présentent pas toutes les conditions nécessaires pour croître, et se mettent alors dans des phases stationnaires de dormance avec un taux de croissance nul ou très faible. (60) Ainsi, la machinerie enzymatique de ces cellules étant au ralenti, les agents anti-microbiens s'ils agissent sur une voie métabolique enzymatique perdent beaucoup de leur efficacité. C'est donc la deuxième cause de tolérance des biofilms. Ceci est d'autant plus important qu'avec le temps et la maturation du biofilm, un nombre plus important de cellules persistantes est retrouvé, d'où une perte d'efficacité de la vancomycine par exemple sur des souches de *S. epidermidis*. (125) Au contraire, les composés qui altèrent l'intégrité de la membrane cellulaire, tels que la colistine, la chlorhexidine ou encore l'Ethylène diamine tétraacétique (EDTA), conservent leurs activités sur les populations centrales du biofilm, mais ont un effet amoindri sur les cellules périphériques métaboliquement actives, qui bloquent la pénétration transmembranaire de la colistine par exemple, par modification des lipopolysaccharides. (126) L'utilisation combinée d'antibiotiques de chaque catégorie semble être une solution relativement efficace. Enfin, une autre caractéristique concerne l'expression des pompes à efflux permettant de rejeter dans le milieu extracellulaire les antibiotiques ce qui abaisse considérablement leur concentration

intra-cellulaire. (123) Bien que ces pompes puissent être exprimées par les cellules sous leur forme planctonique, il se trouve qu'elles sont sur-exprimées lorsque les cellules se retrouvent sous forme sessile. Ceci a été mis en évidence entre autre chez *P. aeruginosa* qui parvient à rejeter la colistine, l'ofloxacine ainsi que l'azithromycine via les transporteurs MexCD-OprJ et MexAB-OprM. Il en est de même chez *E. coli* via le transporteur AcrAB-TolC. (123) *C. albicans* également sur-exprime des pompes à efflux de type ABC et MDR lorsque la levure se situe dans un biofilm. Cependant, l'expression de ces pompes à efflux semble diminuer au cours de la maturation du biofilm ce qui supporte l'idée que, bien que présentes, ces pompes ne joueraient pas un rôle significatif dans la tolérance aux antifongiques azolés. (87)

1.9.1.3 La résistance acquise :

Comme nous l'avons défini précédemment, la résistance aux anti-infectieux correspond à un mécanisme dont l'information est codée génétiquement. Cette résistance peut avoir pour origine plusieurs causes.

La première cause correspond à la présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques à certains endroits du biofilm. Ceci a plusieurs conséquences. Tout d'abord, ces concentrations sub-létales vont permettre de tuer tous les microorganismes sensibles à l'agent concerné, mais vont également induire la sélection des organismes résistants, qui ont dorénavant, la place laissée par les autres pour croître. De plus, de nombreuses études ont montré que des concentrations inférieures à la CMI étaient responsables d'une induction de la production de biofilm. (127) Enfin, il a également été prouvé que des concentrations sub-inhibitrices sont à l'origine d'un stress oxydatif chez les microorganismes, ce qui provoque une mutagénèse accentuée, et donc l'apparition de mutants résistants à un nouvel antibiotique ou biocide. (128)

La deuxième cause de l'acquisition de résistance, est médiée par le transfert horizontal d'information génétique. Pour le monde vivant, ce mécanisme est nécessaire à l'évolution et à la diversité, et c'est depuis l'émergence de bactéries multi-résistantes que des études à ce propos sont réalisées. La haute densité cellulaire du biofilm et la proximité des cellules favorisent ces échanges alors que la MEC stabilise les interactions, nécessaires aux échanges. Il a en effet été montré chez *S. aureus* que le transfert horizontal de gènes n'avait lieu que lorsque les cellules se trouvaient encastrées dans un biofilm. (129) Comme nous l'avons vu précédemment, il y a de l'ADN bien évidemment dans les cellules, mais aussi dans la MEC. Pour certaines espèces bactériennes, l'ADN extracellulaire peut être capté par une bactérie dite en état de compétence, puis éventuellement subir une recombinaison génétique afin d'être

intégré au génome de façon stable et héréditaire, c'est ce qu'on appelle la transformation bactérienne. (72,130) Un autre moyen plus commun pour l'échange horizontal d'ADN correspond au phénomène de conjugaison bactérienne. Ceci nécessite un contact physique entre 2 bactéries via un pilus sexuel qui va servir à transférer de l'ADN plasmidique ou chromosomique d'une cellule donneuse à une cellule receveuse, pas forcément de la même espèce ni du même biotope ni du même règne. (131) Par exemple une étude a montré que *Bacillus subtilis* (bactérie non retrouvée dans la cavité buccale) était capable de donner par conjugaison, un gène de résistance à la tétracycline à des espèces du genre *Streptococcus* (genre fréquemment retrouvé dans la cavité buccale). (132)

1.10 Les moyens de lutte contre les biofilms

Les traitements actuels des maladies infectieuses sont confrontés à plusieurs défis de taille, que sont d'une part l'antibiorésistance croissante face à laquelle très peu de nouvelles molécules ou stratégies thérapeutiques sont en développement, et d'autre part la tolérance intrinsèque des biofilms aux antibiotiques et au système immunitaire. Même si certains antibiotiques comme la rifampicine conservent une activité raisonnable à l'encontre des biofilms, la majorité des antibiotiques conventionnels sont inefficaces aux doses habituelles. (8) Des solutions alternatives sont alors nécessaires. Elles se répartissent sur 2 points : d'une part des mesures préventives afin d'éviter la formation des biofilms, et d'autre part des mesures curatives à l'encontre des biofilms déjà formés.

1.10.1 Les mesures préventives

1.10.1.1 L'hygiène :

Au bloc opératoire, l'application maximale de mesures d'hygiène, même s'il ne s'agit pas de mesures spécifiques anti-biofilm, relève du bon sens et a fait ses preuves. En effet, la mise en œuvre des recommandations de bon usage relatives à la manipulation des dispositifs médicaux (DM), associée à l'asepsie du site opératoire permettent de limiter l'adhésion et la colonisation initiale des dispositifs implantés. (60)

1.10.1.2 Les verrous sur cathéters :

Appelée aussi « lock therapy », cette stratégie est appropriée surtout pour les cathéters. Elle consiste en l'injection dans la lumière du cathéter d'une solution d'antibiotique à haute concentration (100 à 1000 fois plus que les concentrations sanguines possibles), en la maintenant pendant 12 à 24h. Selon les recommandations cette stratégie est réservée aux patients porteurs sur le long terme d'un cathéter, ayant présenté, malgré l'application de

mesures préventives, de multiples complications infectieuses. Cette restriction d'usage est imposée dans le but de limiter l'émergence de nouvelles antibiorésistances. D'autres essais de cette stratégie mais avec de l'éthanol à 70 % semblent également prometteurs. (60) Enfin, les cations divalents tels que les ions Mg^{2+} , Ca^{2+} et Fe^{2+} sont essentiels à l'adhérence et à la croissance du biofilm. Ainsi, l'utilisation de verrous à base de chélateurs de ces métaux (citrate, acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA)) pourrait être intéressante. En effet, l'utilisation de citrate, ainsi que l'association EDTA / minocycline en préventif permettent une diminution significative des infections associées aux cathéters. (133)

1.10.1.3 Inhiber l'adhésion initiale

1.10.1.3.1 L'inhibition non spécifique :

L'inhibition non spécifique des microorganismes passe généralement par la modulation des propriétés des surfaces à l'aide de polymères. De façon générale le fait d'augmenter l'hydrophilie des surfaces semble diminuer l'adhérence des agents pathogènes. (54) La recherche s'oriente également sur des polymères qui limitent la formation du film conditionnant, ce dernier étant à l'origine de l'adhérence des microorganismes. Le polymère de sulfobétaïne par exemple, grâce à ses propriétés tensioactives, induit une diminution de l'adhésion des cellules de l'hôte, des protéines ainsi que de l'adhésion microbienne. (134) Par ailleurs l'utilisation de dispositifs imprégnés de molécules antiseptiques sont en cours d'évaluation, mais le point négatif de cette approche est la faible rémanence des composés imprégnés, ce qui restreint l'indication à des dispositifs implantés sur du court terme. Enfin, la recherche s'étend également sur des polymères multifonction, dotés de propriétés variées et complémentaires telles que l'inhibition de l'adhésion, l'expression de propriétés antibiotiques, et favorisant l'intégration du DM par les tissus de l'hôte. (135)

1.10.1.3.2 L'inhibition spécifique :

L'inhibition spécifique quant à elle consiste à cibler de façon spécifique des mécanismes servant à la formation des biofilms, avec comme exemple, les adhésines impliquées dans l'adhésion irréversible. Un certain nombre d'inhibiteurs compétitifs des pili de type 1 (notamment la sous unité FimH) permettent par exemple de prévenir chez la souris lors de l'utilisation de cathéter urinaires, des infections du tractus urinaire par des souches uropathogènes d'*E. coli*. (136) D'autres approches étudient également l'inhibition de synthèse de ces pili. (134) Cependant l'inhibition spécifique est compliquée face à la pluralité des structures impliquées durant le processus d'adhérence, et l'hypothèse de développer une molécule anti-adhérence universelle semble faible.

1.10.1.4 Les vaccins

Des études ont montré des résultats encourageant à propos de la mise au point de vaccins à l'encontre des biofilms. Plusieurs de ces vaccins sont en cours d'évaluation, le but est d'immuniser des individus vis-à-vis d'antigènes infectieux exprimés lors de l'adhésion précoce (adhésines) ou dans le biofilm formé (polysaccharides de la MEC). Des preuves d'efficacité ont été obtenues entre autres vis-à-vis d'*E. coli*, de *S. aureus* ou encore de *Fusobacterium nucleatum* mais des investigations cliniques supplémentaires sont nécessaires. (60,134,137)

1.10.2 Les mesures curatives

1.10.2.1 L'ablation du dispositif

Dans le cadre d'une infection liée ou suspectée à un dispositif implanté, l'ablation de ce dernier est en principe conseillée malgré des traitements antibiotiques de longue durée, ne pouvant à eux seuls éradiquer le biofilm formé. Cependant, ce choix thérapeutique peut être délicat vis-à-vis de certains dispositifs implantables (pacemaker...) et les retentissements multiples (qualité de vie du patient et impacts économiques liés à l'hospitalisation...) (3)

1.10.2.2 Induire la dispersion du biofilm

La MEC du biofilm est finalement la cause de la majorité des problèmes. L'altération de cette dernière déstabiliserait le biofilm dans son ensemble ce qui permettrait de relâcher et de rendre plus accessibles les cellules nichées en son sein, rendant de nouveau efficace le système immunitaire de l'hôte ainsi que les antibiotiques. Bien que ce procédé soit particulièrement adapté au milieu industriel, il entraîne en revanche la libération en quantité importante, de cellules du biofilm risquant d'induire une réaction inflammatoire notable ainsi qu'une infection systémique. C'est pour cela que des antibiotiques doivent être associés à cette stratégie. Pour cela, plusieurs pistes sont explorées.

Premièrement, la dispersion du biofilm peut être enzymatique. (123) L'analyse de la composition de la MEC de certains biofilm a permis de mettre en évidence des enzymes capables d'hydrolyser certains polymères. Les cibles peuvent être des polysaccharides comme le poly N acétyl glucosamine (fréquemment retrouvé chez *E. coli*, *S. aureus* et *S. epidermidis*) qui est dégradé par la dispersine B (une enzyme produite par la bactérie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*). Les enzymes peuvent également cibler l'ADN extracellulaire, c'est le cas par exemple de la DNaseI. (123) L'inconvénient des enzymes est double : leur spectre

d'action est très restreint, et il subsiste toujours un risque d'immunisation de l'organisme à l'encontre de celles-ci, ce qui les rendrait inefficaces.

Une autre piste actuelle concerne le di-GMPc, un messager secondaire intra-cellulaire fortement impliqué dans le basculement entre la forme planctonique et la forme sessile. La diminution de sa concentration intra-cellulaire induit la dispersion du biofilm. Si des composés tels que le sulfathiazole et l'aziathoprine sont capables d'inhiber la diguanylate cyclase (enzyme de synthèse du di-GMPc), la piste la plus intéressante semble pencher en faveur du monoxyde d'azote (NO). Cette petite molécule est entre autre produite par *P. aeruginosa*, et permet d'induire la dispersion du biofilm en diminuant les taux intra-cellulaires de di-GMPc via l'activation d'une phospho diestérase. (134) Cette piste est très intéressante car d'une part, le NO est capable d'induire la dispersion des biofilms à des concentrations faibles et non toxiques, et d'autre part ce mécanisme d'action semble largement conservé au sein de nombreuses espèces. (8)

Enfin, les chélateurs tels que l'EDTA, comme évoqués précédemment peuvent agir non seulement durant les phases précoces de formation des biofilms, mais peuvent également participer à leur dispersion, toujours en opérant de la même façon. L'EDTA semble particulièrement intéressant car au delà de son activité pro-dispersante, il présente une activité bactéricide directe à l'encontre des bactéries des biofilms. (138)

Un autre moyen de dispersion peut être médié par la modulation du QS, évoqué ci-dessous.

1.10.2.3 La modulation du QS

Comme nous l'avons vu précédemment, de nombreux facteurs de virulence, y compris la formation de biofilms, sont sous l'égide du QS. Le brouillage des communications inter-cellulaires représente donc une piste intéressante, mais très complexe. La première approche consiste à empêcher l'action des auto-inducteurs, en bloquant leur liaison avec des inhibiteurs compétitifs. (94) Ces derniers peuvent être classiquement des analogues structuraux substitués de telle sorte qu'ils parviennent à se lier aux récepteurs mais n'entraînent aucune action. Ceci a été mis en évidence chez des bactéries à Gram négatif telle que *P. aeruginosa*. (97) D'autres composés structurellement différents peuvent faire office d'inhibiteurs. Toujours chez *P. aeruginosa*, la méta-bromo-thiolactone est capable d'inhiber partiellement les récepteurs LasR et RhlR à l'origine du blocage de la production de facteurs de virulence et de la synthèse de biofilm. (97) Bloquer la synthèse des auto-inducteurs représente une autre option. Par exemple, encore chez *P. aeruginosa*, la synthèse du PQS dépend de l'anthranilate comme composé intermédiaire, et sa production peut être inhibée avec le méthyl anthranilate,

un analogue structural. Quant aux enzymes de synthèse LasI et RhlI, elles semblent pouvoir être inhibées par l'acide salicylique, certains tannins, ainsi que le trans-cinnamaldéhyde (composé retrouvé dans certaines HE). (97) Enfin, la découverte potentielle d'agonistes des récepteurs de certains auto-inducteurs est une alternative car, selon les espèces, comme chez *Vibrio cholerae*, c'est l'activation du QS qui réprimerait la production de facteurs de virulence et promouvrait la dispersion du biofilm. (97) Du côté des champignons également la modulation du QS est très intéressante puisque, par exemple, le farnésol semble capable d'inhiber la formation de biofilm chez de nombreuses espèces (*C. albicans*, *C. dubliensis*, *D. hansenii*, *H. capsulatum*...) et possède également un effet dispersif sur le biofilm de *C. albicans* entre autres. (113) Finalement, même si le brouillage du QS comme approche anti-biofilm offre de multiples perspectives, la complexité de toutes les interactions et redondances des mécanismes nécessite encore de nombreuses études.

1.10.2.4 Lutter contre les cellules persistantes

Les cellules persistantes nichées au fond des biofilms représentent à la fois un défi et une cible. Un défi car ces cellules expriment la plupart du temps une activité métabolique très ralentie, et qu'elles sont principalement situées dans les couches profondes des biofilms, difficilement accessibles. Ainsi une des solutions préventive serait d'éviter leur formation. Il est clair maintenant qu'un des facteurs essentiel de la formation des cellules persistantes est induit par le stress nutritionnel, impliquant le (p)ppGpp (guanosine tétra ou pentaphosphate), médiateur de la réponse stringente. (134) Son taux intra-cellulaire étant corrélé à l'induction de la persistance, plusieurs études tentent de trouver des moyens de diminuer sa concentration afin de lutter contre l'apparition des cellules persistantes. (139) D'autres approches consistent à augmenter malgré tout la sensibilité des cellules persistantes aux antibiotiques. Les ions argentiques par exemple sont capables de potentialiser plusieurs antibiotiques à l'encontre de bactéries à Gram positif ou négatif en favorisant d'un côté l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène et de l'autre, la perméabilité de la membrane bactérienne. Certains sucres également comme le mannitol ou le fructose, mais aussi certains acides aminés basiques comme la L-arginine potentialisent l'action des aminosides en favorisant leur pénétration dans les cellules persistantes. (134) Enfin, une autre alternative serait d'exploiter la faiblesse des cellules persistantes liée à leur métabolisme ralenti, telle que leur haute sensibilité à la protéolyse. Des résultats prometteurs émanent du peptide ADEP4 activant la protéase ClpP chez les bactéries à Gram positif par exemple. (134) La figure 41 nous présente un schéma de synthèse des différents sites d'actions envisageables pour lutter contre les biofilms.

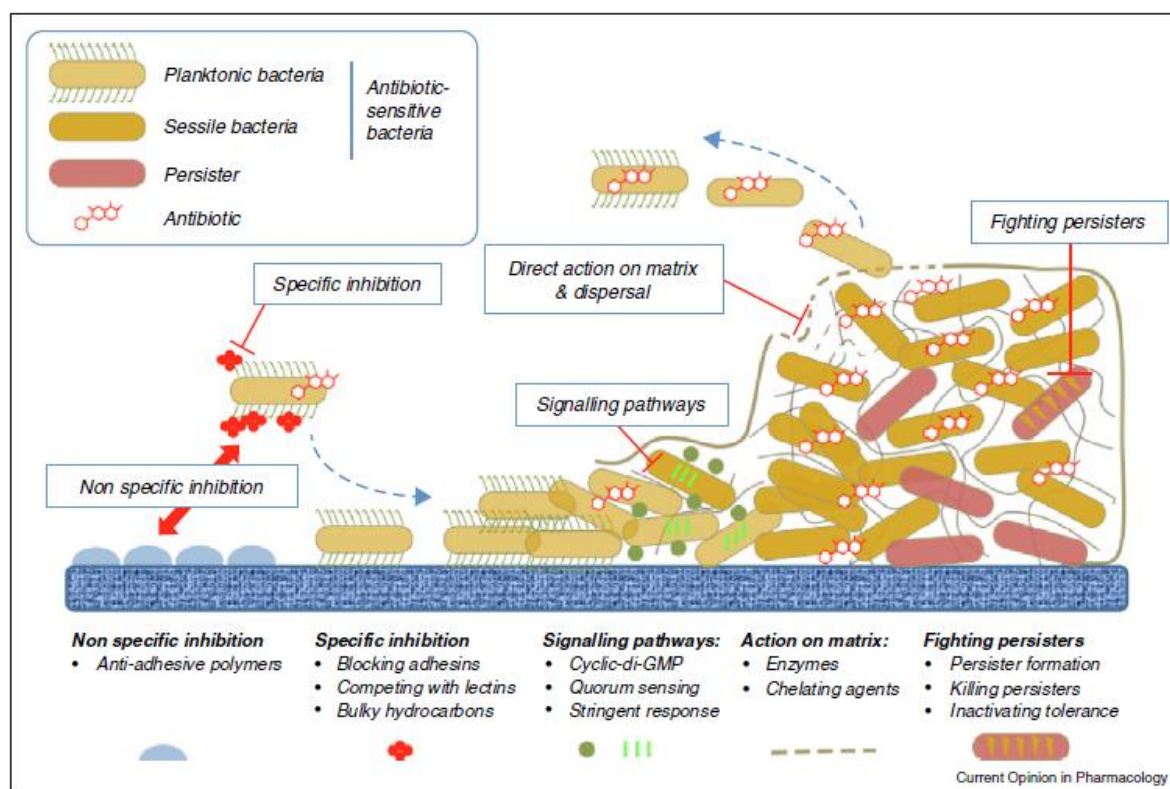


Figure 41 : schéma de synthèse avec les différentes cibles thérapeutiques sur différents phénotypes bactériens. (134)

A en croire l'ensemble de ces perspectives, certaines plus prometteuses que d'autres à l'encontre des biofilms, la recherche fondamentale semble plus que jamais intense. Cependant, en dépit de tous ces efforts en laboratoire, les progrès avancent lentement en clinique. Au-delà du coût financier de développement de nouveaux médicaments à usage humain, les différentes stratégies étudiées doivent faire face à la diversité des microorganismes et sont bien souvent, chacune, efficaces à l'encontre seulement d'un nombre restreint d'espèces, limitant leur efficacité en général. Aussi, bien que les études in vitro soient indispensables, les molécules doivent être validées sur des modèles in vivo montrant leur efficacité, leur pharmacocinétique et leur toxicité potentielle doivent être également analysées.

2 La place des HE contre les biofilms

2.1 Les HE

Il y a fort longtemps que l'Homme utilise les plantes, ce dernier exploitant ce qu'il avait alors à portée de main pour se soigner. Lorsque nous parlons des HE, il est en effet important d'avoir à l'esprit l'héritage conséquent que cela représente. Les plantes aromatiques entières ont d'abord été utilisées à des fins alimentaires, puis religieuses ou encore médicinales, et

progressivement, ces plantes aromatiques furent manipulées afin d'en extraire les molécules odorantes bénéfiques en les brûlant, en les faisant macérer dans des huiles végétales ou encore en les distillant. (140) Certains pays étaient très avancés pour l'époque dans les procédés d'extraction des HE puisque des alambics primitifs datant de plus de 5 000 ans avant Jésus Christ ont été retrouvés en Inde, en Chine ou encore au Pakistan. (140) L'usage des HE s'est répandu ensuite au reste des civilisations, les Egyptiens utilisaient par exemple des onguents à base d'HE lors des processus de momification, dont l'odeur, même après 3500 ans se répandait encore lorsque les bandages de la momie de Toutankhamon furent ôtés. (140) Néanmoins, même si les HE étaient utilisées dans de nombreux domaines (la parfumerie, la médecine, les embaumements, la cosmétique...), leur usage fut éclipsé par l'avènement de la chimie de synthèse du 20^{ème} siècle permettant de produire des composés synthétiques à faible coût. Pourtant, diverses études datant des années 1900 mettaient en valeur les propriétés antiseptiques puissantes des HE. Robert Koch par exemple, connu pour la découverte du bacille de Koch, observe en 1881 l'effet bactéricide de l'HE de thérébenthine issue de résines de conifères. (141) William Harrison Martindale montre également en 1910 l'efficacité nettement supérieure de l'HE d'origan par rapport au phénol (antiseptique largement utilisé à l'époque) vis-à-vis d'*E. coli*. (141)

A en croire les dizaines de milliers de tonnes d'HE, les milliards de dollars de chiffre d'affaire annuel mondiaux, ainsi que le nombre sans cesse croissant d'études à leur égard, (142) les HE connaissent un nouveau regain d'intérêt, et ceci pour plusieurs raisons. Elles sont en effet considérées comme des produits « tendance » de par leur origine naturelle, leur conférant une large acceptation par la population générale. De plus, les HE utilisées à faibles doses induisent peu d'effets indésirables, ce sont des substances facilement biodégradables et leur coût est relativement peu élevé. (143) Par ailleurs, une autre explication du regain d'intérêt, est directement liée à la modification de la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques que le monde connaît actuellement, ce phénomène devenant de plus en plus préoccupant. (27) Les biofilms sont une des causes principales de cette diminution de la sensibilité, via l'induction d'une tolérance aux antibiotiques et en favorisant l'apparition de résistances à ces derniers. (123) Les HE pourraient ainsi être une piste intéressante dans la lutte contre les biofilms.

2.1.1 Rappels succincts

Il est difficile de citer précisément une définition des HE car il en existe plusieurs. Selon la pharmacopée européenne VI^e édition, une HE est définie comme étant « un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale

botaniquement définie, soit pas entraînement à la vapeur d'eau, soit pas distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'HE est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement de sa composition. »

En aromathérapie, bien que d'autres procédés existent, le terme HE regroupe uniquement les produits naturels, purs et totaux, issus de la distillation par entraînement à la vapeur d'eau des feuilles, tiges, écorces, racines, fleurs... odoriférantes des plantes ou arbres aromatiques. L'HE correspond à la distillation de l'essence des plantes. L'essence quant à elle diffère de l'HE par sa composition et son mode d'extraction, car elle est extraite par pressage à froid du péricarpe des *Citrus*. (140)

Par soucis de redondance et d'originalité, je ne m'attarderai pas davantage sur les HE en général, d'autres travaux précédents abordent parfaitement le sujet. (140,144,145)

2.1.2 Précautions d'emploi

Pour les personnes non averties, les produits naturels, souvent considérés à tort comme étant dénués de toxicité, peuvent être utilisés de façon abusive, surtout lorsqu'il y a confusion entre plante à HE, et HE. Si la plante en question est dépourvue de toxicité, son HE ne l'est pas toujours pour autant. Il me semble bon de rappeler quelques précautions de bases (140,145) :

- Pas d'injection d'HE par voie intra-musculaire ou intra-veineuse.
- Ne pas utiliser d'HE pure sur les oreilles, sur le nez, sur les zones ano-génitales ainsi que sur les muqueuses. En général, les HE doivent être diluées au maximum entre 2 et 5 % sur les muqueuses.
- Interdiction totale d'utiliser des HE sur les yeux. En cas de contact accidentel, rincer à l'aide d'une huile végétale, afin de diluer, et diminuer l'irritation et la toxicité, l'eau est à utiliser dans un second temps en rinçage abondant.
- Ne pas utiliser d'HE pure chez l'enfant de moins de 1 an, et pas de voie orale avant 3 ans, pas de menthe poivrée avant 6 ans (risque non négligeable de spasme laryngé).
- Rester prudent quant à l'utilisation d'HE et leurs posologies chez l'enfant, la femme enceinte et allaitante.
- Ne pas employer d'aérosol d'HE chez les personnes asthmatiques et allergiques.
- Chez tout patient à terrain allergique, appliquer pur 1 à 2 gouttes de l'HE ou du mélange dans le creux du coude et vérifier l'absence de signes au bout de 10 minutes.

- Prudence avec les HE photosensibilisantes (essence de *Citrus*, HE d'*H. perforatum*, d'*Angelica archangelica*...), ne pas s'exposer au soleil dans les 6 h après l'application cutanée et être prudent si ingestion par voie orale sur le long terme.
- Attention à la dermocausticité des HE riches en phénols et en cinnamaldéhyde, elles doivent être diluées respectivement à 20 % et 10 % maximum dans de l'huile végétale.
- Attention à l'hépatotoxicité à haute dose des phénols, leur utilisation peut être prolongée à faibles doses ou courte à haute dose (<15 jours) et être associée à des HE hépatoprotectrices type HE de romarin à verbénone, de carotte, essence de citron, ou encore le chardon marie en phytothérapie.

Les HE semblent sans danger à faibles concentrations en thérapeutique, la toxicité n'apparaît qu'à des hautes concentrations. (146) Cependant, la toxicité chronique à faible concentration est nettement moins connue. (145) Le fait que certaines HE ou composés soit carcinogènes chez le rat (safrole, β -asarone, estragol...), d'autres oestrogènes like, d'autres cortisone like... oblige à évaluer leur toxicité ainsi que celles de leurs composants in vitro à l'encontre des cellules de mammifères et in vivo avant de pouvoir les utiliser en pratique en dessous des seuils définis, bien que cela reste compliqué à faire compte tenu de la complexité de composition des HE, et de la toxicité éventuelle de leurs métabolites. (147)

2.1.3 Modes d'actions sur les cellules planctoniques

Les modes d'action des HE sur les cellules planctoniques ont été au fil du temps, élucidés. Même s'ils sont différents de ceux contre les biofilms, il est intéressant de les citer brièvement. Tout d'abord, contrairement aux antibiotiques classiques, les HE, de par leur composition complexe, possèdent la plupart du temps plusieurs mécanismes d'actions. (148) Cette pluralité de mécanismes d'action reste vrai pour certains de leurs composés utilisés seuls. (85) En tout état de cause, le mécanisme d'action des HE dépend de leur composition chimique, et leur activité anti-microbienne est due à une cascade de réactions impliquant la cellule toute entière. Le caractère hydrophobe des HE est probablement le paramètre le plus important, et c'est également ce qui explique que généralement les HE soient plus actives à l'encontre des bactéries à Gram positif que contre celles à Gram négatif, à cause de la différence de structure de la paroi bactérienne. (143,148) De façon générale, voici les principaux modes d'actions, ou plutôt sites d'action des HE à l'encontre des cellules planctoniques (149–151) :

- Altération de la nature et de la proportion des acides gras de la bicouche lipidique de la membrane plasmique entraînant une modification de sa fluidité.

- Altération de la paroi cellulaire.
- Liaison et altération des protéines membranaires.
- Augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique et de la paroi cellulaire entraînant la perte de composés intra-cellulaires (ions, métabolites, ATP...) ainsi que la perturbation de la pression hydrostatique, du statut énergétique, des régulations métaboliques, du transport de solutés...
- Coagulation du cytoplasme.
- Inhibition des enzymes cytoplasmique et membranaires.
- Altération de la force motrice protonique et inhibition du transport des électrons pour la production d'énergie.
- Inhibition de la synthèse d'ergostérol chez les champignons.
- Perturbation du QS.
- Changements conformationnels cellulaires.

2.2 Avant propos

Sur la revue de la littérature qui suit, à cause du nombre important de publications, j'ai souhaité restreindre mon analyse aux articles qui traitent de l'effet anti-biofilm des HE à l'encontre des biofilms d'*E. coli* (31 articles depuis 2011), de *S. aureus* (43 articles depuis 2011) et de *C. albicans* (51 articles depuis 2012), ceci afin d'avoir une bactérie à Gram négatif, une bactérie à Gram positif ainsi qu'une levure. En effet, rien que sur la base de donnée Web of Science, 405 publications sont disponibles depuis 2012 avec comme équation : « biofilm* » ET « essential oil* ». Par ailleurs, j'ai souhaité détailler l'étude de certains articles qui abordent entre autre les mécanismes d'actions des HE, la plupart des données des autres articles sont résumées dans les tableaux en annexe.

2.3 Etude sur un exemple de bactérie à Gram négatif : *Escherichia coli*

2.3.1 Généralités à propos d'*E. coli* et de son biofilm

E. coli est un bacille à Gram négatif anaérobie facultatif, ne sporulant pas. La plupart des souches d'*E. coli* sont retrouvées dans l'intestin des organismes à sang chaud. Ces souches jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du microbiote intestinal en empêchant la colonisation par d'autres bactéries ou levures pathogènes. Néanmoins, les biofilms de certaines souches d'*E. coli* sont responsables de morbidité et de mortalité importante. Ces souches pathogènes sont classifiées en 2 types : le groupe pathogène intestinal impliqué dans la production de toxines diverses associées à la maladie de Crohn, à certains syndromes entériques et hémorragiques. (152) Le groupe pathogène extra intestinal

lui est fréquemment impliqué dans les infections du tractus urinaire, certains sepsis néonataux, méningites... et est responsable d'une part importante des infections associés à des dispositifs médicaux (cathéters sanguins ou urinaires, prothèses...), faisant des biofilms d'*E. coli*, la première cause d'infection sur cathéter urinaire. (152) Selon les souches, différents facteurs de virulences permettent de favoriser la persistance et la colonisation par des biofilms, tels que les pili et leurs adhésines, des toxines, des sidérophores, parfois une capsule polysaccharidique, la production de MEC... (152)

2.3.2 Etude d'HE et/ou de leurs composants potentiellement intéressants contre les biofilms d'*E. coli*

2.3.2.1 Etude 1 : Etude de concentrations sub-inhibitrices d'Allicine sur la formation de biofilm, l'adhésion et la mobilité d'*Escherichia coli* uropathogène (UPEC) : (85)

Détail du composé	L'allicine (diallylthiosulfate), composé retrouvé en grande quantité dans l'HE d'ail (<i>Allium sativum</i>), est ici testé contre des souches UPEC. Les expériences sont menées avec un composé de synthèse, similaire à celui retrouvé dans l'HE d'ail.
Protocole	Trois souches d'<i>E. coli</i> ont été utilisées dans cette étude : une souche standard (ATCC 25922) et 2 souches uropathogènes : J96 (ATCC 700336) et CFT073 (ATCC 700928). 7 expériences ont été menées : -expérience 1 : détermination des concentrations sub-inhibitrices (CSI) d'allicine. -expérience 2 : étude de l'impact des CSI d'allicine sur la formation et la dispersion de biofilms d'UPEC. -expérience 3 : étude de l'allicine sur l'architecture des biofilms d'UPEC. -expérience 4 : étude de l'effet de l'allicine sur l'adhérence et la mobilité d'UPEC. -expérience 5 : étude de l'expression du gène fimH codant pour une sous unité des pilis de type 1 en présence d'allicine. -expérience 6 : étude de docking moléculaire entre l'allicine et les pilis de type 1. Expérience 7 : étude de l'effet de l'allicine sur le système à 2 composants BarA-UvrY et de la protéine CsrA impliqués dans la formation et la dispersion de biofilm d'UPEC.
Paramètres	La croissance bactérienne a été déterminée en mesurant la densité optique des bouillons de culture à 600 nm après 24 h d'incubation avec ou sans allicine. La quantité de biofilm produite après incubation des souches UPEC a été déterminée par méthode colorimétrique avec le cristal violet. (153) L'architecture des biofilms a été visualisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB) Hitachi S-4800. Le test d'adhérence des UPEC a été effectué sur cellules uroépithéliales humaines T24 (ATCC HTB-4) pour un rapport de 100 UPEC pour une T24, incubé pendant 2h avec ou sans allicine. Le test de mobilité a été effectué en mesurant le diamètre de chaque colonie UPEC après incubation pendant 24 h à 37°C préalablement traitée avec de l'allicine pendant 2h à différentes concentrations. Les niveaux d'expression des gènes concernés ont été mesurés par RT-qPCR, la variation d'expression a été déterminée par comparaison avec le niveau d'expression des ARN ribosomiques 16S. L'étude de docking a été réalisée sur 10 cycles avec le programme GOLD.

Interprétation des résultats :

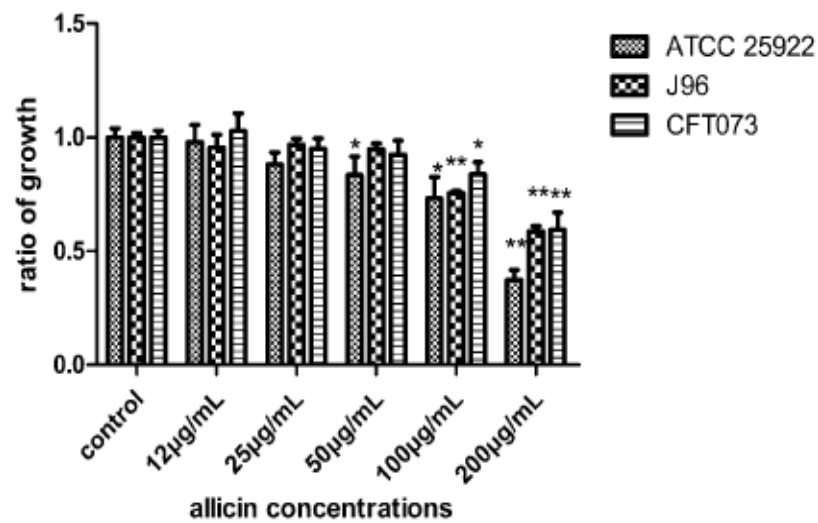


Figure 42 : croissance des formes planctoniques d'*E. coli* en fonction de concentrations croissantes d'allicine. $p < 0,05$ (*). (85)

Pour s'intéresser à l'impact spécifique sur le biofilm, il est nécessaire de déterminer les concentrations sub-inhibitrices d'allicine (CSI) qui ont un effet sur le biofilm mais qui n'altèrent pas la croissance des bactéries. Ainsi la figure 42 nous montre qu'il ne faut pas dépasser la concentration de 50 µg/mL. C'est pour cela que le reste de l'étude se déroule avec des concentrations testées à 12, 25 et 50 µg/mL d'allicine.

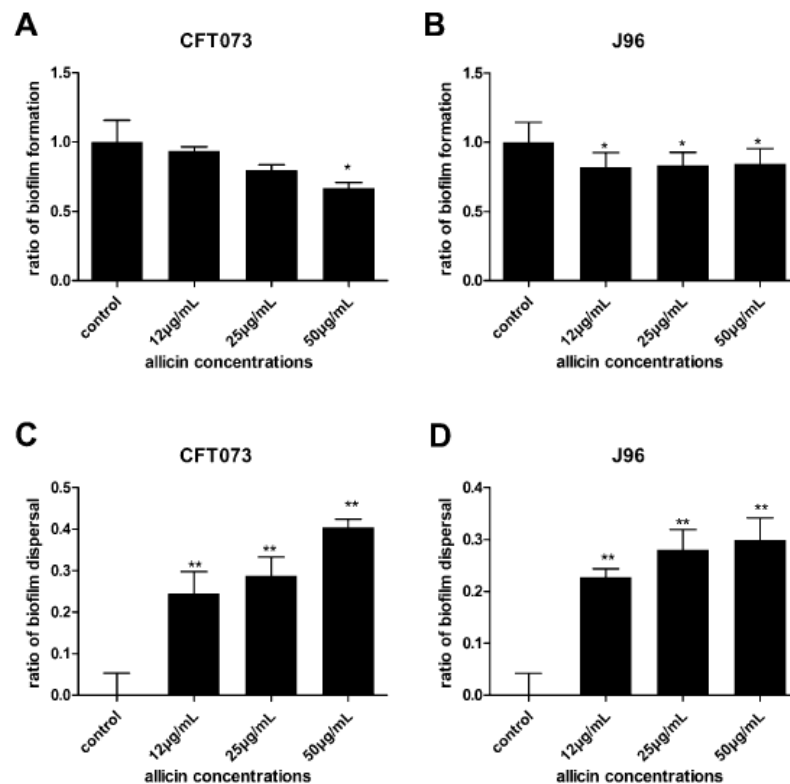


Figure 43 : Impact de l'allicine sur la formation (A/B) et la dispersion (C/D) du biofilm des souches CFT073 (A/C) et J96 (B/D) d'*E. coli*. (85)

Les résultats présentés sur la figure 43 montrent que, en comparant au témoin, la concentration de 50 µg/mL d'allicine permet une diminution significative de 33 % de la formation de biofilm chez CFT073 et toutes les concentrations testées d'allicine permettent de diminuer de 17 % la formation de biofilm chez J96 ($p < 0,05$). D'autre part, la dispersion du biofilm est proportionnelle à la concentration d'allicine. Avec la concentration à 50 µg/mL, 40 % du biofilm de CFT073 et 30 % du biofilm de J96 a été dispersé. L'utilisation d'allicine à 50 µg/mL a donc permis d'inhiber la formation et de favoriser la dispersion du biofilm de deux souches uropathogènes.

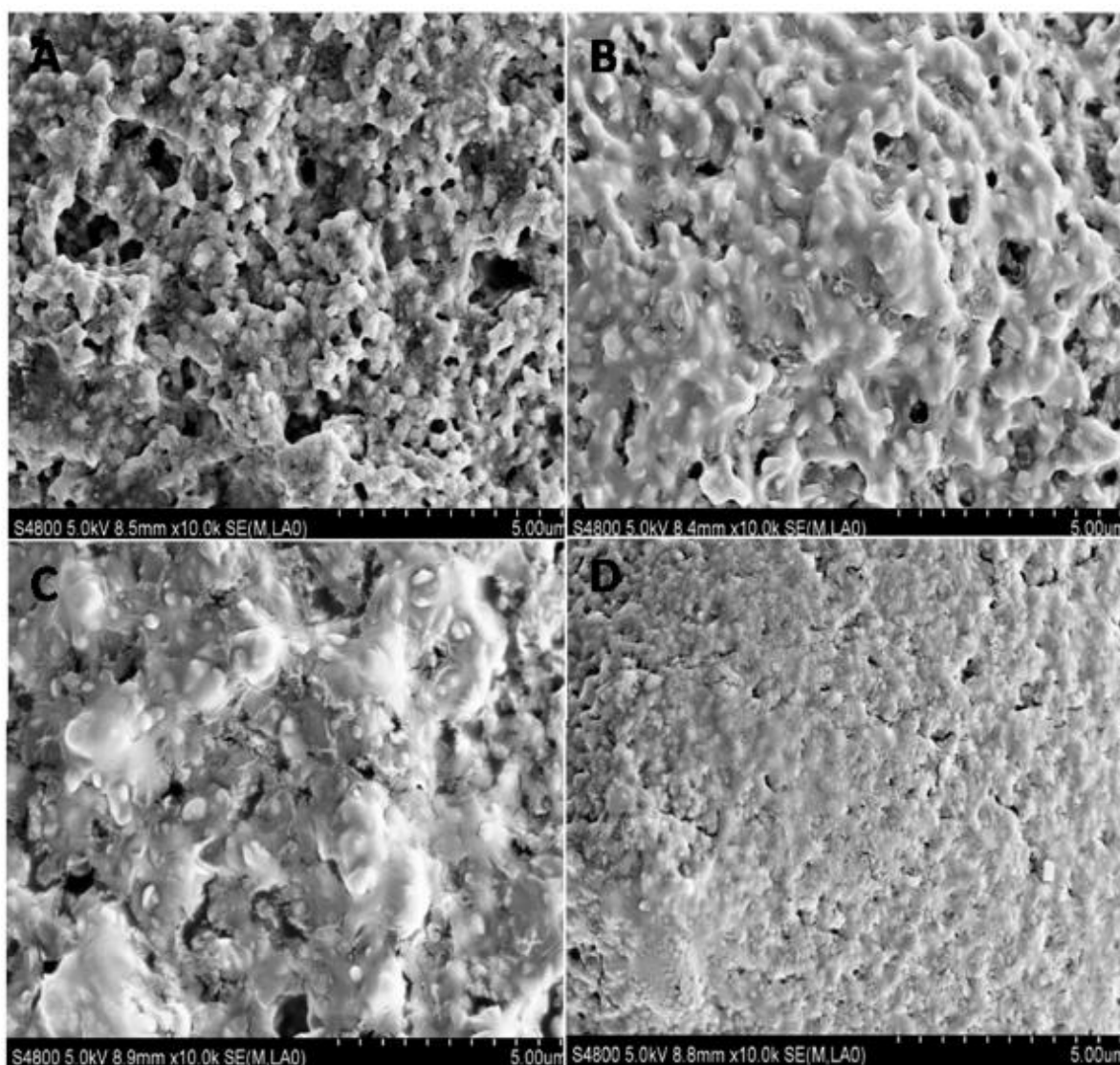


Figure 44 : vue en microscopie électronique à balayage d’UPEC CFT073 en présence ou non d’allicine. Contrôle (A), 12 µg/mL (B), 25 µg/mL (C), 50 µg/mL (D). (85)

L’image contrôle A de la figure 44 permet de visualiser la communauté bactérienne dense encastrée dans une MEC. La surface présente un aspect rugueux, au milieu de laquelle on peut visualiser des canaux. Après 24 h d’incubation en présence d’allicine sur les images B et D de la figure 44, plus les concentrations sont élevées, plus la surface devient lisse avec un aspect muqueux qui recouvre les canaux jusqu’à les faire disparaître. L’architecture des biofilms est donc altérée par la présence d’allicine.

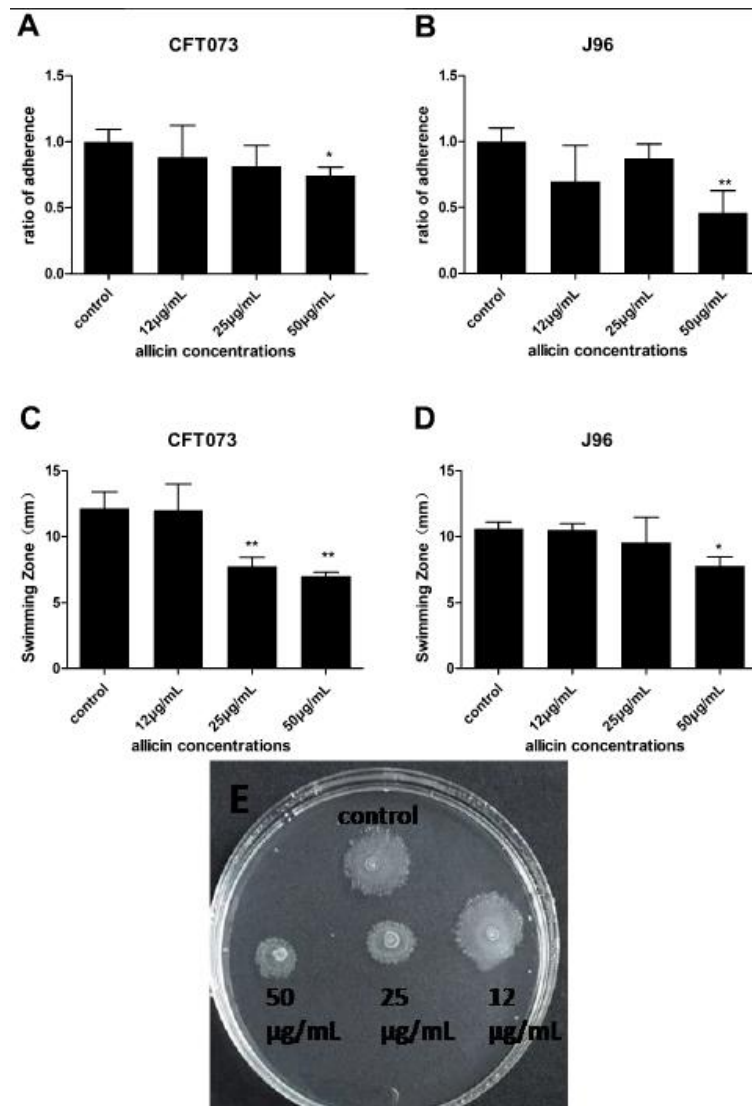


Figure 45 : Impact de l'allicine sur l'adhérence et la mobilité de CFT073 et J96. (85)

Les résultats présentés sur la figure 45 montrent que l'utilisation de 50 µg/mL d'allicine a permis la diminution de l'adhérence de CFT073 et J96 de 26 % et 54 % respectivement sur les cellules T24 ($p < 0,05$). Les autres concentrations d'allicine n'ont pas d'effet significatif sur la diminution de l'adhérence.

De plus, les concentrations à 25 et 50 µg/mL d'allicine ont permis de diminuer de près de 50 % la diamètre de mobilité chez CFT073, et uniquement la concentration à 50 µg/mL d'allicine a permis de diminuer d'environ 25 % le diamètre de mobilité de J96 comme on peut le voir sur la gélose E.

