THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Ecologie et biologie des interactions - EBI (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac (La Rochelle)
Secteur de recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Cotutelle : Université de Monastir (Tunisie)

Présentée par :
Nawel Chaftar

Occurrence des légionelles dans les eaux thermales tunisiennes et évaluation de l'activité anti-legionella des huiles essentielles de plantes autochtones

Directeur(s) de Thèse :
Jacques Frère, Khaled Hani, Christine Imbert

Soutenue le 06 novembre 2013 devant le jury

Jury :

Président	**Thierry Jouenne**	Directeur de recherche CNRS, Université de Rouen
Rapporteur	**Thierry Jouenne**	Directeur de recherche CNRS, Université de Rouen
Rapporteur	**Chedly Chouchani**	Maître de conférence, Université de Carthage, Tunisie
Membre	**Jacques Frère**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	**Khaled Hani**	Professeur, Université de Sousse, Tunisie
Membre	**Christine Imbert**	Professeur des Universités, Université de Poitiers
Membre	**Tawfik Ghrairi**	Maître assistant, Université de Sousse, Tunisie

Pour citer cette thèse :
Nawel Chaftar. *Occurrence des légionelles dans les eaux thermales tunisiennes et évaluation de l'activité anti-legionella des huiles essentielles de plantes autochtones* [En ligne]. Thèse Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Poitiers : Université de Poitiers, 2013. Disponible sur Internet <http://theses.univ-poitiers.fr>

THÈSE EN CO-TUTELLE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONASTIR

(Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir)

Ecole Doctorale : Sciences Biologiques, Biotechnologie et Santé

Secteur de Recherche : Sciences Biologiques et Biotechnologie

Et

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)

(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

Ecole Doctorale : Sciences pour l'environnement Gay Lussac

Secteur de Recherche : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée par :

Nawel CHAFTAR

OCCURRENCE DES LÉGIONELLES DANS LES EAUX THERMALES TUNISIENNES ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI-*LEGIONELLA* DES HUILES ESSENTIELLES DE PLANTES AUTOCHTONES

Directeurs de Thèse : Pr. Christine IMBERT et Pr. Jacques FRERE

Pr. Khaled Hani

*Soutenue le **6 Novembre 2013**, devant la Commission d'Examen :*

Rapporteurs :

Dr. Chedly CHOUCHANI	Maître de conférence, Université de Carthage, Tunisie
Pr. Thierry JOUENNE	Directeur de Recherche CNRS, Université de Rouen, France

Examinateurs :

Pr. Christine IMBERT	Professeur, Université de Poitiers, France
Pr. Jacques FRERE	Professeur, Université de Poitiers, France
Pr. Khaled HANI	Professeur, Université de Sousse, Tunisie
Dr. Taoufik GHRAIRI	Maître-assistant, Université de Sousse, Tunisie

Ce travail de thèse est dédié à mes très chers parents ***Habiba*** *et* ***Sassi****. J'espère que vous trouverez dans ce travail l'expression de mon profond respect, de ma gratitude et surtout de tout mon amour pour vous. Vous m'avez donné sans cesse, vous êtes toujours là à mes cotés...*

J'espère que je serais à la hauteur de vos attentes et que vous serez fière de moi.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé en collaboration, entre le Laboratoire de Biochimie à la Faculté de Médecine de Sousse (Tunisie), et le Laboratoire de Microbiologie de l'Eau, à l'Université de Poitiers (France). Je remercie les directeurs respectifs, Messieurs les Professeurs ***Khaled Hani*** *et* ***Yann Héchard****, pour m'avoir accueillie dans leur équipe.*

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance à mes directeurs de thèse, Messieurs les Professeurs ***Jacques Frère*** *et* ***Khaled Hani*** *pour la confiance et la liberté qu'ils m'ont accordées pour la réalisation de ce travail de thèse.*