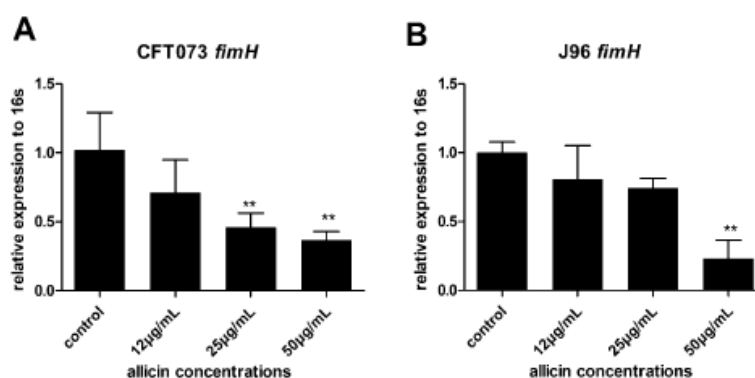


Figure 46 : Impact de l'allicine sur l'expression du gène *fimH* codant pour la sous unité *fimH* des pilis de type 1 pour les souches CFT073 et J96. (85)

Les résultats présentés sur la figure 46 montrent qu'une concentration de 50 µg/mL d'allicine permet de diminuer de 64 % et 77 % respectivement l'expression du gène *fimH* chez CFT073 et J96, et l'allicine à 25 µg/mL permet de diminuer de 54 % l'expression de *fimH* chez CFT073. Sachant que ce gène code pour l'adhésine *fimH* située sur les pilis de type 1, qui est capable de reconnaître l'uroplakine Ia/IIIa et l'intégrine $\alpha3/\beta1$, elles-mêmes situées sur l'épithélium de la vessie, la diminution de l'adhérence préalablement observée est probablement due à la diminution d'expression des pilis de type 1, ou à la formation de pilis non fonctionnels.

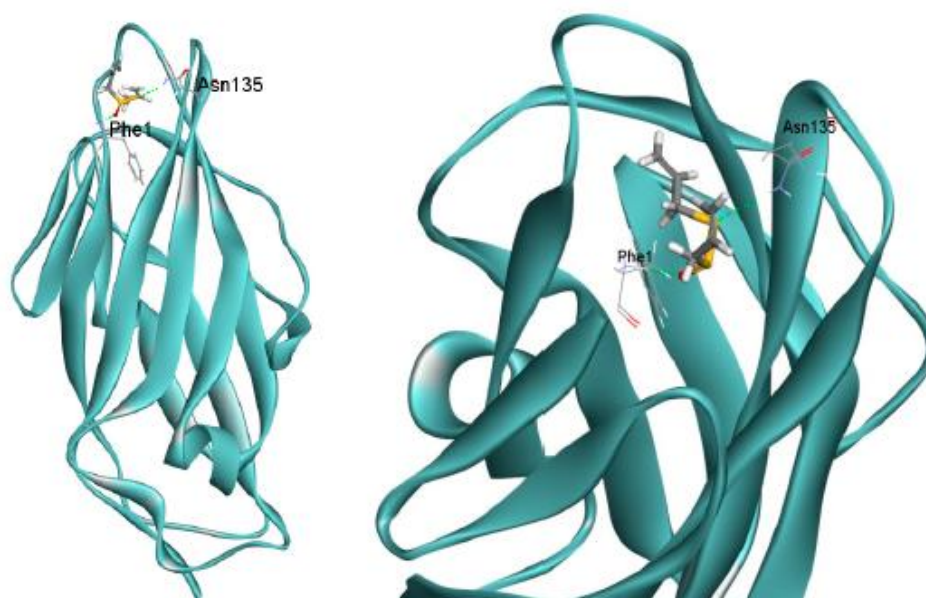


Figure 47 : visualisation par docking de l'allicine cristallisée dans le domaine lectine du pili de type 1. (85)

La visualisation par docking présentée sur la figure 47 permet de montrer qu'en plus de l'inhibition de l'expression du gène *fimH*, l'allicine est à l'origine d'une inhibition

compétitive en neutralisant l'interaction entre les pilis et les glycoprotéines cibles de la vessie, en s'insérant directement dans la poche réceptrice par formation de liaisons hydrogène avec la phénylalanine 1 et l'asparagine 135.

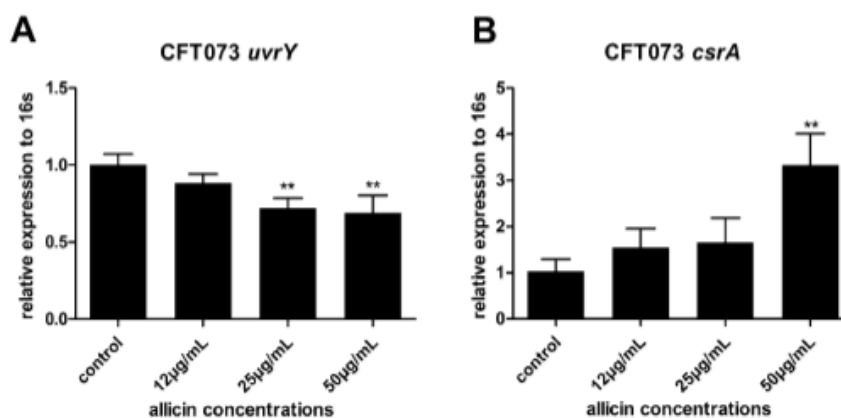


Figure 48 : Impact de l'allicine sur la voie BarA/UvrY/Csr de la souche CFT073. (85)

D'autres études préalables ont montré que chez *E. coli* CFT073 la stimulation du système à 2 composants BarA / UvrY était impliqué dans la formation du biofilm (154) et que la sur-expression de CsrA (protéine sous l'influence de BarA / UvrY) conduisait à une inhibition de la formation de biofilm. Effectivement, UvrY contrôle la transcription de gènes qui codent pour des sous unités majeures de pilis de type 1 ou P. Les résultats présentés sur la figure 48 montrent donc un autre mode d'action de l'allicine puisque l'allicine à 25 ou 50 µg/mL permet de diminuer de 32 % l'activité de BarA / UvrY et 50 µg/mL permet de multiplier par 3,3 le taux de la protéine CsrA chez CFT073.

Discussion :

Les dérivés de l'HE d'ail montrent des résultats intéressants dans la lutte antibactérienne. En effet en plus de l'allicine, l'ajoène, autre composé présent dans l'HE d'ail, possède un effet antibactérien par inhibition des gènes impliqués dans la pathogénicité médiée par le QS (155). Dans cette présente étude, il a été montré que l'allicine possédait des capacités très intéressantes vis-à-vis des biofilms de souches uropathogène d'*E. coli*. L'allicine, à seulement 50 µg/mL inhibe la formation de biofilm à de multiples niveaux en inhibant d'une part l'adhésion bactérienne aux cellule uroépithéliales en interagissant directement avec les pilis de type 1, mais aussi en diminuant l'expression du gène *fimH* qui code pour une sous unité des pilis de type 1. L'adhésion étant la première étape nécessaire à la formation d'un biofilm, c'est donc un point majeur pour lutter contre les infections du tractus urinaire. D'autre part, l'inhibition de la formation du biofilm peut également être médiée par la diminution d'expression du système à 2 composants BarA / UvrY et par l'augmentation de la protéine

CsrA qui en plus, possède une activité stimulatrice de la dispersion du biofilm (156). Enfin, l'allicine semble pouvoir diminuer l'expansion des biofilms en limitant la mobilité des bactéries qui sont libérées par le biofilm mature. Pour terminer, l'allicine semble agir sur les biofilms matures puisque seulement 1h d'incubation a permis de diminuer de 30 % et 40 % les biofilms de J96 et CFT073 respectivement, à 50 µg/mL. L'allicine pourrait ainsi aider à libérer les cellules persistantes nichées au fond du biofilm afin de les rendre accessibles aux antibiotiques, utilisés en association. L'observation microscopique a mis en évidence une modification de l'aspect de surface des biofilms avec un aspect mucoïde du à une sur-expression d'exopolysacharides désorganisés. L'allicine possède probablement d'autres mécanismes d'action non élucidés par cette étude.

En conclusion, l'allicine représente un réel intérêt thérapeutique mais des études complémentaires de cytotoxicité sont nécessaires afin de pouvoir pousser l'expérimentation in vivo sur l'Homme. L'utilisation en combinaison avec des antibiotiques serait judicieuse pour avoir une synergie d'action anti-biofilm et antibactérienne.

2.3.2.2 ***Etude 2 : Etude de l'effet anti-biofilm du trans-cinnamaldéhyde sur des souches uropathogènes d'E. coli. (UPEC) (158)***

Détail du composé	Le trans-cinnamaldéhyde (TC) ou aldéhyde cinnamique ou 3-phényl-prop-2-ène est un aldéhyde aromatique, principal composé retrouvé dans les HE de canelle : <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (cannelle de ceylan), <i>Cinnamomum cassia</i> (cannelle de chine) et <i>Cinnamomum loureirii</i> (cannelle du vietnam)
Protocole	Des cathéters urinaires en latex ainsi que des microplaques de polystyrène ont été inoculés par 10^5 à 10^6 UFC d'UPEC puis traités par le TC à 0%, 0,1%, 0,25% ou 0,5% à 37°C afin d'étudier l'inhibition de la formation de biofilm. Des cathéters avec des biofilms d'UPEC préformés ont également été traités par lock thérapie contenant du TC à 0%, 1%, 1,25% ou 1,5%. L'efficacité du TC sur chacune des expériences a été déterminée après 0, 1, 3 et 5 jours d'incubation. Une analyse microscopique de l'architecture des biofilms a été réalisée, ainsi qu'un test de cytotoxicité du TC. L'expérimentation porte sur 2 souches UPEC dénommées ATCC 700415 et UTI 89.
Paramètres	L'effet préventif de la formation de biofilm a été mesuré en comptabilisant le nombre d'UFC attaché au substrat (polystyrène ou cathéter). Pour cela les substrats ont été rincés, puis grattés avec une spatule stérile, et les bactéries sessiles mises en culture sur gélose TSA (tryptone caséine soja). L'inactivation des biofilms préformés a été déterminée à l'aide de la méthode colorimétrique du cristal violet. (153) L'observation microscopique a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser SP2. Le test de cytotoxicité du TC a été effectué sur des cellules HTB-4 (cellules épithéliales issues d'un carcinome de vessie humaine) en présence de 1%, 1,25% ou 1,5% de TC. La viabilité cellulaire a été étudiée par méthode colorimétrique des sels de tétrazolum. (157)

Interprétation des résultats :

Sachant que les effets du TC ont été similaires sur les 2 souches UPEC utilisées, seulement les résultats de la souche ATCC 700415 sont présentés.

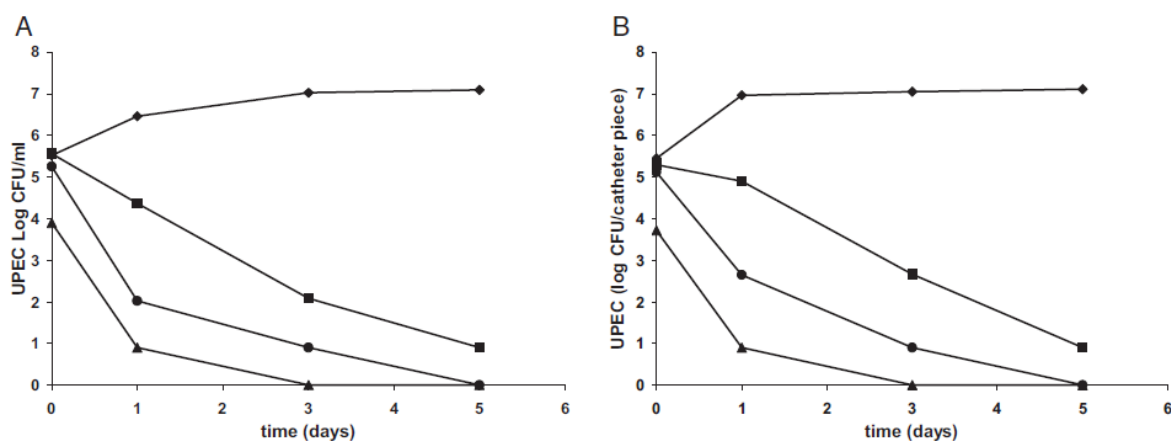


Figure 49 : impact du TC sur la formation de biofilm d’UPEC ATCC 700415 sur microplaques de polystyrène (A) et cathéter urinaire (B) en présence de 0% (◆) ; 0,1% (■) ; 0,25% (●) ; 0,5% (▲) de TC. (158)

Les résultats présentés sur la figure 49 montrent qu’après 5 jours d’incubation, en l’absence de TC, il s’est formé un biofilm mature sur les 2 substrats contenant 10^7 UFC/ml ou 10^7 UFC/cathéter, c’est le contrôle. Dans les 2 cas, les concentrations de TC à 0,5% et 0,25 % ont totalement permis de prévenir l’apparition de biofilm, respectivement en 3 et 5 jours. L’effet préventif de la formation de biofilm est rapide puisqu’après 24 heures, ces mêmes concentrations de TC permettent de diminuer approximativement de 3 log le nombre de cellules contenues dans les biofilms. Les auteurs ont également étudié l’impact de la présence d’urine synthétique sur l’effet du TC à l’encontre des biofilms d’UPEC sur cathéter, aucune différence n’a été observée (données non montrées).

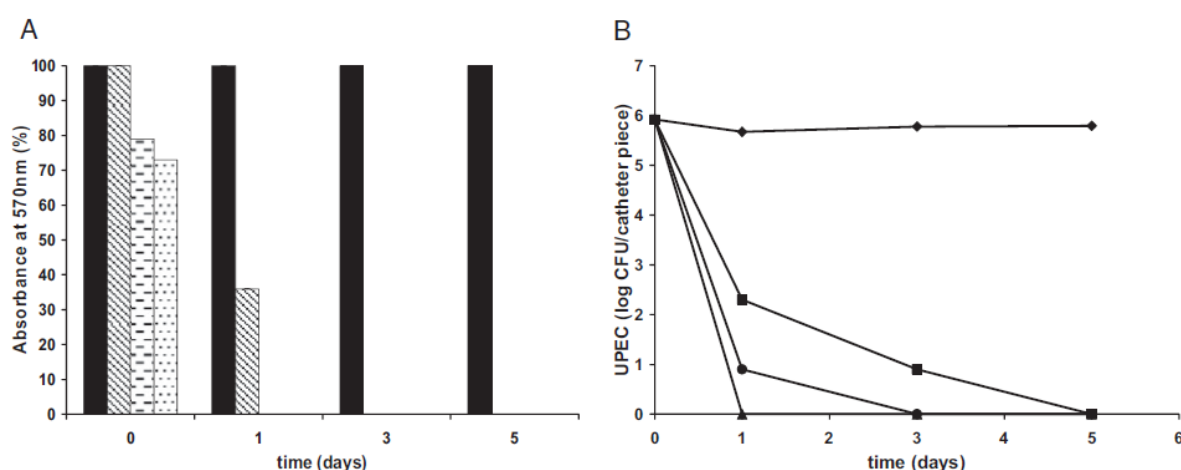


Figure 50 : impact du TC sur des biofilms d’UPEC ATCC 700415 préformés sur microplaques de polystyrène (A) et sur cathéters urinaires en latex (B) à 0% (colonne noire et ◆) ; 1% (colonne hachurée et ■) ; 1,25% (colonne à tirets et ●) et 1,5% (colonne à pointillés et ▲). (158)

Les résultats présentés sur la figure 50 montrent que toutes les concentrations testées de TC ont permis d’éliminer le biofilm préformé sur microplaques de polystyrène et sur les cathéters urinaires. En effet, sur le polystyrène après 24 h d’incubation, le contrôle montre un biofilm

intact et mature, mais aucun biofilm n'est détecté lors du traitement à 1,5 et 1,25 % de TC. C'est après 72 h d'incubation que la concentration à 1% de TC a permis d'éliminer le biofilm. Sur les cathéters urinaires, l'effet est plus long à apparaître puisque seulement une concentration à 1,5% de TC permet d'éliminer le biofilm au bout de 24h d'incubation.

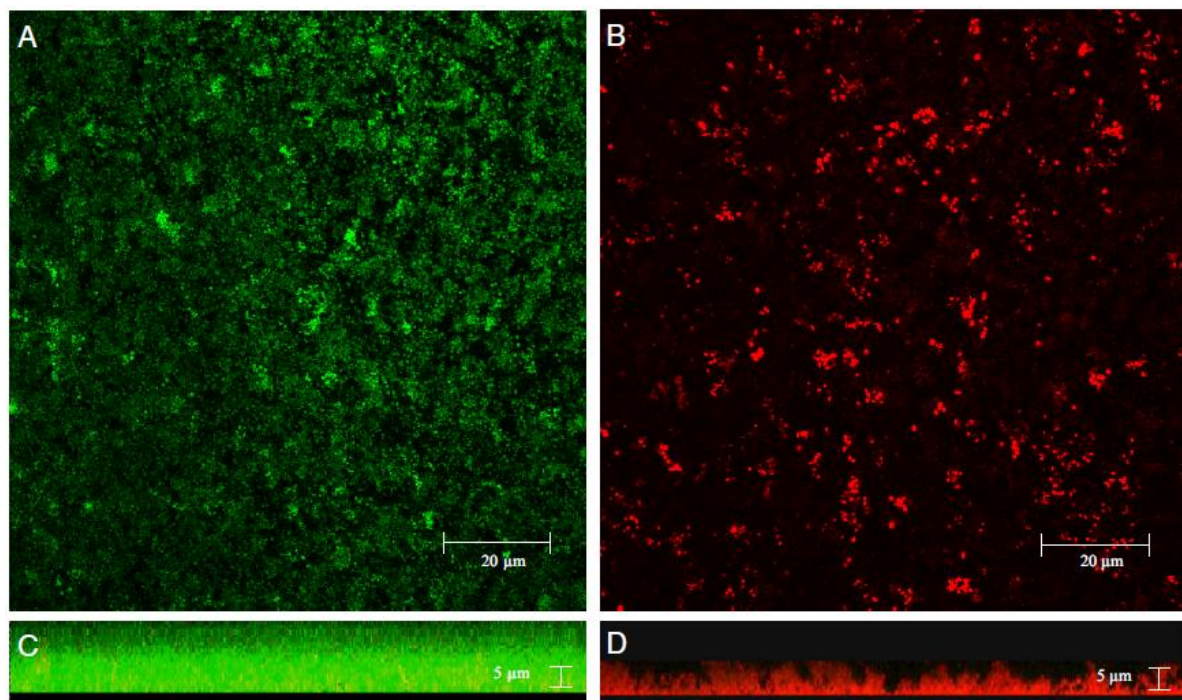


Figure 51 : observation microscopique de biofilms d'UPEC ATCC 700415 sans (A et C) et avec (B et D) traitement par TC. Coloration SYTO (A et C) et iodure de propidium (B et D). (158)

L'observation microscopique présentée sur la figure 51 montre, en l'absence de traitement par TC (A/C), un biofilm homogène et dense avec une épaisseur moyenne de 14 µm (maximum 18 µm). Les observations de biofilm traité par TC (B/D) montrent une hétérogénéité due à la perte de cellules, à une désorganisation structurale ainsi qu'à la mort de bactéries (visualisées par l'iodure de propidium). L'épaisseur quant à elle se situe autour de 3 µm de moyenne (maximum 5µm).

Le test de cytotoxicité a montré que le TC, aux concentrations inférieures à 1,5 % n'induisait aucune diminution de viabilité des cellules HTB-4 comparé au contrôle, ni de changements morphologiques vus en microscopie. (résultats non présentés)

Discussion :

Cette étude montre effectivement que le TC est capable de prévenir la formation de biofilms d'UPEC et d'éliminer des biofilms préformés à la fois sur polystyrène et sur latex. Les concentrations de TC pour lutter contre les biofilms préformés sont 2 à 3 fois plus importantes que les concentrations utilisées pour l'effet préventif, malheureusement nous ne

savons pas si les concentration inhibitrices de la formation de biofilm sont efficaces également contre les biofilms préformés. D'autre part, en condition réelle, les sondes urinaires sont constamment exposées à l'urine (riche en composés organiques), les auteurs ont montré que, sur les biofilms sur latex, cela n'avait aucune incidence sur l'efficacité du TC. Enfin, les auteurs ont également étudié l'intérêt du TC à l'encontre de *Proteus mirabilis*, autre pathogène fréquemment impliqué dans les complications sur dispositif urinaire. A l'instar des souches d'UPEC, l'efficacité du TC est identique. (158) L'incroyable efficacité du TC vis-à-vis des UPEC pourrait être due à de multiples mécanismes. A faible concentration, le TC perturbe le QS médié par les AHL et les AI-2 chez *E. coli* et *V. harveyi* (159) et inhibe certaines enzymes. (158) En concentration supérieure, le TC agit en tant qu'inhibiteur d'ATPase. A concentration létale, sa haute hydrophobie, à l'instar des HE en général, permet de cibler les membranes bactériennes et mitochondriales, altérant leur intégrité. (149) Enfin, les résultats de cytotoxicité à l'encontre des cellules épithéliales de vessie n'ont montré aucune toxicité quantitative ou morphologique. L'ensemble de ces résultats montre que le TC peut être un anti-infectieux sûr et efficace pour prévenir et inactiver des biofilms sur cathéters urinaires. Cependant beaucoup de sondes urinaires ne sont pas en latex, ce qui fait que d'autres études sont nécessaires afin de déterminer l'efficacité du TC en général

2.3.2.3 Etude 3 : étude de l'impact du Trans-Cinnamaldéhyde (TC) sur l'attachement et l'invasion des cellules épithéliales du tractus urinaire par des souches uropathogènes d'*E. coli* (UPEC) (160)

Détail du composé	Le trans-cinnamaldéhyde (TC) ou aldéhyde cinnamique ou 3-phényl-prop-2-énal est un aldéhyde aromatique, principal composé retrouvé dans les HE de cannelle : <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (cannelle de ceylan), <i>Cinnamomum cassia</i> (cannelle de chine) et <i>Cinnamomum loureirii</i> (cannelle du vietnam)
Protocole	Des microplaques de polystyrène sur lesquelles des cellules de carcinome vésical HTB-4 sont fixées, ont été incubées pendant 1 heure à 37°C en présence de 10 ⁶ UFC d'UPEC (ATCC 700415 ou UTI 89) et de concentrations subinhibitrices de TC (à 0, 325, 560 et 750 µM). Ensuite, ont été dénombrées les bactéries adhérentes ainsi que celles internalisées dans les cellules épithéliales. En parallèle a été réalisé l'étude de la variation d'expression de certains gènes codant pour des adhésines (fimA, fimH, sfaA, focA et papG).
Paramètres	L'adhérence des UPEC aux cellules HTB-4 a été mesurée en comptant, après avoir rincé et lysé ces dernières afin de libérer les UPEC, le nombre d'UFC sur gélose TSA après incubation. Pour mesurer les UPEC internalisées, les UPEC adhérentes ont été tuées à l'aide de la gentamicine, puis les cellules HTB-4 ont été lysées afin de libérer les UPEC internalisées, ces dernières ayant pu être mises en culture sur gélose TSA puis comptabilisées. L'analyse transcriptomique des gènes codant pour les adhésines a été réalisée par RT-qPCR

Interprétation des résultats :

Sachant que les effets du TC ont été similaires sur les 2 souches UPEC utilisées, les résultats présentés n'abordent pas systématiquement les souches.

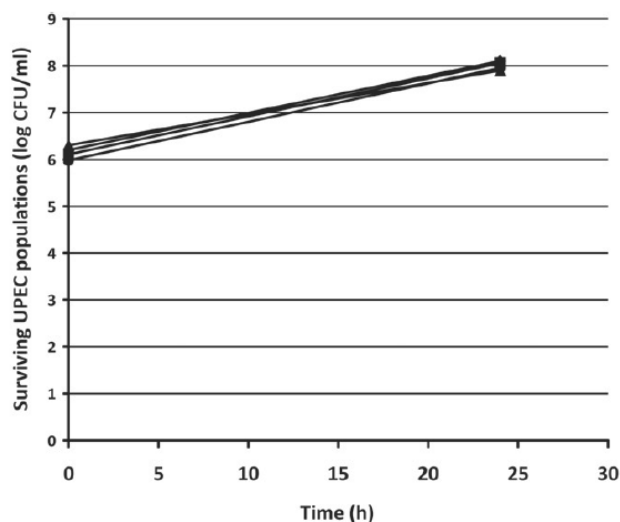


Figure 52 : cinétique de croissance des souches d'UPEC en présence de TC à 0 µM (♦) ; 325 µM (■) ; 560 µM (▲) ; 750 µM (●). (160)

Les résultats présentés sur la figure 52 permettent de s'assurer que la croissance des souches d'UPEC en présence de 325, 560 ou 750 µM de TC est similaire à la croissance de ces mêmes souches en absence de TC, allant de 10^6 à 10^8 CFU/ml d'UPEC en 24 h d'incubation. Ceci permet de définir ces taux de TC comme étant des concentrations sub-inhibitrices (CSI) n'altérant aucunement la croissance normale des bactéries.

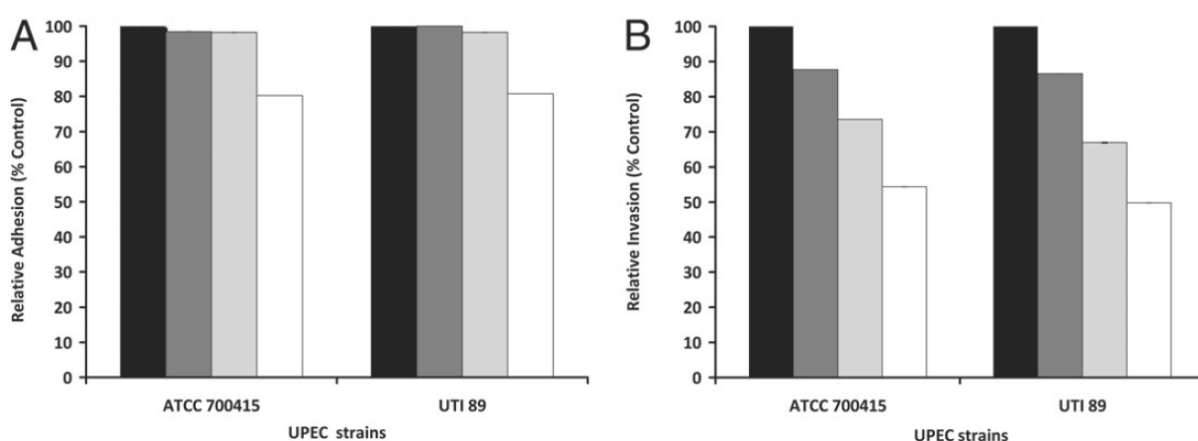


Figure 53 : impact des CSI de TC sur l'adhésion des UPEC (A) et sur l'invasion des cellules HTB-4 par les UPEC (B). 0 µM (noir) ; 325 µM (gris foncé) ; 560 µM (gris clair) ; 750 µM (blanc) de TC. (160)

Les résultats présentés sur la figure 53 sont contrastés. En effet seule la concentration à 750 µM de TC permet de réduire significativement après 60 minutes d'incubation,

l'adhésion des souches d'UPEC aux cellules épithéliales, et ceci que de 20 % par rapport au contrôle. Cependant l'effet du TC sur l'invasion des cellules épithéliales est plus marqué. Après 50 minutes d'incubation, le TC à 750 et 560 μM a permis de diminuer respectivement de 50 % et 30 % l'invasion des cellules épithéliales comparé au contrôle. L'effet semble concentration dépendant.

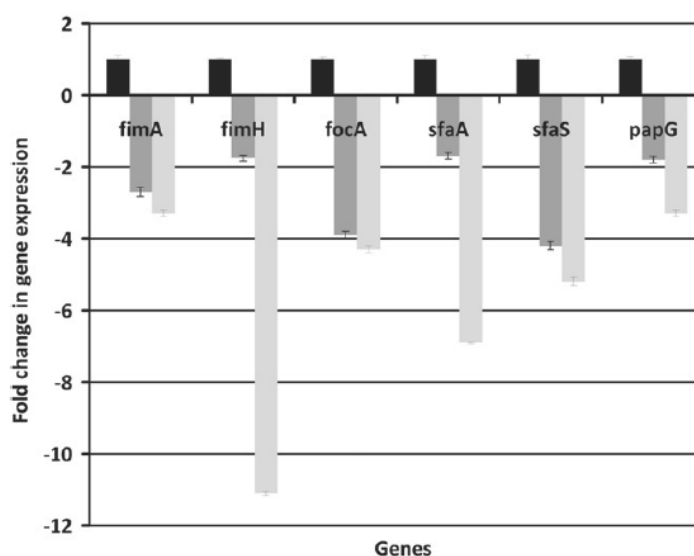


Figure 54 : impact du TC sur l'expression chez les souches d'UPEC des gènes codant pour les adhésines correspondantes à 560 μM (gris foncé) et 750 μM (gris clair) de TC. (160)

Les résultats présentés sur la figure 54 à propos de la variation d'expression des gènes codant pour 6 adhésines différentes en présence de TC concernent seulement les concentrations à 560 et 750 μM car seules ces dernières concentrations ont montré une diminution significative de l'invasion des cellules HTB-4. Dans tous les cas, le TC a permis de diminuer l'expression des gènes des adhésines, ces dernières contribuant à la virulence des souches d'UPEC. La concentration de TC à 750 μM est la plus active. En effet, comparée au contrôle, l'expression de fimA, fimH, focA, sfaA, sfaS et papG a été divisée par 3,3 ; 11,1 ; 4,3 ; 6,9 ; 5,2 ; et 3,3 respectivement.

Discussion :

Ces résultats montrent que le TC est capable de diminuer l'attachement et l'invasion des cellules épithéliales vésicales par des souches d'UPEC. Cependant l'efficacité du TC est bien plus prononcée à l'encontre de l'internalisation que contre l'attachement. L'hypothèse serait que l'attachement réversible des bactéries est un phénomène passif principalement médié par des interactions non spécifiques, liées aux propriétés de surface des cellules ainsi qu'aux organelles appendus, impliquant des interactions avec des molécules diverses et variées. L'attachement irréversible lui, qui précède l'internalisation, est médié par des

mécanismes davantage spécifiques, incluant la production d'adhésines appropriées comme celles étudiées ci-dessus situées sur différents pili (type 1, type P...). Voilà pourquoi le TC, en diminuant l'expression de ces adhésines, posséderait une efficacité supérieure dans la limitation de l'internalisation plutôt que de l'adhérence. Il a été montré par ailleurs dans l'étude précédente que le TC était capable de prévenir la formation de biofilms de souches d'UPEC mais aussi d'inactiver des biofilms préformés de ces mêmes souches. (158) Or l'attachement des bactéries est la première étape de formation d'un biofilm. L'effet anti-biofilm du TC peut donc se situer à plusieurs niveaux : en diminuant l'expression de facteurs de virulence comme les adhésines ce qui diminue l'attachement, mais aussi en perturbant le QS, (159) en inhibant certaines enzymes (158) et en altérant les membranes bactériennes et mitochondriales. (149) D'autres mécanismes d'actions restent probablement à être découverts. Enfin, concernant son utilisation en pratique, le TC est une molécule reconnue comme sûre par la Food and Drug administration (161) n'ayant montré aucune toxicité vis-à-vis des cellules épithéliales vésicales à des doses 100 fois supérieures que celles utilisées dans cette étude. (158) Bien que certaines études aient mis en évidence in vitro une certaine génotoxicité du TC à haute dose, les études in vivo n'ont montré aucun effet secondaire lors de l'administration d'une dose unique de 2220 mg/kg ou bien 550 mg/kg/jour pendant 2 ans, (162) ce qui confère au TC un fort potentiel.

2.3.2.4 Etude 4 : étude de l'impact de l'HE de cannelle de ceylan, de palmarosa, de tea tree ainsi que l'eugénol, le géraniol et le terpinène-4-ol sur des formes planctoniques et sessiles d'E. coli et S. aureus. (163)

Détail des HE et de leurs composés	Les HE de feuilles de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (cannelle de ceylan), de <i>Cymbopogon martini</i> (palmarosa) et de <i>Melaleuca alternifolia</i> (tea tree) obtenues par hydrodistillation ont été utilisées. Leurs composés majoritaires ont également été testés, à savoir l'eugénol (phénol aromatique présent à 86 % dans les rameaux et feuilles de cannelle), le géraniol (monoterpénol présent à 86 % dans le palmarosa) et le terpinene-4-ol (monoterpénol présent à 48 % dans le tea tree)
Protocole	Les HE de cannelle, tea tree et palmarosa ont été testées aux concentrations suivantes : 0,12 % ; 0,48 % et 0,96 %. Les composés individuels eux, ont été testés à la concentration de 1,56 %. Cette étude a pour but d'étudier l'impact des HE et de leurs composés principaux sur la croissance de bactéries planctoniques, sessiles, ainsi que sur la biomasse lors de la formation de biofilm, ceci durant 24h d'incubation à 37°C sous agitation. Les espèces étudiées sont <i>E. coli</i> ATCC 25922 et <i>S. aureus</i> ATCC 24922.
Paramètres	Après incubation en présence des HE, contrairement aux cellules planctoniques, les cellules des biofilms ont été extraites par sonication, puis ont été mises en culture sur gélose TSA pendant 18h à 37 °C avant d'être comptabilisées. Les cellules planctoniques ont directement été mises en culture. Les résultats du comptage des cellules planctoniques sont exprimés en Log CFU/ml alors que les cellules sessiles sont exprimées en Log CFU/cm². La biomasse des biofilms a été quantifiée par méthode colorimétrique par cristal violet. (153)

Interprétation des résultats :

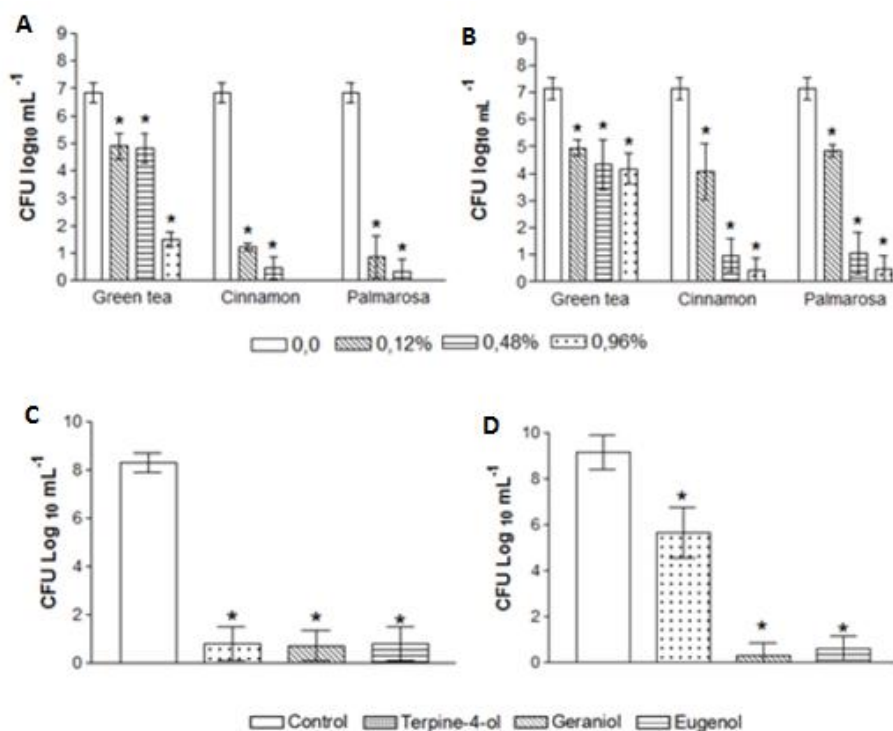


Figure 55 : impact sur les formes planctoniques d'*E. coli* (A/C) et de *S. aureus* (B/D) des HE à différentes concentrations (A/B) ainsi que de leurs composés majoritaires à 1,56 % (C/D). (163)

Les résultats de la figure 55 montrent que l'ensemble des HE utilisées à 0,12 %, 0,48 %, 0,96 % ainsi que leurs composés majoritaires utilisés à la concentration de 1,56 % présentent une activité bactéricide à l'encontre des bactéries planctoniques, ce qui veut donc dire que ces concentrations utilisées ne sont pas sub-inhibitrices à la différence d'autres études.

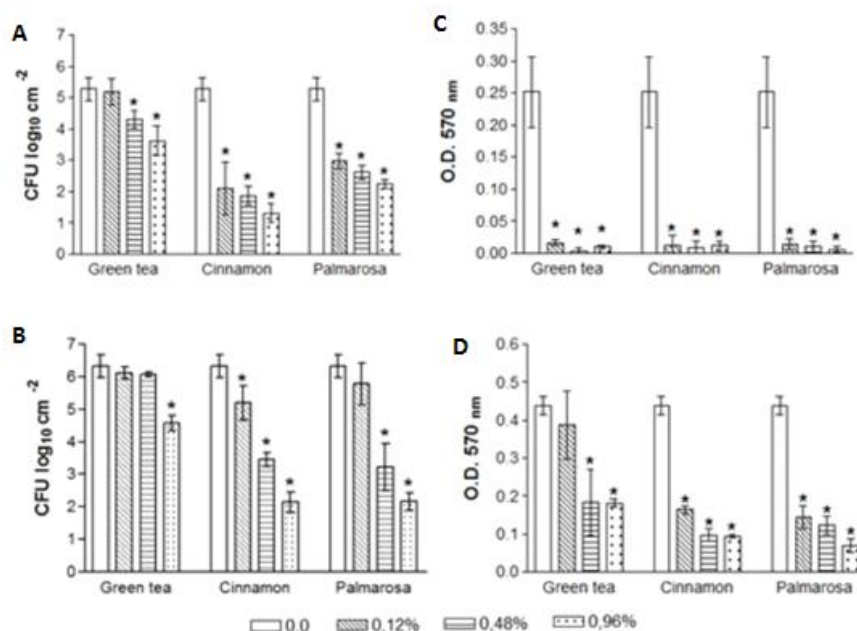


Figure 56 : Impact sur les bactéries du biofilm d'*E. coli* (A) et de *S. aureus* (B) ainsi que sur la biomasse des biofilms de *E. coli* (C) et de *S. aureus* (D) lors de l'incubation pendant 24 heures en présence d'HE à différentes concentrations. (163)

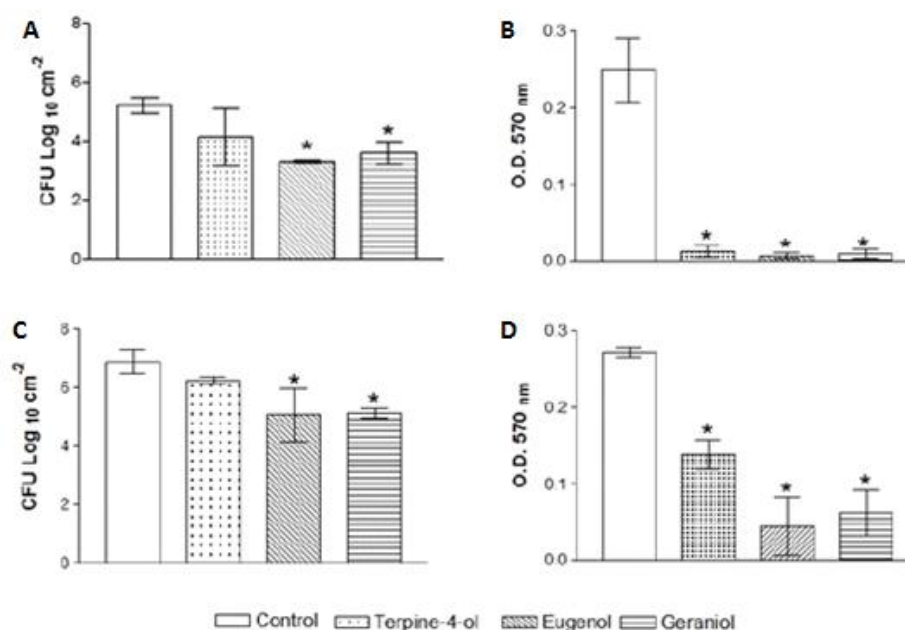


Figure 57 : Impact des composants majoritaires des HE à la concentration de 1,56 % sur les bactéries du biofilm d'*E. coli* (A) et de *S. aureus* (C) ainsi que sur la biomasse des biofilms de *E. coli* (B) et de *S. aureus* (D) lors de l'incubation pendant 24 heures. (163)

Les résultats présentés sur les figures 56 et 57 montrent que les cellules du biofilms sont plus résistantes que les cellules planctoniques, comme nous pouvions nous y attendre. Concernant *E. coli*, l'HE de tea tree exprime la plus faible activité bactéricide à l'encontre des bactéries sessiles avec une diminution de 1,66 log à la concentration de 0,96 %, le terpinène-4-ol lui, ne possède pas d'activité bactéricide significative. L'HE de palmarosa possède une activité bactéricide proportionnelle à sa concentration sur les bactéries sessiles en diminuant

de 3,04 log les UFC à 0,96%. Le géraniol lui ne permet de diminuer que de 1,6 log les UFC du biofilm. Enfin, l'HE de cannelle est la plus bactéricide puisqu'elle est capable, à toutes les concentrations testées, de diminuer de minimum 3 log les UFC du biofilm. A 0,96 %, le nombre d'UFC dans le biofilm est réduit de près de 4 log soit 99,99 % de réduction. En revanche, l'eugénol n'a pas montré la même efficacité, avec seulement 1,88 log d'UFC de diminution. Concernant la biomasse du biofilm d'*E. coli*, l'action des HE et de leurs composés est majeure puisque tous ont entraîné au minimum une diminution de plus de 93 % de la formation de la biomasse du biofilm.

Concernant *S. aureus*, Les effets de ces composés sont moins efficaces. A propos du tea tree, seule la concentration à 0,96 % permet de diminuer le nombre d'UFC de *S. aureus*, et de seulement 1,76 log. Le terpinène-4-ol lui, comme chez *E. coli* n'a pas d'activité bactéricide significative. L'HE de palmarosa est efficace à 0,48 et 0,96 %, entraînant une diminution respectivement de 3,12 et 4,17 log d'UFC de *S. aureus*, alors que le géraniol ne diminue que de 1,7 log le nombre d'UFC dans le biofilm. Enfin, la cannelle même si elle est moins efficace que chez *E. coli* à 0,12 et 0,48 %, la concentration de 0,96 % induit 4,66 log de diminution du nombre d'UFC du biofilm. Un fois encore, l'eugénol seul ne permet de diminuer que de 1,7 log le nombre d'UFC. Concernant la biomasse générale du biofilm de *S. aureus*, tous les composés excepté l'HE de tea tree, entraînent une diminution significative de la biomasse. L'HE de cannelle, de palmarosa ainsi que leurs composés principaux entraînent tous une diminution supérieure à 62 %.

Discussion :

Cette étude met en valeur le potentiel des HE de cannelle, de palmarosa, de tea tree ainsi que leurs composés principaux pour lutter contre les biofilms d'*E. coli* et de *S. aureus*. L'ensemble des résultats montrent que les bactéries sessiles du biofilm sont comme vis-à-vis des autres anti-infectieux, moins sensibles aux HE. D'autre part, les HE testées ici possèdent des activités bactéricides et anti-biofilm supérieures à leurs composés principaux testés individuellement. Si ces résultats appuient les conclusions d'études mettant en évidence ces phénomènes de synergie, (164) ils sont divergents par rapport à d'autres publications qui montrent le contraire, certains composés principaux individuels étant plus actifs que les HE entières vis-à-vis de biofilms d'*E. coli*. (165) Par ailleurs, certaines études ont montré que les bactéries à Gram négatif étaient plus résistantes aux HE que les bactéries à Gram positif. (148) Cependant dans cette présente étude, l'efficacité des HE et de leurs composés semble meilleure à l'encontre d'*E. coli* plutôt que chez *S. aureus*, corroborant tout de même avec les

résultats d'autres publications. (166) Enfin, même si dans cette étude le tea tree possède des propriétés bactéricides limitées par rapport aux autres HE, son activité inhibitrice sur la biomasse du biofilm est marquée (>93 %). Or une autre étude, entre autre sur le tea tree n'a montré aucune efficacité à l'encontre du biofilm d'*E. coli*. (167) Néanmoins, ces différences peuvent être dues à de nombreux facteurs, les protocoles d'expérimentations étant différents (durées d'incubation, stade de croissance des biofilms, nature du substrat...), et les concentrations et compositions des HE n'étant pas exactement identiques. Tout ceci ne fait que rappeler la complexité et la diversité des résultats en fonction des multiples facteurs de variabilité (protocoles, HE, souches bactériennes ou fongiques...).

2.3.2.5 Etude 5 : étude chez *E. coli* de l'activité anti-QS et de l'inhibition de la formation de biofilm par les HE de Sauge sclarée, de genévrier, de citron jaune et de marjolaine à coquilles ainsi que leurs composés principaux. (165)

Détail des HE et de leurs composés	Les HE de sauge sclarée (<i>Salvia sclarea</i>), de genévrier (<i>Juniperus communis</i>), de citron jaune (<i>Citrus lemon</i>), de marjolaine à coquille (<i>Origanum majorana</i>) ainsi que leurs composés principaux, respectivement le linalol, l'alpha pinène, le limonène, et de terpinene-4-ol ont été testés. L'HE de cannelle a également été testée contre des biofilms mixtes, mais pas ses composés principaux.
Protocole	Dans un premier temps, les CMI individuelles des HE sur les bactéries planctoniques ont été déterminées après 24h d'incubation d' <i>E. coli</i> 0582 en présence des HE ou de leurs composés principaux. Puis les concentrations sub-inhibitrices des HE ou composés ont été testées pour analyser leurs effets sur la formation de biofilms homogènes et hétérogènes d' <i>E. coli</i> entre autres. Pour cela, 200 µL d'une solution de bactéries planctoniques à 10 ⁸ UFC/ml ont été déposée dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, puis un délai de 4h est laissé afin que les cellules adhèrent au substrat, ensuite le surnageant a été remplacé par 200 µL d'une solution contenant une des HE ou un de leurs composés à la concentration CMI/2, et ceci pendant 24h. L'effet sur le QS a également été étudié aux volumes en HE ou composés de 1 ; 2 et 3 µL. Enfin une observation microscopique a été réalisée pour visualiser l'architecture tridimensionnelle des biofilms.
Paramètres	La détermination des CMI a été déterminée par absorbance à 600 nm, après 24h d'incubation, les absorbances inférieures à 10 % du contrôle sont considérée comme correspondantes aux CMI. La mesure de l'inhibition de formation des biofilms a été réalisée par méthode colorimétrique au cristal violet. (153) L'étude sur le QS a été réalisée en mesurant le diamètre d'inhibition de production de violacéine chez la bactérie à Gram négatif <i>Chromobacterium violaceum</i>. La production de ce pigment étant sous influence du QS. (168) L'observation microscopique des biofilms a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage Hitachi S4700.

Interprétation des résultats :

Tableau 3 : valeurs de CMI en $\mu\text{L.mL}^{-1}$ des HE ou de leurs composés contre *E. coli*. (165)

HE ou composés	<i>E. coli</i> 0582
Sauge sclérée	2
Genevrier	2
Citron jaune	4
Marjolaine à coquille	0,5
Alpha-pinène	1
Limonène	6
Linalol	3
Terpinène-4-ol	2

Des concentrations de 0,5 à 16 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ont été utilisées, les valeurs de CMI présentées dans le tableau 3 se situent toutes entre 0,5 et 6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ avec dans la plupart des cas des CMI supérieures pour les composés individuels comparées aux CMI des HE complètes. Ainsi, afin d'étudier les effets sur le biofilm et non l'effet bactéricide, des concentrations sub-inhibitrices sont utilisées à l'encontre de la formation de biofilms d'*E. coli* 0582.

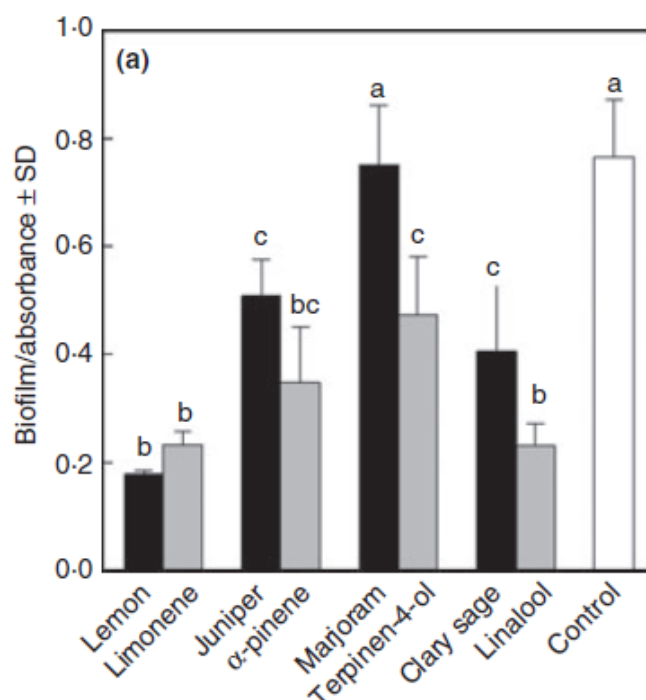
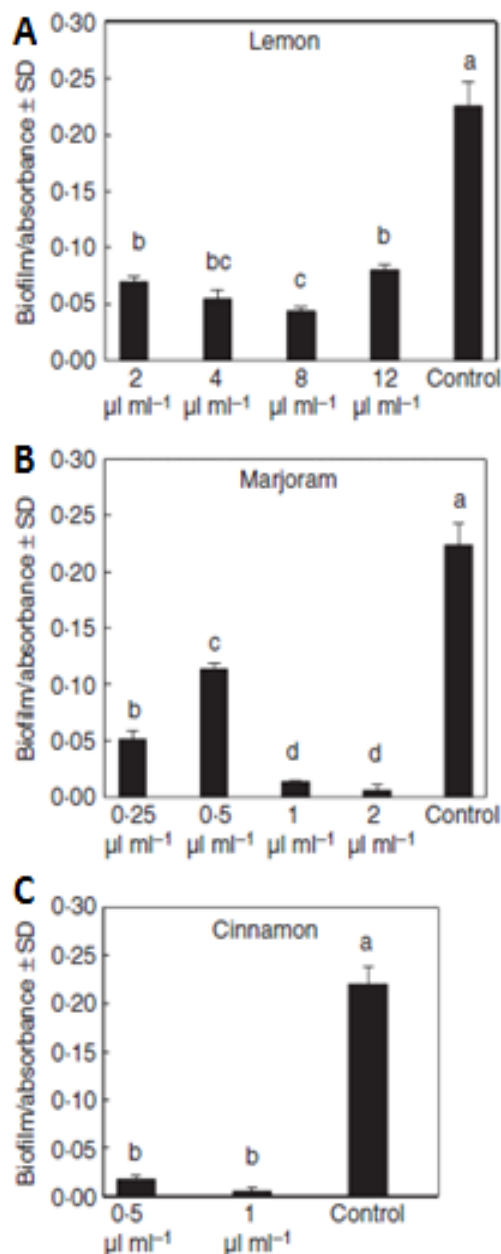


Figure 58 : effet des HE et de leurs composés sur la formation de biofilm d'*E. coli* à la concentration CMI/2. (165)

Les résultats de la figure 58 montrent qu'excepté l'HE de marjolaine à coquille, toutes les HE et les composés principaux possèdent une activité inhibitrice vis-à-vis de la formation de biofilm par *E. coli*, comparé au contrôle. De façon surprenante, tous les composés

principaux des HE, à l'exception du limonène, possèdent une activité inhibitrice supérieure à leur HE complète.



Les résultats présentés sur l'encadré A de la figure 59 montrent que l'HE de citron est capable d'inhiber en partie la formation du biofilm mixte d'*E. coli* et de *P. putida*, mais de façon étonnante, non proportionnelle à sa concentration. Les HE de marjolaine à coquille et de cannelle, respectivement sur les encadrés B et C de la figure 59, possèdent une activité inhibitrice plus marquée encore, car les plus petites concentrations testées sont capables d'inhiber quasiment totalement la formation de biofilms mixtes.

Il est intéressant de préciser que dans le contrôle, après 24 heures d'incubation à 30°C, *E. coli* s'est développé beaucoup plus vite que *P. putida*, avec un ratio de 99 : 1 alors qu'initialement le ratio était de 1 : 1. Le fait de traiter ce biofilm mixte par de l'HE de citron a rétabli la tendance en diminuant de 2 log le nombre de cellules d'*E. coli*, sans influencer le nombre de cellules de *P. putida*. Lors de l'incubation en présence de Marjolaine à coquille, les 2 espèces ont été réduites de 2 log. Quant au traitement par la cannelle, aucune colonie n'a été visualisée après 24h d'incubation. (Données non montrées).

Figure 59 : effet des HE de citron (A), de marjolaine à coquille (B) et de cannelle (C) à différentes concentration sur la formation de biofilms mixtes composés d'*E. coli* et de *P. putida*. (165)

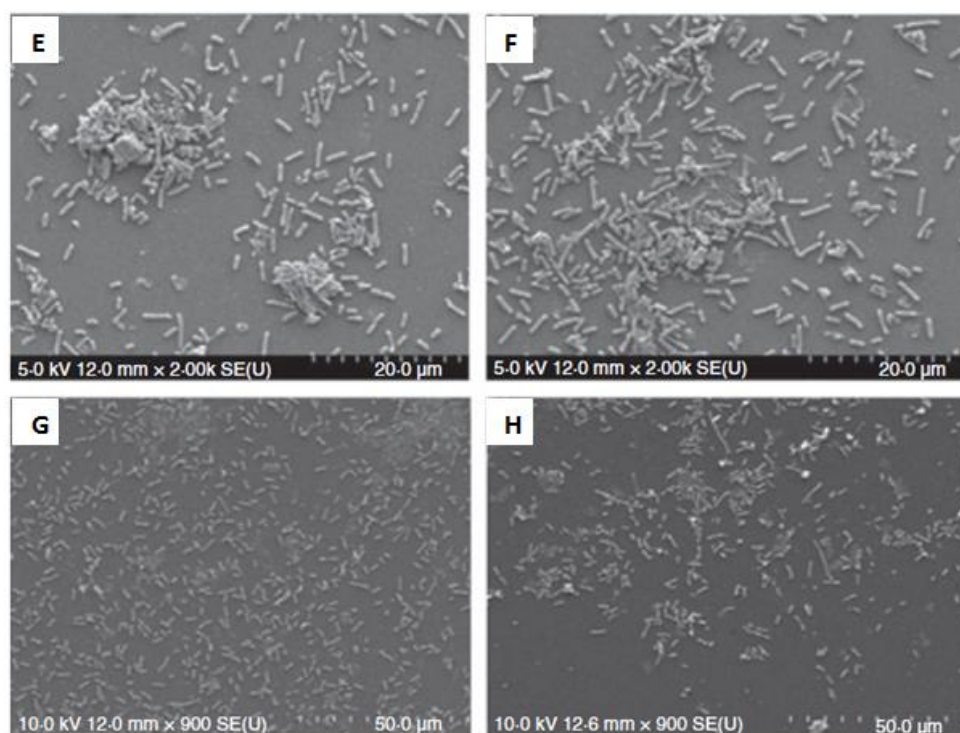


Figure 60 : observation microscopique de biofilms mixtes d'*E. coli* et de *P. putida* après 24 h d'incubation en l'absence d'HE (E/F), après 24 h d'incubation en présence d'HE de citron (G), et après 24 h d'incubation en présence d'HE de cannelle (H). (165)

Les images contrôle présentées sur la figure 60 mettent en évidence la présence de microcolonies, qui se forment lors de l'étape suivant l'attachement irréversible des cellules. Les 2 HE testées semblent avoir un impact négatif sur la formation de ces microcolonies et sur le nombre de cellules attachées, que l'on peut visualiser sur les images G et H de la figure 60. Cependant l'image G de la figure 60 montre que l'HE de citron paraît avoir un effet moindre par rapport à l'HE de cannelle.

Tableau 4 : halo d'inhibition de croissance et halo décoloré du à l'effet anti-QS des HE et de leurs composés. (165)

EOs/ components	Growth inhibition halo (mm)			Anti-QS halo (mm)		
	1 μ l	2 μ l	3 μ l	1 μ l	2 μ l	3 μ l
Clary sage	4	4	4	10	20	25
Linalool	5	5	3	10	15	20
Lemon	1	2	2.5	0	0.5	1
Limonene	4	7	6.5	0	0	0
Marjoram	1	3	3	10	15	20
Terpinen-4-ol	1	2	2	0	15	20
Juniper	2	3	3	0	10	20
α -Pinene	5	5	5	1	1	1

En regard des résultats présentés dans le tableau 4, l'HE de citron ainsi que son composé majoritaire, le limonène, ne semble posséder aucune propriété anti-QS. De plus, l'effet anti-QS de l'alpha pinène, même s'il est faible, ne dépend pas de sa concentration. Les HE de sauge sclérée, de marjolaine, de genévrier ainsi que le linalol et le terpinène-4-ol, eux, possèdent une activité anti-QS proportionnelle à leur concentration. Enfin, dans tous les cas, les HE complètes possèdent une activité anti-QS supérieure à leurs composants majoritaires, contrairement à ce qui a été observé sur la formation du biofilm d'*E. coli*.

Discussion :

Les HE utilisées dans cette étude sont composées principalement de terpènes : soit des monoterpènes cycliques aliphatiques (alpha pinène et limonène) soit des alcools monoterpéniques (linalol et terpinène-4-ol). Cela ne doit pas être le cas pour l'HE de cannelle dont l'auteur ne nous donne malheureusement aucune information dessus... Il est intéressant de noter que bien que l'HE de marjolaine à coquille soit inefficace pour lutter contre la formation de biofilm d'*E. coli* à la CMI/2, elle possède à cette même concentration une activité anti-biofilm importante à l'encontre d'un biofilm mixte d'*E. coli* et de *P. putida*. Ceci est très intéressant car dans la majorité des cas, les biofilms dans l'environnement sont hétérogènes, ce qui signifie que ce n'est pas parce qu'une HE ne possède pas d'activité à l'encontre d'un biofilm mono-espèce, qu'elle ne possèdera pas d'activité lorsque cette même espèce sera mélangée à d'autres. D'autre part, certaines études précédentes ont montré que les HE exerçaient une activité antibactérienne supérieure comparée à l'activité isolée de leurs composants principaux utilisés purs, ceci à cause de phénomènes de synergies entre composés. (163,169) Même si cela reste vrai pour l'effet anti-QS, cette présente étude dément cette théorie puisque, chez *E. coli*, l'inhibition de formation de biofilm par les composés principaux purs, est au moins égale (limonène et HE de citron) voire supérieure aux HE complètes (linalol, alpha pinène, terpinène-4-ol), ce qui signifie que les composés principaux, utilisés seuls pourraient suffire. Et contrairement à ce qui a pu être observé auparavant, le linalol, le limonène ainsi que l'alpha-pinène entraînent bel et bien une diminution de production de biofilm, et non une augmentation comme c'est le cas chez *L. monocytogenes*. (170) Ces résultats mettent en évidence la variabilité considérable de susceptibilité individuelle des agents pathogène vis-à-vis des HE et de leurs composés, ce qui complique leur utilisation en pratique, et peut parfois nécessiter de connaître l'agent pathogène en question afin de ne pas obtenir un effet inverse. Enfin, toutes les solutions utilisées (sauf l'HE de citron, le limonène et l'alpha-pinène) possèdent une activité anti-QS. En réalité cela ne veut pas forcément dire grand-chose car les voies de QS fluctuent entre espèces. Comme nous

l'avons vu précédemment, chez *V. cholerae*, c'est l'activation du QS qui entraîne la dispersion du biofilm. (97) Tout ceci nous oblige à dire que davantage d'études sont nécessaires afin d'exploiter le potentiel des HE.

2.3.2.6 Etude 6 : étude des propriétés inhibitrices de l'HE d'*Eucalyptus globulus* libre ou encapsulée dans des nanoparticules de silice (NPS) sur la formation de biofilm par *E. coli*. (171)

Détail de l'HE	L'HE entière d' <i>Eucalyptus globulus</i> a été utilisée, soit libre, soit encapsulée dans des nanoparticules de silice. Elle est composée entre 65 et 80 % d'eucalyptol (=1-8 cinéole) qui est un oxyde monoterpénique. (140)
Protocole	L'effet anti-biofilm de l'HE d' <i>E. globulus</i> a été testé contre la souche <i>E. coli</i> ATCC 25922. Les auteurs ont souhaité observer la différence d'effet lorsque l'HE est encapsulée dans des nanoparticules d'une taille moyenne de 1000 nm. Outre l'effet bactéricide sur les cellules planctoniques, l'effet inhibiteur sur la formation de biofilm a été analysé après 48 h d'incubation, à une concentration en HE ou en NPS allant de 0,3 à 50 µl/ml. Une observation microscopique a également été réalisée.
Paramètres	La mesure de la formation des biofilms a été réalisée par méthode colorimétrique au cristal violet. (153) Les observations microscopiques des NPS ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage (tension d'accélération à 15 kV et grossissement 10 000). Les biofilms eux ont été observés à l'aide d'un microscope optique L'ensemble des tests a été réalisé en utilisant des concentrations identiques en HE, que ce soit avec l'HE libre ou bien l'HE contenue dans les NPS en se reportant à leur volume.

Interprétation des résultats :

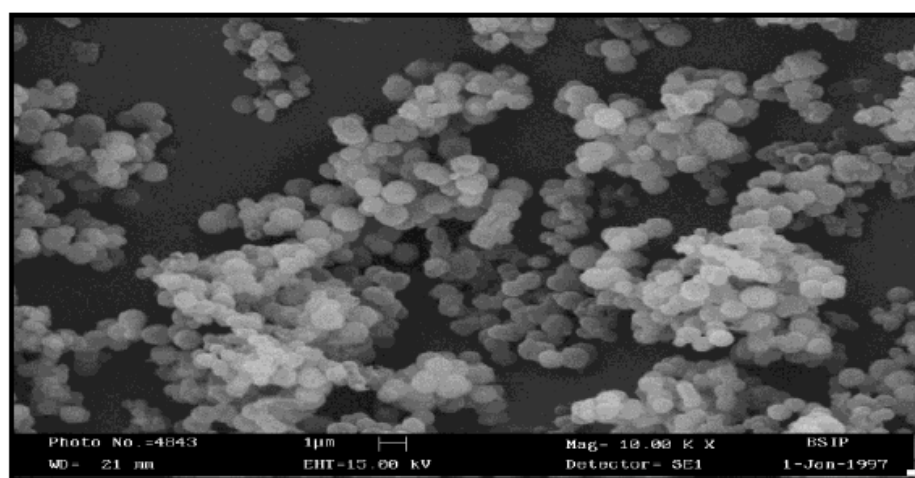


Figure 61 : visualisation des NPS par microscopie électronique à balayage. (171)

L'image présentée sur la figure 61 permet de visualiser des nanoparticules de silice d'un diamètre moyen de 1000 +/- 20 nm, sphériques et relativement bien dispersées dans la phase aqueuse, permettant une surface optimale pour la libération de l'HE. L'auteur précise que ces NPS, utilisées vierges, possèdent un effet antibactérien négligeable vis-à-vis d'*E. coli*.

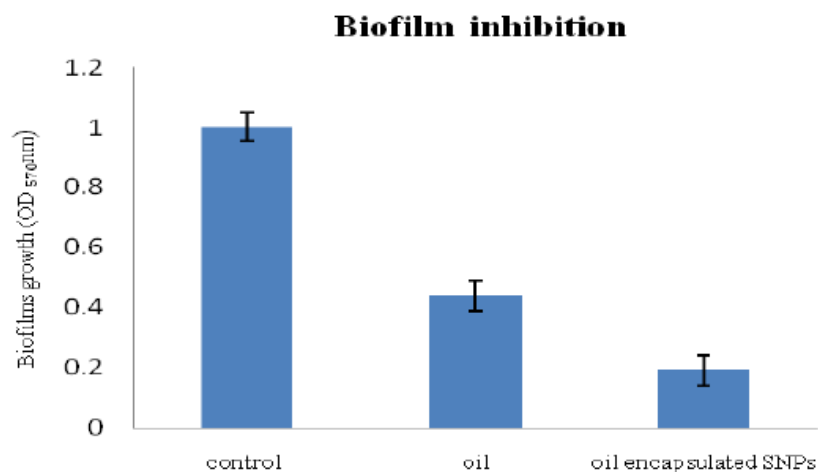


Figure 62 : effet à 50 µl/ml de l'HE d'*E. globulus* libre ou encapsulée sur la croissance du biofilm d'*E. coli* ATCC 25922 après 48 h d'incubation. (171)

Seuls les résultats à 50 µl/ml sont présentés sur le figure 62. Ils montrent une réduction importante de la formation du biofilm d'*E. coli*. Utilisée libre, l'HE d'*E. globulus* induit une diminution de formation de biofilm de 62,4 %. Lorsqu'elle est encapsulée, l'HE induit une diminution de 81,4 % soit 19 points de plus.

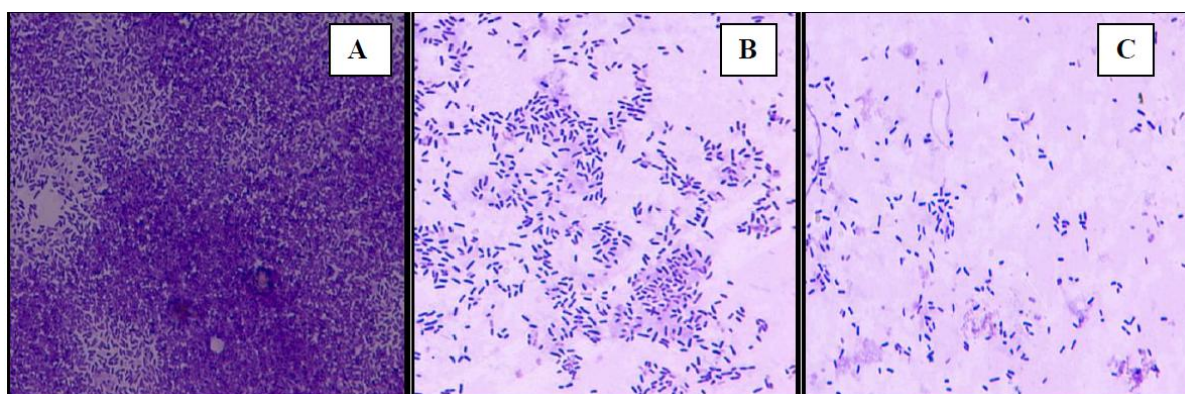


Figure 63 : observation microscopique de biofilm d'*E. coli* ATCC 25922 après 48 h d'incubation en l'absence d'HE (A), en présence d'HE libre (B), en présence d'HE encapsulée (C). (171)

Sur l'image contrôle (A) de la figure 63, nous pouvons visualiser de nombreuses bactéries adhérentes au substrat, elles sont quasiment toutes confluentes, certaines semblent former des microcolonies. Les images B et C de la figure 63 confirment les résultats préalablement obtenus par la quantification au cristal violet du biofilm, puisque le nombre de cellules

attachées est considérablement réduit, et aucune microcolonie ne semble s'être formée. Les effets sont plus importants lorsque l'HE est encapsulée.

Discussion :

Il a été montré auparavant que l'HE d'*E. globulus* possédait des propriétés antibactériennes à la fois contre les bactéries à Gram positif et négatif. (172,173) Cette présente étude prouve également la capacité qu'a cette HE pour lutter contre les biofilms d'*E. coli*. Son efficacité est améliorée lorsqu'elle est encapsulée, probablement grâce à l'amélioration de la diffusion dans le biofilm grâce à une hydrophilie augmentée. Cependant l'auteur nous présente les résultats de la concentration maximale testée (50 µl/ml), sans préciser ce qu'il en est pour les concentrations inférieures... Néanmoins, en plus de l'effet anti-biofilm de l'HE d'*E. globulus*, cette étude illustre le potentiel éventuel que peuvent avoir les NPS, pouvant véhiculer tout type d'HE, limitant d'une part leur volatilité (et augmente donc leur durée d'effet) et d'autre part peut masquer leur goût (propriété intéressante dans l'industrie agro-alimentaire). Les NPS ne sont néanmoins pas dénuées de toxicité. En effet, certains travaux ont montré un effet cytotoxique des NPS vis-à-vis de fibroblastes humains et également génotoxique, principalement pour des NPS de diamètre inférieur ou égal à 10 nm, et ceci avec une concentration en NPS de 0,6 mg.mL⁻¹. Cependant ces effets cytotoxiques et génotoxiques semblent disparaître lorsque les concentrations en NPS sont divisées par 10. (174) La prudence est de mise, mais les NPS utilisées pour encapsuler l'HE d'*Eucalyptus globulus* possèdent un diamètre de l'ordre du micromètre, à priori sans danger.

2.3.2.7 Etude 7 : Etude des propriétés antibactériennes des HE de lemongrass, de tea tree et de cannelle de chine vis-à-vis de bactéries sessiles d'E. coli entéropathogène (EPEC). (167)

Détail des HE	Les HE d'écorce de cannelle de chine (<i>Cinnamomum cassia</i>), de lemongrass (<i>Cymbopogon flexuosus</i>) et des feuilles de tea tree (<i>Melaleuca alternifolia</i>) ont été testées séparément ou combinées contre des bactéries sessiles d' <i>E. coli</i> . Les composés majoritaires de ces HE sont le cinnamaldéhyde (81 %) pour la cannelle, le citral (70 %) pour le lemongrass et le terpinène-4-ol (40 %), le γ -terpinène (22,3 %), l' α -terpinène (10,8 %) et le cinéole (3 %) pour le tea tree.
Protocole	Le potentiel antibactérien de ces 3 HE a été évalué à l'encontre de bactéries planctoniques ou sessiles d'EPEC CDC 0126. Les HE ont été testées séparément ou dans différentes combinaisons à pourcentage égal (1:1 v/v ou 1:1:1 v/v). Pour cela, 50 μ l d'inoculum à 10^8 CFU/ml a été administré dans chaque puits d'une microplaque en polystyrène, et incubé pendant 48 h à 37°C pour laisser croître le biofilm. Puis 200 μ l d'une solution allant de 0,01 à 1 % d'HE a été ajouté et laissé dans chaque puits pendant 20 minutes à température ambiante. Après rinçage des puits, 200 μ l de milieu de culture a été ajouté dans chaque puits pendant 24 h à 37°C. La soustraction de l'absorbance à 620 nm avant et après les 24 h d'incubation permet une approche semi quantitative basée sur la relation qu'il existe entre l'absorbance du biofilm et la croissance bactérienne des cellules sessiles. Les auteurs ont également souhaité analyser l'effet de la cannelle sur ces mêmes biofilms formés sur de l'acier inoxydable type AISI 304. Pour cela des biofilms formés depuis 48h (avec ou sans agitation) ont été incubés pendant 20 minutes à température ambiante en présence de 1 % ou 2 % (v/v) d'HE de cannelle, ou en présence d'un ammonium quaternaire. (chlorure d'alkyldiméthylbenzylammonium)
Paramètres	La mesure de la formation des biofilms a été réalisée par méthode colorimétrique au cristal violet à 620 nm permettant une approche semi quantitative du nombre de cellules sessiles viables. (153) La comptabilisation du nombre de CFU d'EPEC sur l'acier inoxydable a été réalisée après incubation à 37°C pendant 14h sur gélose TSA des bactéries sessiles écouvillonnées après le traitement par les HE.

Interprétation des résultats :

Toutes les HE et combinaisons d'HE testées se sont révélées posséder des propriétés antibactériennes à l'encontre des bactéries planctoniques d'EPEC, avec des CMI allant de 0,06 % à 0,25 %.

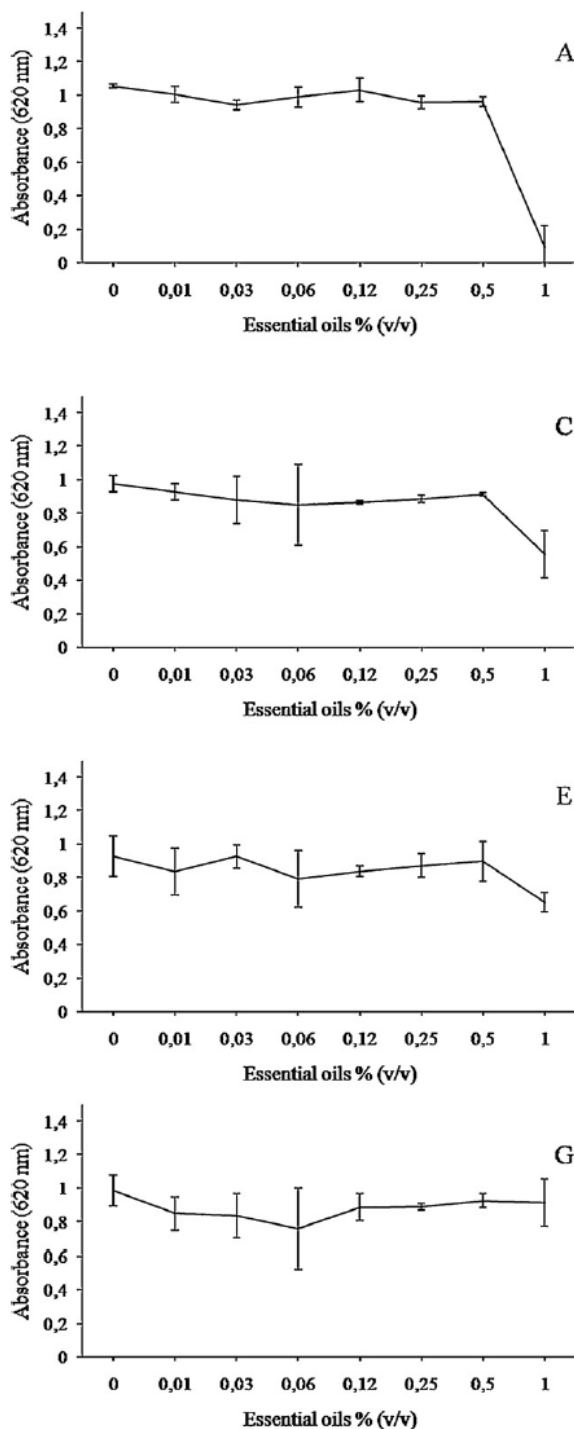


Figure 64 : Effet des HE à différentes concentration, cannelle + lemongrass (A), cannelle + tea tree (C), lemongrass + tea tree (E), cannelle + lemongrass + tea tree (G) vis-à-vis de biofilms d'EPEC préétablis sur polystyrène.

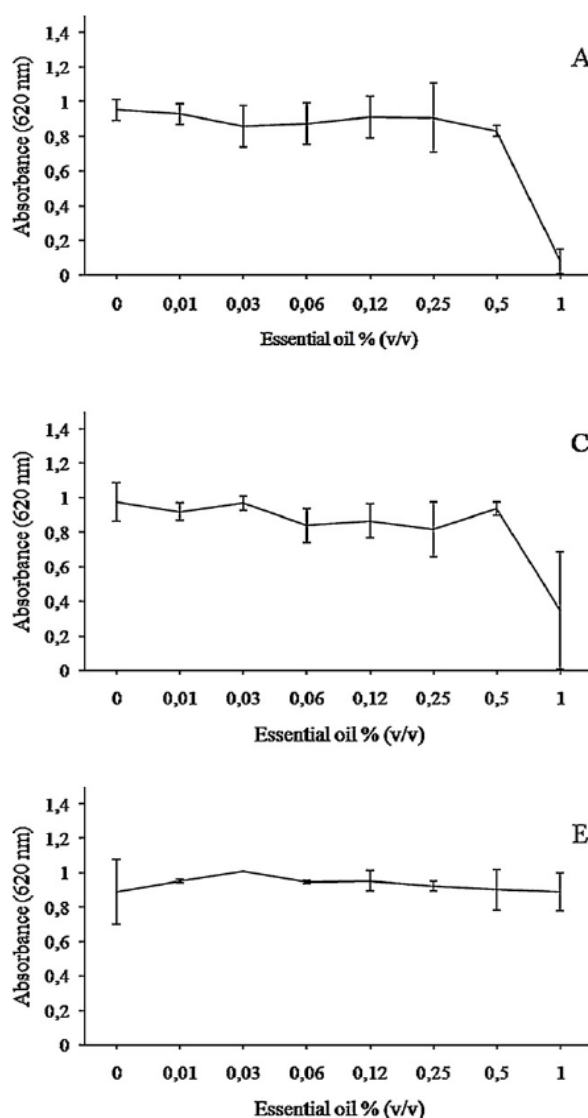


Figure 65 : Effet des HE à différentes concentration, cannelle (A), lemongrass (C) et tea tree (E) vis-à-vis de biofilms d'EPEC préétablis sur polystyrène.

Les résultats présentés sur les figures 64 et 65 mettent en évidence une diminution de sensibilité des bactéries sessiles aux anti-infectieux, puisque contrairement aux formes planctoniques, seules les concentrations les plus élevées de certaines HE à 1% induisent une diminution du biofilm (concentrations bien supérieures aux CMI des bactéries planctoniques). En effet, à 1%, c'est la cannelle utilisée seule qui possède la plus forte activité anti-biofilm, suivie de l'association cannelle + lemongrass, elle-même suivie par le lemongrass seul. En revanche l'HE de tea tree semble dénuée d'intérêt contre le biofilm d'EPEC. De façon surprenante, l'association des 3 essentielles ne possède également pas d'activité anti-biofilm aux concentrations testées.

Tableau 5 : Effet de l'HE de cannelle comparé à un ammonium quaternaire vis-à-vis du biofilm d'EPEC sur acier inoxydable. (167)

Treatments	EPEC	
	Log-reductions	%
EO (1% v/v)	0.83 ± 0.05 ^a	12.67
Sanitizer	2.72 ± 0.45 ^b	41.33
EO (2% v/v)	6.57 ± 0.00 ^c	100.00

Les auteurs ont également évalué l'effet anti-biofilm de la cannelle sur des biofilms d'EPEC, formés sur acier inoxydable, matériau très souvent utilisé dans l'industrie agro-alimentaire. Ils ont étudié uniquement l'HE de cannelle car c'est elle qui a montré les meilleurs propriétés antibactériennes sur les formes planctoniques et sessiles. Sur les résultats présentés dans le tableau 5, nous pouvons voir qu'à 1%, l'efficacité de la cannelle est très modérée puisqu'elle diminue seulement de 12,67 % le nombre de bactéries sessiles en 20 minutes. En revanche, à 2%, 100 % des bactéries sessiles ont été éliminées, l'efficacité est bien meilleure que l'ammonium quaternaire (chlorure d'alkyldiméthylbenzylammonium) fréquemment utilisé dans l'industrie agroalimentaire qui lui, n'entraîne une diminution que de 41,33% du nombre de bactéries sessiles.

Enfin, les auteurs ont analysé l'impact de l'HE de cannelle sur des biofilms formés en condition statiques ou sous agitation (50 rotations par minutes). Il s'avère que cela n'influe pas sur l'efficacité de la cannelle vis-à-vis d'EPEC, ce qui n'est pas le cas vis-à-vis de *L. monocytogenes* qui est plus résistante à cette HE lorsque son biofilm est formé sous agitation.

Discussion :

Là où des concentrations sub-inhibitrices de certaines HE ou composés principaux sont capables d'agir sur des biofilms préformés, (85) cela ne semble pas être le cas avec les HE testées dans cette étude. En effet la CMI de la cannelle vis-à-vis d'EPEC CDC 0126

correspond à 0,06 %. Or ce n'est qu'à partir de 1% que celle-ci parvient à inactiver en partie des biofilms préformés depuis 48h. Cela est également valable pour l'HE de lemongrass. Il faut tout de même garder à l'esprit que ce ne sont pas des souches identiques qui sont testées, ce qui pourrait expliquer les différences de résultat. En revanche, cette étude va dans le sens d'autres études qui montrent que le cinnamaldéhyde seul à 1% (présent à 81 % dans la cannelle de chine) est capable d'inactiver des biofilms préformés d'UPEC sur polystyrène ou latex. (158) Si les concentrations sub-inhibitrices en cinnamaldéhyde ne semblent pas inactiver des biofilms préformés d'*E. coli*, elles peuvent en revanche inhiber en partie leur formation. (160) D'autre part, l'HE de tea tree, aux concentrations utilisées dans cette étude semble totalement inefficace, même à la concentration de 4 fois la CMI. Cependant d'autres études étudiant le terpinène-4-ol (présent à 40 % dans le tea tree) ont montré que des concentrations sub-inhibitrices, elles, (à l'instar du cinnamaldéhyde) étaient capables de diminuer la formation de biofilm d'*E. coli* (165) ou de *C. albicans*. (175) De plus, même si ce n'est pas le cas chez *E. coli*, les auteurs ont montré dans cette étude que la sensibilité aux HE pouvait être affectée par les conditions de formation du biofilm. En effet sous agitation, le biofilm de *L. monocytogenes* est moins sensible à l'action de la cannelle. Ceci est probablement dû à des modifications architecturales du biofilm, ainsi qu'à une augmentation du taux de mutation et de recombinaisons génétiques. (176) Enfin, là où nous aurions pu nous attendre à un effet synergique lorsque les 3 HE sont mélangées à volume égal, en réalité aucun effet n'a été observé à la concentration maximum totale de 1 %. Ainsi, cette étude renforce l'idée, qu'au même titre que les antibiotiques, des concentrations supérieures en HE sont nécessaires pour inactiver des biofilms plutôt que pour prévenir leur formation.

2.4 Etude sur un exemple de bactérie à Gram positif : *Staphylococcus aureus*

2.4.1 Généralités à propos de *S. aureus* et de son biofilm

Staphylococcus aureus est un coccus à Gram positif aérobie-anaérobie facultatif dont l'Homme est le réservoir naturel. C'est une bactérie commensale présente chez 30 à 50 % de la population principalement retrouvée sur la peau et les muqueuses des fosses nasales et du pharynx. Elle peut devenir parfois pathogène et causer des infections cutanées (panaris, abcès, impétigo...), des infections ORL (otites, angines, sinusites...) ainsi que des infections nosocomiales parfois graves. (177) En effet *S. aureus*, au même titre qu'*E. coli* se place au premier rang des agents infectieux responsables d'infections nosocomiales. De plus, *S. aureus* est également une des principales bactéries à l'origine d'intoxications alimentaires. (177,178) Le traitement de ces infections est parfois difficile car d'une part 20 à 50 % des souches seraient multi-résistantes aux antibiotiques, et d'autre part, *S. aureus* est capable de produire des biofilms via des mécanismes divers et redondant, lui permettant de coloniser quasiment toutes les surfaces. (179) Cette bactérie est une des principales causes d'infections liées aux biofilms sur dispositif médicaux (valves cardiaques, cathéters, prothèses...) et est à l'origine de plusieurs centaines de millions de dollars de dépense chaque année. (179,180)

2.4.2 Etude d'HE potentiellement intéressantes contre son biofilm

2.4.2.1 Etude 1: Etudes de l'eugénol à l'encontre du biofilm de souches cliniques de *S. aureus*. (181)

Détail du composé	L'eugénol, phénol aromatique (4-allyl-2-méthoxyphénol) et composant majoritaire de l'HE de clou de girofle, a été testé seul et en combinaison avec le carvacrol.
Protocole	72 souches cliniques de <i>S. aureus</i> ont été utilisées (43 résistantes à la méticilline : SARM, et 29 sensibles à la méticilline : SASM) et une souche ATCC 29213 et 5 autres souches de SARM résistantes à d'autres antibiotiques (erythromycine, clindamycine, gentamicine...) Dans cette étude, 8 expériences ont été menées : Exp 1 : détermination vis-à-vis des bactéries planctoniques des CMI, des concentrations minimales bactéricides (CMB) et des concentrations minimales éradiquant le biofilms (CMEB). Exp 2 : détermination de l'effet de l'eugénol sur la croissance de biofilm de SARM et de SASM. Exp 3 : détermination de l'effet de l'eugénol sur des biofilms préétablis depuis 24 h de SARM et de SASM. Exp 4 : détermination du temps de contact nécessaire de l'eugénol permettant un effet bactéricide sur les bactéries sessiles du biofilm préétabli de la souche de référence ATCC 29213. Exp 5 : détermination in vivo de l'effet de l'eugénol à la concentration de 0,5 CMI sur la colonisation par <i>S. aureus</i> de l'oreille moyenne de rats Sprague-Dawley. Exp 6 : détermination de la variation d'expression en présence d'eugénol de gènes impliqués dans la formation de biofilm (icaD et sarA) ainsi qu'un gène de toxine (seA) Exp 7 : évaluation de la perméabilité des membranes de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 en présence d'eugénol. Exp 8 : évaluation de la synergie entre l'eugénol et le carvacrol vis-à-vis de biofilms préformés de SARM et SASM.

Paramètres	La CMI est considérée comme la plus petite concentration d'eugénol n'entraînant pas de croissance visible, la CMB elle est considérée comme la plus petite concentration réduisant de 3 log l'inoculum bactérien et la CMEB est considérée comme la plus petite concentration entraînant une diminution ≥ 1 log de bactéries viables dans le biofilm. La comptabilisation des UFC a été effectuée après une nuit d'incubation sur gélose BHI à 37°C. La biomasse des biofilms a été déterminée par méthode spectrophotométrique au cristal violet. (153) Les observations microscopiques ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage Hitachi S-4700 La synergie de l'eugénol et du carvacrol a été mesurée en calculant l'indice de concentration inhibitrice fractionnaire (FICI). L'évaluation de la perméabilité membranaire a été évaluée par méthode spectrophotométrique au cristal violet. (182) L'analyse de la variation d'expression des gènes concernés a été évaluée par RT-PCR en temps réel.
------------	--

Interprétation des résultats :

Au sein de toutes les souches de *S. aureus*, les valeurs de CMI varient de 0,01 % à 0,04 %, les valeurs de CMB elles, sont doublées. Aucune différence de sensibilité n'a été constatée entre les SARM et les SASM.

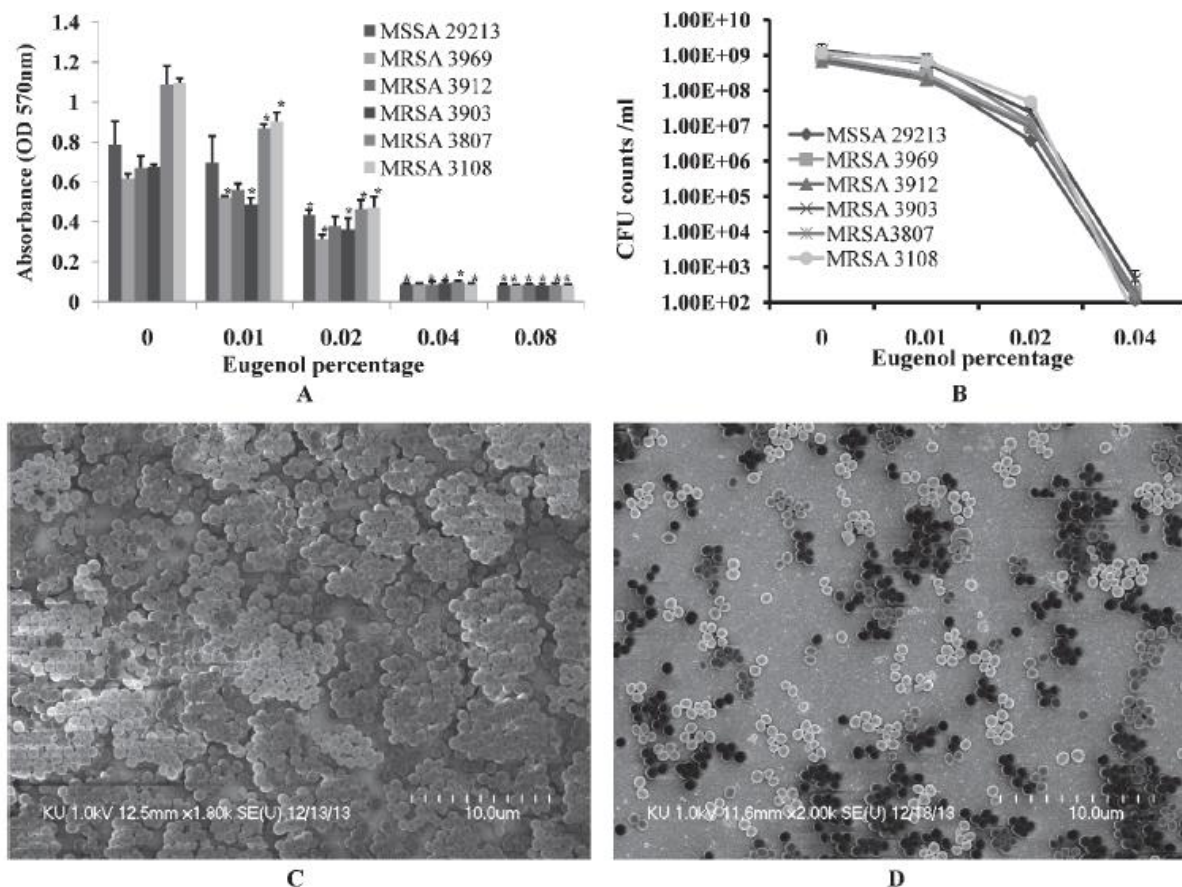


Figure 66 : effet sur la croissance de biofilms de SARM et de SASM en présence de différentes concentrations d'eugénol. Effet de l'eugénol sur la biomasse (A). Effet de l'eugénol sur la viabilité des bactéries sessiles (B). Vue en microscopie électronique à balayage de la croissance du biofilm de *S. aureus* ATCC 29213 en l'absence d'eugénol (C) et en présence de 0,02 % (0,5 CMI) d'eugénol (D). (181)

Les résultats présentés sur la figure 66 montrent que l'eugénol à CSI, est capable de diminuer de façon importante la croissance de biofilms de *S. aureus* puisque la moitié de la CMI (0,02 %) permet de diminuer de près de 50 % la biomasse du biofilm (Fig. 66, A) et également de 99 % (2 log) le nombre de bactéries viables dans le biofilm (Fig. 66, B). L'architecture quant à elle est, toujours à 0,5 CMI, très affectée : sans eugénol, le biofilm est épais, organisé en structure tridimensionnelle avec des microcolonies et les cellules connectées les unes aux autres (Fig. 66, C). L'eugénol a pour conséquence d'induire une désorganisation dans le biofilm naissant, avec nettement moins de cellules, ces dernières étant dispersées et attachées à la surface (Fig. 66, D). L'étude de viabilité cellulaire montre que l'eugénol est bactériostatique et bactéricide selon les concentrations, et que par conséquent,

cela diminue le nombre de bactéries susceptibles de participer à la formation du biofilm, et prévient ainsi l'agrégation et les connections inter-cellulaires.

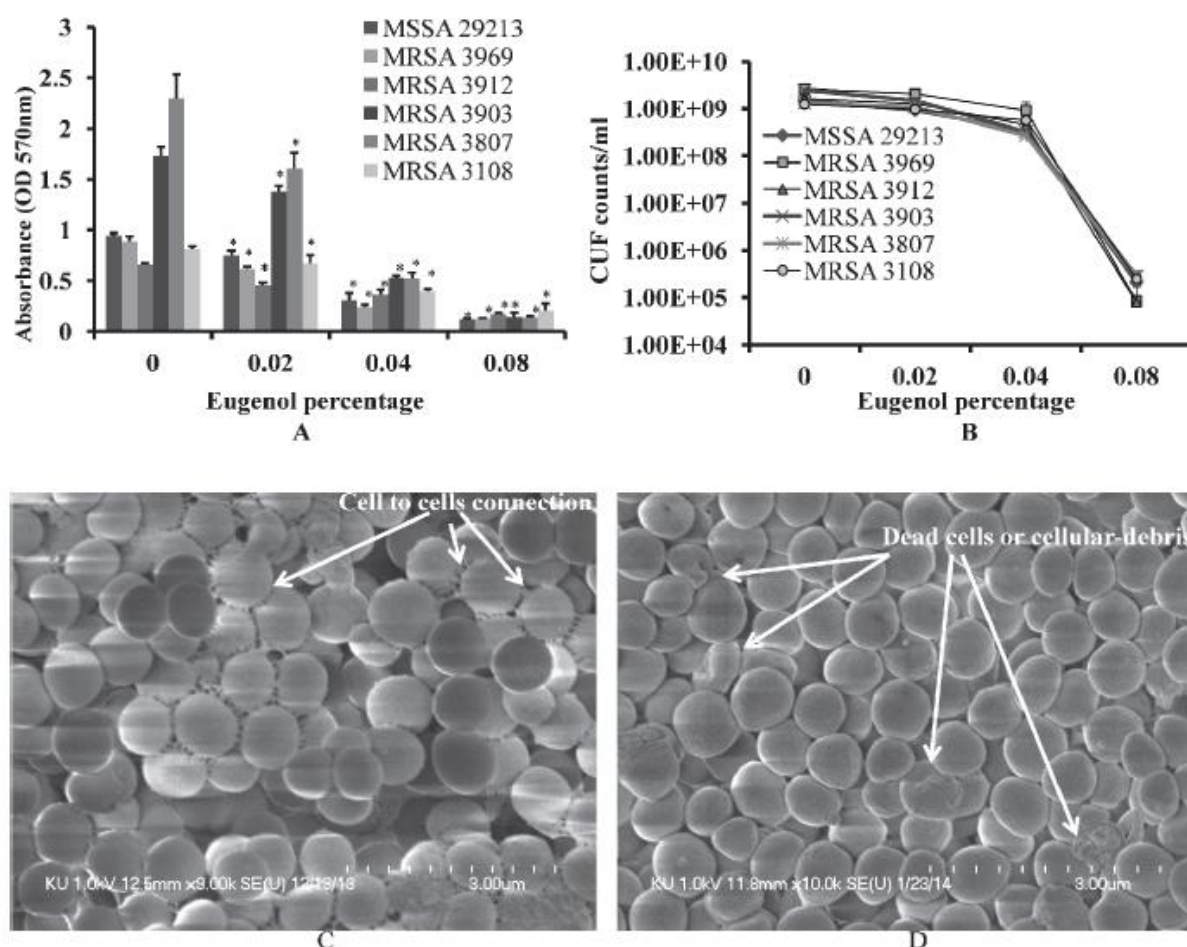


Figure 67 : impact de l'eugénol à différentes concentration vis-à-vis de biofilms préétablis de SARM et de SASM. Effet de l'eugénol sur la biomasse (A). Effet de l'eugénol sur la viabilité des bactéries sessiles (B). Vue en microscopie électronique à balayage du biofilm préformé de *S. aureus* ATCC 29213 en l'absence d'eugénol (C) et en présence de 0,04 % (=CMI) d'eugénol (D). (181)

Les résultats présentés sur la figure 67 montrent qu'à sa CMI (0,04 %), l'eugénol diminue la biomasse des biofilms préétablis de plus de 50 %, et qu'à 2 fois la CMI (0,08 %), l'eugénol induit une diminution de 99,99 % (4 log) le nombre de bactéries viables dans le biofilm. La CMEB de l'eugénol vis-à-vis de *S. aureus* peut donc être considérée à 0,08%. Les images microscopiques montrent en l'absence d'eugénol une structure tridimensionnelle très organisée avec des connexions inter-cellulaires intactes (Fig. 67, C). La morphologie des cellules est lisse et régulière. L'eugénol a pour effet de rompre les connexions inter-cellulaires, désorganiser la structure tridimensionnelle, tuer certaines bactéries et d'affecter la morphologie des cellules vivantes (elles sont plus petites et rugueuses) (Fig. 67, D). Ces résultats semblent prouver que l'éradication du biofilm par l'eugénol peut être due à la rupture des liaisons inter-cellulaires et à la lyse cellulaire.