J'exprime également ma profonde reconnaissance et ma gratitude à Madame le Professeur ***Christine Imbert****, qui a accepté le co-encadrement de ma thèse, après le départ de* ***Jacques Frère*** *au Vietnam.* ***Christine****, je te remercie pour ta disponibilité, pour ton soutien, pour tes conseils, pour être à mon écoute et surtout pour tes encouragements.*

Je remercie Monsieur le Dr. ***Taoufik Ghrairi****, mon co-encadrant de thèse au Laboratoire de Biochimie à Sousse (Tunisie) pour m'avoir aidée à réaliser ce projet de co-tutelle et pour ses conseils lors de la relecture du manuscrit.*

Je remercie Monsieur ***Chedly Chouchani****, Maître de Conférences à l'Institut Supérieur des Sciences et Technologies de l'Environnement de Borj-Cedria (Tunisie) et Monsieur* ***Thierry Jouenne****, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Rouen (France) de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de mon travail.*

Je remercie les membres de l'équipe de Microbiologie de l'Eau de Poitiers, ***Julien Verdon****,* ***Jean-Marc Berjeaud****,* ***Marie-Hélène Rodier,*** *ainsi que les membres du Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine de Sousse,* ***Amira Zairi****,* ***Fatma Balloumi****,* ***Najoua****,* ***Hamadi****,…*

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidée dans mon travail : ***Daniel Guyonnet****, merci pour ton aide pour le séquençage ;* ***Thierry Bergès****, merci pour l'aide apportée au début de cette thèse sur les huiles essentielles, merci pour les manips de GC et surtout pour vos conseils si précieux ;* ***Jérôme Labanowski****, sans toi je n'aurais pas mes compositions chimiques des huiles essentielles, merci pour les manips de GC-MS !* ***Nathalie Quellard****,* ***Béatrice Fernandez****, mesdames, je vous remercie infiniment pour vos explications de microscopie électronique et surtout pour votre bonne humeur permanente ;* ***Emile Bere****, merci pour les photos de microscopie électronique et pour tes conseils ; enfin* ***Sophie Jarraud****, merci pour les analyses par PFGE de mes souches.*

Sylvie*,* ***Laurence*** *et* ***Karine****, mesdames, sans vous les démarches administratives seraient compliquées et pénibles, merci !*

*Je remercie les techniciens du Laboratoire de Microbiologie de l'Eau, **Christophe**, **Marie-Claude** et **Stéphanie** pour le travail réalisé afin d'assurer le bon déroulement de nos activités de recherche.*

*Je remercie mes chers collègues : **Anne**, merci pour ton aide précieuse durant cette année et surtout tes conseils lors de la rédaction du manuscrit, je te suis très reconnaissante ; **Arnaud**, merci pour ta bonne humeur et pour tes encouragements ; **Adrienne**, merci pour ton aide et tes explications des manips de CMI ; **Emilie Fouque**, oh la Miss !! Nos supers discussions me manquent, mais promis je viendrais vous voir à Nantes, toi, **JB** et le **Chat** !! **Emilie Portier**, hey American woman !! Merci pour ton soutien jusqu'au dernier moment même quand tu n'es pas là, merci pour nos discussions tous les soirs ; **Renaud**, mon collègue de bureau, merci pour nos échanges d'idées, pour les jeux de mots (bons ou moins bons !), merci pour tes encouragements ; **Damien**, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur; sans oublier **Clémence, Vincent**, **Mathieu**, et **Ascel**, qui vient juste d'arriver mais qui m'encourage quotidiennement ; enfin **Marion**, je ne sais pas comment te remercier, Docteur !! Vraiment tu m'as beaucoup aidée, merci pour tout le temps consacré à mon travail… les huiles essentielles nous ont bien fatiguées, mais nous avons fini par les vaincre !! YOUPIII, je suis fière de notre « méga » tableau...*