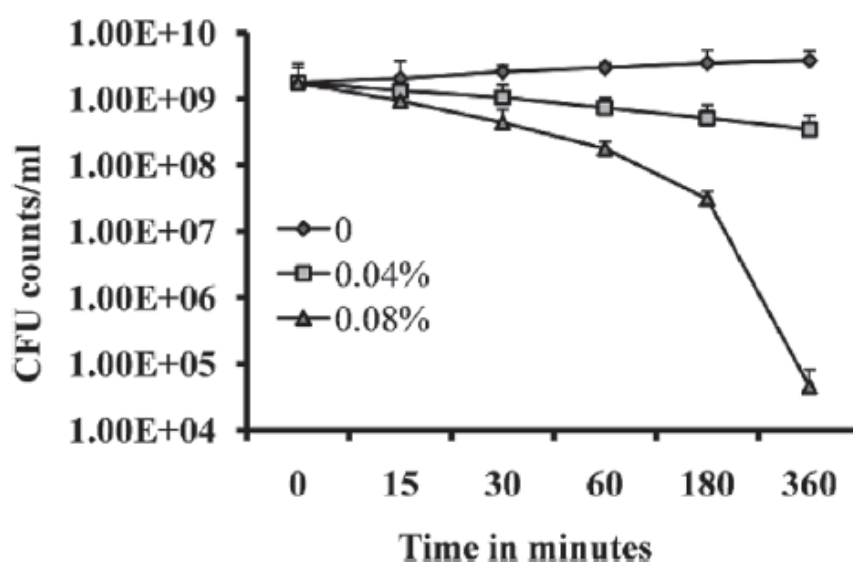


Figure 68 : cinétique de l'effet bactéricide de l'eugénol sur un biofilm préformé de *S. aureus* ATCC 29213. (181)

Les résultats présentés sur la figure 68 montrent qu'à 0,08 % (=CMEB), l'eugénol après 3 et 6 heures de contact, entraîne une diminution de 2 et 4 log respectivement du nombre de bactéries viables dans le biofilm. Cette observation suggère que l'effet bactéricide de l'eugénol vis-à-vis de biofilms préétablis se manifeste après 3 à 6 heures de contact.

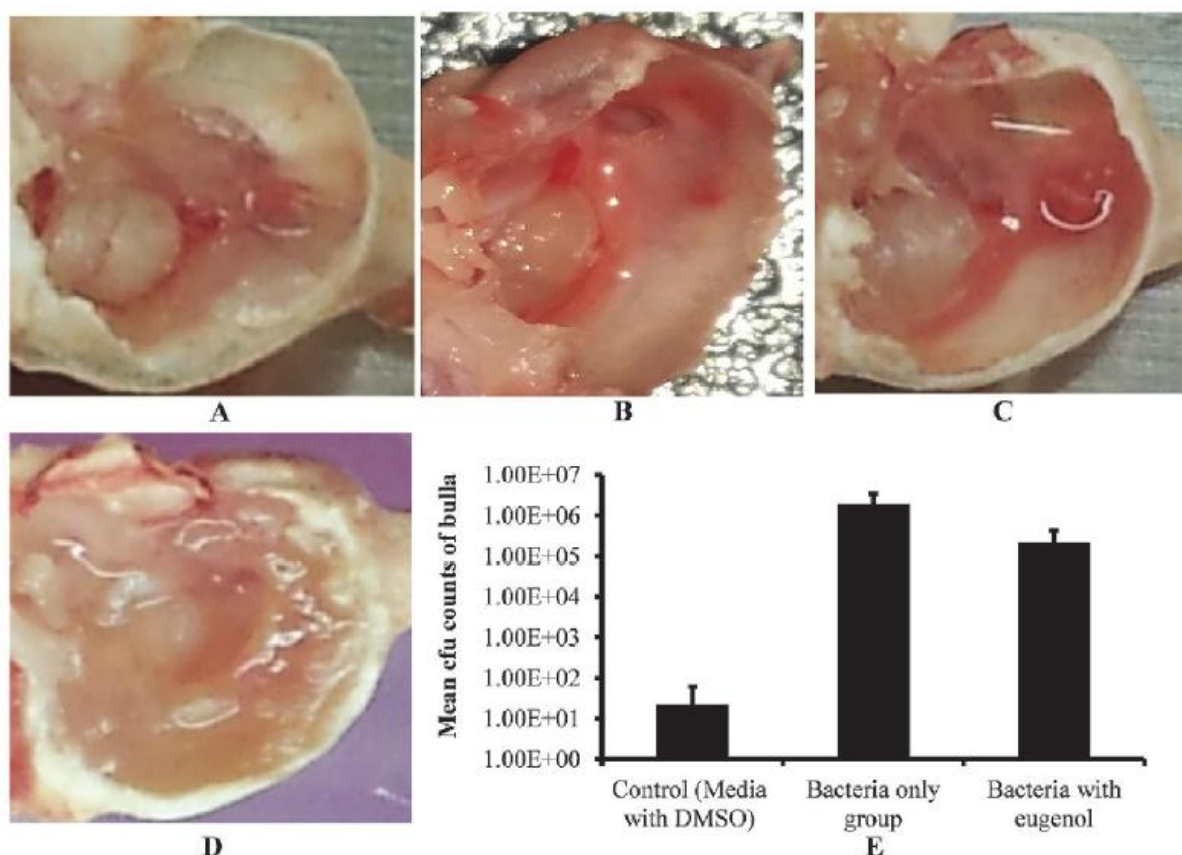


Figure 69 : Effet de l'eugénol sur la colonisation de l'oreille moyenne de rats par *S. aureus* ATCC 29213 pendant 1 semaine. (A) contrôle. (B) inoculation de DMSO seul. (C)

inoculation de *S. aureus* et d'eugénol. (D) inoculation de *S. aureus* seul. (E) comptabilisation du nombre d'UFC de *S. aureus* présent sur la muqueuse de l'oreille moyenne dans les différents cas. (181)

Les résultats présentés sur la figure 69 mettent en évidence l'efficacité in vivo de l'eugénol pour prévenir la colonisation de l'oreille moyenne par *S. aureus*. En effet, l'inoculation de la bactérie seule a pour conséquence de recouvrir totalement la muqueuse, induisant une inflammation de cette dernière avec obstruction de la trompe d'eustache, recouverte par un biofilm épais associé à de nombreux débris cellulaires. Inversement, l'oreille moyenne inoculée par *S. aureus* en présence d'eugénol est complètement saine et non enflammée, sans biofilm ni débris cellulaires visibles, à l'image du témoin négatif et de l'oreille inoculée avec du DMSO. La comptabilisation du nombre d'UFC de *S. aureus* montre une diminution de 88 % de sa colonisation sur la muqueuse. Quelques bactéries ont été mises en évidence sur les témoins, reflet de la flore normale de la muqueuse.

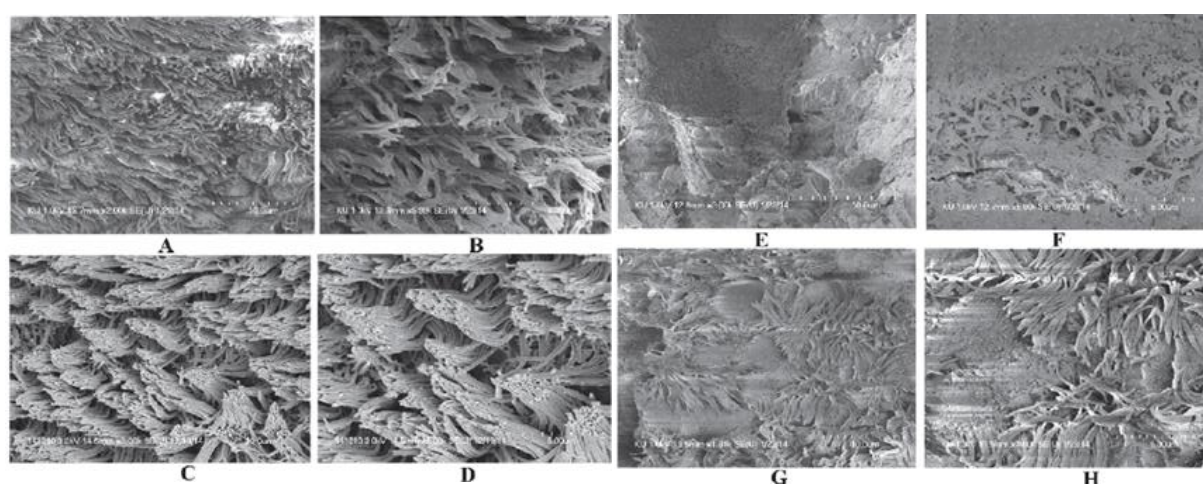


Figure 70 : colonisation par *S. aureus* de la muqueuse de l'oreille moyenne de rats. (A/B) contrôle. (C/D) inoculation de DMSO seul. (E/F) inoculation de *S. aureus* seul. (G/H) inoculation de *S. aureus* en présence d'eugénol. (181)

D'après les résultats présentés sur la figure 70, nous pouvons observer sur les images d'oreilles contrôles des rats (aucune inoculation (A/B) et DMSO seul (C/D)) un épithélium cilié développé. Sur les images où *S. aureus* a été inoculé seul (G/H), les débris cellulaires et la MEC du biofilm recouvre complètement les cils. Inversement, l'ajout d'eugénol ne permet pas à *S. aureus* de produire son biofilm (G/H), l'épithélium cilié est toujours visible, bien que les cils semblent davantage agglomérés entre eux.

L'analyse par RT-PCR à 24, 36 et 48 heures des gènes *icaD* (codant pour des polysaccharides d'adhésion inter-cellulaire), *sarA* (codant pour un régulateur transcriptionnel

impliqué dans la formation de biofilm) et *seA* (codant pour une entérotoxine) met en évidence une diminution notable de leur expression induite par l'eugénol à la moitié de la CMI (0,02 %). L'expression d'*icaD* est divisée par 1,3 ; 6,1 et 3,4 respectivement à 24, 36 et 48h. Le taux d'expression du gène *seA* quant à lui est divisée par 1,3 ; 12,9 et 17,8. Enfin l'expression de *sarA* est divisée par 1,5 ; 8,8 et 2,9. (données non représentées)

L'altération de la membrane plasmique de *S. aureus* est mise en évidence par l'augmentation d'absorption et d'adsorption du cristal violet. En effet sans traitement, *S. aureus* absorbe 42 % du cristal violet, le traitement par eugénol à 0,04 et 0,08 % (=CMI et 2xCMI) induit 90 et 92 % d'absorption du cristal violet. (données non représentées)

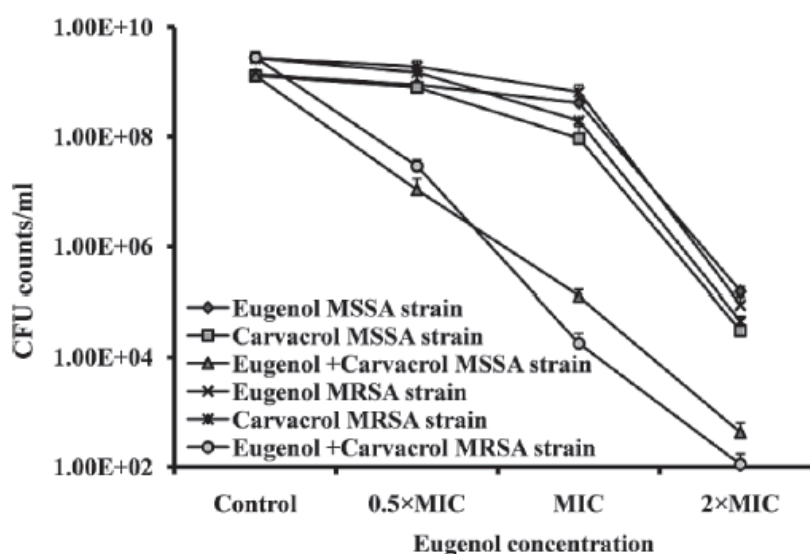


Figure 71 : impact de l'association eugénol/carvacrol sur l'éradication de biofilms préformés de *S. aureus* après 6h de d'incubation. (181)

L'association eugénol/carvacrol présentée sur la figure 71 met en évidence un effet synergique sur l'éradication de biofilms préformés de *S. aureus*, avec un FICI inférieur à 0,5. En effet, le traitement avec la moitié de la CMI (soit le quart de la CMEB : 0,02 %) de l'eugénol seul entraîne seulement 25 % de diminution du nombre d'UFC dans le biofilm de *S. aureus*, pareillement le carvacrol à 0,01 % entraîne 40 % de diminution. En revanche l'association des 2 composés à ces concentrations entraîne 99 % de diminution d'UFC, soit 2 log de diminution. De plus, 0,08 % d'eugénol associé à 0,04 % de carvacrol entraînent près de 7 log de réduction des UFC du biofilm. La synergie permet ainsi de diminuer par 4 la valeur de CMEB.

Discussion :

Le potentiel de l'eugénol vis-à-vis des SARM et SASM semble vraiment très intéressant. Cette molécule est considérée comme sûre par la FDA. (161) En somme, il permet

à des concentrations sub-inhibitrices de diminuer la formation de biofilm, de diminuer la colonisation *in vivo*, et d'altérer l'expression de gènes impliqués dans la formation de biofilms et de toxines. A des concentrations égales à la CMI ou le double, l'eugénol permet d'éradiquer des biofilms préformés, de tuer les bactéries en son sein, d'augmenter leur perméabilité et d'altérer leur morphologie ainsi que leurs connexions inter-cellulaires. L'augmentation de perméabilité est un aspect important dans l'association éventuelle d'antibiotiques afin de renforcer leur action. Par ailleurs aucune différence n'a été constatée entre les SARM et les SASM, probablement grâce à la pluralité des modes d'action de l'eugénol et des HE en général. Ainsi, l'eugénol pourrait avoir toute sa place pour le contrôle et l'éradication de biofilms impliquant *S. aureus* dans les otites moyennes aiguës par exemple, d'autres études ayant montré que les vapeurs d'HE étaient capables de traverser le tympan pour aller agir sur la muqueuse de l'oreille moyenne (183).

2.4.2.2 Etude 2 : étude des composés principaux de l'essence d'orange douce vis-à-vis de *S. aureus* impliqué dans les mammites bovines. (184)

Détail des composés	Les composés principaux de l'essence d'orange douce (<i>Citrus sinensis</i>) sont testés, à savoir le linalol (20,2 %), le décanal (18 %), le citral (14,1 %) et le valencène (5,2 %).
Protocole	Les composés sont testés vis-à-vis de cellules de <i>S. aureus</i> ATCC 29740, isolées depuis une mammite bovine et vis-à-vis du biofilm qui en découle. 4 expérimentations ont été effectuées à propos du biofilm : Exp 1 : analyse de l'effet du citral et du linalol sur des biofilms préformés. Exp 2 : détermination de la toxicité de ces 2 composés sur les cellules épithéliales mammaires MAC-T. Exp 3 : analyse de l'effet du citral et du linalol sur l'adhérence et l'invasion des cellules épithéliales mammaires MAC-T. Exp 4 : analyse de la variation d'expression des gènes de <i>S. aureus</i> impliqués dans la formation de biofilm et d'autres facteurs de virulence.
Paramètres	L'éradication de biofilms préformés a été mesurée par méthode colorimétrique au cristal violet. (153) L'évaluation de la toxicité du linalol et du citral à l'encontre des cellules épithéliales a été déterminée par méthode colorimétrique enzymatique à l'aide des sels de tétrazolium. (157) L'effet de ces 2 composés sur l'adhérence et l'invasion des cellules épithéliales a été mesuré en comptabilisant les UFC sur gélose Luria-Bertani après 1 heure d'incubation en présence de citral ou de linalol. L'analyse de la variation d'expression génique a été réalisée par RT-qPCR.

Interprétation des résultats :

Parmi les 4 composés principaux testés, seuls le citral et le linalol sont retenus de part leur CMI vis-à-vis des bactéries planctoniques de 0,02 % et 0,12 % respectivement. Le décanal et le valencène n'ont pas été retenus car même à 2,5 %, ils ne sont pas capables d'inhiber la croissance de *S. aureus*.

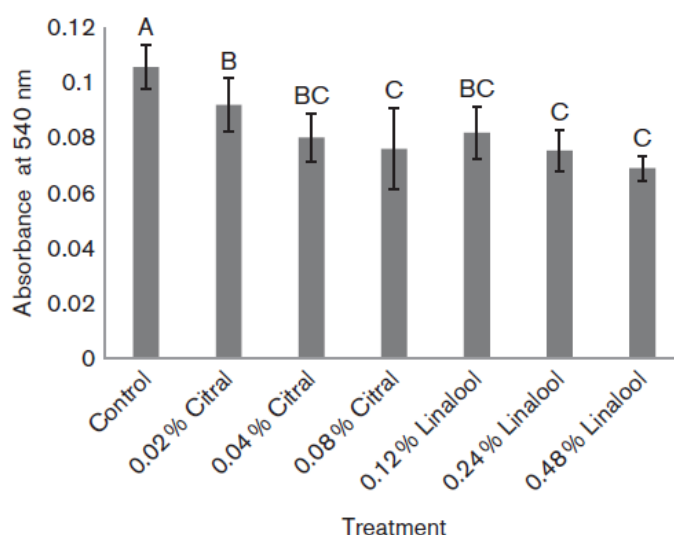
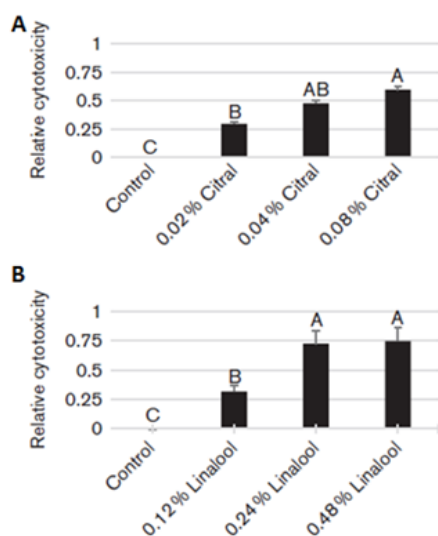


Figure 72 : effet du citral et du linalol sur des biofilms préformés de *S. aureus*. (184)

Le graphique présenté sur la figure 72 montre que toutes les concentrations testées induisent une diminution de la biomasse des biofilms préformés, et ceci dès la CMI de chacun des composés. Même si aucun des 2 composés n'entraîne une éradication totale (maximum 33 % de diminution d'absorbance), le linalol semble légèrement plus actif que le citral.



Les résultats présentés sur la figure 73 montrent qu'à la fois le citral et le linalol exercent une cytotoxicité envers les cellules épithéliales à toutes les concentrations testées. Seules les concentrations entraînant moins de 50 % de cytotoxicité relative sont conservées pour les prochains tests, à savoir le linalol à 0,12 % et le citral à 0,02 et 0,04 %.

Figure 73 : évaluation de la cytotoxicité relative du citral (A) et du linalol (B) à l'encontre des cellules épithéliales mammaires MAC-T. (184)

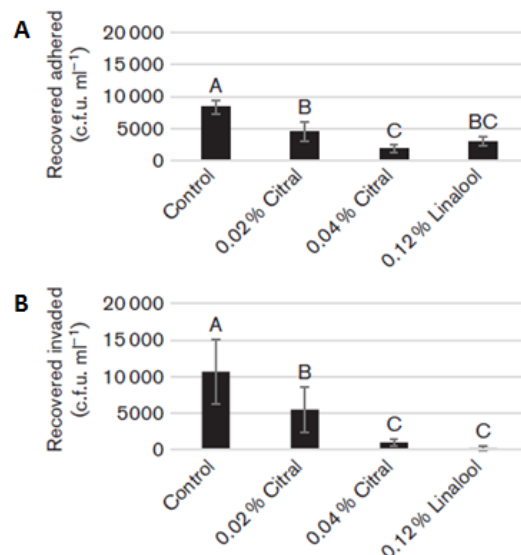


Figure 74 : effet du citral et du linalol sur l'adhérence (A) et l'invasion (B) des cellules épithéliales mammaires MAC-T. (184)

Les résultats présentés sur la figure 74 montrent que toutes les concentrations testées induisent une diminution d'adhérence et d'invasion des cellules épithéliales par *S. aureus* de plus de 50 %. Le citral à 0,02 % (=CMI) entraîne la plus faible diminution d'adhérence et d'invasion ($\approx 3,6$ log dans les deux cas). La concentration à 0,04 % ainsi que le linalol à 0,12 % entraînent des effets similaires : 3,8 log de diminution d'adhérence et 4 log de diminution d'invasion.

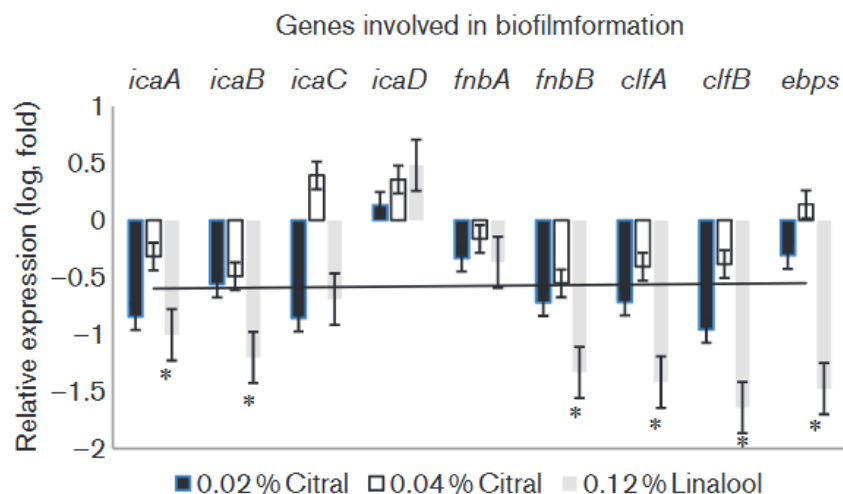


Figure 75 : variation d'expression des gènes impliqués dans la formation du biofilm après 24 h de croissance et après 24 h d'incubation en présence de citral ou linalol. Différences statistiques (*). (184)

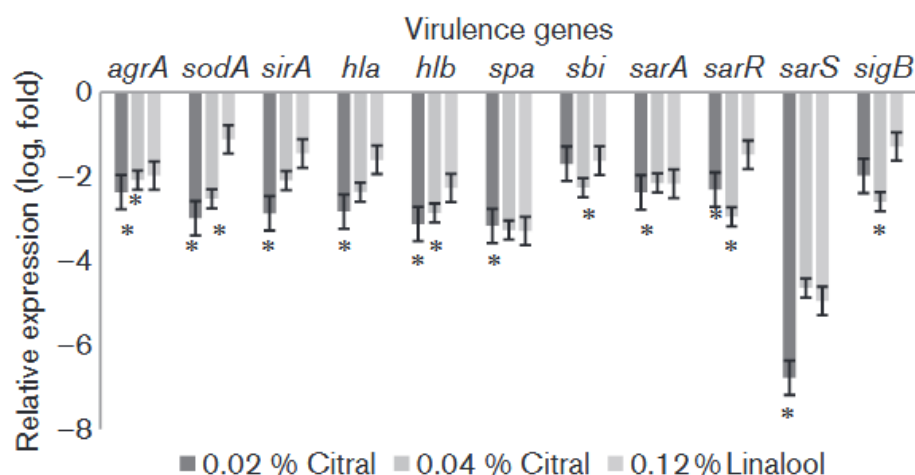


Figure 76 : variation d'expression des gènes impliqués dans la virulence de *S. aureus* 1h après l'infection des cellules MAC-T et 1 h encore après traitement par citral ou linalol Différences statistiques (*). (184)

Les variations d'expression génique présentées sur la figure 75 concernent les gènes de virulences autres que ceux codant pour la formation du biofilm. Toutes les concentrations testées de citral (0,02 et 0,04 %) et de linalol (0,12 %) induisent une diminution d'expression des gènes concernés, bien qu'il ne semble pas y avoir de réponse dose dépendante (citral). A propos des gènes impliqués dans la formation du biofilm présentés sur la figure 76, seul le linalol possède un effet répresseur significatif à leur encontre.

Discussion :

Même si les effets du linalol et du citral ne sont pas excellents, les résultats restent néanmoins intéressants. Comme d'autres études l'ont mis en évidence avec d'autres HE, ces composés sont capables d'agir sur les biofilms préformés à des concentrations équivalentes à leur CMI envers les cellules planctoniques. (166) Le facteur limitant est la toxicité observée sur les cellules épithéliales mammaires bovines. Même si l'essence d'orange est déclarée comme sûre par la FDA, (161) d'autres études ont montré une toxicité importante du citral à l'encontre de cellules de peau humaine, mais seulement à partir de 1 %. (185) Cependant, cette toxicité in vivo sur des rats se trouve 100 fois moins importante. (185) Ainsi, le citral à 0,02 ou 0,04 % est probablement sans danger pour l'utilisation in vivo. De la même manière la toxicité du linalol a été testée à l'encontre de cellules de peau humaine, (186) et on retrouve comme dans cette présente étude, une toxicité majorée au-delà de 0,12 %. Ainsi des concentrations inférieures seraient sans danger, mais d'autres études sont nécessaires, notamment in vivo chez l'Homme pour être sûr. En ce qui concerne le mécanisme d'action, la perturbation d'expression génique induite par le citral et le linalol peut en partie expliquer leur effet anti-biofilm. Seul le linalol parvient à diminuer significativement l'expression des gènes

impliqués dans la formation du biofilm tels que les gènes *ica* (impliqués dans la production de polysaccharides et de leur déacétylation), les gènes *fnb* (impliqués dans l'initiation de formation du biofilm et de sa persistance) et les gènes impliqués dans l'adhérence des bactéries (*clfA*, *clfB*, et *ebps*). Ainsi, leur sous expression contribue sans doute à l'effet anti-biofilm. Si le citral n'agit pas significativement sur l'expression de ces gènes, il agit (à l'instar du linalol) sur les gènes impliqués dans la virulence de *S. aureus* en diminuant notamment l'expression d'*agrA* (codant pour un régulateur transcriptionnel des gènes de virulence, aussi considéré comme le seul régulateur du QS chez *S. aureus* (187)), de la famille de protéines membranaires et extracellulaires sar, de *sibB* (impliqué dans la virulence et la réponse au stress cellulaire), de *sirA* (impliqué dans l'acquisition du fer), et enfin de *sbi* et de *spA* (impliqués dans l'échappement au système immunitaire). Diminuer leur expression contribue également à réduire la virulence et l'intégrité du biofilm. Le linalol et le citral possèdent un intérêt certain dans la lutte contre le biofilm de *S. aureus* en altérant en partie l'adhérence initiale, la colonisation et la formation de ce dernier, mais il semble nécessaire d'associer ces molécules à d'autres afin d'augmenter l'efficacité.

2.4.2.3 Etude 3 : effet du cinnamaldéhyde (TC) sur la croissance du biofilm et l'expression de *sarA* chez des souches de SARM. (188)

Détail du composé	Le (trans)-cinnamaldéhyde (TC) ou aldéhyde cinnamique ou 3-phényl-prop-2-énal est un aldéhyde aromatique, principal composé retrouvé dans les HE de canelle : <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (cannelle de Ceylan), <i>Cinnamomum cassia</i> (cannelle de Chine) et <i>Cinnamomum loureirii</i> (cannelle du Vietnam)
Protocole	6 souches cliniques de SARM (JB-01 à JB-06) ont été isolées à partir d'expectorations, de pus, de sang, d'urine, de liquide céphalorachidien et d'ascite, ainsi qu'une souche de référence (ATCC 25923) ont été utilisées dans cette étude. Les CMI et CMB ont d'abord été déterminées à l'encontre des bactéries planctoniques des différentes souches. Puis l'effet du TC sur la viabilité et l'activité métabolique des biofilms a été analysé après 24 h d'incubation à différentes concentrations à l'encontre de jeunes biofilms préformés depuis 24 h. Des observations microscopiques ont également été réalisées. Enfin, l'impact du TC à des concentrations sub-inhibitrices vis-à-vis de l'expression de <i>sarA</i> a été étudié.
Paramètres	Les CMI ont été déterminées par dilution en milieu liquide sur microplaque, les CMB ont été déterminées par comptabilisation des CFU sur gélose Mueller-Hinton. Est considérée comme CMB la plus petite concentration de TC induisant la formation de moins de 5 UFC par gélose à partir d'un bouillon à 10^5 UFC/mL. L'activité métabolique des cellules formant les biofilms a été déterminée par l'utilisation des sels de tétrazolium. (157) La CMEB est définie comme la plus petite concentration de TC induisant une absorbance inférieure à 5 % du contrôle. Les observations des biofilms ont été réalisées à l'aide d'un microscope électronique à balayage ainsi qu'un microscope confocal à balayage LASER. L'étude de l'expression de <i>sarA</i> a été réalisé par RT-PCR temps réel.

Interprétation des résultats :

Pour toutes les souches cliniques testées, la CMI du TC à leur encontre est égale à 0,125 % (v/v), excepté la souche JB-05 qui est égale à la souche standard soit 0,0625 %. En ce qui concerne les CMB, elles sont toutes 2 à 4 fois plus élevées que les CMI. (Données non représentées)

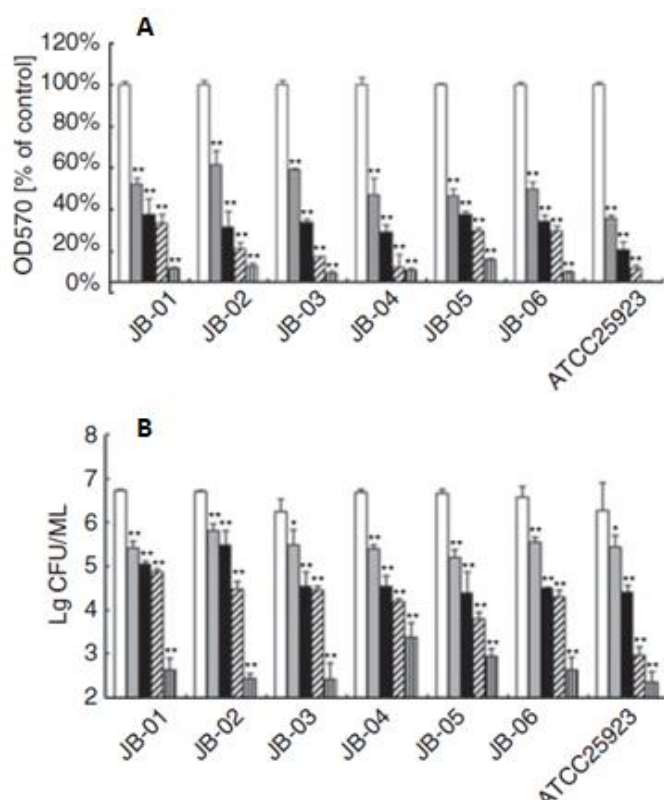


Figure 77 : Effet du TC sur la viabilité du biofilm (A) et des bactéries (B) après 24 h d'incubation en présence du TC sur des biofilms préformés depuis 24h. (□) Contrôle ; (▤) 0,5 CMI ; (■) CMI ; (■) 2,5 CMI ; (□) 5 CMI. Différences statistiques (**) (188)

Les résultats de la figure 77 à propos de la mesure de l'activité métabolique ainsi que la comptabilisation du nombre d'UFC dans les biofilms permet d'affirmer que toutes les concentrations testées de cinnamaldéhyde (de 0,031 à 0,625 %) permettent de diminuer de façon significative la viabilité et le nombre de cellules dans le biofilm, et ceci de façon concentration dépendante. De plus les concentrations à 5 CMI sont capables d'éradiquer les biofilms formés, et correspondent donc aux CMEB vis-à-vis des différentes souches.

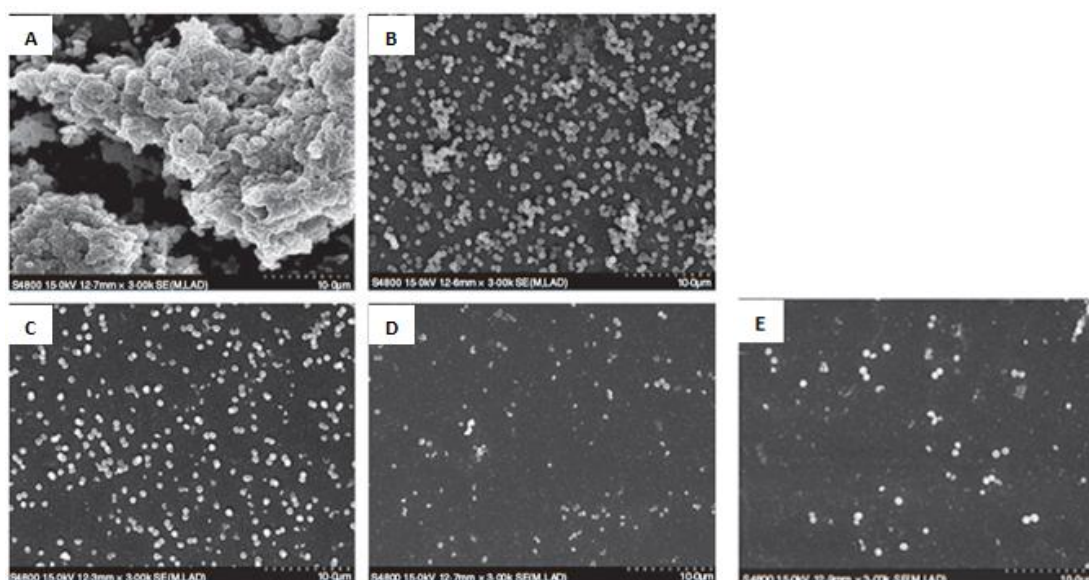


Figure 78 : images en microscopie électronique à balayage (x3000) de la souche JB-01 et de son biofilm en l'absence de traitement (A) et après 24 h d'incubation en présence de TC à 0,0625 % (B) ; 0,125 % (C) ; 0,313 % (D) et 0,625 % (E). (188)

L'observation microscopique présentée sur la figure 78 met en évidence sur le biofilm contrôle (âgé alors de 48 heures) une architecture tri-dimensionnelle complexe, composée de colonies formant des couches de taille et densité variables. Le nombre et la taille de ces colonies diminuent proportionnellement aux doses de TC utilisées, jusqu'à la présence isolée de bactéries seules sur le substrat à haute concentration.

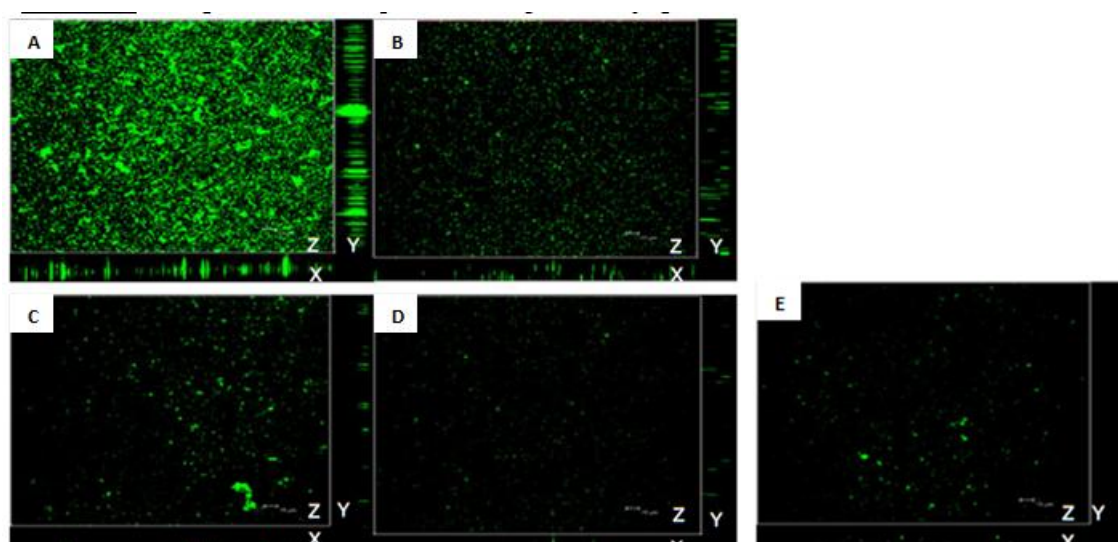


Figure 79 : images au microscope confocal à balayage LASER (x400) de biofilm de *S. aureus* après 24 h d'incubation en l'absence (A) ou en présence de TC à 0,0625 % (B) ; 0,125 % (C) ; 0,313 % (D) et 0,625 % (E). (188)

Cette autre observation microscopique présentée sur la figure 79 met en évidence la variété de structure et d'épaisseur du biofilm de *S. aureus*. Lorsque les concentrations de TC

augmentent, le biofilm devient de moins en moins épais avec seulement quelques rares microcolonies après 24 h d'incubation en présence de 5 CMI de TC.

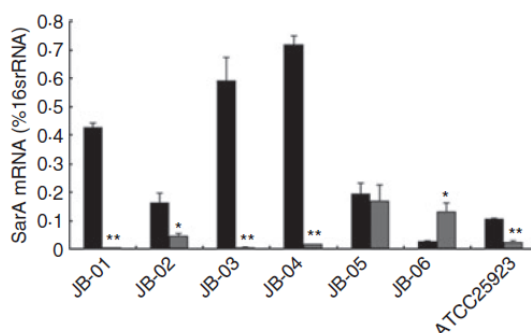


Figure 80 : effet de concentrations sub-inhibitrices de TC après 24 h d'incubation sur l'expression de *sarA* chez *S. aureus*. (■) contrôle ; (□) TC à 0,5 CMI. Différences statistiques (**). (188)

Les résultats issus de la figure 80 montrent qu'à l'exception des souches JB-05 et JB-06, le TC à la CMI/2 entraîne une diminution d'expression de *sarA* chez toutes les souches étudiées. Les résultats sont en revanche assez variés selon les souches, en effet, si le TC induit 130 à 140 fois moins d'expression de *sarA* chez JB-01 et JB-03, il n'entraîne pas de variation significative chez JB-05, et induit par contre une augmentation significative chez JB-06.

Discussion :

Cette étude permet donc de mettre en évidence le potentiel du cinnamaldéhyde à l'encontre de jeunes biofilms préformés de *S. aureus*. L'inhibition de croissance et même l'éradication des biofilms des différentes souches de *S. aureus* semble être dose dépendant et survient dès la concentration du TC à 0,5 CMI. Un des mécanismes d'action du TC peut être du à l'inhibition de l'expression de *sarA*, qui code pour un régulateur transcriptionnel de plus de 120 gènes, dont le gène *bap*. (189) Ce dernier code pour la protéine Bap, associée à la paroi cellulaire, impliquée dans la formation de biofilms, qui permet même chez des mutants du locus *icaADBC* (codant pour des enzymes synthétisant des polysaccharides servant à l'adhésion inter-cellulaire) de former des biofilms sans les polysaccharides. (190) De part son rôle pivot, l'inhibition de *sarA* est une cible très intéressante. Cependant, cette étude montre que l'inhibition de *sarA* par le TC n'a pas lieu chez toutes les souches de *S. aureus*, pourtant l'effet anti-biofilm du TC est homogène entre les diverses souches, ce qui prouve que d'autres mécanismes d'action du TC existent, et que l'inhibition de *sarA* jouerait un rôle plus important dans l'inhibition de formation de biofilms plutôt que dans l'éradication de biofilms préformés. A l'image de l'eugénol qui inhibe à des concentrations sub-inhibitrices l'expression de *sarA*, *icaD* ou encore *seA*, (181) le TC agirait probablement sur l'expression

d'autres gènes non étudiés ici. De plus, des concentrations sub-inhibitrices de TC sont effectives à l'encontre des biofilms de *S. aureus*, (à l'instar des biofilms d'*E. coli* (158,160)) et cela est intéressant dans le sens où l'utilisation de concentrations supérieures ou égales aux CMI des HE ou composés principaux sont parfois élevées, et ne sont pas toujours tolérables pour l'organisme. Bien que le TC soit considéré comme sûr par la FDA (161), n'ayant pas de toxicité à des concentrations inférieures à 1,5 % vis-à-vis des cellules épithéliales vésicales (158), il n'est pour autant pas dénué de toxicité (hépatotoxicité entre autres...) et sa toxicité n'est certainement à ce jour pas complètement établie, ainsi les concentrations les plus faibles seront probablement les mieux tolérées. En somme, autant chez *E. coli* que chez *S. aureus*, le cinnamaldéhyde représente une molécule d'intérêt majeur dans la lutte à la fois contre la formation des biofilms mais également vis-à-vis des biofilms préformés. (158,160) Les doses nécessaires pour éradiquer un biofilm préformé d'*E. coli* semblent plus élevées que chez *S. aureus* puisqu'après 24 h d'incubation, 0,625 % de TC permet d'éradiquer totalement le biofilm de *S. aureus*, alors que chez *E. coli*, 1,5 % de TC est nécessaire, ce qui suit l'hypothèse à laquelle les bactéries à Gram négatif sont moins sensibles que les bactéries à Gram positif.

2.5 Etude sur un exemple de levure : *Candida albicans*

2.5.1 Généralités à propos de *C. albicans* et de son biofilm

Candida albicans est une levure polymorphe aérobie, dépourvue de capsule et de pigmentation, appartenant à la flore commensale du tube digestif, de la muqueuse vaginale, ainsi que de la peau chez l'Homme et d'autres espèces homéothermes. (191) Elle est un des rares champignons susceptible d'être pathogène pour l'Homme. Chez les individus sains immunitairement, elle est la plupart du temps inoffensive, sa présence est maintenue constamment en balance avec les autres microorganismes de la flore commensale. (192) Cependant, toute altération de la flore commensale (traitement antibiotique), du système immunitaire (immunodépression, stress...) ou modification de l'environnement (pH, nutriments...) peut permettre à *C. albicans* de devenir pathogène. Ces infections peuvent simplement aller de la mycose superficielle à la candidose systémique à l'origine de près de 40 % de mortalité dans certains cas. (192) La pathogénicité de *C. albicans* est en partie due à son biofilm. En effet, cette levure polymorphe est capable d'adopter 3 formes cellulaires : la forme blastospore ronde, la forme pseudomycélium allongée, et la forme mycélium vraie filamenteuse. (191) La formation du biofilm passe effectivement par ces 3 formes : la forme sphérique de la levure adhère dans un premier temps à la surface, puis prolifère pour former une couche basale, et ensuite survient la formation des tubes germinatifs à l'origine du mycélium avec en parallèle la production de la MEC. (192) Une fois formé sur une surface (muqueuse ou dispositif médical) le biofilm de *C. albicans* peut être à l'origine de dissémination systémique grave. Il est ainsi estimé que les infections à biofilms causées par *C. albicans* sur cathéter surviennent dans plus de 50 % des cas d'implantation de cathéter veineux centraux aux USA, à l'origine de 100 000 morts et 6,5 milliards de dollars de dépense, annuellement. (192)

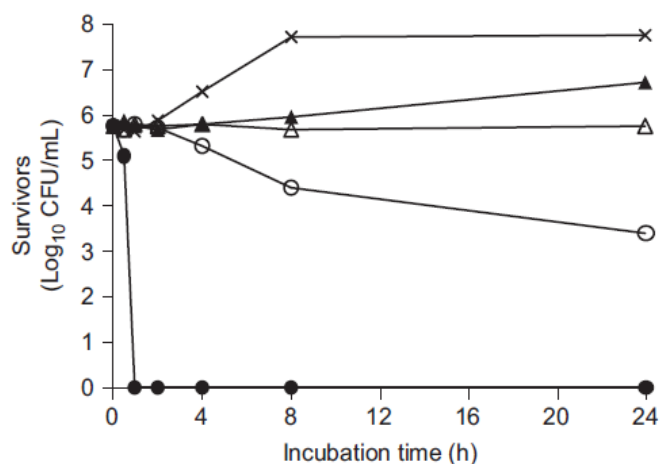
2.5.2 Etude d'HE potentiellement intéressantes contre son biofilm

2.5.2.1 Etude 1 : étude de l'effet du linalol vis-à-vis du biofilm de *C. albicans*. (193)

Détail du composé	Le linalol (3,7-diméthyl-1,6-octadiène-3-ol) est un alcool terpénique retrouvé dans de nombreuses plantes aromatiques telles que la lavande vraie (<i>Lavandula angustifolia</i>) ou encore la bergamote (<i>Citrus bergamia</i>).
Protocole	La souche de référence de <i>C. albicans</i> ATCC 14053 a été utilisée durant cette étude. 5 expérimentations ont été menées : Exp 1 : Détermination de la CMI afin d'utiliser ensuite des CSI. Exp 2 : analyse de la cinétique de l'effet fongicide Exp 3 : étude de l'inhibition de formation du tube germinatif Exp 4 : analyse de l'inhibition de formation du biofilm et de l'intégrité de biofilms préformés et visualisation microscopique Exp 5 : étude de la variation d'expression génique.
Paramètres	La détermination de la CMI a été réalisée par dilution en milieu liquide sur microplaque. La CMI correspond à la plus petite concentration inhibant une croissance visible après 48 h d'incubation à 35°C. La concentration minimale fongicide (CMF) est définie comme la plus petite concentration en linalol inhibant la croissance des levures sur gélose YPD (Yeast Peptone Dextrose). La cinétique de l'effet fongicide a été déterminée après incubation pendant 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 8 ; 24 h en comptabilisant les UFC après 48 h de culture sur gélose YPD à 35°C. L'inhibition du tube germinatif a été visualisée par microscope optique après 3h d'incubation des levures en présence de linalol. L'étude de la quantité de biofilm a été réalisée avec la méthode semi quantitative colorimétrique aux sels de tétrazolium. (194) L'observation du biofilm a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage JEOL JSM-7600F. La variation d'expression génique a été mesurée par RTq-PCR.