*Un grand merci aux personnes qui ne sont plus au labo : **Momo,** merci pour les bons moments, merci d'avoir été à mes cotés, merci pour tes conseils et surtout tes qualités humaines ; **Mohamad,** merci d'avoir marqué ma vie, cher ami, merci de me soutenir et d'être à mes cotés même quand tu n'es plus là, merci pour tout ! **Thomas**, merci de m'avoir « encadrée » et surveillée durant les manips de RT-PCR ; **Montaha, Aïcha, Jean-Fabrice, Sadat, Marion, Elodie** (bon courage pour ta thèse !), **Maroua, Pegaud, Khadija, Tristan,** merci pour votre gentillesse, je vous souhaite plein de belles choses…*

*Merci à **Raphaël** pour ton aide et ta disponibilité, et à **Faudel,** pour tes conseils et nos discussions politiques qui ne se terminent pas…*

*J'aimerais également remercier tous mes chers amis avec lesquels j'ai eu le plaisir de partager mes 3 années de thèse à Poitiers, en particulier **Mehrez, Sami, Mohamed** les gars merci pour la super bonne ambiance durant ces années et surtout durant ce mois de Ramadan ; **Hussein,** merci brother d'être à mes cotés, pour ton écoute ; **Haydar,** merci cher ami pour ta présence et ton soutien ; **Nader, Mehdi** merci les amis !*

***Najah**, la plus belle maman et docteur de l'année, merci ma très chère sœur d'être toujours là à mes cotés, merci pour nos heures de discussion, merci pour tout ce que tu fais pour moi, j'espère que nous resterons réunies pour toujours ; **Meriam**, la plus belle et douce nouvelle docteur, merci Miss pour ton amour et surtout ton soutien moral, merci pour nos moments de folie ; **Safsoufty**, merci ma belle pour ta présence, pour tes super expressions qui me rappellent la Tunisie qui m'a beaucoup manquée cette année, merci ma « **soufffrons »** préférée !! **Amounti**, merci ma chère pour ton aide, pour ton soutien et surtout tes délicieux plats cuisinés*

pendant le mois de Ramadan ; ***Nadou****, cette dernière période n'était pas « top » après la perte de tata, que son âme repose en paix, merci pour tout ce que tu fais pour moi ;* ***Hania*** *et* ***Pascale,*** *les filles, vos appels et vos messages d'encouragements me touchent beaucoup, j'espère que vous trouverez tout le bonheur que vous méritez ;* ***Ghizlane****, je n'oublie pas ce que tu as fait pour moi, merci quand même ;* ***Ines****,* ***Odissa****,* ***Ferdous*** *et j'en oublie surement…*

Nesrine, *ma très chère sœur, je te remercie pour être toujours là à m'encourager et à me rassurer, merci de m'avoir aidée à réaliser la super surprise de cet été ;* ***Sana****, merci pour ton optimisme infini, merci pour ce que tu fais dans cette vie parfois injuste, je te souhaite le meilleur, ma très chère ;* ***Feyrouz****, merci madame pour ta bonne humeur tout au long de ces années d'études et même si, chacune de nous a pris un chemin différent, merci pour ton amitié ;* ***Amina****, tu es une super maman, et surtout une très bonne sœur, nos discussions me manquent, j'espère qu'après la thèse nous aurons un peu plus le temps pour nous revoir toutes les 3 avec* ***Ness ; Necima, Sara, Fatma, Mounira, Souhir,*** *les filles merci pour la bonne ambiance au labo, en Tunisie, merci pour nos beaux moments de folie, de fous rires, merci pour nos sorties, merci pour tout ;* ***Imed****, je n'ai pas eu beaucoup de temps pour échanger avec toi, mais crois moi, tu es un super ami qui me fait rigoler avec ou sans raison, surtout tes pensées sur fb !! J'espère que la vie sera juste avec toi et que tu auras tout ce que tu voudras.*

C'est au tour de ma très chère famille d'être remerciée : ma chère ***Nour****, je t'adore sœurette, tu sais me faire rigoler, me réconforter. Je n'ai pas eu vraiment le temps de te dire combien je t'aime très fort ; mes deux chers frères* ***Mohamed*** *et* ***Mootez,*** *vous êtes la lumière de ma vie, vous êtes toujours à mes cotés, vous ne pouvez pas supporter me voir pleurer, vous faites l'impossible pour mon bonheur !! Je vous aime énormément !*

I want to thank my two sisters in law ***Ingrid*** *and* ***Salsabil*** *for their help, their love and especially for making my two dear brothers so happy.*

Je remercie ma très chère ***Zaza,*** *pour son soutien tout au long de ces années, merci pour tes cadeaux qui viennent avec et surtout sans occasion ! Tu mérites tout le bonheur du monde. Je remercie* ***Fafa*** *qui me donne généreusement son amour, ses conseils, et surtout des cadeaux précieux !! Je ne m'imagine pas faire un remerciement pour ma thèse sans remercier ma très chère* ***Mamy*** *!! Elle ne m'a jamais privé de ses « douaa », elle me demande toujours « quand est-ce que tu rentres ? Tu m'as beaucoup manqué » !! Mamy, j'ai bientôt fini... Je remercie également ma deuxième maman* ***Joujou****, elle n'attend que ça, elle n'a jamais cessé de m'encourager !! Elle veut absolument assister à ma soutenance et bien moi aussi ! Je remercie mes très chers oncles et tantes pour leurs amours. Je remercie mes chers cousins et mes chères cousines.*

Une pensée spéciale à mes grands-parents qui ne sont plus parmi nous. Je sens que vous veillez sur moi là où vous êtes. Reposez en paix…

Personnellement, je trouve que cette partie est la plus dure à rédiger !! Certes la liste est longue, j'ai connu beaucoup de gens tout au long de ces années de thèse. Je vous remercie tous.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS **1**

LISTE DES FIGURES **3**

LISTE DES TABLEAUX **4**

PARTIE 1 : INTRODUCTION GENERALE **5**

PARTIE 2 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **8**

CHAPITRE 1: LEGIONELLA **9**

1. GENERALITES SUR LE GENRE *LEGIONELLA* 9

1.1 Historique *9*

1.2 Taxonomie *9*

1.3 Caractéristiques *11*

2. LEGIONELLA PNEUMOPHILA 12

2.1 Sérogroupes *13*

2.2 Facteurs de virulence de L. pneumophila *13*

2.2.1 Facteurs de surfaces 13

2.2.2 Facteurs de sécrétion 14

2.3 Analyse génomique de L. pneumophila *15*

2.4 Écologie des Legionella *18*

2.4.1 Interaction avec les protozoaires 18

2.4.2 Interaction avec les biofilms 21

2.5 Thermalisme et légionelles *23*

2.5.1 Thermalisme 23

2.5.2 Risques microbiologiques liés au thermalisme 24

2.5.3 Normes applicables à *Legionella* et *L. pneumophila* dans le contexte des stations thermales 25

3. LA LEGIONELLOSE 26

3.1 Source de contamination *26*

3.2 Formes cliniques *27*

3.3 Épidémiologie *28*

4. LUTTE CONTRE LES *LEGIONELLA* 29

4.1 Agents désinfectants *29*

4.2 Traitements thermiques *31*

4.3 Traitements biologiques *31*

CHAPITRE 2 : LES HUILES ESSENTIELLES (HE) **33**

1. GENERALITES 33
2. METHODES D'EXTRACTION DES HE 33
2.1 Extraction des HE par entraînement à la vapeur d'eau 33
2.2 Extraction des HE par expression à froid 34
2.3 Autre procédé 34
2.4 Extraction des HE par solvants 35
2.5 Cas particulier : extraction par un corps gras fondu 35
2.6 Extraction des HE par les gaz supercritiques 35
3. LES ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DES HE 36
4. LA COMPOSITION DES HE 38
4.1 La composition chimique des HE 38
4.2 Les composants des HE 40
4.3 Interactions entre les différents composants des HE 42
5. LES MODES D'ACTION DES HE 42
6. APPLICATIONS ACTUELLES 48
7. TOXICITE DES HE 49
7.1 Toxicité orale aiguë 49
7.2 Toxicité cutanée aiguë 50
7.3 Toxicité chronique 50