Interprétation des résultats :

Les valeurs de CMI et de CMF du linalol envers la forme planctonique de *C. albicans* sont équivalentes à 8 mM ($\approx 0,14\%$ v/v). Ceci suggère que le linalol exerce davantage un effet fongicide plutôt que fongistatique contre cette levure.



La figure 81 met en évidence un effet fongicide conséquent du linalol à 8 mM puisqu'après 1h d'incubation, une diminution de près de 6 log UFC est observée alors que la CMF de l'amphotéricine B après 24h d'incubation entraîne une diminution d'à peine 2 log UFC.

Figure 81 : cinétique de l'effet fongicide du linalol vis-à-vis de *C. albicans*. (x) contrôle ; (▲) linalol 4 mM ; (●) linalol 8 mM ; (○) amphotéricine B 0,5 µg/mL ; (Δ) amphotéricine B 0,25 µg/mL. (193)

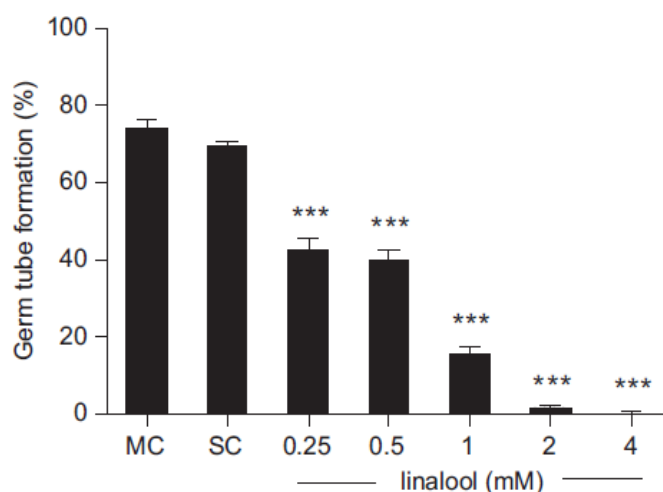


Figure 82 : effet inhibiteur du linalol sur la formation de tube germinatif. MC : contrôle milieu ; SC contrôle solvant. (193)

Le graphique présenté sur la figure 82 montre le potentiel du linalol dans l'inhibition du tube germinatif à des CSI après 3 h d'incubation. En effet environ 70 à 80 % des levures forment un tube germinatif dans les 2 contrôles, alors que le linalol inhibe cela de façon dose dépendante jusqu'à complètement inhiber la germination à partir du quart de la CMI (2 mM).

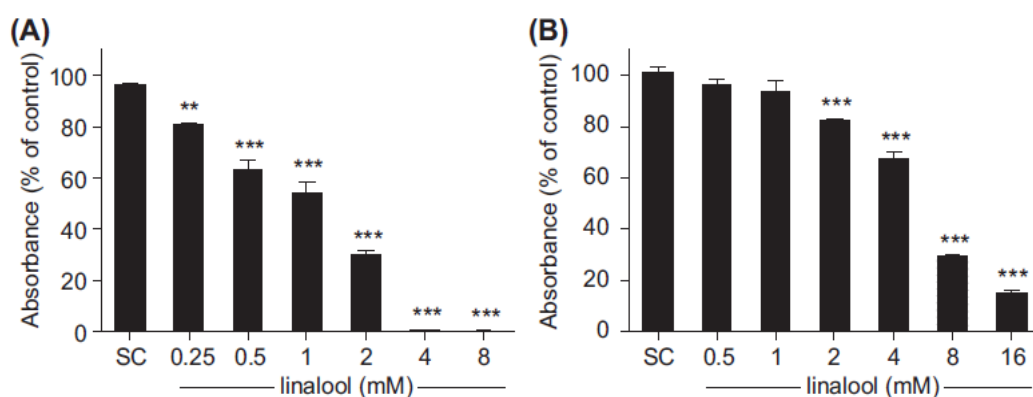


Figure 83 : effet du linalol sur la formation du biofilm 1h après l’adhésion (A), et sur des biofilms préformés depuis 24h (B). (193)

Les résultats de la figure 83 prouvent que le linalol est capable également d’inhiber totalement la formation du biofilm à la CMI/2. Même si l’inhibition du biofilm préformé n’est pas totale aux concentrations testées, à 16 mM, environ 85 % du biofilm est tout de même d’inhibé.

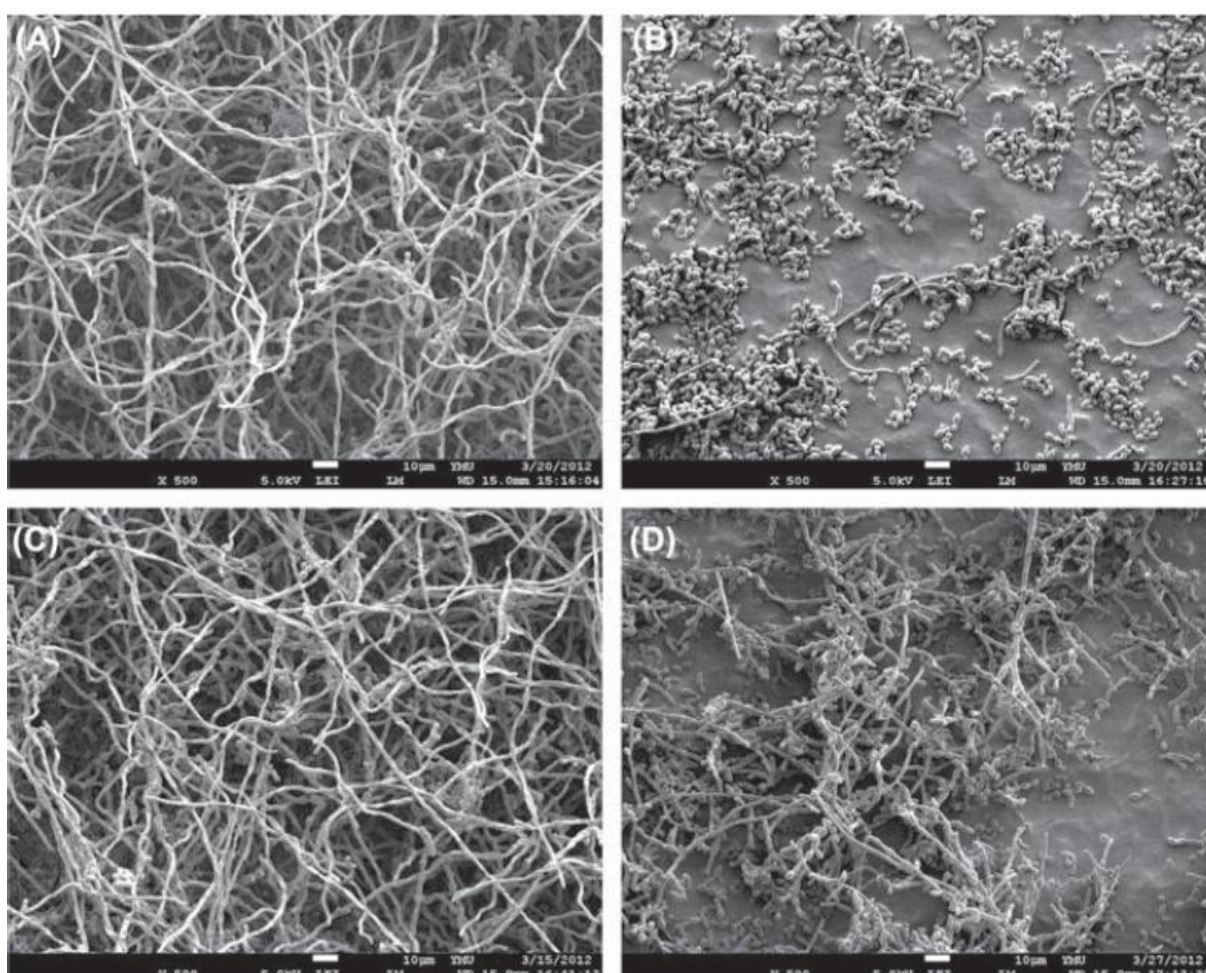


Figure 84 : observation au microscope électronique à balayage x500. (A) image contrôle d’un biofilm de 24h. (B) Effet du linalol à 4 mM ajouté 1h après l’adhérence et incubation pendant 24h. (C) image contrôle d’un biofilm de 48h. (D) Effet du linalol à 16 mM sur un biofilm préformé depuis 24h et incubation pendant 24h. (193)

Les images contrôle A et C de la figure 84 en l'absence de linalol mettent en évidence un biofilm dense, tridimensionnel, uniforme et homogène composé de nombreuses levures filamenteuses. Durant la formation du biofilm en présence de linalol, nous observons sur l'image B de la figure 84 que beaucoup moins de cellules filamentent, ces dernières étant dispersées et ne formant que peu de structure tridimensionnelle. Vis-à-vis du biofilm mature, le linalol induit également une diminution du nombre de levures filamenteuses sur l'image D de la figure 84, le biofilm semble davantage compact, hétérogène et beaucoup moins abondant.

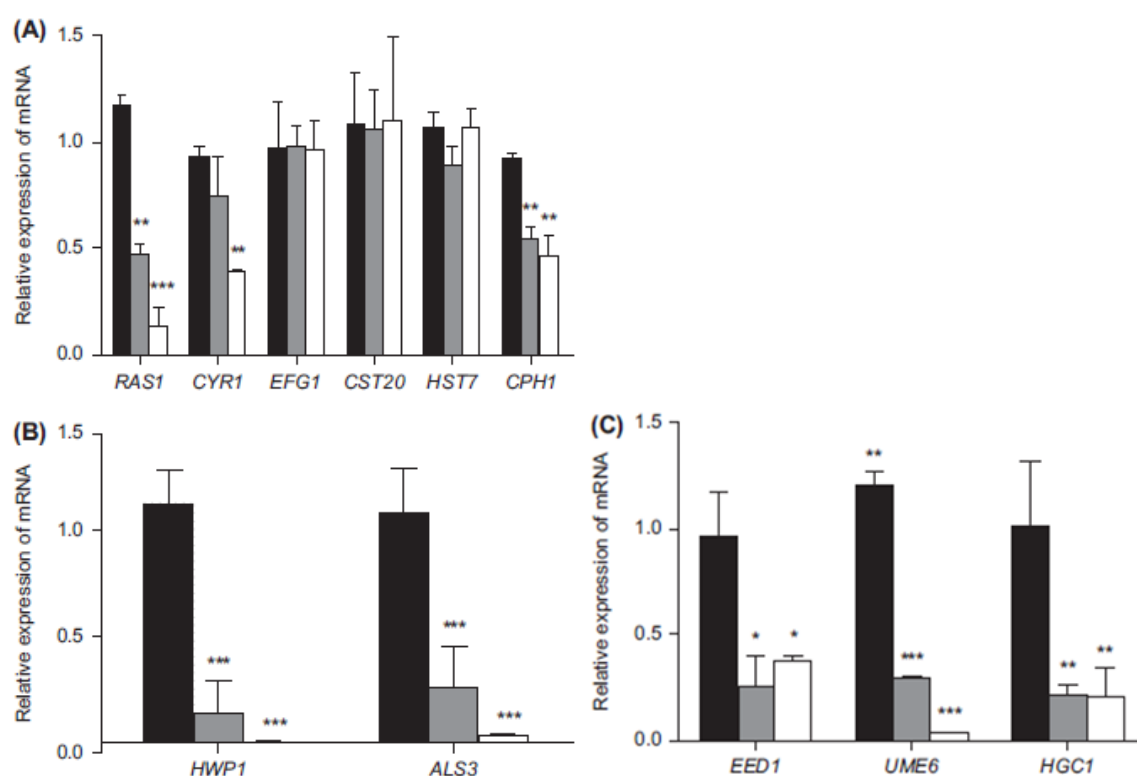


Figure 85 : expression relative des ARNm. Gènes impliqués dans les voies de signaux de transduction des gènes spécifiques des hyphes (A). Gènes d'adhésines de surface (B). Gènes impliqués dans la formation et la maintenance des hyphes (C). (■) 0,25 mM linalol ; (▒) 1 mM linalol ; (□) 4 mM linalol. (193)

Les résultats d'analyse d'une partie du transcriptome présentés sur la figure 85 permettent de mettre en évidence une répression importante des gènes d'adhésines de surface (HWP1 et ALS3) par le linalol à 0,25 et 0,5 mM de façon dose dépendante. Les gènes impliqués dans la formation et la maintenance des hyphes (EED1, UME6, HGC1) sont également réprimés de façon similaire. L'expression de ces catégories de gènes dépend en amont de voies de signalisation telles que la voie MAPK (RAS1, CST20, HST7 et CPH1) et la voie de la protéine kinase AMPc dépendante (RAS1, CYR1 et EFG1) qui sont globalement toutes les 2 réprimées par le linalol, surtout à 4 mM.

En somme ces résultats montrent que le linalol altère possiblement la formation de biofilm en réduisant le taux d'adhésines, en interférant avec la formation des hyphes par perturbation des voies PKA-AMPC et MAPK, et en perturbant la maintenance des hyphes.

Discussion :

Cette étude confirme le potentiel du linalol dans la lutte contre les biofilms de plusieurs espèces puisqu'il est actif vis-à-vis du biofilm d'*E. coli*, de *S. aureus* et comme nous venons de le voir de *C. albicans*. C'est finalement *C. albicans* qui semble être le plus sensible au linalol puisque 4 mM ($\approx 0,07\%$ v/v) permet d'inhiber totalement la formation du biofilm alors que chez *E. coli*, 0,15 % (v/v) ne permet d'inhiber que de 69 % sa formation. (165) De plus, 16 mM ($\approx 0,29\%$ v/v) permet d'inhiber 85 % du biofilm préétabli de *C. albicans*, alors que 0,48 % de linalol ne permet d'inhiber que 34 % du biofilm préformé par *S. aureus*. (184) Chez *C. albicans*, le linalol semble agir à de multiples niveaux, en inhibant d'une part l'expression de certaines adhésines ce qui prévient l'adhésion des levures, et également en inhibant la formation de tube germinatif via la perturbation des voies de signalisation MAPK et PKA-AMPC. En effet, l'emploi de levures mutées ne formant pas d'hyphes conduit à la formation de biofilms anormaux, fins, denses et facilement détachables de la surface. (195) L'inhibition de formation de tube germinatif est d'autant plus intéressante qu'en plus d'inhiber la formation de biofilm, ceci semble suffisant pour traiter les candidoses systémiques. (196) Par ailleurs, d'autres mécanismes d'actions existent puisque le linalol permet d'agir sur le biofilm préformé de *C. albicans*, et ceci avec des concentrations égales ou légèrement supérieures à la CMI puisque 2 CMI (0,28 % v/v) permet de diminuer de 85 % le biofilm existant. Certaines études vis-à-vis des cellules planctoniques ont montré que le linalol perturbait l'intégrité de la membrane cellulaire en altérant la production de l'ergostérol, ainsi qu'en perturbant les processus enzymatiques. (197). Quant à sa sécurité, le linalol est un composé généralement reconnu comme sûr par la FDA, (161) ainsi que par le comité d'expert sur les additifs alimentaires, (198) dont l'utilisation est largement répandue à travers le monde. Son utilisation à l'encontre de *C. albicans* est donc tout à fait envisageable.

2.5.2.2 Etude 2 : étude de l'effet de l'HE de tea tree aux CSI sur l'adhésion et la formation de biofilm par *C. albicans*. (175)

Détail de l'HE	L'HE de tea tree est composée principalement ici de terpinène-4-ol (42,4 %), de γ -terpinène (20,1 %), d' α -terpinène (9,0 %), de 1,8-cinéole (3,7 %), de terpinolène (3,2 %), de para-cymène (3,1 %) et d' α -terpineol (3,1 %).
Protocole	Cette étude porte sur 3 souches de référence de <i>C. albicans</i> : ATCC 10231, 90028, 90029 ainsi que sur 25 souches cliniques. 5 expérimentations ont été menées : Exp 1 : détermination des CMI Exp 2 : évaluation de la toxicité de l'HE vis-à-vis de cellules épithéliales humaines. Exp 3 : évaluation de l'effet de l'HE sur la formation de biofilm après 24h d'incubation à 35°C Exp 4 : évaluation de l'adhésion des levures en présence d'HE de tea tree sur le polystyrène et des cellules épithéliales après 90 minutes d'incubation Exp 5 : étude de l'hydrophobicité de surface en présence d'HE
Paramètres	Les auteurs ont déterminé les CMI à l'encontre des levures planctoniques par méthode de dilution en milieu liquide. Le test de cytotoxicité vise à déterminer les plus petites concentrations entraînant moins de 10 % de mort cellulaire vis-à-vis de cellules épithéliales buccales humaines, de cellules HeLa (cellules humaines d'adénocarcinome épithélial de col utérin) et A549 (cellules d'adénocarcinome épithélial de poumon humain). La formation et l'activité du biofilm a été mesurée par 2 méthodes colorimétriques : au cristal violet et en mesurant l'activité métabolique des cellules à l'intérieur avec les sels de tétrazolium. (153,194) L'adhésion des levures sur le polystyrène a été mesurée par méthode colorimétrique au cristal violet, l'adhésion sur les cellules épithéliales a été mesurée par cytométrie en flux à l'aide du colorant FUN1. L'étude de l'hydrophobicité de surface a également été mesurée par cytométrie en flux à l'aide de microsphère fluorescente de 0,8 μm.

Interprétation des résultats :

Les valeurs de CMI à l'encontre des levures planctoniques des 28 souches vont de 0,25 à 0,5 % (v/v d'HE de tea tree). Les CSI inférieures à 0,25 % sont alors analysées. Quant à la cytotoxicité vis-à-vis des cellules épithéliales humaines, les concentrations maximales d'HE de tea tree engendrant moins de 10 % de mort cellulaire sont de 0,031 % vis-à-vis des cellules épithéliales buccales, et de 0,062 % vis-à-vis des cellules HeLa et A549.

Tableau 6 : formation relative du biofilm par *C. albicans* en présence d'HE de tea tree quantifiée par la méthode au cristal violet (CV) ou aux sels de tétrazolium (XTT). (175)

Isolate	Stain	Relative biofilm formed in the presence of TTO (% v/v) at:					
		0	0.016	0.031	0.062	0.125	0.25
ATCC 10231	XTT	1.00 ± 0.00	0.47 ± 0.20*	0.39 ± 0.16*	0.22 ± 0.07*	0.06 ± 0.04*	0.03 ± 0.04*
	CV	1.00 ± 0.00	0.45 ± 0.09	0.60 ± 0.34	0.64 ± 0.97	0.27 ± 0.43	-0.04 ± 0.26†
ATCC 90028	XTT	1.00 ± 0.00	0.58 ± 0.27*	0.56 ± 0.20*	0.30 ± 0.10*	0.10 ± 0.07*	0.04 ± 0.02*
	CV	1.00 ± 0.00	0.63 ± 0.29	0.36 ± 0.14	0.35 ± 0.37	0.44 ± 0.78	0.03 ± 0.10*
ATCC 90029	XTT	1.00 ± 0.00	0.58 ± 0.13*	0.47 ± 0.14*	0.26 ± 0.13*	0.05 ± 0.03*	0.01 ± 0.02*
	CV	1.00 ± 0.00	0.60 ± 0.16	0.49 ± 0.26	0.31 ± 0.10†	0.04 ± 0.11*	-0.04 ± 0.18*
137442J	XTT	1.00 ± 0.00	0.50 ± 0.22*	0.23 ± 0.10*	0.08 ± 0.05*	0.03 ± 0.02*	0.09 ± 0.08*
	CV	1.00 ± 0.00	0.27 ± 0.13*	0.09 ± 0.04*	0.03 ± 0.01*	0.01 ± 0.01*	0.03 ± 0.02*
137645E	XTT	1.00 ± 0.00	0.87 ± 0.04	0.71 ± 0.16†	0.58 ± 0.18*	0.31 ± 0.05*	0.14 ± 0.14*
	CV	1.00 ± 0.00	0.89 ± 0.22	0.48 ± 0.15	0.45 ± 0.22	0.96 ± 0.97	0.25 ± 0.22
142457X	XTT	1.00 ± 0.00	0.94 ± 0.17	0.78 ± 0.18†	0.55 ± 0.11*	0.20 ± 0.08*	0.12 ± 0.05*
	CV	1.00 ± 0.00	0.75 ± 0.43	0.39 ± 0.09†	0.41 ± 0.19†	0.18 ± 0.07*	0.17 ± 0.29*
147168E	XTT	1.00 ± 0.00	0.62 ± 0.23†	0.60 ± 0.24†	0.37 ± 0.15*	0.12 ± 0.06*	0.05 ± 0.04*
	CV	1.00 ± 0.00	0.54 ± 0.27†	0.47 ± 0.24†	0.35 ± 0.13*	0.11 ± 0.08*	0.17 ± 0.33*
FF225	XTT	1.00 ± 0.00	0.53 ± 0.29†	0.32 ± 0.31*	0.15 ± 0.15*	0.05 ± 0.05*	0.14 ± 0.19*
	CV	1.00 ± 0.00	0.21 ± 0.10*	0.09 ± 0.09*	0.04 ± 0.04*	0.02 ± 0.01*	0.06 ± 0.08*
KE216	XTT	1.00 ± 0.00	0.63 ± 0.23†	0.48 ± 0.33†	0.35 ± 0.28*	0.13 ± 0.13*	0.08 ± 0.13*
	CV	1.00 ± 0.00	0.34 ± 0.20*	0.14 ± 0.09*	0.05 ± 0.02*	0.02 ± 0.01*	0.00 ± 0.01*
LL031	XTT	1.00 ± 0.00	0.67 ± 0.21	0.63 ± 0.25†	0.52 ± 0.29†	0.21 ± 0.22*	0.05 ± 0.07*
	CV	1.00 ± 0.00	0.64 ± 0.40†	0.54 ± 0.18†	0.40 ± 0.08*	0.15 ± 0.09*	0.02 ± 0.05*

D'après les résultats du tableau 6, nous pouvons voir que la formation de biofilm est affectée par l'HE de tea tree chez toutes les souches testées à au moins une CSI. Lorsque la quantification par la méthode des sels de tétrazolium est utilisée, 70 % des souches testées forment moins de biofilm en présence de la plus petite concentration testée (0,016 %), et 100 % des souches produisent moins de biofilm en présence de 0,031 % d'HE de tea tree (22 à 77 % d'inhibition). En utilisant la méthode au Cristal Violet, seulement 50 % des souches forment moins de biofilm en présence de 0,016 % de tea tree, et à 0,25 % de tea tree, la formation de biofilm chez toutes les souches n'est pas diminuée de façon significative.

Tableau 7 : adhésion relative de *C. albicans* au polystyrène en présence d'HE de tea tree quantifié par le cristal violet. (175)

Isolate	Relative adhesion ^a in the presence of TTO (% v/v) at:						
	0	0.008	0.016	0.031	0.062	0.125	0.25
ATCC 10231	1.00 ± 0.00	0.66 ± 0.22†	0.67 ± 0.09†	0.54 ± 0.16*	0.46 ± 0.20*	0.33 ± 0.14*	0.28 ± 0.11*
4047	1.00 ± 0.00	0.79 ± 0.25	0.78 ± 0.28	0.82 ± 0.29	0.67 ± 0.28	0.56 ± 0.32	0.43 ± 0.27†
137548L	1.00 ± 0.00	0.83 ± 0.23	0.72 ± 0.26	0.54 ± 0.23†	0.35 ± 0.12*	0.24 ± 0.10*	0.27 ± 0.15*
142455R	1.00 ± 0.00	0.95 ± 0.02	0.85 ± 0.21	0.75 ± 0.12	0.61 ± 0.16†	0.34 ± 0.09*	0.29 ± 0.14*
142629J	1.00 ± 0.00	0.92 ± 0.34	0.79 ± 0.30	0.67 ± 0.26	0.43 ± 0.23†	0.39 ± 0.20†	0.41 ± 0.33†
142636J	1.00 ± 0.00	0.95 ± 0.26	0.86 ± 0.30	0.61 ± 0.30	0.41 ± 0.24†	0.27 ± 0.20*	0.39 ± 0.30*
147131G	1.00 ± 0.00	1.02 ± 0.28	0.89 ± 0.36	0.55 ± 0.17†	0.51 ± 0.16†	0.41 ± 0.14†	0.46 ± 0.22†

Les résultats du tableau 7 montrent que l'adhésion sur polystyrène de toutes les souches testées est inhibée en partie en présence de 0,25 % de tea tree (54 à 73 % d'inhibition) et 6 souches sur 7 exercent moins d'adhérence en présence de 0,062 et 0,125 % d'HE de tea tree (44 à 76 % d'inhibition).

L'inhibition de l'adhésion sur les cellules humaines est plus mitigée. L'HE de tea tree permet de diminuer de 44 % l'adhésion de la souche de référence ATCC 10231 sur les cellules épithéliales buccales en présence de 0,016 % de tea tree mais une concentration 4 fois supérieure est nécessaire pour observer une diminution d'adhésion sur les cellules HeLa (73 % d'inhibition), et aucune inhibition d'adhésion n'a lieu sur les cellules A549. Vis-à-vis des 2 souches cliniques testées (4047 et 137548L), à 0,016 % l'HE de tea tree ne permet de diminuer significativement que de 25 % l'adhésion d'une des deux souches, la diminution de l'autre souche n'étant pas significative. Les auteurs ont également testé l'effet de l'HE de tea tree pendant 90 minutes sur des levures pré adhérentes pendant 1h sur les cellules HeLa. Là encore, à 0,062 % l'HE de tea tree engendre une diminution de l'adhésion de *C. albicans* (45 % d'inhibition). (Données non présentées)

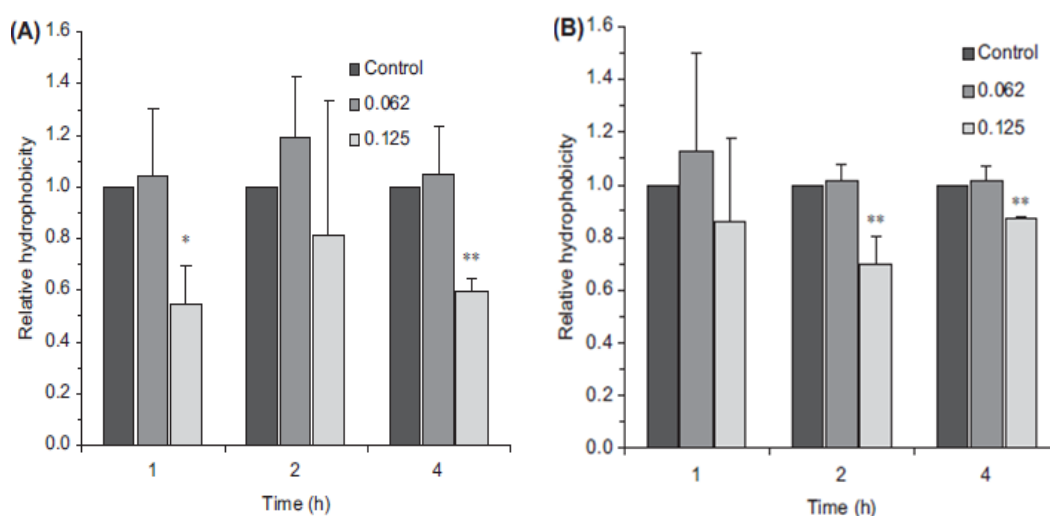


Figure 86 : hydrophobicité relative de surface après différents temps de contact en présence d'HE de tea tree. (A) *C. albicans* ATCC 10231 ; (B) *C. albicans* 137548L. (175)

Les résultats présentés sur la figure 86 montrent qu'après 4 h d'incubation une diminution de l'hydrophobicité de surface chez les 2 souches testées uniquement en présence de 0,125 % d'HE de tea tree. La diminution d'hydrophobicité de surface survient dès une heure d'incubation chez *C. albicans* ATCC 10231 (Fig. 90, A) mais la différence n'est pas significative après 2h. En revanche la différence est significative après 2h d'incubation chez *C. albicans* 137548L.

Discussion :

D'après cette étude qui met en avant des résultats quelque peu différents selon les souches testées, nous pouvons dire que le tea tree en plus de son action sur le biofilm des bactéries (163) agit sur celui de *C. albicans* en diminuant la formation de biofilm, en réduisant l'adhésion à la fois sur polystyrène et sur cellules épithéliales ainsi qu'en diminuant l'hydrophobicité de surface, tout cela avec des concentrations bien inférieures aux CMI. L'adhésion est médiée par des processus non spécifiques (telle que l'hydrophobicité de surface, les forces de Van der Waals) ou spécifiques (telles que les interactions récepteur ligand). (199) Le fait que la diminution d'hydrophobicité de surface ne survienne qu'en présence des plus hautes concentrations d'HE de tea tree alors que l'inhibition d'adhésion survient à des concentrations bien plus faibles, signifie que la diminution de l'hydrophobicité ne joue qu'un rôle mineur, et que d'autres facteurs interviennent avec notamment l'inhibition de certaines adhésines ou encore la formation de tube germinatif comme c'est le cas avec le linalol. (193) En effet d'autres études ont montré 100 % d'inhibition de formation du tube germinatif en présence de 0,125 % d'HE de tea tree. (200)

Cette étude met, en revanche, en avant les différences de mesure du biofilm que l'on peut avoir selon la technique utilisée. En effet l'emploi des sels de tétrazolium se base sur l'activité métabolique du biofilm, mais comme nous l'avons vu précédemment, de nombreuses cellules adoptent un état de dormance au sein du biofilm au fur et à mesure que le biofilm vieillit et expriment donc une activité métabolique réduite ce qui peut conduire à une sous estimation de la quantité de biofilm. La méthode au cristal violet, elle, se fait par l'adsorption passive du cristal violet sur les cellules métaboliquement actives ou non et sur la MEC. Selon les études, ces 2 méthodes ne sont pas toujours bien corrélées.

Enfin, bien que l'utilisation d'HE de tea tree en concentration inférieure ou égale à 0,031 % semble sûre, peu d'études se penchent sur la toxicité de l'HE de tea tree, les données actuelles sont néanmoins rassurantes à faibles doses. (200)

2.5.2.3 Etude 3 : étude de l'hinokitiol vis-à-vis de la formation de biofilm par des souches de *C. albicans* résistantes ou non au fluconazole. (201)

Détail du composé	L'hinokitiol, aussi connu sous le nom de β -thujaplicine est un composé aromatique dont le noyau contient 7 atomes de carbone. Cette molécule est retrouvée dans l'HE de certaines espèces de la famille des <i>Cupressaceae</i> dont le cyprès du Japon (<i>Chamaecyparis obtusa</i>).
Protocole	3 souches de <i>C. albicans</i> ont été utilisées : ATCC 90028, 90029 dont une souche résistante au fluconazole KCMF 20017. 4 expérimentations distinctes ont été menées : Exp 1 : Détermination de la CMI de l'hinokitiol Exp 2 : Effet de l'hinokitiol à 37°C pendant 24h sur la formation de biofilm ainsi que sur des biofilms préformés depuis 24h et visualisation au MEB. Exp 3 : évaluation de la cytotoxicité vis-à-vis de cellules souches de moelle osseuse humaine. Exp 4 : étude de la variation d'expression de certains gènes en présence d'hinokitiol
Paramètres	La CMI a été déterminée par dilution en milieu liquide sur microplaque, elle est définie comme la plus petite concentration d'hinokitiol diminuant de minimum 50 % l'absorbance comparée au contrôle. La formation du biofilm a été mesurée par méthode colorimétrique aux sels de tétrazolium. (194) LA CMI du biofilm correspond à la plus petite concentration inhibant au minimum 50 % de l'activité métabolique. La viabilité des cellules souches a également été étudiée via la réduction des sels de tétrazolium. (157) La variation d'expression génique a été mesurée par RT-PCR en temps réel sur les ARNm.

Interprétation des résultats :

La CMI déduite de l'hinokitiol envers les formes planctoniques de *C. albicans* (ATCC 90028) est de 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Elle est comparable à la CMI du fluconazole (2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Les auteurs ont également testé les CMI de 8 autres terpènes qui possèdent une activité 120 à

2000 fois plus faible que l'hinokitiol (thymol, géraniol, citral, carvacrol, menthol, eugénol, linalol et camphre selon leur action décroissante).

Concernant le biofilm, la concentration à $3,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'hinokitiol permet d'inhiber chez les 3 souches de *Candida albicans* plus de 50 % de l'activité métabolique du biofilm en croissance. Selon l'auteur cette valeur correspond donc à la CMI d'inhibition de la formation du biofilm. Vis-à-vis des biofilms préformés, des concentrations bien supérieures sont nécessaires pour obtenir le même effet : en effet il faut $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ d'hinokitiol pour inhiber l'activité métabolique de plus de 50 % du biofilm préformé depuis 24 h de *C. albicans* KCMF 20017, et $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les deux autres souches, soit 65 et 130 fois plus d'hinokitiol respectivement.

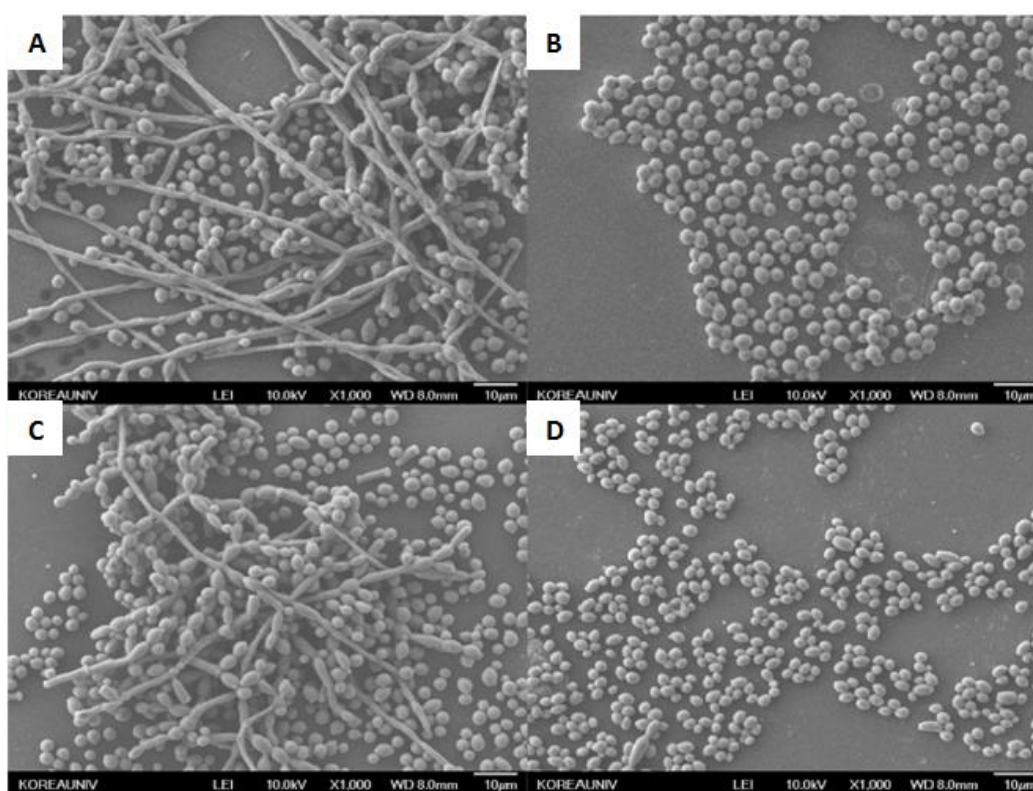


Figure 87 : images au MEB x500. Formation de biofilm en l'absence d'hinokitiol (A/C) et en présence d'hinokitiol à $3,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (B/D) chez *C. albicans* sensible au fluconazole (A/B) ou résistant au fluconazole (C/D). (201)

L'observation microscopique présentée sur la figure 87 confirme les données obtenues avec les sels de tétrazolium. En effet en l'absence d'hinokitiol, *C. albicans* forme un biofilm tridimensionnel composé de plusieurs couches de levures, dont un certain nombre filamentent. L'hinokitiol a pour effet après 24 h d'incubation, d'inhiber totalement la formation de filaments, le biofilm étant constitué d'une monocouche de levures relativement dispersées.

Aucune différence de sensibilité n'est constatée entre les souches résistantes ou sensibles au fluconazole.

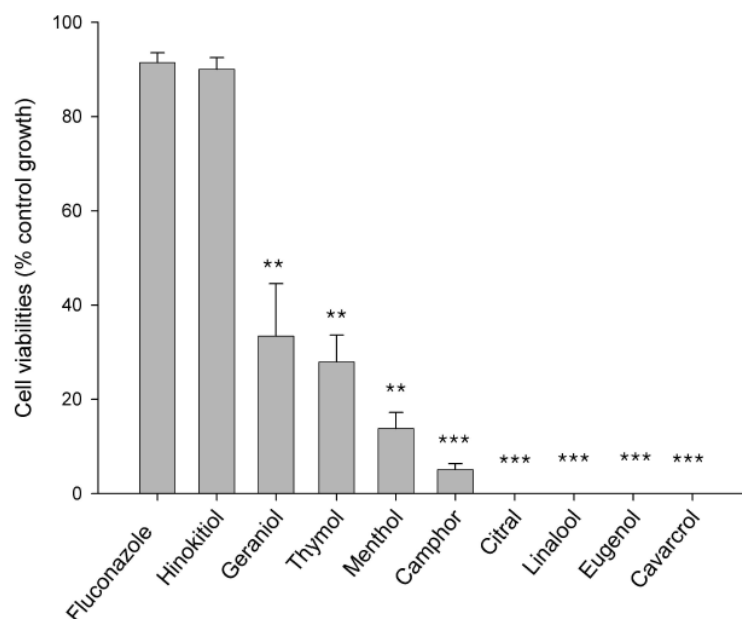


Figure 88 : Effet de l'hinokitiol, du fluconazole et des 8 terpènes sur la viabilité des cellules souches humaines après 48 h d'incubation de ces dernières en présence d'une concentration égale à la CMI de chacun des composés sur les levures planctoniques. (201)

Le test de cytotoxicité présenté sur la figure 88 montre que l'hinokitiol (à $1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$), au même titre que le fluconazole ($2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) possède une faible activité cytotoxique puisqu'ils entraînent à peine 10 % de perte de viabilité des cellules souches alors que tous les terpènes entraînent au minimum 67 % de mort cellulaire.

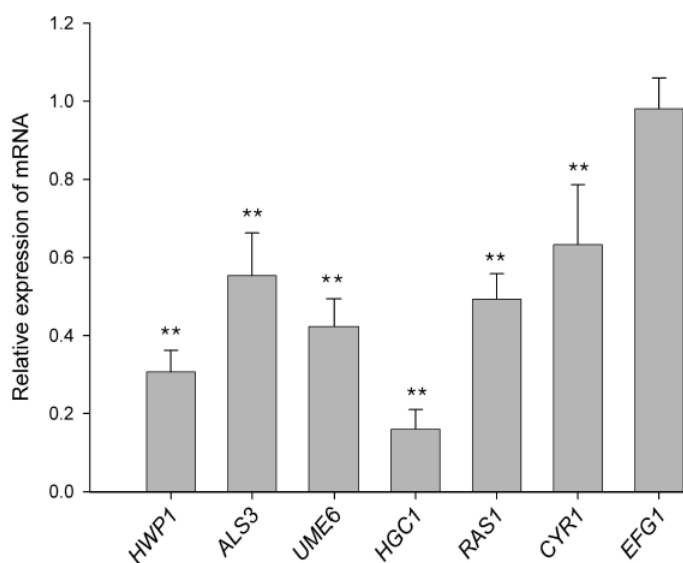


Figure 89 : effet de l'hinokitiol à $0,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ sur l'expression de gènes associés à la formation d'hyphes chez *C. albicans*. (201)

D'après les résultats exposés sur la figure 89, l'inhibition de formation du biofilm pourrait en partie être due à l'inhibition de l'adhésion (*HWP1* et *ALS3* codant pour des adhésines de surface), de la formation d'hyphes et de leur maintenance (*UME6* et *HGC1*), et également de la voie de la protéine kinase AMPc dépendante, même si *EFG1* n'est pas affecté, ses régulateurs en amont (*RAS1* et *CYR1*) sont sous exprimés.

Discussion :

Cette étude met en avant l'hinokitiol, un composé relativement peu connu. D'après son mode d'action étudié ici, il semble posséder des mécanismes d'actions communs avec le linalol. (193) Si l'hinokitiol est en revanche capable d'inhiber la formation du biofilm de *C. albicans* à de très faibles concentrations : $3,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (environ 0,00027 %), les concentrations nécessaires pour inhiber plus de 50 % d'un biofilm préformé sont 65 à 130 fois plus élevées, alors que le linalol est capable d'inhiber 85 % d'un biofilm préformé avec seulement des concentrations 4 à 5 fois plus élevées par rapport à sa propre CMI. (193) Cela reste valable également lorsque le linalol est étudié chez les bactéries où à 2 CMI, il est capable d'inhiber 35 % de biofilm préformé de *S. aureus*. (184) Plus généralement, les HE et leurs composés ont tendance à être actifs sur les biofilms préformés avec des concentrations supérieures aux CMI des cellules planctoniques certes, mais plutôt 2 à 5 fois supérieure que 65 à 130 fois plus. (143) Si l'hinokitiol semble sûr à de très faibles concentrations, il n'est pas assuré que des concentrations 130 fois plus élevées, nécessaires pour inhiber des biofilms préformés, soient dénuées de toxicité. Ainsi l'hinokitiol semble intéressant dans la lutte contre les biofilms mais son intérêt serait davantage porté sur la prévention de la formation de biofilm de *C. albicans*.

2.6 Discussion de l'ensemble des résultats :

L'ensemble des résultats de ces études mettent en avant le potentiel que possèdent les HE ainsi que leurs composés principaux dans la lutte contre les biofilms, là où certains antibiotiques classiques sont totalement inefficaces à l'encontre de ce mode de vie. (202) Bien que cela ne représente qu'un faible échantillonnage en termes d'HE, de composés et d'espèces testés, les résultats sont très prometteurs. A la différence des antibiotiques, et lorsqu'ils sont étudiés, les mécanismes d'actions des HE envers les biofilms sont multiples et variés :

- Modification de l'hydrophobicité de surface des germes.
- Diminution de l'adhérence par inhibition compétitive des pili.
- Inhibition de la formation et de la maintenance de tube germinatif chez *C. albicans*
- Altération non spécifique des bicouches lipidiques.
- Répression de l'expression de certains gènes et diminution de synthèse de protéines, de polysaccharides, d'ATP, du biofilm en général etc...
- Inhibition compétitives d'enzymes, de régulateurs transcriptionnels...
- Inhibition de sécrétion d'enzymes extracellulaires
- Inhibition de voies de communication intra-cellulaires (MAPK, protéine kinase AMPc...)
- Perturbation du QS.
- ...

Plusieurs nuances sont cependant à apporter. Tout d'abord, les HE sont des solutions très complexes, avec parfois plusieurs centaines de composés, (140) qui varient fortement en proportions selon la partie de la plante utilisée, son stade de développement, le biotope sur lequel la plante s'est développée, l'ensoleillement, son génome, etc... ce qui peut en partie expliquer des résultats parfois disparates entre certaines études, bien que les protocoles expérimentaux puissent également en être la cause. (163) De plus, les résultats peuvent être contradictoires selon les souches d'une même espèce. (149,203) Il est parfois observé un effet paradoxal d'induction de formation de biofilm chez certaines souches. C'est le cas du TC chez certaines souches de *S. aureus* (ATCC 6538 ainsi que 2 souches cliniques) ou encore de l'alpha-pinène, de l'acétate de géranyl, du limonène, du 1,8-cinéol et du linalol à l'encontre de *L. monocytogenes* ATCC 19111, même si cela reste relativement peu fréquent. (170,204)

L'activité des HE quant à elle, est multi-factorielle. En effet, les propriétés antimicrobiennes de nombreux terpènes vis-à-vis des formes planctoniques semblent dépendre non seulement de leurs caractéristiques moléculaires (réalisation de liaisons hydrogènes par exemple), mais aussi de leur poids moléculaire, ainsi que de l'espèce ciblée (notamment à Gram positif ou négatif). (143)

De telle sorte, les molécules de petite taille capable de donner ou accepter des doublets d'électrons impliqués dans des liaisons hydrogène semblent plus aptes à inhiber les bactéries à Gram négatif, la membrane externe de ces bactéries expliquant en partie cela. (143)

Concernant les bactéries à Gram positif, le facteur le plus important étant probablement la capacité des molécules à être donneuses de liaisons hydrogène, bien plus que la taille moléculaire. Néanmoins, la capacité à accepter des liaisons hydrogènes, la proportion de substituants hydrophobes ainsi que la polarité sont également importants. (143) En réalité, selon Nazzaro et son équipe, l'activité antimicrobienne des HE est strictement corrélée à leur structure. (149) En effet, le simple fait de remplacer la fonction phénol du carvacrol par une fonction amine (ce qui correspond en fait au 2-amino-p-cymène) entraîne une activité antimicrobienne 3 fois inférieure par rapport au carvacrol. (205) De plus, l'emplacement des fonctions est également important, le thymol et le carvacrol, analogues structuraux dont seul l'emplacement de la fonction phénol diffère, possèdent des propriétés antimicrobiennes similaires, mais des mécanismes d'action différents à l'encontre des bactéries. (149) Des principes semblables existent probablement pour l'activité anti-biofilm des HE. Il est quasiment impossible de généraliser l'action des HE selon leur classe chimique, même si tout de même, certaines familles de molécules sont comme vis-à-vis des cellules planctoniques plus actives à l'encontre des biofilms. Les molécules contenant un groupement hydroxyle semblent en effet posséder de meilleures propriétés anti-biofilm. (206) Les phénols sont généralement les plus actifs, suivis par les aldéhydes, les cétones, les alcools, les éthers et enfin les terpènes aliphatiques, avec des variations d'action au sein des familles. (143,202,207–210) Néanmoins, l'ajout par exemple au camphre d'une deuxième fonction cétone ou d'une fonction acide sulfonique entraîne une diminution de l'activité anti-biofilm. (206) Les groupements fonctionnels ne suffisent donc pas à eux seuls à expliquer l'activité anti-biofilm. Le coefficient de partage eau / octanol semble également important, en effet il faut que le logarithme décimal de ce dernier ne soit pas trop élevé pour que les molécules parviennent à traverser la MEC hydrophile, mais qu'il soit suffisamment élevé ($\log P > 3$) pour aller perturber les membranes cellulaires. (211) Cependant il existe un nombre important de contre exemples. Il n'y a tout d'abord pas nécessairement de lien de corrélation entre

l'activité antimicrobienne d'une HE et son activité anti-biofilm. En effet, l'HE de marjolaine à coquille, bien que possédant une CMI à 0,05 % à l'encontre de la forme planctonique d'*E. coli* (relativement faible donc), n'est aucunement capable d'inhiber la formation de son biofilm à la concentration CMI/2. (165) Inversement, l'HE de cèdre du Liban à 0,1 % ne possède aucune propriété bactéricide contre les cellules planctoniques de *C. albicans* mais est capable à cette même concentration d'inhiber presque totalement la formation du biofilm fongique. (206) Pareillement, d'autres HE dotées de propriétés bactéricides à l'encontre des cellules planctoniques, ne sont nullement capables d'altérer la formation de biofilms, mais peuvent en revanche agir de façon importante à l'encontre de biofilms préformés. (143,165) Le carvacrol également, est capable d'inhiber la formation du biofilm d'*E. coli* et de *S. aureus* mais pas celui de *P. aeruginosa* (l'hypothèse étant que *P. aeruginosa* est capable de modifier la composition de sa membrane externe, expliquant sa faible sensibilité à de nombreuses molécules). (212,213)

Généralement, les HE semblent plus actives à l'encontre des formes planctoniques des bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. Ceci est en partie dû à la présence chez les bactéries à Gram négatif d'une membrane externe complexe, rigide et riche en lipopolysaccharides qui limite la diffusion des composés hydrophobes. Les bactéries à Gram positif, dépourvues de cette membrane externe, possèdent tout de même une enveloppe épaisse de peptidoglycane, mais qui n'est cependant pas assez dense pour résister aux petites molécules antimicrobiennes. (149,205,214) De plus les acides teichoïques et lipoteichoïques ancrés dans la couche de peptidoglycane des bactéries à Gram positif semblent faciliter la pénétration des composés hydrophobes. (205) Néanmoins, cette différence de sensibilité semble être moins évidente vis-à-vis des formes sessiles des bactéries. (143,163,166,214) Quant au biofilm de *C. albicans*, il est difficile de comparer sa susceptibilité aux HE par rapport aux bactéries car aucune étude ne semble apparemment réaliser cette comparaison. Néanmoins lorsque l'on compare les concentrations en HE ou en composés individuels efficaces entre les études, il semblerait que l'effet anti-biofilm ait plutôt tendance à être davantage marqué vis-à-vis de *C. albicans* (163,175,188,213,215). Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de valider cette hypothèse car de nombreux contre exemples semblent également être présents. (143,202,216)

Ensuite, il est davantage observé au travers des études que l'éradication de biofilms matures bactériens ou fongiques est beaucoup plus difficile à obtenir que l'inhibition de leur croissance et de leur développement, elle-même plus difficile à obtenir que l'adhérence initiale des cellules sur le substrat. Autrement dit, plus on agit tôt dans la formation d'un

biofilm, moins les concentrations en HE à utiliser sont élevées. (143,204,207,209) De façon intéressante, de nombreuses études montrent une efficacité importante de certaines HE ou composés individuels à propos de l'inhibition de formation de biofilm, et ceci lors d'utilisation de CSI, ce qui permet l'utilisation de concentrations très faibles, dont la toxicité aiguë est par voie de conséquence fortement diminuée. (85,181,193,217,218) Pareillement, la formation du tube germinatif chez *C. albicans*, nécessaire à la formation d'un biofilm solide, est généralement inhibée par des HE testées à leur CSI. (219,220) En général, le brouillage du QS quand il a lieu, se produit également lors de l'utilisation de CSI, (221,222) les mécanismes d'actions de perturbation du QS sont cependant à ce jour encore très peu élucidés, certaines HE contiennent néanmoins des auto-inducteurs, tel que le farnésol (un alcool sesquiterpénique), ou encore le nérolidol, un analogue structural du farnésol capable de perturber les phénomènes de QS. (222)

D'autre part, là où les antibiotiques classiques doivent être 100 à 1000 fois plus concentrés pour agir sur des biofilms matures, de nombreux auteurs ont montré que seules des concentrations légèrement supérieures en HE étaient nécessaires pour agir contre les biofilms. (166,188,193,202,210,214) Cela peut s'expliquer par le fait que de nombreux composés sont dotés de propriétés amphiphiles, avec un certain degré d'hydrophilie leur permettant de traverser la MEC polysaccharidiques hydrophile, tels que le thymol, le carvacrol, le menthol, l'eucalyptol... (211,223) L'action des HE également ne semble pas ou très peu être affectée par des résistances éventuelles à certains antibiotiques que ce soit chez les SARM, (181,210,224) ou chez *C. albicans*. (201,225)

Par ailleurs, bien qu'un certain nombre d'études mettent en avant l'existence de phénomènes de synergie entre composés isolés d'une part, tels que l'eugénol et le carvacrol, (181) mais aussi au sein de l'ensemble des constituants des HE d'autre part, (147,163,222) la généralisation semble impossible car les résultats diffèrent et sont au cas par cas selon les HE et les espèces ciblées, (165,207) même si la balance optimale entre les composés individuels des HE semble améliorer l'efficacité. (226) Un autre point source de variabilité est dû à l'influence de la surface sur laquelle se forme le biofilm. Certaines études ont montré qu'il fallait multiplier par 4 à 8 la concentration en HE pour obtenir le même effet sur un biofilm formé selon le type de surface. (166) Cela pose problème en pratique en santé compte tenu du nombre de substrats différents qui peuvent exister (tissu vivant, polymères divers et variés etc...)

Enfin, des biais lors des études sont susceptibles d'influencer les résultats précédents. Premièrement, à cause de la faible solubilité des HE dans les phases aqueuses, la plupart des études utilisent un tensioactif (du tween 80 souvent) afin d'augmenter leur dispersion. Or Nielsen et son équipe ont montré que l'utilisation de tween 80 à 0,5 % (classiquement retrouvé dans les autres études) diminuait considérablement l'activité de l'isoeugénol à l'encontre de biofilms préformés de plusieurs germes (*P. fluorescens*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*...) par rapport à l'utilisation d'isoeugénol seul. (214) L'hypothèse serait qu'en augmentant la solubilité de l'HE, le tensioactif diminuerait la pénétration transmembranaire. Le tensioactif pourrait également augmenter l'hydrophilie des protéines de surface des germes, rendant moins favorable les interactions avec les HE ou leurs composés. Cette notion nécessiterait donc de reconsidérer l'utilisation de tensioactif dans les études afin de savoir si c'est un cas isolé ou non, même si par conséquent, les HE testées seraient encore plus puissantes que ce qui a été montré. Un autre biais important est l'absence de prise en compte de la dynamique et de la cyclicité des biofilms. Bien souvent les études étudient l'impact sur les biofilms à deux instants distincts au début et à la fin de l'expérimentation. Or certains auteurs ont montré que les résultats pouvaient être différents selon l'intervalle de temps devant lequel nous nous situons. (210) Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, lorsque la quantification du biofilm est réalisée par la méthode cristal violet, ou bien par la mesure de l'activité métabolique avec les sels de tétrazolium, les résultats sont parfois différents. (143,175,227) Ceci est en partie dû à la diminution d'activité métabolique des cellules persistantes qui apparaissent avec le vieillissement du biofilm. Ainsi, ces 2 méthodes auraient plutôt tendance à être complémentaires qu'interchangeables. (215,228) Enfin, il n'existe pas à ce jour de méthode unique et standardisée pour l'étude de susceptibilité des biofilms vis-à-vis de molécules, et encore moins d'interprétation univoque des résultats, les résultats des multiples études sont par conséquent difficiles à comparer. (211)

Finalement, tous ces facteurs de variation d'efficacité montrent que l'effet anti-biofilm est propre à chaque espèce voire souche bactérienne ou fongique ainsi qu'à chaque HE ou composé ce qui ne permet pas vraiment de généraliser l'action des HE contre les biofilms et nécessite encore de nombreuses recherches. Une standardisation des protocoles d'étude ainsi que des HE serait appréciable afin de minimiser les variations de leurs propriétés biologiques. (229)

2.7 Les HE contre les cystites récidivantes

Au cours de leur vie, c'est près de 50 % des femmes qui sont affectées au moins une fois par une cystite aiguë, dont *E. coli* est la principale responsable à hauteur de 85 % des cas. (230) Après un premier épisode aigu, environ 25 % d'entre elles sont victimes de récurrence dans les 6 mois, et 44 % dans les 12 mois suivant l'épisode. (231) Ces cystites récidivantes sont considérées soit comme une ré-infection si la seconde souche infectieuse diffère de la première, ou bien comme une rechute si c'est la même souche qui est responsable des récurrences. (232,233) Ces dernières altèrent la qualité de vie et causent des dépenses de santé supplémentaires. L'importance des biofilms d'*E. coli* dans la récurrence des cystites a été mise en évidence dans plusieurs études. En effet, selon Soto et son équipe, 74 % des rechutes et 42 % des ré-infections impliquent des souches d'*E. coli* formant in vitro des biofilms. (232) Il a de plus été observé que certaines souches d'*E. coli* étaient capables d'envahir les cellules uro-épithéliales et de former des biofilms intra-cellulaires. (231)

Ainsi, le diagnostic de cystite récidivante est posé lorsqu'il survient plus de 3 crises annuelles. Leur prise en charge n'est pas toujours facile et repose, en plus des recommandations générales (boire abondamment, ne pas retenir ses mictions, traiter les troubles digestifs, uriner après un rapport sexuel, s'essuyer d'avant en arrière après la selle...), sur une antibioprophylaxie suppressive prolongée sur plusieurs mois. (234) Cependant, une méta-analyse a montré que si les récurrences sont diminuées de 85 % lors d'une antibioprophylaxie de minimum 6 mois, les effets secondaires quant à eux sont majorés de 58 % (candidose buccale ou vaginale, nausées, éruptions cutanées...), (235) sans parler du risque d'apparition de résistances aux antibiotiques.

Les HE grâce à leurs propriétés anti-biofilm semblent présenter un intérêt certain pour lutter contre les cystites récidivantes. Il est possible de proposer aux patientes adultes qui le souhaitent et qui sont sujettes aux cystites à répétition, une association d'HE à but préventif comme la suivante :

- HE de feuille de Cannelle de chine (*Cinnamomum cassia*)
- HE (= essence) de Citron jaune (*Citrus limon*)
- HE de lavande vraie (*Lavandula angustifolia*)

Diluer une goutte de chaque HE dans une cuillère à café (5 mL) d'huile végétale et prendre ce mélange 3 fois par jours et cela 2 jours consécutifs par semaine ou 8 jours consécutifs par

mois, et garder si possible en bouche pendant 1 minute afin de favoriser l'absorption par la muqueuse buccale et d'éviter l'effet de premier passage hépatique.

Si l'on estime que les gouttes flacon font 40 mg, la dose totale d'HE par jour représente donc 360 mg. La posologie maximum par voie orale étant de 10 mg/kg, (140) cette formule convient à toutes les femmes puisque le poids minimum doit être de 36 Kg. Le fait de prendre les HE 2 jours consécutifs par semaine ou 8 jours consécutifs par mois est recommandé par certains aromathérapeutes, (236) mais d'autres protocoles existent. Il est cependant très important de respecter des fenêtres thérapeutiques afin de ne pas surcharger l'organisme au risque d'entraîner une toxicité. (237)

Pourquoi cette association ? Tout d'abord, la cannelle de chine (167,238), le citron (165,239), la lavande fine (166,240) ainsi que leurs composés principaux le trans-cinnamaldéhyde (143,158,159,238), le limonène (165) et le linalol (165) possèdent tous des propriétés anti-biofilms à l'encontre d'*E. coli* qui sont présentées dans le tableau 8 en annexe. L'HE de cannelle de chine reste l'HE phare de par son importante activité à l'encontre de la formation des biofilms ainsi qu'envers les biofilms préformés. C'est le cinnamaldéhyde, présent à plus de 80 % dans l'HE qui est en partie responsable de son activité, certains de ses mécanismes d'action ayant été résolus (inhibition de synthèse d'adhésines, brouillage du QS, effet bactéricide...) (158–160,238) Ceci explique que nous nous penchons plutôt en faveur de l'emploi de la cannelle de chine plutôt que la cannelle de ceylan à cause d'une concentration plus faible en cinnamaldéhyde de cette dernière. (140) Par ailleurs, le fait d'associer une autre HE de composition différente peut augmenter l'effet de la cannelle. Pour cela, la lavande vraie semble adaptée car elle est riche en alcools monoterpéniques (40 %) et en esters (50 %), (140) cette HE étant d'autant plus, très sûre d'utilisation. Enfin, il est important de rester prudent, et le fait d'associer du citron semble intéressant pour limiter une éventuelle toxicité hépatique liée à la cannelle de chine au long cours, même si cette toxicité survient principalement lors de l'utilisation de fortes doses sur une longue période. (237,241) De plus, l'exposition solaire les jours de prise de la formule doit être évitée afin de ne pas induire de photosensibilisation par l'HE de citron.

Pour conclure, cette proposition de formule ne repose que sur des preuves d'efficacité in vitro, aucune étude in vivo sur l'Homme à ce propos n'existe. D'autres HE pourraient être largement proposées, tout comme l'emploi de la voie cutanée. Il faut néanmoins prendre garde aux précautions d'emploi éventuelles (dermocausticité, photosensibilisation...). J'ai choisi la cannelle car son efficacité est importante et ses mécanismes d'action sont plutôt bien

étudiés. Nous pourrions aussi utiliser l'HE d'ail mais son emploi est quasiment impossible à cause de l'odeur, et son efficacité moins puissante (85,140) Les HE à phénol possèdent également un intérêt tout aussi certain à l'encontre des biofilms d'*E. coli*. Pour terminer, les patientes doivent être informées sur les signes de pyélonéphrite (fièvre supérieure à 38,5, douleur lombaire souvent unilatérale, malaise général, signes de cystite associés...) imposant une consultation médicale en urgence.

2.8 Etude de l'hypothèse de résistance aux HE

L'utilisation des HE est constamment en progression de par leur effet de mode via leurs propriétés dites « naturelles » et, comme nous l'avons vu tout au long des résultats précédemment abordés, elles constituent une approche prometteuse dans la lutte anti-biofilm. Là où la résistance des formes planctoniques des agents infectieux aux antibiotiques n'est plus à démontrer, il est tout à fait logique de s'interroger quant à l'acquisition de résistances éventuelles aux HE. Je tiens à préciser que ce que nous allons aborder à propos de la résistance aux HE ne concerne pas uniquement les biofilms, mais également les agents infectieux sous leur forme planctonique. Cependant ce sujet est relativement difficile à aborder compte tenu du faible nombre d'études à ce propos.

Tout d'abord, le mécanisme d'action principal des HE passe par l'altération des membranes lipidiques. Or il est difficile d'envisager la possibilité qu'une ou plusieurs mutations génétiques puissent entraîner une imperméabilisation des membranes aux HE tout en permettant un fonctionnement cellulaire normal, en effet, toute mutation entraînant des modifications des membranes conférant une résistance aux HE induit un impact négatif sur la survie et la croissance microbienne. (242) D'autre part, il est largement répandu l'idée que, du fait de la complexité de composition des HE et donc de leur multiples modes d'action, il est très peu probable que les bactéries ou champignons puissent développer de résistances à ces HE. (243) En effet, il ne faut pas oublier le but primaire des HE des plantes aromatiques qu'est la lutte contre les infections microbiennes via la production de métabolites secondaires, dont l'évolution s'est faite sur plusieurs millions d'années. (244) D'autre part, si la variabilité des HE pose problème notamment lors de l'étude de leurs propriétés biologiques, cela peut en revanche devenir un avantage en limitant l'apparition de résistances à grâce à la variabilité de composition de l'HE selon son origine, son mode d'extraction etc... (245) Cependant la nature est pleine de surprises, et cette notion de résistance aux HE ne doit pas être écartée. Ainsi, certains auteurs avancent l'hypothèse que chercher à prévenir l'apparition de facteurs de virulences (adhésion, formation de tube germinatif, formation de

biofilm, sécrétion d'enzymes extracellulaires...) plutôt que de tuer les agents infectieux serait un moyen d'éviter l'apparition la sélection de souches résistantes. (246) Or, nous avons fréquemment observé que l'inhibition des facteurs de virulence pouvait s'effectuer lors de l'utilisation de CSI d'HE. Cependant, si l'exposition des germes à des CSI d'antibiotiques classiques est un facteur d'apparition de résistances, (247) nous pouvons alors nous interroger sur l'impact de l'exposition des microorganismes à des CSI d'HE sur la sensibilité de ces derniers non seulement aux HE, mais également aux antibiotiques en général.

A ce jour, la plupart des études ne mettent pas en évidence de diminution de sensibilité des bactéries aux HE (243,248–251) ou aux antibiotiques (243,252) lorsqu'elles sont exposées préalablement pendant plusieurs jours à des concentrations sub-inhibitrices d'HE de Tea Tree, de cannelle de ceylan, d'origan vulgaire, ainsi qu'en présence d'eugénol, de citral et de cinnamaldéhyde. Certaines études mettent en évidence des différences statistiques significatives de CMI d'antibiotiques suite à l'exposition des microorganismes en présence de CSI d'HE de Tea Tree ou de terpinène-4-ol certes, mais à seulement une dilution près (253,254), ce qui n'est pas considéré comme significatif. (253)

Plusieurs études montrent même une augmentation de sensibilité des agents pathogènes aux molécules anti-infectieuses (HE, antibiotiques classiques) ou aux conditions de stress (modification de température, pH, NaCl...) suite à l'exposition à des CSI d'HE de thym vulgaire et d'origan vulgaire. (209,252)

Apolonio et son équipe ont montré également que l'exposition de souches de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, de SARM et de *Listeria monocytogenes* à des CSI d'eugénol, altérerait in vivo leur virulence après infection de *Galleria melonella* (243).

Cependant, d'autres publications montrent des résultats plus mitigés. En effet, Becerril et son équipe ont bien mis en évidence que, même après 50 cultures successives en présence de CSI d'HE de cannelle de ceylan, la CMI de l'HE de cannelle de ceylan ainsi que celle de divers antibiotiques vis-à-vis de *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Serratia marcescens* n'était significativement pas modifiée. En revanche, l'expérimentation similaire avec 50 cultures successives en présence de CSI d'HE d'origan vulgaire induit une multiplication par 4 de la CMI de l'HE d'origan vis-à-vis de *P. mirabilis* et *M. morganii*, ainsi qu'une augmentation de la CMI de divers antibiotiques vis-à-vis de *S. marcescens* et *P. mirabilis*, mais pas *M. morganii* ni *P. aeruginosa*. (248) De plus, McMahon et son équipe ont montré à travers 2 études portant sur l'exposition à des CSI de Tea Tree une augmentation de résistances à divers antibiotiques. En effet, l'exposition préalable de SASM et SARM à des

CSI de Tea Tree induit l'augmentation de nombreuses CMI d'antibiotiques, bien que cette augmentation soit réversible lorsque l'exposition à l'HE de Tea Tree est arrêtée. Cependant l'augmentation de CMI de l'HE de Tea Tree est maintenue. Cette même expérimentation vis-à-vis de staphylocoques à coagulase négative n'a par ailleurs pas montré d'augmentation de CMI de l'HE de Tea Tree, mais une augmentation transitoire de la CMI de 60 % des antibiotiques testés. (255) Dans une autre étude, après 3 jours d'exposition à des CSI d'HE de Tea Tree, toutes les espèces testées (*E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, SARM, SASM) expriment une diminution de sensibilité à pratiquement l'ensemble des 10 antibiotiques testés. (256) Pour expliquer cela, plusieurs hypothèses peuvent être formulées, (256) la première étant la sélection éventuelle de sous population moins sensibles aux antibiotiques ou HE par résistance accrue aux situations de stress, la 2ème serait due à des modifications phénotypiques transitoires telle que l'induction de production de pompes à efflux ou bien la sélection de sous population plus riches en pompes à efflux, et une fois l'exposition arrêtée, soit il y a un arrêt de la production de pompes à efflux, soit il y a un retour à l'équilibre entre les souches qui produisent moins de pompes à efflux car leur production est coûteuse énergiquement. Cette hypothèse expliquerait la diminution transitoire de sensibilité aux antibiotiques mais pas la diminution de sensibilité maintenue à l'HE de Tea Tree. (255) Enfin la dernière hypothèse serait due à des altérations génotypiques telles que des mutations ou des transferts horizontaux de plasmides.

Malgré tout, même si quelques études introduisent le doute, la majorité des études ne mettent pas en évidence de résistances induites par les HE, ou s'il y en a, elles ne sont que mineures. De plus, les études qui mettent en évidence une diminution de sensibilité de souches de staphylocoques à de nombreux antibiotiques en présence de CSI d'HE de Tea Tree (255,256) sont contrecarrées par d'autres études qui ne mettent en évidence que des diminutions mineures de sensibilité lorsqu'il y en a. (253,254) Quoi qu'il en soit, l'adaptation des microorganismes qui est une condition nécessaire à l'apparition de résistances, est certainement favorisée lorsque ceux-ci sont exposés à un seul composé (257–259) plutôt qu'en présence des HE complètes, il faudrait donc privilégier dans ce sens l'utilisation des HE entières et non leurs composés individuels.

Ainsi, les trop rares études à ce jour ne nous permettent pas de conclure formellement sur l'absence ou non de l'acquisition de résistance aux HE. Bien que nous aurions tendance à pencher en faveur d'un faible risque d'apparition de résistances, les résultats de certains auteurs nous rappellent que la nature est capable de bien des surprises, comme de mésaventures et qu'il est nécessaire de pousser la recherche dans ce sens afin d'éviter de faire

de nouveau face avec les HE à ce que nous vivons actuellement concernant les multiples résistances aux antibiotiques...

2.9 Intérêt de l'association des HE avec les antibiotiques

Depuis les années 1970, aucune réelle nouvelle classe d'antibiotique n'a émergé, les nouvelles molécules étant principalement issues de modifications mineures d'autres antibiotiques préexistants. (150) Parallèlement à cela, l'émergence des résistances aux antibiotiques ne fait que croître, poussant l'Homme à utiliser des molécules de dernière ligne, avant de se retrouver devant des impasses thérapeutiques. (27) Cependant, certains, comme le chercheur Adnane Remmal, ont eu l'idée de combiner des HE aux antibiotiques classiques, afin de redynamiser le potentiel de ces derniers. En effet, toujours selon ce même chercheur, « là où les antibiotiques agissent comme des clefs dans des serrures, les HE agissent comme un gros marteau pour enfoncer les portes. » De telle manière, une mutation unique et mineure risque à elle seule de rendre inefficace un antibiotique classique, alors qu'elle n'aura probablement aucun effet vis-à-vis de l'HE. (181,243) Plusieurs études montrent des effets synergiques, et également additifs entre les HE et les antibiotiques classiques à la fois contre les formes planctoniques et sessiles. Pour obtenir un effet synergique, plusieurs hypothèses sont avancées. (150,260)

- La première est basée sur la multiplicité et la complémentarité des sites d'actions. En effet le mécanisme d'action principal des HE reste les membranes bactériennes ou fongiques. Ainsi, cibler une autre cible cellulaire comme la synthèse des protéines par les aminosides semble être une bonne solution. (261,262) Néanmoins, nous pourrions penser qu'associer des bêta-lactamines aux HE pourrait avoir un intérêt limité, or un effet synergique a été montré entre le thymol et la pénicilline chez *E. coli*, (263) ainsi que le thymol ou le carvacrol et la pénicilline vis-à-vis de *E. coli* et *S. typhimurium*. (264) L'explication serait qu'en altérant les membranes, les HE permettraient d'augmenter de façon non spécifique la pénétration des antibiotiques classiques par augmentation de la perméabilité membranaire. (265,266)
- La deuxième hypothèse consiste à cibler des mécanismes spécifiques de résistance aux antibiotiques comme l'inhibition d'enzymes (telles que les bêta-lactamases) ou non spécifiques, comme l'inhibition des pompes à efflux, (169,260,267) bien qu'il soit proposé que l'inhibition de ces dernières puisse être induite par l'altération des membranes ou l'inhibition de voies métaboliques. (150)

- La dernière pourrait être due à des modifications par les HE des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des antibiotiques améliorant ainsi leur solubilité et biodisponibilité. (260)

Ainsi, de nombreuses études montrent des effets synergiques entre certaines HE ou composés et certains antibiotiques, (150,211,260,261,264,268–270) bien que ce soit loin d'être systématiquement le cas. (225,271,272) Certaines HE ou composés sont capables de restaurer la susceptibilité de certains germes à des antibiotiques auxquels ils étaient auparavant résistants, l'association carvacrol / érythromycine permet par exemple de diminuer de 2 à 2048 fois la CMI de l'érythromycine à l'encontre de streptocoques du groupe A résistants à l'érythromycine. (273) D'autres HE, ou composés tel que le cinnamaldéhyde sont capables d'agir à des CSI, afin de perturber le QS (sans pour autant connaître précisément le mécanisme), et d'augmenter ainsi la sensibilité des germes aux antibiotiques classiques. (274) En outre, ce n'est pas parce qu'aucune synergie entre HE ou composé individuel et antibiotique classique n'est mise en évidence contre les formes planctoniques, qu'aucune synergie de ces substances n'existe vis-à-vis des biofilms. Effectivement, lorsque le thymol, le menthol ou le 1,8-cinéole sont associés à la mupirocine vis-à-vis de souches planctoniques de *S. aureus*, aucune synergie n'est visualisée. (211) En revanche, un effet synergique de l'association mupirocine / 1,8-cinéole ou thymol est mis en évidence dans l'élimination de biofilms préformés de souches de *S. aureus*, ainsi que de l'association mupirocine / thymol ou menthol dans l'inhibition de formation de biofilms, toujours de souches de *S. aureus*. (211) Cependant, comme à l'encontre des formes planctoniques, certains effets antagonistes peuvent survenir, telle que l'association mupirocine / menthol dans l'élimination de biofilms préformés de *S. aureus*. (211) Cet exemple montre la complexité de l'étude des interactions HE ou composés individuels et antibiotiques classiques puisque l'association mupirocine / menthol n'a aucun effet sur les cellules planctoniques de *S. aureus*, mais présente un effet synergique dans l'inhibition de formation du biofilm et antagoniste dans l'élimination du biofilm préformé, des variations d'effets diamétralement opposés sont par ailleurs mises en évidence entre les différentes souches d'une même espèce. (211) Ces résultats étant issus de la même étude, ils ne peuvent pas être liés à la variation d'effet selon la méthode utilisée, ou encore selon les différentes interprétations de l'index de concentration fractionnaire inhibitrice (FICI) comme cela peut être le cas parfois. (269)

En conclusion, l'étude des effets synergiques des HE ou de leurs composés individuels reste une approche très intéressante dans la lutte contre la résistance et la tolérance aux antibiotiques classiques. Cette approche peut être utilisée effectivement dans le cadre de

résistances ou de tolérances, mais également dans le but de diminuer les doses d'antibiotiques utilisées, réduisant ainsi les toxicités éventuelles. (269)

2.10 Perspectives d'utilisation des HE

Le facteur principal limitant l'utilisation des HE est leur faible solubilité et leur volatilité importante. Pour tenter de pallier ce problème, la plupart des études utilisent dans leur protocole un tensioactif à faible concentration afin d'augmenter la dissolution des HE ou de leurs composés. Pour tenter d'augmenter la dissolution des HE et de leurs composés, plusieurs auteurs s'orientent vers le développement de nano-composés. Ce peut être l'encapsulation dans des nanoparticules lipidiques telles que des micro ou nano-émulsions, (275,276) des liposomes, (277) ou d'autres particules lipidiques plus complexes, (205,278,279). L'avantage des particules lipidiques est leur meilleure tolérance ainsi que leur biodégradabilité. (279) Néanmoins, l'utilisation de nanoparticules à base de polymères semble intéressante, (280) ainsi que des nanoparticules de silice, (171,213) ces dernières ayant l'avantage d'être biocompatibles. (213) Enfin, des nanoparticules métalliques sont également développées pour jouer le rôle de transporteur, (213,278,281) en plus de leur activité antimicrobienne intrinsèque. (151) La majorité de ces études mettent en évidence un effet antimicrobien et anti-biofilm majoré par rapport à l'utilisation d'HE ou de composés individuels non encapsulés. Cela est dû à l'augmentation de la stabilité physique des HE, à la diminution de leur volatilité, à l'augmentation de la surface d'interaction, à la protection des interactions avec l'environnement (oxydation, pH, lumière...), à l'augmentation de la pénétration au sein de la MEC et à l'apport direct des molécules au contact des cellules. (151,214) De plus l'emploi de tels procédés permet de réduire la toxicité des HE car des concentrations inférieures en HE suffisent. (213) Par ailleurs, la réduction des concentrations nécessaire peut être réalisée par la vectorisation des nanoparticules à travers l'utilisation d'anticorps fixés sur les particules, (278) ou encore par l'utilisation de protéoliposomes contenant une protéine dans la membrane du liposome qui est dégradée par des protéases extracellulaires, sécrétées par les biofilms de *S. aureus*, libérant ensuite par les orifices l'HE encapsulée, (277) ou encore la libération du cinnamaldéhyde fixé sur des nanoparticules d'or et de silice en présence du pH acide au sein de la MEC. (213)

Par ailleurs, la recherche bat son plein dans le souhait de développer de nouvelles surfaces limitant la formation de biofilms, les HE font partie de cette option, plusieurs études montrent l'intérêt de ces dernières dans la lutte anti-biofilm, en les combinant à des nanostructures afin

d'obtenir de nouveaux matériaux biocompatibles enveloppant les implants, prothèses, cathéters... inhibant la formations des biofilms. (282–285)

Conclusion générale

THESE SOUTENUE PAR : Mr DUPIN Alban

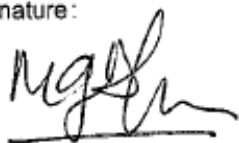
La première partie de ce travail met en évidence l'importance des biofilms dans l'environnement et en santé humaine, ainsi que leur complexité. Si ces derniers peuvent être utiles à l'Homme (biorémédiation, biotechnologies...), ils restent néanmoins un problème dont les répercussions sont mondiales, sans distinctions des classes socio-économiques. En effet les biofilms seraient dans le monde la cause de 65 % des infections nosocomiales, de 65 à 80 % des infections quelles qu'elles soient ou encore la cause de 60 à 100 % des plaies chroniques. [Bjarnsholt et al. 2016 (29)] Ils sont par ailleurs capables de se développer pratiquement sur toutes les surfaces à leur disposition, tels que les dispositifs médicaux, dont le nombre d'implantation croît parallèlement au vieillissement de la population. Le traitement des infections à biofilms est complexe car ils sont responsables de la tolérance aux antibiotiques, et sont également un facteur d'apparition de résistances. Les biofilms diminuent donc considérablement la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques aux doses usuelles, ce qui réduit l'efficacité du traitement et favorise le développement de résistances. Par ailleurs, la détermination des CMI en laboratoire est la plupart du temps réalisée à l'encontre des formes planctoniques qui ne correspondent pas du tout au mode de vie majoritaire des microorganismes. Les bactéries par exemple ne seraient présentes sous cette forme qu'à hauteur de 1 % par rapport à la forme sessile. [Garrett et al. 2008 (1)]

Si l'effet antibactérien et antifongique de nombreuses huiles essentielles (HE) est depuis quelques décennies largement étudié, ce n'est que depuis récemment qu'un certain nombre d'études s'intéressent aux propriétés anti-biofilm dont sont dotées les HE, là où bon nombre d'antibiotiques demeurent inefficaces. C'est précisément l'objet de la seconde partie de ce travail consistant en une revue de la littérature portant sur environ 200 publications à propos de l'activité des HE sur les biofilms de trois micro-organismes de nature différente mais responsables d'infections courantes chez l'Homme: d'*Escherichia coli* (une bactérie gram-négative), de *Staphylococcus aureus* (une bactérie gram-positive) et de *Candida albicans* (une levure). Ce travail fait ainsi ressortir les avantages des HE et met en avant leurs mécanismes d'action. La lutte contre les biofilms peut donc s'articuler sur différents points, en contrôlant tout d'abord la population planctonique, mais aussi en inhibant la formation des biofilms et en éradiquant ceux qui sont déjà préformés. L'avantage des HE est qu'elles sont capables d'agir de façon plus ou moins efficiente sur toutes ces étapes. Ce sont surtout les HE qui ont montré

des propriétés bactéricides importantes contre les formes planctoniques qui possèdent des propriétés anti-biofilm, telles que celles qui sont riches en phénols volatils, en aldéhydes et dans une moindre mesure en alcools terpéniques. Néanmoins, il paraît impossible de généraliser l'action anti-biofilm des HE à cause, ou plutôt grâce, à la pluralité de leurs mécanismes d'actions. C'est ainsi que certaines HE n'ayant aucune propriété bactéricide sont capables d'exercer un effet anti-biofilm par modification d'expression de gènes, par brouillage du quorum sensing, etc... De plus, de nombreuses HE exercent une activité anti-biofilm lors de l'utilisation de concentrations sub-inhibitrices (CSI), permettant d'employer des concentrations très faibles d'HE. Par ailleurs, à l'inverse des antibiotiques classiques qui, utilisés à des CSI, entraînent l'apparition de résistances, les HE elles, même lors de l'utilisation de CSI ne semblent entraîner qu'un très faible risque de développement de résistance. Enfin, un dernier avantage est dû à l'effet synergique qu'il est possible d'obtenir en combinant des HE entre elles, ou bien à des antibiotiques, permettant parfois de restaurer la sensibilité initiale des microorganismes aux antibiotiques en cas d'antibio-résistance.

Quoi qu'il en soit, les HE possèdent un intérêt sans équivoque pour la lutte future contre les biofilms bien que les études cliniques chez l'Homme nous font défaut à l'heure actuelle. Certains ont bien compris l'intérêt des HE, mais l'inconvénient de ces dernières est leur volatilité et leur faible solubilité dans les milieux biologiques. Ainsi plusieurs études émergent, montrant l'efficacité encore plus importante de la combinaison des HE à différentes formulations galéniques voire aux nanotechnologies, peut-être est-ce là le véritable avenir des HE ?

Le Président de la thèse,
Nom :
MA DIJOUX-FRANCA
Signature :



Vu et permis d'imprimer, Lyon, le **14 NOV. 2017**
Vu, la Directrice de l'Institut des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie

Pour le Président de l'Université Claude Bernard
Lyon 1,



Professeure C. VINCIGUERRA

Bibliographie :

1. Garrett TR, Bhakoo M, Zhang Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci*. 10 sept 2008;18(9):1049-56.
2. Girardin N, Morin D. Etat des lieux de la recherche sur les biofilms en France [En ligne]. 2012 [cité le 12 août 2017]. Disponible: http://adebiotech.org/colloque_biofilms/PDF/1-Preface_Biofilms_Enjeux_et_valorisation.pdf
3. Mihai MM, Holban AM, Giurcaneanu C, Popa LG, Oanea RM, Lazar V, et al. Microbial Biofilms: Impact on the Pathogenesis of Periodontitis, Cystic Fibrosis, Chronic Wounds and Medical Device-Related Infections. *Curr Top Med Chem*. 2015;15(16):1552-76.
4. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 11 2016;14(9):563-75.
5. Briandet R, Fechner L, Naïtali M, Dreanno C. Biofilms, quand les microbes s'organisent. Editions Quae; 2012. 180 p.
6. Nya EJ. biofilms and biofouling: cost and effect on drinking water quality for human development. *J Glob Biosci*. 2015;4(2):1571-8.
7. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock RE. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr Opin Microbiol*. 1 oct 2013;16(5):580-9.
8. Römling U, Kjelleberg S, Normark S, Nyman L, Uhlin BE, Åkerlund B. Microbial biofilm formation: a need to act. *J Intern Med*. 1 août 2014;276(2):98-110.
9. Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. avr 2017;125(4):272-5.
10. Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 2003;47(1):317-23.
11. Chalvet de Rochemonteix A de. Les biofilms et la peau [Thèse d'exercice]. EnvA, France : École nationale vétérinaire d'Alfort; 2009.
12. Lebeaux D, Ghigo J-M, LUCET J-C. Physiopathologie et prévention des infections liées aux dispositifs médicaux implantés. *Rev Prat*. 2014;64(5):620–625.
13. Harding MW, Marques LLR, Howard RJ, Olson ME. Can filamentous fungi form biofilms? *Trends Microbiol*. 1 nov 2009;17(11):475-80.
14. Wang C, Miao L, Hou J, Wang P, Qian J, Dai S. The effect of flow velocity on the distribution and composition of extracellular polymeric substances in biofilms and the

- detachment mechanism of biofilms. *Water Sci Technol J Int Assoc Water Pollut Res.* 2014;69(4):825-32.
15. Oliveira NM, Martinez-Garcia E, Xavier J, Durham WM, Kolter R, Kim W, et al. Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition. *PLoS Biol.* 9 juill 2015;13(7).
 16. Shim H, Yang ST. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *J Biotechnol.* 22 janv 1999;67(2-3):99-112.
 17. Martí S, Rodríguez-Baño J, Catel-Ferreira M, Jouenne T, Vila J, Seifert H, et al. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Res Notes.* 11 janv 2011;4:5.
 18. Vlamakis H, Chai Y, Beauregard P, Kolter R. Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *ResearchGate.* janv 2013;11(3):157-68.
 19. Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol.* oct 2003;50(1):61-8.
 20. Torresi E, Fowler SJ, Polesel F, Bester K, Andersen HR, Smets BF, et al. Biofilm Thickness Influences Biodiversity in Nitrifying MBBRs-Implications on Micropollutant Removal. *Environ Sci Technol.* 6 sept 2016;50(17):9279-88.
 21. Liu Y, Tay J-H. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* avr 2002;36(7):1653-65.
 22. Kraigsley A, Rooney P. Hydrodynamic effects on biofilm formation [En ligne]. 2003 [cité le 15 juin 2017]. Disponible: <http://ronney.usc.edu/research/biophysics/Biofilms4Web.html>
 23. Mazza MG. The physics of biofilms-an introduction. *J Phys -Appl Phys.* 25 mai 2016;49(20):203001.
 24. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* sept 2014;78(3):510-43.
 25. CDC. Get Smart About Antibiotics: Antibiotic Resistance: The Global Threat [En ligne]. 2017 [cité le 8 juin 2017]. Disponible: <https://www.cdc.gov/getsmart/week/downloads/antibiotic-resistance-the-global-threat.pdf>
 26. Claudeberaud. La résistance aux antibiotiques. Une grave menace pour la santé de la population [En ligne]. 2017 [cité le 25 mai 2017]. Disponible: <http://www.claudeberaud.fr/resistance-antibiotiques-menace-population/>

27. Chen L. Notes from the Field: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2017;66(1):33.
28. Attinger C, Wolcott R. Clinically Addressing Biofilm in Chronic Wounds. Adv Wound Care. juin 2012;1(3):127-32.
29. Bjarnsholt T, Cooper R, Fletcher J, Fromantin I, Kirketerp-Molle K, Malone M, et al. Position document: Management of biofilm [En ligne]. 2016 [cité le 25 mai 2017]. Disponible: <http://www.woundsinternational.com/wuwhs/view/position-document-management-of-biofilm>
30. INSERM. Infections nosocomiales [En ligne]. 2015 [cité le 25 mai 2017]. Disponible: <https://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/infections-nosocomiales>
31. ECDC. Healthcare-associated infections [En ligne]. 2017 [cité le 25 mai 2017]. Disponible: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/healthcare-associated_infections/pages/index.aspx
32. Joo H-S, Otto M. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. Chem Biol. 21 déc 2012;19(12):1503-13.
33. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res. avr 2002;66(2):86-92.
34. Bas Z. Biofilm Alliance [En ligne]. 2016 [cité le 9 juin 2017]. Disponible: <http://www.bali-consortium.eu/index.php/infection/biofilms>
35. Brinkman CL, Schmidt-Malan SM, Karau MJ, Greenwood-Quaintance K, Hassett DJ, Mandrekar JN, et al. Exposure of Bacterial Biofilms to Electrical Current Leads to Cell Death Mediated in Part by Reactive Oxygen Species. PLoS ONE. 19 déc 2016;11(12).
36. Sohail MR, Henrikson CA, Braid-Forbes MJ, Forbes KF, Lerner DJ. Mortality and cost associated with cardiovascular implantable electronic device infections. Arch Intern Med. 14 nov 2011;171(20):1821-8.
37. Klouche S, Sariali E, Mamoudy P. Total hip arthroplasty revision due to infection: a cost analysis approach. Orthop Traumatol Surg Res OTSR. avr 2010;96(2):124-32.
38. Tacconelli E, Smith G, Hieke K, Lafuma A, Bastide P. Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four European countries: literature- and registry-based estimates. J Hosp Infect. juin 2009;72(2):97-103.
39. UFSBD. Chiffres clés par thématique [En ligne]. 2017 [cité le 26 mai 2017]. Disponible: <http://www.ufsbd.fr/espace-public/espace-presse/chiffres-cles-par-thematique/>

40. Hoegger M, Fischer A, McMenimen J, Ostedgaard L, Tucker A, Awadalla M. Impaired Mucus Detachment Disrupts Mucociliary Transport in a Piglet Model of Cystic Fibrosis. août 2015;345(6198):818-22.
41. Vaincre la mucoviscidose. Parution du Registre français de la mucoviscidose [En ligne]. 2016 [cité le 27 mai 2017]. Disponible: <http://www.vaincrelamuco.org/2016/12/16/parution-du-registre-francais-de-la-mucoviscidose-1746>
42. BDSP. Une filière spécialisée « plaies chroniques » pour l'accompagnement des patients sur le territoire de santé, quel intérêt de santé publique ? [En ligne]. 2011 [cité le 27 mai 2017]. Disponible: <http://www.bdsp.ehesp.fr/Base/453688/>
43. Phillips P, Wolcott R, Fletcher J. Biofilms Made Easy. [En ligne]. 2010. Disponible: <http://www.woundsinternational.com/home>
44. Omar A, Wright JB, Schultz G, Burrell R, Nadworny P. Microbial Biofilms and Chronic Wounds. Microorganisms. 7 mars 2017;5(1).
45. Le Touze A, Robert M. La cicatrisation et la cicatrice [En ligne]. 2000 [cité le 5 juill 2017]. Disponible: https://www.chirpediatric.fr/upload/documents/fiches_public/PLAIES-CICATRISATION.pdf
46. Drosou A, Falabella A, Kirsner R. Antiseptics on Wounds: An Area of Controversy. Wounds Compend Clin Res Pract. 2003;15(5):149-66.
47. Zimmerli W, Lew PD, Waldvogel FA. Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. J Clin Invest. avr 1984;73(4):1191-200.
48. Stickler DJ. Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. Nat Clin Pract Urol. nov 2008;5(11):598-608.
49. Wilks SA, Fader MJ, Keevil CW. Novel Insights into the *Proteus mirabilis* Crystalline Biofilm Using Real-Time Imaging. PLOS ONE. 30 oct 2015;10(10):1-13.
50. Percival SL, Suleman L, Vuotto C, Donelli G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. J Med Microbiol. avr 2015;64(4):323-34.
51. PAES Montpellier. Les biofilms [En ligne]. 2005 [cité le 6 juill 2017]. Disponible: <https://ecm.univ-rennes1.fr/nuxeo/site/esupversions/bfc57a4f-c4dd-48aa-b046-d3c9c8799da7>
52. Oilo M, Bakken V. Biofilm and Dental Biomaterials. Materials. juin 2015;8(6):2887-900.
53. El Khatib R. Contrôle hydrodynamique de la formation des biofilms en milieu eaux usées [Thèse de doctorat]. France : Institut national polytechnique de Lorraine; 2011.

54. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 oct 2001;33(8):1387-92.
55. Song B, Leff LG. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*. Microbiol Res. 17 nov 2006;161(4):355-61.
56. Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. Biomaterials. nov 2013;34(34):8533-54.
57. Nadell CD, Drescher K, Foster KR. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. Nat Rev Microbiol. sept 2016;14(9):589-600.
58. Estrela S, Brown SP. Metabolic and Demographic Feedbacks Shape the Emergent Spatial Structure and Function of Microbial Communities. PLoS Comput Biol. 26 déc 2013;9(12):1-12.
59. Hobley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. FEMS Microbiol Rev. sept 2015;39(5):649-69.
60. Lebeaux D, Ghigo J-M. Infections associées aux biofilms. médecine/sciences. 2012;(28):727-39.
61. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. sept 2010;8(9):623-33.
62. Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. Microbiol Spectr. juin 2015;3(3):1-30.
63. Domenech M, Ramos-Sevillano E, García E, Moscoso M, Yuste J. Biofilm Formation Avoids Complement Immunity and Phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. juill 2013;81(7):2606-15.
64. Toyofuku M, Roschitzki B, Riedel K, Eberl L. Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. J Proteome Res. 5 oct 2012;11(10):4906-15.
65. Tielen P, Kuhn H, Rosenau F, Jaeger K-E, Flemming H-C, Wingender J. Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol. 13 juill 2013;13:159.
66. Bakaraki Turan N, Chormey DS, Büyükpınar Ç, Engin GO, Bakirdere S. Quorum Sensing: Little talks for an effective bacterial coordination. TrAC Trends Anal Chem. 2017;91:1-11.