PARTIE 3 : MATERIEL ET METHODES 51

CHAPITRE 1 : TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE ET TESTS BIOCHIMIQUES 52

1. MILIEUX DE CULTURE : 52
1.1 Culture des légionelles 52
1.2 Culture des autres bactéries 52
1.3 Culture des champignons 53
2. SOUCHES BACTERIENNES 53
2.1 Souches de Legionella 53
2.2 Les autres souches bactériennes 54
3. SOUCHES FONGIQUES 55
4. TESTS DE SURVIE EN CONDITIONS DE STRESS 55
4.1 Choc thermique 56
4.2 Choc osmotique 56
4.3 Choc acide 56
4.4 Choc oxydatif 56

5. ENSEMENCEUR SPIRAL (WASP) 56
6. ANALYSES STATISTIQUES 57
7. TESTS BIOCHIMIQUES 57

CHAPITRE 2 : TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE 58

1. EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE 58
2. ÉLECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE 58
3. PURIFICATION 58
4. AMPLIFICATION PAR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) 59
5. SEQUENÇAGE 60
6. ANALYSE PHYLOGENETIQUE ET SAUVEGARDE DES SOUCHES 61
7. PCR EN TEMPS REEL (RT-PCR) 61
8. ELECTROPHORESE EN CHAMP PULSE (PFGE) 63

CHAPITRE 3 : EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES ET EVALUATION DE LEURS ACTIVITES ANTIMICROBIENNES 64

1. PLANTES 64
2. EXTRACTION DES HE 65
3. CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (GC-MS) 65
4. ÉVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES HE 66
   4.1 Activité anti-Legionella 66
   4.2 Activité anti-bactérienne autres qu'anti-Legionella 67
   4.3 Activité antifongique 67
5. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 68
   5.1 Microscopie électronique à balayage (MEB) 68
   5.2 Microscopie électronique à transmission (MET) 68

PARTIE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION 70

INTRODUCTION DES RESULTATS ET DE LA DISCUSSION 71

CHAPITRE 1 : OCCURRENCE DES LEGIONELLES DANS LES STATIONS THERMALES TUNISIENNE 72

1. PRINCIPAUX RESULTATS DE LA PUBLICATION 1 : DIVERSITY OF *LEGIONELLAE* STRAINS FROM TUNISIAN HOT SPRING WATER 72
2. RESULTATS COMPLEMENTAIRES : 83
   2.1 RT-PCR 83
   2.2 PFGE 83

CHAPITRE 2 : ÉVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-*LEGIONELLA* DES HUILES ESSENTIELLES DE PLANTES TUNISIENNES 85

1. PRINCIPAUX RESULTAT DE LA PUBLICATION 2 : ANTI *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* ACTIVITY OF 6 ESSENTIAL OILS OF TUNISIAN PLANTS 85
2. RESULTATS COMPLEMENTAIRES : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 113

CHAPITRE 3 : ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES HUILES ESSENTIELLES 115

1. PRINCIPAUX RESULTANTS DE LA PUBLICATION 3 : ESSENTIAL OILS WITH A BROAD SPECTRUM ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY: 20 ESSENTIAL OILS ON TEST BENCH 115

ESSENTIAL OILS WITH A BROAD SPECTRUM ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY: 20 ESSENTIAL OILS ON TEST BENCH 118