67. Maruthupandy M, Anand M, Maduraiveeran G, Beevi ASH, Priya RJ. Electrical conductivity measurements of bacterial nanowires from *Pseudomonas aeruginosa*. Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol. 2015;6(4):1-7.
68. Lovley DR, Malvankar NS. Seeing is believing: novel imaging techniques help clarify microbial nanowire structure and function. Environ Microbiol. juill 2015;17(7):2209-15.
69. Montanaro L, Poggi A, Visai L, Ravaioli S, Campoccia D, Speziale P, et al. Extracellular DNA in biofilms. Int J Artif Organs. sept 2011;34(9):824-31.
70. Barnes AMT, Ballering KS, Leibman RS, Wells CL, Dunny GM. *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. mBio. 2012;3(4):193-212.
71. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. Environ Microbiol. juin 2010;12(6):1621-9.
72. Wang BY, Chi B, Kuramitsu HK. Genetic exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms. Oral Microbiol Immunol. avr 2002;17(2):108-12.
73. Jennings LK, Storek KM, Ledvina HE, Coulon C, Marmont LS, Sadovskaya I, et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. Proc Natl Acad Sci U S A. 8 sept 2015;112(36):11353-8.
74. Conrad A, Suutari MK, Keinänen MM, Cadoret A, Faure P, Mansuy-Huault L, et al. Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. Lipids. oct 2003;38(10):1093-105.
75. Lattif AA, Mukherjee PK, Chandra J, Roth MR, Welti R, Rouabhia M, et al. Lipidomics of *Candida albicans* biofilms reveals phase-dependent production of phospholipid molecular classes and role for lipid rafts in biofilm formation. Microbiology. nov 2011;157(11):3232-42.
76. Okabe S, Yasuda T, Watanabe Y. Uptake and release of inert fluorescence particles by mixed population biofilms. Biotechnol Bioeng. 5 mars 1997;53(5):459-69.
77. Wilking JN, Zaburdaev V, De Volder M, Losick R, Brenner MP, Weitz DA. Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms. Proc Natl Acad Sci U S A. 15 janv 2013;110(3):848-52.
78. Battin TJ, Besemer K, Bengtsson MM, Romani AM, Packmann AI. The ecology and biogeochemistry of stream biofilms. Nat Rev Microbiol. avr 2016;14(4):251-63.
79. Flemming H-C, Leis A. Sorption Properties of Biofilms. Encyclopedia of Environmental Microbiology. 2002;5:2958-67.

80. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* avr 2013;3(4):1-24.
81. Ciofu O, Tolker-Nielsen T, Jensen PØ, Wang H, Høiby N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv Drug Deliv Rev.* mai 2015;85:7-23.
82. Pillon F. L'hygiène bucco-dentaire, de l'importance de la prévention. *Actual Pharm.* 1 avr 2010;49(495):22-4.
83. Soto SM. Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches [En ligne]. 2014 [cité le 23 mai 2017]. Disponible: https://www.researchgate.net/publication/273611983_Importance_of_Biofilms_in_Urinary_Tract_Infections_New_Therapeutic_Approaches
84. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* avr 2013;3(4):1-24.
85. Yang X, Sha K, Xu G, Tian H, Wang X, Chen S, et al. Subinhibitory Concentrations of Allicin Decrease Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Biofilm Formation, Adhesion Ability, and Swimming Motility. *Int J Mol Sci.* juill 2016;17(7):979-91.
86. Keen M, Foreman A, Wormald P-J. The clinical significance of nasal irrigation bottle contamination. *The Laryngoscope.* oct 2010;120(10):2110-4.
87. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis.* juin 2016;74(4):18-31.
88. Woodworth BA, Tamashiro E, Bhargava G, Cohen NA, Palmer JN. An in vitro model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on viable airway epithelial cell monolayers. *Am J Rhinol.* juin 2008;22(3):235-8.
89. Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol.* 1 avr 2014;18:96-104.
90. Kırmusaoğlu S. Staphylococcal Biofilms: Pathogenicity, Mechanism and Regulation of Biofilm Formation by Quorum-Sensing System and Antibiotic Resistance Mechanisms of Biofilm-Embedded Microorganisms [En ligne]. 2016 [cité le 23 mai 2017]. Disponible: <http://www.intechopen.com/books/microbial-biofilms-importance-and-applications/staphylococcal-biofilms-pathogenicity-mechanism-and-regulation-of-biofilm-formation-by-quorum-sensin>
91. Verma SC, Miyashiro T. Quorum Sensing in the Squid-*Vibrio* Symbiosis. *Int J Mol Sci.* 7 août 2013;14(8):16386-401.

92. Baldwin TO, Christopher JA, Raushel FM, Sinclair JF, Ziegler MM, Fisher AJ, et al. Structure of bacterial luciferase. *Curr Opin Struct Biol.* déc 1995;5(6):798-809.
93. Banerjee G, Ray AK. The talking language in some major Gram-negative bacteria. *Arch Microbiol.* août 2016;198(6):489-99.
94. Grandclement C, Tannieres M, Morera S, Dessaux Y, Faure D. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *Fems Microbiol Rev.* janv 2016;40(1):86-116.
95. Ryan M. Quorum Sensing [En ligne]. [cité le 3 avr 2017]. Disponible: <https://sites.tufts.edu/quorumsensing/quorumsensing101/>
96. Redfield RJ. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiol.* août 2002;10(8):365-70.
97. Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* sept 2016;14(9):576-88.
98. Kai K, Fujii H, Ikenaka R, Akagawa M, Hayashi H. An acyl-SAM analog as an affinity ligand for identifying quorum sensing signal synthases. *Chem Commun.* 8 juill 2014;50(62):8586-9.
99. Swem LR, Swem DL, O'Loughlin CT, Gatmaitan R, Zhao B, Ulrich SM, et al. A Quorum-Sensing Antagonist Targets Both Membrane-Bound and Cytoplasmic Receptors And Controls Bacterial Pathogenicity. *Mol Cell.* 31 juill 2009;35(2):143-53.
100. Gelencsér Z, Choudhary KS, Coutinho BG, Hudaiberdiev S, Galbáts B, Venturi V, et al. Classifying the Topology of AHL-Driven Quorum Sensing Circuits in Proteobacterial Genomes. *Sensors.* 27 avr 2012;12(5):5432-44.
101. Heeb S, Fletcher MP, Chhabra SR, Diggle SP, Williams P, Cámara M. Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *Fems Microbiol Rev.* mars 2011;35(2):247-74.
102. Thevenard B. Implication des systèmes à deux composants dans les réponses de *Streptococcus thermophilus* à des changements environnementaux, dont la coculture avec *Lactobacillus bulgaricus*. [Thèse de doctorat]. Jouy-en-Josas, France : Microbiologie de l'Alimentation au Service de la Santé humaine; 2011.
103. Monnet V, Gardan R. Quorum-sensing regulators in Gram-positive bacteria: « cherchez le peptide ». *Mol Microbiol.* juill 2015;97(2):181-4.
104. Pereira CS, Thompson JA, Xavier KB. AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* mars 2013;37(2):156-81.
105. Miller ST, Xavier KB, Campagna SR, Taga ME, Semmelhack MF, Bassler BL, et al. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. *Mol Cell.* 10 sept 2004;15(5):677-87.

106. Duan K, Dammel C, Stein J, Rabin H, Surette MG. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* gene expression by host microflora through interspecies communication. *Mol Microbiol.* déc 2003;50(5):1477-91.
107. Rezzonico F, Smits THM, Duffy B. Detection of AI-2 Receptors in Genomes of *Enterobacteriaceae* Suggests a Role of Type-2 Quorum Sensing in Closed Ecosystems. *Sensors.* 21 mai 2012;12(5):6645-65.
108. Xavier KB, Bassler BL. Interference with AI-2-Mediated Bacterial Cell-Cell Communication. *Nature.* 29 sept 2005;437(7059):750-3.
109. Dow JM. Diffusible signal factor-dependent quorum sensing in pathogenic bacteria and its exploitation for disease control. *J Appl Microbiol.* janv 2017;122(1):2-11.
110. Rahmani-Badi A, Sepehr S, Fallahi H, Heidari-Keshel S. Dissection of the cis-2-decenoic acid signaling network in *Pseudomonas aeruginosa* using microarray technique. *Front Microbiol.* 28 avr 2015;6:383-96.
111. Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol.* mai 2013;9(5):339-43.
112. Dixon EF, Hall RA. Noisy neighbourhoods: quorum sensing in fungal–polymicrobial infections. *Cell Microbiol.* oct 2015;17(10):1431-41.
113. Wongsuk T, Pumeesat P, Luplertlop N. Fungal quorum sensing molecules: Role in fungal morphogenesis and pathogenicity. *J Basic Microbiol.* mai 2016;56(5):440-7.
114. Du Toit A. Fungal Biology: A fungal quorum-sensing system. *Nat Rev Microbiol.* juill 2016;14(7):404-5.
115. Madhani HD. Quorum Sensing in Fungi: Q&A. *PLoS Pathog.* oct 2011;7(10).
116. Barriuso J. Quorum sensing mechanisms in fungi. 18 nov 2015;1(1):37-47.
117. Cremer J, Vatou V, Braveny I. 2,4-(hydroxyphenyl)-ethanol, an antioxidative agent produced by *Candida* spp., impairs neutrophilic yeast killing in vitro. *FEMS Microbiol Lett.* 15 janv 1999;170(2):319-25.
118. Katragkou A, McCarthy M, Alexander EL, Antachopoulos C, Meletiadis J, Jabra-Rizk MA, et al. In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother.* févr 2015;70(2):470-8.
119. Zargar A, Quan DN, Carter KK, Guo M, Sintim HO, Payne GF, et al. Bacterial secretions of nonpathogenic *Escherichia coli* elicit inflammatory pathways: a closer investigation of interkingdom signaling. *mBio.* 10 mars 2015;6(2):15-25.

120. Karavolos MH, Winzer K, Williams P, Khan CMA. Pathogen espionage: multiple bacterial adrenergic sensors eavesdrop on host communication systems. *Mol Microbiol.* févr 2013;87(3):455-65.
121. Cugini C, Calfee MW, Farrow JM, Morales DK, Pesci EC, Hogan DA. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* août 2007;65(4):896-906.
122. Abe S, Tsunashima R, Iijima R, Yamada T, Maruyama N, Hisajima T, et al. Suppression of anti-*Candida* activity of macrophages by a quorum-sensing molecule, farnesol, through induction of oxidative stress. *Microbiol Immunol.* juin 2009;53(6):323-30.
123. Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. *J Anti-Infect.* sept 2014;16(3):112-21.
124. Daddi Oubekka S, Briandet R, Fontaine-Aupart M-P, Steenkest K. Correlative Time-Resolved Fluorescence Microscopy To Assess Antibiotic Diffusion-Reaction in Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2012;56(6):3349-58.
125. Monzón M, Oteiza C, Leiva J, Lamata M, Amorena B. Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis.* déc 2002;44(4):319-24.
126. Chiang W-C, Pamp SJ, Nilsson M, Givskov M, Tolker-Nielsen T. The metabolically active subpopulation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms survives exposure to membrane-targeting antimicrobials via distinct molecular mechanisms. *FEMS Immunol Med Microbiol.* juill 2012;65(2):245-56.
127. Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs.* sept 2011;34(9):737-51.
128. Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ. Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell.* 12 févr 2010;37(3):311-20.
129. Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ. *Staphylococcus aureus* Biofilms Promote Horizontal Transfer of Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2013;57(4):1968-70.
130. Borgeaud S, Metzger LC, Scignari T, Blokesch M. The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science.* 2 janv 2015;347(6217):63-7.
131. Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, Hooykaas PJ. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 3 juill 1995;14(13):3206-14.

132. Chadha T. Bacterial Biofilms: Survival Mechanisms and Antibiotic Resistance. *J Bacteriol Parasitol.* janv 2014;5(3):190-4.
133. Raad II, Fang X, Keutgen XM, Jiang Y, Sherertz R, Hachem R. The role of chelators in preventing biofilm formation and catheter-related bloodstream infections. *Curr Opin Infect Dis.* août 2008;21(4):385-92.
134. Beloin C, Renard S, Ghigo J-M, Lebeaux D. Novel approaches to combat bacterial biofilms. *Curr Opin Pharmacol.* oct 2014;18:61-8.
135. Muszanska AK, Rochford ETJ, Gruszka A, Bastian AA, Busscher HJ, Norde W, et al. Antiadhesive polymer brush coating functionalized with antimicrobial and RGD peptides to reduce biofilm formation and enhance tissue integration. *Biomacromolecules.* 9 juin 2014;15(6):2019-26.
136. Spaulding CN, Kau AL, Klein RD, Janetka JW, Gordon JI, Hultgren SJ. Small-molecule inhibitors against type 1 pili selectively target uropathogenic *E. coli* in the gut and bladder. *FASEB J.* 4 janv 2017;31(1):939-9.
137. Miquel S, Lagrèfeuille R, Souweine B, Forestier C. Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Front Microbiol.* 2016;7.
138. Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl Environ Microbiol.* mars 2006;72(3):2064-9.
139. Wexselblatt E, Oppenheimer-Shaanan Y, Kaspy I, London N, Schueler-Furman O, Yavin E, et al. Relacin, a novel antibacterial agent targeting the Stringent Response. *PLoS Pathog.* sept 2012;8(9):e1002925.
140. Faucon M, Lobstein A. *Traité d'aromathérapie scientifique et médicale: fondements & aide à la prescription.* Paris, France : Éditions Sang de la terre, DL 2015; 2015. 879 p.
141. Folliard T. *La Bible Larousse des huiles essentielles.* Paris, France : Larousse, DL 2016; 2016. 319 p.
142. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod.* déc 2014;62:250-64.
143. Borges A, Lopez-Romero JC, Oliveira D, Giaouris E, Simões M. Prevention, removal and inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilms using selected monoterpenes of essential oils. *J Appl Microbiol.* 12 mai 2017;123(1):104-15.
144. Robert T. *Huiles essentielles et antibiotiques: alternative et complémentarité [Thèse d'exercice].* 2015, France : Université de Montpellier. UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques; 2015.

145. Duval L. Les huiles essentielles à l'officine [Thèse d'exercice]. France : Université de Rouen; 2012.
146. Raut JS, Karuppayil SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind Crops Prod.* 1 déc 2014;62:250-64.
147. Freires I de A, Murata RM, Furletti VF, Sartoratto A, de Alencar SM, Figueira GM, et al. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) Essential Oil: Antifungal Activity and Mode of Action on *Candida* spp., and Molecular Targets Affected in Human Whole-Genome Expression. *Plos One.* 5 juin 2014;9(6):e99086.
148. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol.* 1 août 2004;94(3):223-53.
149. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals.* 25 nov 2013;6(12):1451-74.
150. Langeveld WT, Veldhuizen EJA, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit Rev Microbiol.* févr 2014;40(1):76-94.
151. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines.* 8 août 2017;4(3):58.
152. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J Appl Microbiol.* août 2016;121(2):309-19.
153. Alnnasouri M. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau [Thèse de doctorat]. France : Institut national polytechnique de Lorraine; 2010.
154. Mitra A, Palaniyandi S, Herren CD, Zhu X, Mukhopadhyay S. Pleiotropic Roles of uvrY on Biofilm Formation, Motility and Virulence in Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *PLoS ONE.* 1 févr 2013;8(2):e55492.
155. Jakobsen TH, van Gennip M, Phipps RK, Shanmugham MS, Christensen LD, Alhede M, et al. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2012;56(5):2314-25.
156. Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* janv 2002;184(1):290-301.
157. Moch C. Caractérisation du transport moléculaire vésical: applications cliniques et pharmacologiques [Thèse de doctorat]. Lyon, France : Université Claude Bernard; 2014.

158. Amalaradjou MAR, Narayanan A, Baskaran SA, Venkitanarayanan K. Antibiofilm effect of trans-cinnamaldehyde on uropathogenic *Escherichia coli*. J Urol. juill 2010;184(1):358-63.
159. Niu C, Afre S, Gilbert ES. Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. Lett Appl Microbiol. nov 2006;43(5):489-94.
160. Amalaradjou MAR, Narayanan A, Venkitanarayanan K. Trans-cinnamaldehyde decreases attachment and invasion of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract epithelial cells by modulating virulence gene expression. J Urol. avr 2011;185(4):1526-31.
161. FDA. U S Food and Drug Administration [En ligne]. 2017 [cité le 13 juill 2017]. Disponible: <https://www.fda.gov/>
162. Bickers D, Calow P, Greim H, Hanifin JM, Rogers AE, Saurat JH, et al. A toxicologic and dermatologic assessment of cinnamyl alcohol, cinnamaldehyde and cinnamic acid when used as fragrance ingredients. Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc. juin 2005;43(6):799-836.
163. Millezi AF, Piccoli RH, Oliveira JM, Pereira MO. Anti-biofilm and Antibacterial Effect of Essential Oils and Their Major Compounds. J Essent Oil Bear Plants. 2016;19(3):624-31.
164. Oliveira MMM de, Brugnera DF, Cardoso M das G, Alves E, Piccoli RH. Disinfectant action of Cymbopogon sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. Food Control. 1 avr 2010;21(4):549-53.
165. Kerekes E-B, Deák É, Takó M, Tserennadmid R, Petkovits T, Vágvölgyi C, et al. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. J Appl Microbiol. oct 2013;115(4):933-42.
166. Budzyńska A, Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Kalembe D, Rózalska B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. Pol J Microbiol. 2011;60(1):35-41.
167. de Oliveira MMM, Brugnera DF, do Nascimento JA, Piccoli RH. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. Food Bioprod Process. 1 oct 2012;90(4):809-18.
168. McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiol Read Engl. déc 1997;143(12):3703-11.

169. Yap PSX, Yiap BC, Ping HC, Lim SHE. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *Open Microbiol J.* 7 févr 2014;8:6-14.
170. Sandasi M, Leonard CM, Viljoen AM. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control.* 1 nov 2008;19(11):1070-5.
171. Suhaga D, Dubey S, Kalia M. anti-biofilm activity of *eucalyptus globulus* oil encapsulated silica nanoparticles against *e. coli* biofilm. *Int J Pharm Sci Res.* 2014;5(11):5013-8.
172. Bachir RG, Benali M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Biomed.* sept 2012;2(9):739-42.
173. Park J-W, Wendt M, Heo G-J. Antimicrobial activity of essential oil of *Eucalyptus globulus* against fish pathogenic bacteria. *Lab Anim Res.* juin 2016;32(2):87-90.
174. Quignard S. Comportement des nanoparticules de silice en milieu biologique : des cellules aux biomatériaux [Thèse de doctorat]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; 2012.
175. Sudjana AN, Carson CF, Carson KC, Riley TV, Hammer KA. *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. *Med Mycol.* nov 2012;50(8):863-70.
176. van der Veen S, Abee T. Dependence of continuous-flow biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e on SOS response factor YneA. *Appl Environ Microbiol.* mars 2010;76(6):1992-5.
177. Sanofi. *Staphylococcus aureus* (staphylocoque doré) [En ligne]. 2015 [cité le 23 juill 2017]. Disponible: <https://www.antibio-responsable.fr/bacteries/staphylocoque-dore>
178. Institut Pasteur. *Staphylocoque aureus* [En ligne]. 2016 [cité le 23 juill 2017]. Disponible: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque>
179. Zapotoczna M, O'Neill E, O'Gara JP. Untangling the Diverse and Redundant Mechanisms of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *PLoS Pathog.* juill 2016;12(7):e1005671.
180. Bhattacharya M, Wozniak DJ, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(12):1499-516.
181. Yadav MK, Chae S-W, Im GJ, Chung J-W, Song J-J. Eugenol: a phyto-compound effective against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilms. *PloS One.* 2015;10(3):e0119564.

182. Devi KP, Nisha SA, Sakthivel R, Pandian SK. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. J Ethnopharmacol. 6 juill 2010;130(1):107-15.
183. Kristinsson KG, Magnusdottir AB, Petersen H, Hermansson A. Effective treatment of experimental acute otitis media by application of volatile fluids into the ear canal. J Infect Dis. 1 juin 2005;191(11):1876-80.
184. Federman C, Ma C, Biswas D. Major components of orange oil inhibit *Staphylococcus aureus* growth and biofilm formation, and alter its virulence factors. J Med Microbiol. juill 2016;65:688-95.
185. Hayes AJ, Markovic B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (*Lemon myrtle*). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc. avr 2002;40(4):535-43.
186. Prashar A, Locke IC, Evans CS. Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. Cell Prolif. juin 2004;37(3):221-9.
187. Queck SY, Jameson-Lee M, Villaruz AE, Bach T-HL, Khan BA, Sturdevant DE, et al. RNAIII-independent target gene control by the agr quorum-sensing system: insight into the evolution of virulence regulation in *Staphylococcus aureus*. Mol Cell. 10 oct 2008;32(1):150-8.
188. Jia P, Xue YJ, Duan XJ, Shao SH. Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lett Appl Microbiol. oct 2011;53(4):409-16.
189. Cheung AL, Zhang G. Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus* by the SarA protein family. Front Biosci J Virtual Libr. 1 août 2002;7:1825-42.
190. Le Loir Y, Gautier M, rédacteurs. *Staphylococcus aureus*. Paris, France : Éd. Tec & doc : Lavoisier; 2009. 299 p.
191. Lagane C. Rôle de l'IL-13 et des ligands de PPAR-gamma dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida Albicans*: implication de PPAR-gamma [Thèse de doctorat]. Toulouse, France : Université Paul Sabatier; 2007.
192. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. Annu Rev Microbiol. 2015;69:71-92.
193. Hsu C-C, Lai W-L, Chuang K-C, Lee M-H, Tsai Y-C. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. Med Mycol. juill 2013;51(5):473-82.

194. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc.* 2008;3(9):1494-500.
195. Nobile CJ, Mitchell AP. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. *Cell Microbiol.* sept 2006;8(9):1382-91.
196. Saville SP, Lazzell AL, Bryant AP, Fretzen A, Monreal A, Solberg EO, et al. Inhibition of filamentation can be used to treat disseminated candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2006;50(10):3312-6.
197. Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* 15 oct 2011;18(13):1181-90.
198. Expert Committee on Food Additives. Evaluation du linalol [En ligne]. 2004 [cité le 25 juill 2017]. Disponible: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_1271.htm
199. Cotter G, Kavanagh K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. *Br J Biomed Sci.* 2000;57(3):241-9.
200. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin Microbiol Rev.* janv 2006;19(1):50-62.
201. Kim DJ, Lee MW, Choi JS, Lee SG, Park JY, Kim SW. Inhibitory activity of hinokitiol against biofilm formation in fluconazole-resistant *Candida* species. *Plos One.* 2 févr 2017;12(2):e0171244.
202. Raut JS, Shinde RB, Chauhan NM, Karuppayil SM. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling.* 2013;29(1):87-96.
203. Cannas S, Mollicotti P, Usai D, Maxia A, Zanetti S. Antifungal, anti-biofilm and adhesion activity of the essential oil of *Myrtus communis* L. against *Candida* species. *Nat Prod Res.* 2014;28(23):2173-7.
204. Ferro TAF, Araújo JMM, dos Santos Pinto BL, dos Santos JS, Souza EB, da Silva BLR, et al. Cinnamaldehyde Inhibits *Staphylococcus aureus* Virulence Factors and Protects against Infection in a *Galleria mellonella* Model. *Front Microbiol.* 21 déc 2016;7.
205. Rai M, Paralikar P, Jogee P, Agarkar G, Ingle AP, Derita M, et al. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles: Emerging trends and future perspectives. *Int J Pharm.* 15 mars 2017;519(1):67-78.

206. Manoharan RK, Lee J-H, Lee J. Antibiofilm and Antihyphal Activities of Cedar Leaf Essential Oil, Camphor, and Fenchone Derivatives against *Candida albicans*. Front Microbiol. 3 août 2017;8:1476.
207. Bazargani MM, Rohloff J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. Food Control. mars 2016;61:156-64.
208. Venkadesaperumal G, Rucha S, Sundar K, Shetty PH. Anti-quorum sensing activity of spice oil nanoemulsions against food borne pathogens. LWT - Food Sci Technol. 1 mars 2016;66:225-31.
209. Vázquez-Sánchez D, Cabo ML, Rodríguez-Herrera JJ. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* biofilms. Food Sci Technol Int Cienc Tecnol Los Aliment Int. déc 2015;21(8):559-70.
210. Espina L, Pagan R, Lopez D, Garcia-Gonzalo D. Individual Constituents from Essential Oils Inhibit Biofilm Mass Production by Multi-Drug Resistant *Staphylococcus aureus*. Molecules. juin 2015;20(6):11357-72.
211. Kifer D, Muzinic V, Klaric MS. Antimicrobial potency of single and combined mupirocin and monoterpenes, thymol, menthol and 1,8-cineole against *Staphylococcus aureus* planktonic and biofilm growth. J Antibiot (Tokyo). sept 2016;69(9):689-96.
212. Burt SA, Ojo-Fakunle VTA, Woertman J, Veldhuizen EJA. The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations. Plos One. 1 avr 2014;9(4):e93414.
213. Ramasamy M, Lee J-H, Lee J. Development of gold nanoparticles coated with silica containing the antibiofilm drug cinnamaldehyde and their effects on pathogenic bacteria. Int J Nanomedicine. 2017;12:2813-28.
214. Nielsen CK, Kjems J, Mygind T, Snabe T, Schwarz K, Serfert Y, et al. Antimicrobial effect of emulsion-encapsulated isoeugenol against biofilms of food pathogens and spoilage bacteria. Int J Food Microbiol. 2 févr 2017;242:7-12.
215. Raut JS, Shinde RB, Chauhan NM, Karuppayil SM. Phenylpropanoids of plant origin as inhibitors of biofilm formation by *Candida albicans*. J Microbiol Biotechnol. sept 2014;24(9):1216-25.
216. Singh S, Fatima Z, Hameed S. Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes. Rev Soc Bras Med Trop. août 2016;49(4):465-72.

217. Al-Shuneigat J, Al-Sarayreh S, Al-Saraireh Y, Al-Qudah M, Al-Tarawneh I. Effects of wild *Thymus vulgaris* essential oil on clinical isolates biofilm-forming bacteria. IOSR J Dent Med Sci. 2014;13:62–66.
218. Lee K, Lee J-H, Kim S-I, Cho MH, Lee J. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. Appl Microbiol Biotechnol. nov 2014;98(22):9447-57.
219. Musthafa KS, Hmoteh J, Thamjarungwong B, Voravuthikunchai SP. Antifungal potential of eugenyl acetate against clinical isolates of *Candida* species. Microb Pathog. oct 2016;99:19-29.
220. Alves-Silva JM, Zuzarte M, Goncalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Cardoso SM, et al. New Claims for Wild Carrot (*Daucus carota* subsp *carota*) Essential Oil. Evid Based Complement Alternat Med. 2016;
221. Husain FM, Ahmad I, Khan MS, Ahmad E, Tahseen Q, Khan MS, et al. Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. Front Microbiol. 13 mai 2015;6.
222. Curvelo J a. R, Marques AM, Barreto ALS, Romanos MTV, Portela MB, Kaplan M a. C, et al. A novel nerolidol-rich essential oil from *Piper clausenianum* modulates *Candida albicans* biofilm. J Med Microbiol. mai 2014;63:697-702.
223. Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J Med Microbiol. 2007;56(4):519-23.
224. Adukwu EC, Allen SCH, Phillips CA. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol. nov 2012;113(5):1217-27.
225. Cardoso NNR, Alviano CS, Blank AF, Romanos MTV, Fonseca BB, Rozental S, et al. Synergism Effect of the Essential Oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and Its Major Components with Fluconazole and Its Influence on Ergosterol Biosynthesis. Evid Based Complement Alternat Med. 2016;
226. Schillaci D, Napoli EM, Cusimano MG, Vitale M, Ruberto G. *Origanum vulgare* subsp *hirtum* Essential Oil Prevented Biofilm Formation and Showed Antibacterial Activity against Planktonic and Sessile Bacterial Cells. J Food Prot. oct 2013;76(10):1747-52.
227. Abu-Darwish MS, Cabral C, Goncalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Paoli M, et al. *Ziziphora tenuior* L. essential oil from Dana Biosphere Reserve (Southern Jordan); Chemical characterization and assessment of biological activities. J Ethnopharmacol. 24 déc 2016;194:963-70.

228. Palmeira-de-Oliveira A, Gaspar C, Palmeira-de-Oliveira R, Silva-Dias A, Salgueiro L, Cavaleiro C, et al. The anti-*Candida* activity of *Thymbra capitata* essential oil: effect upon pre-formed biofilm. J Ethnopharmacol. 27 mars 2012;140(2):379-83.
229. Hovijitra RS, Choonharuangdej S, Srithavaj T. Effect of essential oils prepared from Thai culinary herbs on sessile *Candida albicans* cultures. J Oral Sci. sept 2016;58(3):365-71.
230. Renard J, Ballarini S, Mascarenhas T, Zahran M, Quimper E, Choucair J, et al. Recurrent Lower Urinary Tract Infections Have a Detrimental Effect on Patient Quality of Life: a Prospective, Observational Study. Infect Dis Ther. mars 2015;4(1):125-35.
231. Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA, Hultgren SJ. Detection of Intracellular Bacterial Communities in Human Urinary Tract Infection. PLOS Med. 18 déc 2007;4(12):e329.
232. Soto SM, Smithson A, Horcajada JP, Martinez JA, Mensa JP, Vila J. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Infect. 1 oct 2006;12(10):1034-6.
233. Stamm WE, Norrby SR. Urinary Tract Infections: Disease Panorama and Challenges. J Infect Dis. 1 mars 2001;183(Supplement 1):S1-4.
234. HAS. Cystite aiguë simple, à risque de complication ou récidivante, de la femme [En ligne]. 2016 [cité le 22 août 2017]. Disponible: https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2016-11/v1-fm_cystite_aigue_cd-151116.pdf
235. Comité d'Infectiologie de l'Association Française d'Urologie. Cystites récidivantes : questions aux experts [En ligne]. 2010 [cité le 22 août 2017]. Disponible: <http://www.urofrance.org/fileadmin/documents/data/C3/2010/C3-2010-00110001-1/TEXF-C3-2010-00110001-1.PDF>
236. Charles M. Qu'apporte la notion de biofilm dans l'abord des infections [En ligne]. 2017 [cité le 22 août 2017]. Disponible: <http://pro.groupepileje.fr/IMG/pdf/support-pedagogique-wbc-10112016-biofilm.pdf>
237. Figard A, Michalet S. Intérêt de l'aromathérapie dans les pathologies anxieuses et les troubles du sommeil [Thèse d'exercice]. Lyon, France : Université Claude Bernard Lyon 1; 2017.
238. Oliveira MMM de, Brugnera DF, Nascimento JA do, Batista NN, Piccoli RH. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. Eur Food Res Technol. 1 mai 2012;234(5):821-32.
239. Coelho Oliveira SA, Mina Zambrana JR, Reis Di Iorio FB, Pereira CA, Cardoso Jorge AO. The antimicrobial effects of *Citrus limonum* and *Citrus aurantium* essential oils on multi-species biofilms. Braz Oral Res. mars 2014;28(1):22-7.

240. Yap PSX, Krishnan T, Yiap BC, Hu CP, Chan K-G, Lim SHE. Membrane disruption and anti-quorum sensing effects of synergistic interaction between *Lavandula angustifolia* (lavender oil) in combination with antibiotic against plasmid-conferred multi-drug-resistant *Escherichia coli*. J Appl Microbiol. mai 2014;116(5):1119-28.
241. González-Molina E, Domínguez-Perles R, Moreno DA, García-Viguera C. Natural bioactive compounds of *Citrus limon* for food and health. J Pharm Biomed Anal. 20 janv 2010;51(2):327-45.
242. Hammer KA, Carson CF. Antibacterial and Antifungal Activities of Essential Oils. Dans: Thormar H, rédacteur. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. New York, Etats-Unis d'Amérique : John Wiley & Sons, Ltd; 2011. p. 255-306.
243. Apolónio J, Faleiro ML, Miguel MG, Neto L. No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. FEMS Microbiol Lett. mai 2014;354(2):92-101.
244. Radulović NS, Blagojević PD, Stojanović-Radić ZZ, Stojanović NM. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. Curr Med Chem. 2013;20(7):932-52.
245. Steflitsch W, Steflitsch M. Bacteria cannot Build Up Resistance To Essential Oils. mars 2008;5(1):74-85.
246. Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. Nat Chem Biol. sept 2007;3(9):541-8.
247. Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, et al. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. PLOS Pathog. 21 juill 2011;7(7):e1002158.
248. Becerril R, Nerín C, Gómez-Lus R. Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. Foodborne Pathog Dis. août 2012;9(8):699-705.
249. Ali SM, Khan AA, Ahmed I, Musaddiq M, Ahmed KS, Polasa H, et al. Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 21 déc 2005;4:20-7.
250. Ferrini AM, Mannoni V, Aureli P, Salvatore G, Piccirilli E, Ceddia T, et al. *Melaleuca alternifolia* essential oil possesses potent anti-staphylococcal activity extended to strains resistant to antibiotics. Int J Immunopathol Pharmacol. sept 2006;19(3):539-44.
251. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. In vitro and in vivo activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. J Antimicrob Chemother. mai 2003;51(5):1223-9.

252. Luz I da S, Gomes Neto NJ, Tavares AG, Nunes PC, Magnani M, de Souza EL. Evidence for lack of acquisition of tolerance in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. *Appl Environ Microbiol.* juill 2012;78(14):5021-4.
253. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Essential Oil and the Major Monoterpene Component Terpinen-4-ol on the Development of Single- and Multistep Antibiotic Resistance and Antimicrobial Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2012;56(2):909-15.
254. Thomsen NA, Hammer KA, Riley TV, Van Belkum A, Carson CF. Effect of habituation to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on the subsequent susceptibility of *Staphylococcus* spp. to antimicrobials, triclosan, tea tree oil, terpinen-4-ol and carvacrol. *Int J Antimicrob Agents.* avr 2013;41(4):343-51.
255. McMahon M a. S, Tunney MM, Moore JE, Blair IS, Gilpin DF, McDowell DA. Changes in antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). *Lett Appl Microbiol.* oct 2008;47(4):263-8.
256. McMahon MAS, Blair IS, Moore JE, McDowell DA. Habituation to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) is associated with reduced susceptibility to antibiotics in human pathogens. *J Antimicrob Chemother.* janv 2007;59(1):125-7.
257. Ultee A, Kets EP, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Arch Microbiol.* oct 2000;174(4):233-8.
258. Di Pasqua R, Mamone G, Ferranti P, Ercolini D, Mauriello G. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics.* mars 2010;10(5):1040-9.
259. Turina A del V, Nolan MV, Zygodlo JA, Perillo MA. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. *Biophys Chem.* 20 juill 2006;122(2):101-13.
260. Piątkowska E, Rusiecka-Ziółkowska J. Influence of Essential Oils on Infectious Agents. *Adv Clin Exp Med Off Organ Wroclaw Med Univ.* oct 2016;25(5):989-95.
261. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Antonietta Milillo M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* nov 2007;14(11):727-32.
262. D'Arrigo M, Ginestra G, Mandalari G, Furneri PM, Bisignano G. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* avr 2010;17(5):317-22.

263. Gallucci N, Casero C, Oliva M, Zygodlo J, Demo M. Interaction between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta-lactam antibiotics. *Mol Med Chem.* 2006;10(1):30–2.
264. Palaniappan K, Holley RA. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Int J Food Microbiol.* 15 juin 2010;140(2-3):164-8.
265. Hemaiswarya S, Doble M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine Int J Phytother Phytopharm.* nov 2009;16(11):997-1005.
266. Liu Q, Niu H, Zhang W, Mu H, Sun C, Duan J. Synergy among thymol, eugenol, berberine, cinnamaldehyde and streptomycin against planktonic and biofilm-associated food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 1 mai 2015;60(5):421-30.
267. Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, Berti L, Pagès J-M, Amaral L, et al. Geraniol Restores Antibiotic Activities against Multidrug-Resistant Isolates from Gram-Negative Species. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2009;53(5):2209-11.
268. Stringaro A, Vavala E, Colone M, Pepi F, Mignogna G, Garzoli S, et al. Effects of *Mentha suaveolens* Essential Oil Alone or in Combination with Other Drugs in *Candida albicans*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;
269. Aelenei P, Miron A, Trifan A, Bujor A, Gille E, Aprotosoiaie AC. Essential Oils and Their Components as Modulators of Antibiotic Activity against Gram-Negative Bacteria. *Medicines.* 28 juill 2016;3(3):19.
270. Pemmaraju SC, Pruthi PA, Prasad R, Pruthi V. *Candida albicans* biofilm inhibition by synergistic action of terpenes and fluconazole. *Indian J Exp Biol.* nov 2013;51(11):1032-7.
271. Utcharyiakiat I, Surassmo S, Jaturanpinyo M, Khuntayaporn P, Chomnawang MT. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complement Altern Med.* 1 juin 2016;16:158-65.
272. de Rapper S, Viljoen A, van Vuuren S. The In Vitro Antimicrobial Effects of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combination with Conventional Antimicrobial Agents. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM.* 2016;
273. Magi G, Marini E, Facinelli B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group A Streptococci. *Front Microbiol.* 2015;6.

274. Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum Sensing Inhibitors Increase the Susceptibility of Bacterial Biofilms to Antibiotics In Vitro and In Vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 6 janv 2011;55(6):2655-61.
275. Giongo JL, Vaucher R de A, Fausto VP, Quatrin PM, Soares Lopes LQ, Vianna Santos RC, et al. Anti-*Candida* activity assessment of *Pelargonium graveolens* oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. *Microb Pathog.* nov 2016;100:170-8.
276. Amrutha B, Sundar K, Shetty PH. Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. from fresh fruits and vegetables. *LWT - Food Sci Technol.* juin 2017;79:152-9.
277. Cui H, Li W, Lin L. Bacterial protease-triggered clove oil release from proteoliposomes against *S. aureus* biofilms on dried soybean curd. *Rsc Adv.* 2016;6(41):34833-40.
278. Ribeiro SM, Felício MR, Boas EV, Gonçalves S, Costa FF, Samy RP, et al. New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacol Ther.* 1 avr 2016;160:133-44.
279. Sun L, Zhang C, Li P. Characterization, antibiofilm, and mechanism of action of novel PEG-stabilized lipid nanoparticles loaded with terpinen-4-ol. *J Agric Food Chem.* 20 juin 2012;60(24):6150-6.
280. Landis RF, Gupta A, Lee Y-W, Wang L-S, Golba B, Couillaud B, et al. Cross-Linked Polymer-Stabilized Nanocomposites for the Treatment of Bacteria Biofilms. *Acs Nano.* janv 2017;11(1):946-52.
281. Manju S, Malaikozhundan B, Vijayakumar S, Shanthi S, Jaishabanu A, Ekambaram P, et al. Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic effects of *Nigella sativa* essential oil coated gold nanoparticles. *Microb Pathog.* févr 2016;91:129-35.
282. Hendessi S, Sevinis EB, Unal S, Cebeci FC, Menciloglu YZ, Unal H. Antibacterial sustained-release coatings from halloysite nanotubes/waterborne polyurethanes. *Prog Org Coat.* déc 2016;101:253-61.
283. Bilcu M, Grumezescu AM, Oprea AE, Popescu RC, Mogosanu GD, Hristu R, et al. Efficiency of Vanilla, Patchouli and Ylang Ylang Essential Oils Stabilized by Iron Oxide@C-14 Nanostructures against Bacterial Adherence and Biofilms Formed by *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains. *Molecules.* nov 2014;19(11):17943-56.
284. Chan YW, Siow KS, Ng PY, Gires U, Majlis BY. Plasma polymerized carvone as an antibacterial and biocompatible coating. *Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl.* 1 nov 2016;68:861-71.

285. Bagchi B, Banerjee S, Kool A, Thakur P, Bhandary S, Hoque NA, et al. Synthesis of eucalyptus/tea tree oil absorbed biphasic calcium phosphate-PVDF polymer nanocomposite films: a surface active antimicrobial system for biomedical application. *Phys Chem Chem Phys*. 7 juill 2016;18(25):16775-85.
286. Lou Z, Liu Y, Hong Y, Song X, Wang H, Ai L. Anti-biofilm Activities and Chemical Composition of Essential Oil from Burdock Leaf. *Food Sci Technol Res*. sept 2013;19(5):915-21.
287. Oh SY, Yun W, Lee JH, Lee CH, Kwak WK, Cho JH. Effects of essential oil (blended and single essential oils) on anti-biofilm formation of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J Anim Sci Technol*. 2017;59:4.
288. Lopez-Romero JC, González-Ríos H, Borges A, Simões M. Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM*. 2015;2015:795435.
289. Oral NB, Vatansever L, Aydın BD, Sezer Ç, Güven A, Gülmez M, et al. Effect of Oregano Essential Oil on Biofilms formed by *Staphylococci* and *Escherichia coli*. *J Fac Vet Med Univ Kafkas Kars Turk*. 2010;16:23-9.
290. Alvarez MV, Ortega-Ramirez LA, Melissa Gutierrez-Pacheco M, Thalia Bernal-Mercado A, Rodriguez-Garcia I, Gonzalez-Aguilar GA, et al. Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. *Front Microbiol*. 17 déc 2014;5.
291. Raffaella C, Casettari L, Fagioli L, Cespi M, Bonacucina G, Baffone W. Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *Int J Food Microbiol*. 16 janv 2017;241:132-40.
292. Husain F. Antibacterial and antibiofilm activity of some essential oils and compounds against clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical and Therapeutic Sciences*. nov 2014;1(1):65-71.
293. Al-Shabib NA, Husain FM, Ahmad I, Baig MH. Eugenol inhibits quorum sensing and biofilm of toxigenic MRSA strains isolated from food handlers employed in Saudi Arabia. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2017;31(2):387-96.
294. Ceylan O, Ugur A, Sarac N, Sahin MD. The antimicrobial and antibiofilm activities of *Mentha x piperita* L. essential oil. *J Biosci Biotechnol*. 2014;23-7.
295. Cui H, Zhou H, Lin L. The specific antibacterial effect of the Salvia oil nanoliposomes against *Staphylococcus aureus* biofilms on milk container. *Food Control*. mars 2016;61:92-8.

296. Abu-Darwish MS, Cabral C, Goncalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Zulfiqar A, et al. Chemical composition and biological activities of *Artemisia judaica* essential oil from southern desert of Jordan. J Ethnopharmacol. 15 sept 2016;191:161-8.
297. Trindade LA, Oliveira J de A, de Castro RD, Lima E de O. Inhibition of adherence of *C-albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. Clin Oral Investig. déc 2015;19(9):2223-31.
298. Khan MSA, Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. J Ethnopharmacol. 27 mars 2012;140(2):416-23.
299. Budzynska A, Sadowska B, Wieckowska-Szakiel M, Rozalska B. Enzymatic profile, adhesive and invasive properties of *Candida albicans* under the influence of selected plant essential oils. Acta Biochim Pol. 2014;61(1):115-21.
300. Madeira PLB, Carvalho LT, Paschoal MAB, de Sousa EM, Moffa EB, dos Santos da Silva MA, et al. In vitro Effects of Lemongrass Extract on *Candida albicans* Biofilms, Human Cells Viability, and Denture Surface. Front Cell Infect Microbiol. 28 juin 2016;6:71.
301. De Toledo LG, Dos Santos Ramos MA, Sposito L, Castilho EM, Pavan FR, Lopes EDO, et al. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. Int J Mol Sci. août 2016;17(8).
302. Peixoto LR, Rosalen PL, Silva Ferreira GL, Freires IA, de Carvalho FG, Castellano LR, et al. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. Arch Oral Biol. janv 2017;73:179-85.
303. de Campos Rasteiro VM, da Costa ACBP, Araújo CF, de Barros PP, Rossoni RD, Anbinder AL, et al. Essential oil of *Melaleuca alternifolia* for the treatment of oral candidiasis induced in an immunosuppressed mouse model. BMC Complement Altern Med. 15 déc 2014;14:489-99.
304. Sharifzadeh A, Khosravi AR, Ahmadian S. Chemical composition and antifungal activity of *Satureja hortensis* L. essential oil against planktonic and biofilm growth of *Candida albicans* isolates from buccal lesions of HIV+ individuals. Microb Pathog. juill 2016;96:1-9.

3 Annexes :

3.1 Tableau 8 : tableau de synthèse des HE et composés possédant une activité à l'encontre des biofilms d'*E. coli*.

HE et/ou molécule(s) testée(s)	Mécanisme d'action et/ou activité	Concentrations ou volumes testés efficaces	Efficacité	Ref
Allicine	-inhibition de la formation de biofilm -inhibition de l'adhésion des UPEC -Inhibition compétitive des pili de type 1 -Diminution de la production des adhésines fimH -induction de la dispersion du biofilm -Limitation de l'expansion des biofilms -Diminution de la synthèse du système à 2 composants BarA/UvrY -Augmentation de la synthèse de la protéine CsrA	12 à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ - 25 et 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 12 à 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 25 et 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 25 et 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	17 à 33 % d'inhibition 26 et 54 % d'inhibition - 54 à 77 % d'inhibition 25 à 40 % d'inhibition $\approx$ 50 % d'inhibition 32 % de diminution 230 % d'augmentation	(85)
Alpha-pinène	-inhibition de la formation de biofilm	0,5 $\mu\text{l.mL}^{-1}$	55 % d'inhibition	(165)
Arctium lappa	-inhibition de la formation de biofilm	31,25 à 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	40 à 100 % d'inhibition	(286)
Carvacrol	-diminution de la formation de biofilm et altération de la structure tridimensionnelle	CMI/2	-	(287)
Carvéol	-réduction de la production de biomasse du biofilm lors de sa croissance -réduction de l'activité métabolique du biofilm lors de sa	50 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 50 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	31 à 46 % d'inhibition 35 à 50 % d'inhibition	(143)

	croissance -diminution de la biomasse du biofilm préétabli -réduction de l'activité métabolique de biofilm préétabli -bactéricidie sur les bactéries sessiles de biofilm préétabli -diminution de formation de biofilm par augmentation de l'hydrophilie de surface d' <i>E. coli</i>	400 à 2000 µg.mL ⁻¹ 400 à 2000 µg.mL ⁻¹ 400 à 2000 µg.mL ⁻¹ -	≈ 53 % d'inhibition ≈ 60 % d'inhibition Réduit de 0,8 à 1,7 log UFC -	(288)
Carvone	-réduction de la production de biomasse du biofilm lors de sa croissance -réduction de l'activité métabolique du biofilm lors de sa croissance -diminution de la biomasse du biofilm préétabli -réduction de l'activité métabolique de biofilm préétabli -bactéricidie sur les bactéries sessiles de biofilm préétabli -diminution de formation de biofilm par augmentation de l'hydrophilie de surface d' <i>E. coli</i>	50 et 100 µg.mL ⁻¹ 50 et 100 µg.mL ⁻¹ 400 à 2000 µg.mL ⁻¹ 400 à 2000 µg.mL ⁻¹ 400 à 2000 µg.mL ⁻¹ -	48 à 60 % d'inhibition 21 à 30 % d'inhibition 43 à 65 % d'inhibition ≈ 50 % d'inhibition Réduit de 0,9 à 2,2 log UFC -	(143) (288)
Cinnamomum cassia	-inactivation de biofilms préétablis sur polystyrène et acier inoxydable seule ou en combinaison avec <i>C. flexuosus</i> -bactéricidie sur les bactéries sessiles de biofilm préétabli - bactéricidie sur les bactéries sessiles d'un biofilm mixte préétabli en présence de <i>L. monocytogenes</i>	1 % au total 0,15 à 1 % 0,15 à 1 %	≈ 90 % d'inhibition 80 à 100 % d'inhibition 96 à 100 % de réduction	(167) (238)
Cinnamomum	-activité bactéricide sur les bactéries sessiles du biofilm en	0,12 à 0,96 %	Réduit de 3 à 4 log les UFC	(163)

<i>zeylanicum</i>	croissance -diminution de la production de la biomasse du biofilm lors de sa croissance	0,12 à 0,96 %	≈ 95 % d'inhibition	
Citronnelal	- réduction de la production de biomasse du biofilm lors de sa croissance	75 et 150 µg.mL ⁻¹	72 à 83 % d'inhibition	(143)
	- réduction de l'activité métabolique du biofilm lors de sa croissance	75 et 150 µg.mL ⁻¹	≈ 77 % d'inhibition	
	- diminution de la biomasse du biofilm préétabli	600 à 3000 µg.mL ⁻¹	≈ 62 % d'inhibition	
	- réduction de l'activité métabolique de biofilm préétabli -bactéricidie sur les bactéries sessiles de biofilm préétabli	600 à 3000 µg.mL ⁻¹ 600 à 3000 µg.mL ⁻¹	≈ 74 % d'inhibition Réduit de 2,3 à 5,6 log UFC	
Citronnelol	-réduction de la production de biomasse du biofilm lors de sa croissance	1,25 et 2,5 µg.mL ⁻¹	85 à 90 % d'inhibition	(143)
	-réduction de l'activité métabolique du biofilm lors de sa croissance	1,25 et 2,5 µg.mL ⁻¹	81 à 85 % d'inhibition	
	-diminution de la biomasse du biofilm préétabli	10 à 50 µg.mL ⁻¹	59 à 67 % d'inhibition	
	-haute réduction de l'activité métabolique de biofilm préétabli	10 à 50 µg.mL ⁻¹	≈ 73 % d'inhibition	
	-bactéricidie sur les bactéries sessiles de biofilm préétabli	10 à 50 µg.mL ⁻¹	Réduit de 0,6 à 4,8 log UFC	
	-diminution de formation de biofilm par augmentation de l'hydrophilie de surface d' <i>E. coli</i>	-	-	
<i>Citrus aurantium</i>	-bactéricidie sur les bactéries sessiles d'un biofilm mixte en présence de <i>C. albicans</i> et <i>E. faecalis</i>	2 mL	100 % d'inhibition	(239)

Citrus limon	-inhibition de la formation de biofilm	2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	76 % d'inhibition	(165)
	-inhibition de la formation de biofilm mixte avec <i>P. putida</i> -inhibition du QS -bactéricidie sur les bactéries sessiles d'un biofilm mixte en présence de <i>C. albicans</i> et <i>E. faecalis</i>	2 à 12 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 2 et 3 μL 2 mL	75 à 80 % d'inhibition 0,5 à 1 mm d'inhibition 100 % d'inhibition	(239)
Coriandrum sativum	-inhibition de l'adhésion bactérienne	1,6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	72,3 % d'inhibition	(207)
	-inhibition de la formation de biofilm	1,6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	100 % d'inhibition	
	-réduction de l'activité métabolique du biofilm en croissance	1,6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	86 % de réduction	
Cuminum cyminum (nanoémulsion)	-inhibition du QS	30 et 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	$\approx$ 60 à 70 % d'inhibition	(208)
	-inhibition de la formation de biofilm	30 et 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	20 à 45 % d'inhibition	
	-inhibition de la production de polysaccharides extracellulaires	30 et 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	$\approx$ 12 à 23 % d'inhibition	
Cymbopogon flexuosus	-inactivation de biofilms préétablis, HE seule ou en combinaison avec <i>C. cassia</i>	1 % au total	$\approx$ 65 % d'inhibition seule et $\approx$ 41 % d'inhibition combinée	(167)
Cymbopogon martini	-activité bactéricide sur les bactéries sessiles du biofilm en croissance	0,12 à 0,96 %	Réduit de 2 à 3 log les UFC	(163)
	-diminution de la production de la biomasse du biofilm lors de sa croissance	0,12 à 0,96 %	$\approx$ 95 % d'inhibition	
Eucalyptus globulus	-inhibition de la formation de biofilm	50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	62 % d'inhibition libre et 81 % d'inhibition encapsulée	(171)
Eugénol	-diminution de la production de la biomasse du biofilm lors de sa croissance	1,56 %	98 % d'inhibition	(163)

	-activité bactéricide sur les bactéries sessiles du biofilm en croissance	1,56 %	Réduction de 1,9 log UFC	
<i>Foeniculum vulgare</i> (nanoémulsion)	-inhibition du QS -inhibition de la formation de biofilm -inhibition de la production de polysaccharides extracellulaires	30 et 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 30 et 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 30 et 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	≈ 33 à 50 % d'inhibition ≈ 15 à 28 % d'inhibition ≈ 15 à 28 % d'inhibition	(208)
Géraniol	-diminution de la production de la biomasse du biofilm lors de sa croissance -activité bactéricide sur les bactéries sessiles du biofilm en croissance	1,56 % 1,56 %	≈ 95 % d'inhibition Réduit de 1,6 log les UFC	(163)
<i>Juniperus communis</i>	-inhibition de la formation de biofilm -inhibition du QS	1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 2 et 3 μL	33 % d'inhibition 10 et 20 mm d'inhibition	(165)
<i>Lavandula angustifolia</i>	-inhibition du QS médié par la 3-oxo-C12-HSL -inhibition de 90 % l'activité métabolique d'un biofilm préformé	0,01 à 0,05 % 0,19 à 1,52 %	≈ 90 % d'inhibition 1 à 4 h de temps de contact	(240) (166)
Limonène	-inhibition de la formation de biofilm	3 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	69 % d'inhibition	(165)
Linalol	-inhibition de la formation de biofilm -inhibition du QS	1,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 1 à 3 μL	69 % d'inhibition 10 à 20 mm d'inhibition	(165)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	-activité bactéricide sur les bactéries sessiles du biofilm en croissance -diminution de la production de la biomasse du biofilm lors de sa croissance -inhibition de 90 % l'activité métabolique d'un biofilm préformé	0,48 et 0,96 % 0,12 à 0,96 % 0,19 à 1,52 %	réduit de 1 à 1,8 log les UFC ≈ 95 % d'inhibition 1 à 4 h de temps de contact	(163) (166)

Melissa officinalis	-inhibition de 90 % l'activité métabolique d'un biofilm préformé	0,048 à 0,384 %	4 à 24 h de temps de contact	(166)
Mentha x piperita	-inhibition de l'adhésion bactérienne -inhibition de la formation de biofilm -réduction de l'activité métabolique du biofilm en croissance -inhibition par l'HE complète du QS chez <i>C. violaceum</i>	6,3 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 6,3 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 6,3 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 0,012 à 0,1 %	98,4 % d'inhibition 81 % d'inhibition 68,5 % de réduction 40 à 83 % d'inhibition	(207) (221)
Origanum majorana	-inhibition de la formation de biofilm mixte avec <i>P. putida</i> -inhibition du QS	0,25 à 2 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 1 à 3 μL	50 à 97 % d'inhibition 10 à 20 mm d'inhibition	(165)
Origanum onites (CT carvacrol)	-inhibition de la formation de biofilm -blocage de la croissance de biofilms préétablis	0,025 à 0,1 % 0,1 %	44 à 80,5 % d'inhibition -	(289)
Origanum vulgare (CT carvacrol)	-inhibition de la production de violacéine chez <i>C. violaceum</i> par perturbation du QS	15,6 à 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	55 à 98 % d'inhibition	(290)
Pimpinella anisum	-inhibition de l'adhésion bactérienne -inhibition de la formation de biofilm -réduction de l'activité métabolique du biofilm en croissance	12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 12,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	56,2 % d'inhibition 17,4 d'inhibition 63,2 % de réduction	(207)
Piper nigrum (nanoémulsion)	-inhibition du QS -inhibition de la formation de biofilm -inhibition de la production de polysaccharides extracellulaires	30 et 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 30 et 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 30 et 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	$\approx$ 23 à 50 % d'inhibition $\approx$ 17 à 28 % d'inhibition $\approx$ 5 à 15 % d'inhibition	(208)
Sabinène	-réduction de la production de biomasse du biofilm lors de sa croissance	312,5 et 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	52 à 65 % d'inhibition	(143)

	-réduction de l'activité métabolique du biofilm lors de sa croissance -diminution de la biomasse du biofilm préétabli -réduction de l'activité métabolique du biofilm préétabli -bactéricidie sur les bactéries sessiles du biofilm préétabli	312,5 et 625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 2500 à 12500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 2500 à 12500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 2500 à 12500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	48 à 54 % d'inhibition 53 à 65 % d'inhibition 29 à 76 % d'inhibition 66 à 100 % de diminution	
Salvia sclarea	-inhibition de la formation de biofilm -inhibition du QS	1 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ 1 à 3 μL	48 % d'inhibition 10 à 25 mm d'inhibition	(165)
Terpinène-4-ol	-inhibition de la formation de biofilm -inhibition du QS -diminution de la production de la biomasse du biofilm	1 $\mu\text{l.mL}^{-1}$ 2 et 3 μL 1,56 %	38 % d'inhibition 15 et 20 mm d'inhibition 96 % d'inhibition	(165) (163)
Thymol	-diminution de la formation de biofilm et altération de la structure tridimensionnelle	CMI/2	-	(287)
Thymus vulgaris CT thymol	-inhibition de la formation de biofilm	0,125 %	100 % d'inhibition	(217)
Trans-Cinnamaldéhyde	-activité bactéricide sur les bactéries sessiles du biofilm en croissance -bactéricidie sur les bactéries sessiles de biofilm préétabli -diminution de l'adhésion aux cellules épithéliales vésicales - diminution de l'invasion des cellules épithéliales vésicales -diminution de la synthèse des adhésines fimA, fimH, sfaA, focA et papG.	0,1 à 0,5 % 1 à 1,5 % 750 μM 560 et 750 μM 560 et 750 μM	Réduit de 5 à 7 log les UFC 100 % d'inhibition 18 % d'inhibition 26 à 50 % d'inhibition 2 à 11 fois moins de synthèse	(158) (160)

	-brouillage du QS en diminuant la synthèse de la 3-oxo-C6-homosérine lactone	100 à 200 μM	40 à 70 % d'inhibition	(159)
	-bactéricidie sur les bactéries sessiles de biofilm préétabli	0,11 à 0,8 %	80 à 100 % de réduction	(238)
	- bactéricidie sur les bactéries sessiles d'un biofilm mixte préétabli en présence de <i>L. monocytogenes</i>	0,11 à 0,8 %	95 à 100 % de réduction	

3.2 Tableau 9 : tableau de synthèse des HE et composés possédant une activité à l'encontre des biofilms de *S. aureus*.

HE et/ou molécule(s) testée(s)	Mécanisme d'action et/ou activité	Concentrations ou volumes testés efficaces	Efficacité	Ref
<i>Arctium lappa</i>	-inhibition de la formation de biofilm	31,25 à 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	33 à 100 % d'inhibition	(286)
<i>Cananga odorata</i>	-inhibition de la formation de biofilm	0,005 à 0,05 %	59 à 93 % d'inhibition	(218)
Carvacrol	-inhibition de la formation de biofilm	0,5 à 1,25 mM	33 à 100 % d'inhibition	(212)
		0,0039 à 0,0155 %	17 à 97 % d'inhibition	(223)
		0,01 %	33 à 82 % d'inhibition	(210)
	-inhibition de la croissance de biofilms préformés	0,031 à 0,125 %	100 % d'inhibition (=CMIB)	(223)
	-éradication de biofilms préformés	0,125 à 0,5 %	100 % d'inhibition (=CMEB)	
Carvéol	-diminution de la biomasse du biofilm préétabli	4 à 20 mg.mL^{-1}	55 à 68 % d'inhibition	(143)
	-réduction de l'activité métabolique du biofilm préétabli	4 à 20 mg.mL^{-1}	75 à 78 % d'inhibition	
	-bactéricidie sur les bactéries sessiles du biofilm préétabli	4 à 20 mg.mL^{-1}	Réduit 0,9 à 2,2 log les UFC	
Carvone	-réduction de l'activité métabolique du biofilm préétabli	4 et 8 mg.mL^{-1}	38 à 42 % d'inhibition	(143)
	-bactéricidie sur les bactéries sessiles du biofilm préétabli	2 à 8 mg.mL^{-1}	Réduit 2,8 à 3,75 log les UFC	

<i>Cinnamomum cassia</i> (microémulsion)	-bactéricidie sur les bactéries de biofilm préformé -éradication du biofilm préformé	2,5 % 2,5%	>3 log UFC/cm ² de réduction 14 à 60 % d'éradication	(291)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	-activité bactéricide sur les bactéries sessiles du biofilm en croissance -diminution de la production de la biomasse du biofilm lors de sa croissance	0,12 à 0,96 % 0,48 et 0,96 %	réduit de 1,8 à 3,2 log les UFC ≈ 63 à 80 % d'inhibition	(163)
Citral	-inhibition de biofilm préétabli -diminue l'adhérence aux cellules épithéliales mammaires bovines -inhibe l'invasion des cellules épithéliales mammaires bovines -réduit l'expression des gènes de virulences <i>agrA</i> , <i>sodA</i> , <i>sirA</i> , <i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>spa</i> , <i>sbi</i> , <i>sarA</i> , <i>sarR</i> , <i>sarS</i> , <i>sigB</i> -CMI à l'encontre des bactéries sessiles -inhibition de la formation de biofilm	0,02 à 0,08 % 0,02 et 0,04 % 0,02 et 0,04 % 0,02 et 0,04 % 3,2 à 6,4 % 0,02 %	≈ 13 à 28 % d'inhibition Réduit de 3,6 à 3,8 log les UFC Réduit de 3,7 à 4 log les UFC ≈ 4 fois moins d'expression - 0 à 65 % d'inhibition	(184) (292) (210)
Citronellal	-diminution de la biomasse du biofilm préétabli -réduction de l'activité métabolique du biofilm préétabli -bactéricidie sur les bactéries sessiles du biofilm préétabli	0,8 à 4 mg.mL ⁻¹ 0,8 à 4 mg.mL ⁻¹ 0,8 à 4 mg.mL ⁻¹	52 à 69 % d'inhibition 70 % d'inhibition Réduit 0,8 à 3,3 log les UFC	(143)
Citronellol	-diminution de la biomasse du biofilm préétabli -réduction de l'activité métabolique du biofilm préétabli -bactéricidie sur les bactéries sessiles du biofilm préétabli	0,75 à 3,75 mg.mL ⁻¹ 0,75 à 3,75 mg.mL ⁻¹ 0,75 à 3,75 mg.mL ⁻¹	59 à 72 % d'inhibition 75 à 78 % d'inhibition Réduit 1,3 à 3,1 log les UFC	(143)

<i>Commiphora myrrha</i>	-inhibition de la formation de biofilm	0,005 à 0,05 %	59 à 95 % d'inhibition	(218)
<i>Coriandrum sativum</i>	-inhibition de l'adhésion bactérienne -inhibition de la formation de biomasse du biofilm -réduction de l'activité métabolique du biofilm en croissance	0,8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 0,8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ 0,8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	100 % d'inhibition 91 % d'inhibition 71,5 % de réduction	(207)
<i>Cuminum cyminum</i>	-bactéricidie à l'encontre des bactéries d'un biofilm préformé	0,75 à 8 %	Réduit $\approx$ 0,5 à 3 log les UFC	(209)
<i>Cymbopogon citratus</i>	-CMI à l'encontre des bactéries sessiles -bactéricidie à l'encontre des bactéries d'un biofilm préformé	0,8 à 1,6 % 0,25 à 8 %	- Réduit $\approx$ 0,5 à 3 log les UFC	(292) (209)
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	-inhibition de la croissance du biofilm -inhibition de l'activité métabolique de biofilms préformés -bactéricidie sur les bactéries de biofilms préformés	0,06 et 0,125 % 0,06 à 0,25 % 0,125 à 4 %	100 % d'inhibition (=CMIB) 65 à 100 % d'inhibition 100 % d'éradication	(224)
<i>Cymbopogon martini</i>	-bactéricidie à l'encontre des bactéries d'un biofilm préformé -activité bactéricide sur les bactéries sessiles du biofilm en croissance -diminution de production de biomasse du biofilm en croissance	0,25 à 8 % 0,48 et 0,96 %	Réduit $\approx$ 0,5 à 1,5 log les UFC Réduit de 3,1 à 4,1 log les UFC 68 à 85 % d'inhibition	(209) (163)
<i>Cymbopogon nardus</i>	-CMI à l'encontre des bactéries sessiles -bactéricidie à l'encontre des bactéries d'un biofilm préformé	1,6 à 3,2 % 0,1 à 8 %	- Réduit $\approx$ 1 à 3,5 log les UFC	(292) (209)
Eugenol	-inhibition de la formation de biofilm de SARM et SASM	0,01 à 0,08 % 0,2 à 12,8 %	$\approx$ 20 à 94 % d'inhibition 20 à 96 % d'inhibition	(181) (292)

Limonène	-inhibition de la formation de biofilm	0,2 %	11 à 78 % d'inhibition	(210)
Linalol	-inhibition de biofilm préétabli	0,12 à 0,48 %	≈ 23 à 34 % d'inhibition	(184)
	-diminue l'adhérence aux cellules épithéliales mammaires bovines	0,12 %	Réduit de 3,8 log les UFC	
	-inhibe l'invasion des cellules épithéliales mammaires bovines	0,12 %	Réduit de 4 log les UFC	
	-réduit l'expression des gènes de virulences <i>agrA</i> , <i>sirA</i> , <i>hla</i> , <i>hly</i> , <i>spa</i> , <i>sbi</i> , <i>sarA</i> , <i>sarR</i> , <i>sarS</i>	0,12 %	≈ 4 fois moins d'expression	
	-Réduit l'expression des gènes impliqués dans la formation de biofilm <i>icaA</i> , <i>icaB</i> , <i>fbxB</i> , <i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>cbps</i>	0,12 %	≈ 2 à 3 fois moins d'expression	
Melaleuca alternifolia	-activité bactéricide sur les bactéries sessiles du biofilm en croissance	0,96 %	réduit de 1,7 log les UFC	(163)
	-diminution de la production de la biomasse du biofilm lors de sa croissance	0,48 et 0,96 %	≈ 60 % d'inhibition	(166)
	-inhibition de l'activité métabolique d'un biofilm préformé	0,39 à 3,12 %	68 à 95 % d'inhibition	
Melissa officinalis	-inhibition l'activité métabolique d'un biofilm préformé	0,097 % à 0,78 %	17 à 93 % d'inhibition	(166)
Mentha x piperita	-inhibition de la formation de biofilm	0,005 à 2,5 %	5 à 62 % d'inhibition	(294)
	-inhibition de l'adhésion bactérienne	3,1 µL.mL ⁻¹	74,7 % d'inhibition	(207)
	-inhibition de la formation de biomasse du biofilm	3,1 µL.mL ⁻¹	67,5 % d'inhibition	
	-réduction de l'activité métabolique du biofilm en croissance	3,1 µL.mL ⁻¹	52,7 % de réduction	
Nérolidol (cis)	-inhibition de la formation de biofilm	0,001 à 0,01 %	39 à 86 % d'inhibition	(218)

<i>Nigella sativa</i>	-diminution du pourcentage d'hydrophobicité de la surface de <i>S. aureus</i> -inhibition de la formation de biofilm dose dépendant	80 µg.mL ⁻¹ 20 à 80 µg.mL ⁻¹	78 % de diminution -	(281)
<i>Origanum vulgare</i>	-inhibition de la croissance de biofilms préformés -éradication de biofilms préformés -inhibition de la formation de biofilm	0,25 à 0,5 % 0,5 à 1 % 0,0078 à 0,063 % 50 à 200 µg.mL ⁻¹	100 % d'inhibition (=CMIB) 100 % d'inhibition (=CMEB) 9 à 94 % d'inhibition 15 à 75 % d'inhibition	(223) (226)
<i>Perlargonium graveolens</i>	-bactéricidie à l'encontre des bactéries d'un biofilm préformé	0,50 à 8 %	Réduit ≈ 0,5 à 3 log les UFC	(209)
<i>Pimpinella anisum</i>	-inhibition de l'adhésion bactérienne -inhibition de la formation de biomasse du biofilm -réduction de l'activité métabolique du biofilm en croissance	3,1 µL.mL ⁻¹ 3,1 µL.mL ⁻¹ 3,1 µL.mL ⁻¹	90,3 % d'inhibition 88,5 d'inhibition 72,6 % de réduction	(207)
<i>Piper nigrum</i>	-inhibition de la formation de biofilm -répression de l'expression de certains gènes de virulence (<i>hla</i>) et impliqués dans la formation de biofilm (<i>nuc1</i> , <i>nuc2</i> , <i>sarA</i>)	0,005 à 0,05 % 0,01 %	51 à 93 % d'inhibition 4 à 10 fois moins d'expression	(218)
<i>Pogostemon patchouli</i>	-bactéricidie à l'encontre des bactéries d'un biofilm préformé	0,1 à 8 %	Réduit ≈ 1 à 4 log les UFC	(209)
Sabinène	-diminution de la biomasse du biofilm préétabli -réduction de l'activité métabolique du biofilm préétabli -bactéricidie sur les bactéries sessiles du biofilm préétabli	6 à 30 mg.mL ⁻¹ 6 à 30 mg.mL ⁻¹ 6 à 30 mg.mL ⁻¹	49 à 70 % d'inhibition 52 à 78 % d'inhibition Réduit 1,1 à 1,6 log les UFC	(143)
<i>Salvia officinalis</i>	-bactéricidie sur les bactéries de biofilm préformé	2,5 %	>3 log UFC/cm ² de réduction	(291)

(microémulsion)	-éradication du biofilm préformé	2,5%	25 à 68 % d'éradication	
<i>Syzygium aromaticum</i>	-CMI à l'encontre des bactéries sessiles	1,6 à 3,2 %	-	(292)
Terpinène-4-ol	-diminution de la production de la biomasse du biofilm	1,56 %	50 % d'inhibition	(163)
Thymol	-inhibition de la formation de biofilm	0,0039 à 0,031 %	23 à 97 % d'inhibition	(223)
	-inhibition de la croissance de biofilms préformés	0,062 à 0,125 %	100 % d'inhibition (=CMIB)	
	-éradication de biofilms préformés	0,125 à 0,25 %	100 % d'inhibition (=CMEB)	
	-bactéricidie à l'encontre des bactéries de biofilm préformé	0,25 à 2 mg.mL ⁻¹ 0,25 à 2 mg.mL ⁻¹	6 à 100 % d'éradication Réduit ≈ 1 à 5 log UFC	(295)
<i>Thymus vulgaris</i>	-CMI à l'encontre des bactéries sessiles	0,8 à 1,6 %	-	(292)
	-inhibition de la formation de biofilm de SARM et SASM	0,2 à 12,8 %	7 à 88 % d'inhibition	
	-bactéricidie à l'encontre des bactéries d'un biofilm préformé	0,1 à 8 %	Réduit ≈ 1 à 4 log les UFC	(209)
	-bactéricidie à l'encontre des bactéries d'un biofilm préformé en présence de CSI	0,02 à 0,04 %	Réduit de ≈ 1 à 5,5 log les UFC	
Trans-cinnamaldéhyde	-inhibition de l'activité métabolique de biofilm préformé	0,031 à 0,625 %	40 à + de 95 % d'inhibition	(188)
	-bactéricidie sur les bactéries de biofilm préformé	0,031 à 0,625 %	Réduit ≈ 1,6 à 6 log les UFC	
	-inhibition de l'expression de <i>sarA</i>	0,031 et 0,0625 %	130 à 140 fois moins ou 6 fois plus d'expression selon les souches	
	-CMI à l'encontre des bactéries sessiles	0,8 à 1,6 %	-	(292)
	-inhibition de la formation de biofilm	0,025 %	44 à 80 % d'inhibition	(213)

	-inhibition de la formation de biofilm par des nanoparticules d'or enveloppées de silice contenant le TC -inhibition de l'adhésion initiale sur le latex	0,0005 à 0,025 % 0,063 à 0,25 mg.mL ⁻¹	30 à 97 % d'inhibition 44,7 à 94,2 % d'inhibition	(204)
<i>Vetiveria ziznioides</i>	-bactéricidie à l'encontre des bactéries d'un biofilm préformé	0,50 à 8 %	Réduit ≈ 0,5 à 1,7 log les UFC	(209)

3.3 Tableau 10 : tableau de synthèse des HE et composés possédant une activité à l'encontre des biofilms de *C. albicans*.

HE et/ou molécule(s) testée(s)	Mécanisme d'action et/ou activité	Concentrations ou volumes testés efficaces	Efficacité	Ref
Acétate d'eugényl	-inhibition de la formation de tube germinatif -inhibition de l'adhérence sur kératinocytes humains -inhibition de la formation de biofilm	0,0125 et 0,00625 % 0,0125 et 0,025 % 0,0125 et 0,025 %	25 à 73 % d'inhibition 37,5 et 72 % d'inhibition 48 et 56 % d'inhibition	(219)
Acétate de géranyl	-inhibition de la formation de tube germinatif -inhibition de formation du biofilm	0,125 à 2 mg.mL ⁻¹ 1 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 60 % d'inhibition ≈ 10 à 20 % d'inhibition	(202)
Alcool p-anisique	-inhibition de l'adhésion des levures -inhibition de la formation de tube germinatif -inhibition de la formation de biofilm -inhibition de biofilm préformé	0,062 à 4 mg.mL ⁻¹ 0,031 à 1 mg.mL ⁻¹ 0,125 à 4 mg.mL ⁻¹ 0,5 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 25 à 85 % d'inhibition ≈ 40 à 100 % d'inhibition ≈ 10 à 90 % d'inhibition ≈ 20 à 90 % d'inhibition	(215)
Aldéhyde salicylique	-inhibition de l'adhésion des levures -inhibition de la formation de tube germinatif -inhibition de la formation de biofilm	0,062 à 4 mg.mL ⁻¹ 0,031 à 0,25 mg.mL ⁻¹ 0,062 à 2 mg.mL ⁻¹	≈ 40 à 95 % d'inhibition ≈ 45 à 100 % d'inhibition ≈ 40 à 100 % d'inhibition	(215)

	-inhibition de biofilm préformé	0,5 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 45 à 100 % d'inhibition	
Anisaldéhyde	-inhibition de l'adhésion des levures	0,062 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 30 à 100 % d'inhibition	(215)
	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,25 à 2 mg.mL ⁻¹	≈ 35 à 100 % d'inhibition	
	-inhibition de la formation de biofilm	0,125 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 15 à 100 % d'inhibition	
	-inhibition de biofilm préformé	1 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 20 à 100 % d'inhibition	
Artemisia judaica	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,04 à 1,25 µl.mL ⁻¹	23 à 100 % d'inhibition	(296)
	-réduction de biofilm préformé	0,32 à 2,5 µl.mL ⁻¹	16 à 42 % de réduction	
		0,32 à 2,5 µl.mL ⁻¹	16 à 56 % de réduction	
Béta-citronellol	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,031 à 0,125 mg.mL ⁻¹	≈ 50 à 100 % d'inhibition	(202)
	-inhibition de formation du biofilm	0,5 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 25 à 95 % d'inhibition	
	-inhibition du biofilm préformé	0,5 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 20 à 90 % d'inhibition	
Béta-ionone	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,031 à 0,125 mg.mL ⁻¹	≈ 70 à 100 % d'inhibition	(202)
	-inhibition de formation du biofilm	0,125 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 20 à 80 % d'inhibition	
	-inhibition du biofilm préformé	0,25 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 90 % d'inhibition	
Camphre	-inhibition de la formation de biofilm	0,001 à 0,01 %	24 à 90 % d'inhibition	(206)
	-réduction de l'activité métabolique du biofilm en croissance	0,005 et 0,01 %	39 à 76 % d'inhibition	
	-effet bactéricide sur les cellules du biofilm en croissance	0,005 et 0,01 %	71 à 92 % de réduction	
	-réduction de l'expression des gènes spécifiques de la formation d'hyphes, des gènes d'adhésion et de formation du biofilm	0,01 %	Jusqu'à 11 fois moins d'expression pour certains	
Carvacrol	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,031 à 0,125 mg.mL ⁻¹	≈ 60 à 100 % d'inhibition	(202)
	-inhibition de formation du biofilm	0,25 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 20 à 100 % d'inhibition	

	-inhibition du biofilm préformé	0,5 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 20 à 100 % d'inhibition	
Carvone	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,031 à 0,5 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 100 % d'inhibition	(202)
	-inhibition de formation du biofilm	0,062 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 100 % d'inhibition	
Cedrus libani	-inhibition de la formation de biofilm	0,005 à 0,1 %	81 à ≈ 100 % d'inhibition	(206)
Cinnamomum zeylanicum	-inhibition de l'adhérence des levures	0,005 et 0,02 %	50 et 90 % d'inhibition	(229)
	-inhibition du biofilm préformé	0,01 et 0,039 %	50 et 90 % d'inhibition	
cis,trans-Nérolidol	-inhibition de la formation du tube germinatif	0,062 à 0,5 %	72,7 à 98,9 % d'inhibition	(222)
	-inhibition de biofilm préformé	0,06 à 1 %	46,1 à 76,1 % d'inhibition	
Citral	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,031 à 0,125 mg.mL ⁻¹	≈ 60 à 100 % d'inhibition	(202)
	-inhibition de formation du biofilm	0,5 à 2 mg.mL ⁻¹	≈ 25 à 100 % d'inhibition	
	-inhibition du biofilm préformé	2 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 100 % d'inhibition	
Citronellal	-inhibition de l'adhésion sur des implants dentaires	16 µg.mL ⁻¹	95 % d'inhibition	(297)
	-inhibition de l'adhésion sur polystyrène	250 µg.mL ⁻¹	74 % d'inhibition	(216)
	-inhibition de l'adhésion sur des cellules épithéliales humaines	250 µg.mL ⁻¹	Diminution importante	
	-inhibition de la formation de tube germinatif	250 µg.mL ⁻¹	≈ 100 % d'inhibition	
		31 à 125 µg.mL ⁻¹	≈ 60 à 100 % d'inhibition	(202)
	-inhibition de la formation de biofilm	250 à 2000 µg.mL ⁻¹	20 à 100 % d'inhibition	
		250 µg.mL ⁻¹	64 % d'inhibition	(216)
Coriandrum sativum	-inhibition de l'adhérence des levures après 72h d'incubation	62,5 à 250 µg.mL ⁻¹	≈ 50 % d'inhibition	(147)
	-inhibition de l'activité protéolytique	15,6 et 31,2 µg.mL ⁻¹	8 et ≈ 100 % d'inhibition	
Cymbopogon	-inhibition de formation du biofilm	45 à 180 µg.mL ⁻¹	53 à 89 % d'inhibition	(298)

<i>citrat</i>	-bactéricidie envers les levures sessiles	720 µg.mL ⁻¹	≈ 60 % en 12 h et 90 % d'inhibition en 48 h	(299)
	-réduction de la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (protéases, phospholipase et hémolysines) après 1h d'incubation	0,097 %	Réduction variable	
	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,024 et 0,049 %	> à 95 % d'inhibition	
	-inhibition de l'adhésion sur des fibroblastes murins après 1h d'incubation	0,097 %	22 % d'inhibition	(300)
	-réduction du nombre de levures viables dans le biofilm lors de sa croissance	625 à 3125 µg.mL ⁻¹	90 à plus de 99 % de réduction	
	-réduction du nombre de levures viables dans le biofilm mature après 8h d'incubation	625 à 6250 µg.mL ⁻¹	≈ 90 % de réduction	
<i>Cymbopogon nardus</i>	-réduction de l'activité métabolique du biofilm mature après 8h d'incubation	625 à 6250 µg.mL ⁻¹	≈ 35 % de réduction	
	-inhibition de la formation de tube germinatif	15 à 1000 µg.mL ⁻¹	100 % d'inhibition	(301)
	-inhibition de biofilm mature	10 mg.mL ⁻¹	83 à 97,7 % d'inhibition	(297)
<i>Daucus carota var carota</i>	-inhibition de l'adhérence des levures sur des implants dentaires et sur les vis de couverture	32 µg.mL ⁻¹	94 et 83 % d'inhibition	
	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,02 à 5 µL.mL ⁻¹	32 à 100 % d'inhibition	(220)
	-réduction de la biomasse de biofilm préformé	1,25 à 10 µL.mL ⁻¹	25 à 47 % de réduction	
Eucalyptol	-réduction de l'activité métabolique de biofilm préformé	2,5 à 10 µL.mL ⁻¹	19 à 32 % de réduction	
	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,031 à 2 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 100 % d'inhibition	(202)

	-inhibition de formation du biofilm	1 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 15 à 30 % d'inhibition	
Eugénol	-inhibition de l'adhésion des levures	1 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 25 à 100 % d'inhibition	(215)
	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,031 à 0,125 mg.mL ⁻¹	≈ 35 à 100 % d'inhibition	
		0,031 à 0,125 mg.mL ⁻¹	≈ 65 à 100 % d'inhibition	(202)
	-inhibition de formation du biofilm	0,25 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 40 à 100 % d'inhibition	
		0,125 à 1 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 100 % d'inhibition	(215)
	-inhibition de biofilm préformé	0,25 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 100 % d'inhibition	
		0,125 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 90 % d'inhibition	(202)
		0,25 à 8 %	50 à 75 % de réduction	(270)
Farnésol	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,031 à 0,125 mg.mL ⁻¹	≈ 60 à 100 % d'inhibition	(202)
	-inhibition de la formation de biofilm	0,062 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 80 % d'inhibition	
Fenchol	-inhibition de la formation de biofilm	0,005 et 0,01 %	≈ 98 % d'inhibition	(206)
	-réduction de l'activité métabolique du biofilm en croissance	0,005 et 0,01 %	66 à 79 % d'inhibition	
	-effet bactéricide sur les cellules du biofilm en croissance	0,005 et 0,01 %	92 à 98 % d'inhibition	
	-réduction de l'expression des gènes spécifiques de la formation d'hyphes, des gènes d'adhésion et de formation du biofilm	0,01 %	Jusqu'à 7,5 fois moins d'expression pour certains	
Géraniol	-inhibition de la formation de biofilm	152 et 304 µg.mL ⁻¹	≈ 25 et 80 % d'inhibition	(225)
		0,062 à 0,5 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 100 % d'inhibition	(202)
	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,25 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 20 à 95 % d'inhibition	
	-inhibition du biofilm préformé	0,25 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 100 % d'inhibition	
Guaiacol	-inhibition de l'adhésion des levures	1 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 25 à 70 % d'inhibition	(215)

	-inhibition de la formation de tube germinatif -inhibition de la formation de biofilm -inhibition de biofilm préformé	0,062 à 2 mg.mL ⁻¹ 0,125 à 4 mg.mL ⁻¹ 0,25 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 100 % d'inhibition ≈ 10 à 100 % d'inhibition ≈ 10 à 90 % d'inhibition	
Hinokitiol	-inhibition de la formation de biofilm -inhibition de biofilm préformé -inhibition des gènes impliqués dans l'adhérence (<i>HWP1</i> , <i>ALS3</i>) dans la formation et la maintenance des hyphes (<i>UEM6</i> , <i>HGC1</i>) et dans la voie de la protéine kinase AMPc (<i>RAS1</i> , <i>CYR1</i>)	3,1 µg.mL ⁻¹ 200 à 400 µg.mL ⁻¹ 0,8 µg.mL ⁻¹	50 % d'inhibition 50 % d'inhibition -	(201)
Isopulégol	-inhibition de la formation de tube germinatif -inhibition de formation du biofilm -inhibition du biofilm préformé	0,062 à 0,5 mg.mL ⁻¹ 0,25 à 4 mg.mL ⁻¹ 2 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 25 à 100 % d'inhibition ≈ 45 à 95 % d'inhibition ≈ 100 % d'inhibition	(202)
<i>Laurus nobilis</i>	-inhibition de l'adhésion des levures -inhibition de la formation de biofilm sur 48 h après 1 minute d'incubation -réduction du biofilm mature après 1 application pendant 1 minute toutes les 8h pendant 24 à 48h	0,5 à 1 mg.mL ⁻¹ 0,25 et 1 mg.mL ⁻¹ 0,25 à 1 mg.mL ⁻¹	0 à 25 % d'inhibition 0 à 25 % d'inhibition 25 à 50 % de réduction	(302)
Linalol	-inhibition de la formation du tube germinatif -inhibition de la formation de biofilm -éradication de biofilm préformé	0,25 à 4 nM 0,062 à 1 mg.mL ⁻¹ 0,125 à 4 mg.mL ⁻¹ 0,25 à 8 nM 2 à 16 nM	40 à 100 % d'inhibition ≈ 10 à 100 % d'inhibition ≈ 10 à 95 % d'inhibition 16 à 100 % d'inhibition 17 à 85 % d'inhibition	(193) (202) (193)

	-inhibition de l'expression des gènes HWP1 et ALS3 codant pour des adhésines de surface -inhibition de l'expression des gènes EED1, UME6 et HGC1 impliqués dans l'initiation et la maintenance des hyphes -inhibition de l'expression des gènes RAS1, CYR1 et CPH1 impliqués dans les voies de signalisation PKA-AMPC et MAPK	0,5 à 4 mg.mL ⁻¹ 1 et 4 nM 1 et 4 nM 1 et 4 nM	≈ 10 à 100 % d'inhibition 73 à 100 % d'inhibition 63 à 97 % d'inhibition 47 à 87 % d'inhibition	(202) (193)
Melaleuca alternifolia	-inhibition de la formation de biofilm -inhibition de l'adhésion des levures sur le polystyrène -inhibition de l'adhésion des levures sur des cellules épithéliales humaines -réduction de l'hydrophobicité de surface des levures -éradication de biofilm mature présent sur la langue de rats	0,016 à 0,25 % 0,008 à 0,25 % 0,016 à 0,062 % 0,125 % 12,5 %	79 à 100 % d'inhibition 0 à 73 % d'inhibition 0 à 73 % d'inhibition 14 à 46 % de diminution 100 % d'éradication	(175) (303)
Melissa officinalis	-réduction de la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (protéases, phospholipases et hémolysines) après 1h d'incubation -inhibition de la formation de tube germinatif -inhibition de l'adhésion sur des fibroblastes murins après 1h d'incubation	0,097 % 0,024 et 0,049 % 0,097 %	Réduction variable > à 95 % d'inhibition ≈ 50 % d'inhibition	(299)
Mentha suaveolens	-inhibition de l'adhérence des levures -inhibition de la formation de biofilm	0,78 et 1,56 mg.mL ⁻¹ 0,78 et 1,56 mg.mL ⁻¹	29 et 76 % d'inhibition 72 et 76 % d'inhibition	(268)
Menthol	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,125 à 2 mg.mL ⁻¹	≈ 5 à 100 % d'inhibition	(202)

	-inhibition de formation du biofilm -inhibition de biofilm préformé	0,062 à 4 mg.mL ⁻¹ 0,25 à 8 %	≈ 15 à 95 % d'inhibition 27 à 75 % de réduction	(270)
Monoterpènes (pinène, camphène, p-cymène, γ- terpinène, terpinolène, limonène, myrcène)	-inhibition de la formation de tube germinatif -inhibition de la formation de biofilm	0,25 à 2 mg.ml ⁻¹ 0,062 à 4 mg.ml ⁻¹	≈ 10-20 % à 65-100 % d'inhibition ≈ 0-10 à 30-80 % d'inhibition excepté le limonène 100 % d'inhibition	(202)
Myrtus communis	-inhibition de la formation de biofilm vis-à-vis de 5 souches différentes	0,125 %	0 à 100 % d'inhibition	(203)
Nérol	-inhibition de la formation de tube germinatif -inhibition de formation du biofilm	0,031 à 0,25 mg.mL ⁻¹ 0,062 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 10 à 100 % d'inhibition ≈ 5 à 100 % d'inhibition	(202)
Ocimum basilicum	-inhibition de l'adhérence des levures -inhibition du biofilm préformé -inhibition de la formation de biofilm de souches résistantes ou sensibles au fluconazole	0,039 et 0,156 % 0,078 et 0,625 % 1,25 et 2,5 µg.ml ⁻¹	50 et 90 % d'inhibition 50 et 90 % d'inhibition 68 et 89 % d'inhibition	(229) (225)
Pelargonium graveolens	-inhibe la formation de biofilm sur polyéthylène et polyuréthane -réduit le taux de protéine lors de la formation du biofilm sur polyéthylène et polyuréthane -réduction du taux d'ATP lors de la formation du biofilm sur polyuréthane -diminution de la rugosité de surface du biofilm en croissance	1,82 µg.mL ⁻¹ 1,82 µg.mL ⁻¹ 1,82 µg.mL ⁻¹ 1,82 µg.mL ⁻¹	60 et 57 % d'inhibition 50 et 39 % de réduction 81 % de réduction	(275)

	-réduction de la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (protéases, phospholipase et hémolysines) après 1h d'incubation -inhibition de la formation de tube germinatif -inhibition de l'adhésion sur des fibroblastes murins après 1h d'incubation	0,097 % 0,024 et 0,049 % 0,097 %	Réduction variable > à 95 % d'inhibition 25 % d'inhibition	(299)
<i>Piper claussenianum</i>	-inhibition de la formation du tube germinatif -inhibition de la formation de biofilm après 24h d'incubation -inhibition de la formation de biofilm après 48 h d'incubation -inhibition de biofilms préformés	0,062 à 0,5 % 0,06 à 1 % 0,25 à 1 % 0,06 à 1 %	76,8 à 97,3 % 28,9 à 32,5 % d'inhibition ≈ 50 % d'inhibition 47,2 à 63,9 % d'inhibition	(222)
<i>Satureja hortensis</i>	-inhibition de formation du biofilm -inhibition de biofilm préétabli	50 à 4800 µg.mL ⁻¹ 50 à 4800 µg.mL ⁻¹	1 à 91 % d'inhibition 1 à 92 % d'inhibition	(304)
<i>Syzygium aromaticum</i>	-inhibition de formation du biofilm -bactéricidie envers les levures sessiles -réduction de la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (protéases, phospholipase et hémolysines) après 1h d'incubation -inhibition de la formation de tube germinatif -inhibition de l'adhésion sur des fibroblastes murins après 1h d'incubation	50 à 200 µg.mL ⁻¹ 800 µg.mL ⁻¹ 0,097 % 0,024 et 0,049 % 0,097 %	27 à 57 % d'inhibition ≈ 60 % en 18 h et 80 % d'inhibition en 48 h Réduction variable > à 95 % d'inhibition 31 % d'inhibition	(298) (299)
<i>Thymbra capitata</i>	-réduction de la biomasse de biofilm préformé -réduction de l'activité métabolique de biofilm préformé	0,032 et 0,64 µl.mL ⁻¹ 0,032 et 0,64 µl.mL ⁻¹	28,4 et 72 % de réduction 28 et 62 % d'inhibition	(228)

Thymol	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,031 à 0,062 mg.ml ⁻¹	≈ 75 à 100 % d'inhibition	(202)
	-inhibition de la formation de biofilm	0,062 à 4 mg.ml ⁻¹	≈ 20 à 100 % d'inhibition	
		0,005 à 0,01 %	≈ 98 % d'inhibition	(206)
	-inhibition de biofilm préformé	0,062 à 4 mg.ml ⁻¹	≈ 15 à 90 % d'inhibition	(202)
		0,25 à 8 %	34 à 75 % d'inhibition	(270)
Trans-cinnamaldéhyde	-inhibition de l'adhésion des levures	0,062 à 2 mg.mL ⁻¹	≈ 20 à 100 % d'inhibition	(215)
	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,031 à 0,125 mg.mL ⁻¹	≈ 75 à 100 % d'inhibition	
	-inhibition de formation du biofilm	0,062 à 0,5 mg.mL ⁻¹	≈ 30 à 100 % d'inhibition	
	-inhibition de biofilm préformé	0,25 à 4 mg.mL ⁻¹	≈ 30 à 100 % d'inhibition	
Ziziphora tenuior	-inhibition de la formation de tube germinatif	0,08 à 0,32 µL.mL ⁻¹	19 à 100 % d'inhibition	(227)
	-réduction de l'activité métabolique de biofilm préformé	0,32 à 2,5 µL.mL ⁻¹	15 à 33 % de réduction	
	-réduction de la biomasse de biofilm préformé	0,32 à 2,5 µL.mL ⁻¹	19 à 55 % de réduction	

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

L'ISPB - Faculté de Pharmacie de Lyon est engagé dans une démarche de lutte contre le plagiat. De ce fait, une sensibilisation des étudiants et encadrants des thèses a été réalisée avec notamment l'incitation à l'utilisation d'une méthode de recherche de similitudes.

DUPIN Alban Interêts des huiles essentielles dans la lutte contre l’antibio-résistance induite par les biofilms Th. D. Pharm., Lyon 1, 2017, 220 p.	
RESUME Les avancées dans les données de la microbiologie montrent que les biofilms correspondent au mode de vie majoritaire des microorganismes, de nombreuses études abordent le sujet et nous font prendre conscience de l’impact majeur qu’ils ont dans de nombreux domaines, et particulièrement en santé humaine puisqu’ils sont responsables de tolérance et de résistances aux antibiotiques. Dans ce travail de thèse, nous abordons dans un premier temps de façon générale, les mécanismes, ainsi que les facteurs favorisant la formation des biofilms, tout comme les complications qu’ils entraînent lors de la prise en charge des patients. Dans un second temps, une analyse de la littérature est réalisée afin de s’intéresser au potentiel anti-biofilm des huiles essentielles (HE) à travers 3 agents infectieux : une bactérie à Gram négatif (<i>Escherichia coli</i>), une bactérie à Gram positif (<i>Staphylococcus aureus</i>) ainsi qu’une espèce fongique (<i>Candida albicans</i>). Ce travail fait ainsi ressortir les avantages des HE et met en avant leurs mécanismes d’action. Si les problèmes de volatilité et de faible solubilité dans les milieux biologiques des HE sont en partie palliés par des modifications galéniques ou par l’emploi des nanotechnologies, les données actuelles très limitées de toxicologie chez l’Homme représentent un réel frein à leur usage en pratique. Néanmoins, les dernières avancées montrent que les HE possèdent un intérêt sans équivoque dans la lutte future contre les biofilms.	
MOTS CLES Biofilms Huiles essentielles <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> Antibio-résistance	
JURY Mme DIJOUX-FRANCA Marie-Geneviève, Professeur Mr Montreuil Laurent, Docteur en Pharmacie Mr Michalet Serge, Maître de Conférences Mme DOLEANS-JORDHEIM Anne, Maître de Conférences	
DATE DE SOUTENANCE Mardi 19 Décembre 2017	
ADRESSE DE L’AUTEUR 7 rue Arago 69100 Villeurbanne	