2. RESULTATS COMPLEMENTAIRES 138

PARTIE 5 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 144

PARTIE 6 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 150

Liste des abréviations

ACES : N-2-acetamido-2-aminoethansulfonicacid
ADN : Acide désoxyribonucléique
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament
ARN : Acide ribonucléique
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : adénosine-5'-triphosphate
BET : Bromure d'éthidium
BCYE : Buffered Charcoal Yeast Extract
BHI : Brain Heart Infusion
BYE : Buffered Yeast Extract
CHU : Centre hospitalier universitaire
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CO_2 : Dioxyde de carbone
DL_{50} : Dose létale 50
DMSO : Diméthylsulfoxide
DO : Densité optique
Dot/Icm : Defective in organelle trafficking / intracellular multiplication
DTM : Dose tolérée maximale
EBI : Ecologie et Biologie des Interactions
EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique
EMN : Eau minérale naturelle
FDA : Food and Drug Administration
GC-MS : Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse
GVPC : Gélose Vancomycine Polymyxine Cycloheximide
HE : Huile essentielle
Hsp 60 : Heat shock protein 60
H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
IHEM : Institute of Hygiene and Epidemiology, Brussels
IMC : indice de masse corporelle
IP : Institut pasteur
Kb : kilobase
kDa : kilodalton

LLAP : *Legionella*-like amoebal pathogens
Lly : legiolysin
LPS : Lipopolysaccharide
Mb : mégabase
MDE : Microbiologie de l'eau
MEB : microscope électronique à balayage
MET : microscope électronique à transmission
MIP : Macrophage Infectivity Potentiator
MOMP : Major Outer Membran Protein
MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
pb : paires de base
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : réaction de polymérisation en chaine
PCR Q : PCR Quantitative
PFGE : Pulsed Field Gel Electrophoresis
pH : Potentiel Hydrogène
PilD : Péripiline peptidase
ppGpp : alarmone guanosine 3'-5'-bispyrophosphate
PPIase : peptidyl prolyl-cis-trans-isomerase
RMN : magnétique nucléaire
rpm : rotation par minute
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR : Real Time PCR ou PCR en temps réel
SARM : *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline
SBT : Sequence-Based Typing
ssp : sous espèce
TAR : tour aero-réfrigérante
TBE : Tris-Borate-EDTA
UFC : Unité formant colonie
UG : Unité génome
UPGMA : unweighted pair group matching
UV : Ultra-violet
v/v : volume/volume
WASP : Walk-Away Specimen Processor

Liste des figures

Figure 1 : *Legionella pneumophila* observée au microscope électronique 12
Figure 2 : Diagramme comparant le génome de 4 souches de *L. pneumophila* (Paris, Lens, Philadelphia et Corby).....16
Figure 3 : Cycle de vie de *Legionella pneumophila*.....19
Figure 4 : Développement et relargage de *Legionella* spp dans un système d'eau potable.....22
Figure 5 : Évolution du nombre de cas et du taux annuel d'incidence de la légionellose en France, 1988-2011.....28
Figure 6 : Comparaison de la structure de la membrane des bactéries Gram positives et Gram négatives.....37
Figure 7 **:** Structure chimique du carvacrol, du thymol et de l'eugénol.....40
Figure 8 : Structure chimique de la vanillline, de la carvone et de la trans-cinnamaldéhyde.....41
Figure 9 : Structure chimique de quelques composants d'HE possédant des groupements alcool 42
Figure 10 : Principales localisations des sites d'action des constituants des HE sur une cellule bactérienne (Burt, 2004).....43
Figure 11 : Observations par microscopie électronique de cellules de *L. monocytogenes*. 44
Figure 12 : Microscopie électronique en balayage d'un biofilm mature *de C. albicans*. 45
Figure 13 : Micrographies électronique en microscopie à transmission des cellules de *S. aureus* contrastées à l'acétate d'uranyl 48
Figure 14 : Localisation des stations thermales en Tunisie.....53
Figure 15 : Ensemenceur en spiral WASP 57
Figure 16 : Les plantes tunisiennes utilisées pour extraire les HE.....64
Figure 17 : Montage de l'hydrodistillation. 65
Figure 18 : Recherche de la présence d'inhibiteurs internes dans les échantillons à quantifier par RT-PCR.....83
Figure 19 : Dendrogramme et pulsotype des souches *L. pneumophila* sg 4 84
Figure 20 : Dendrogramme et pulsotype des souches *L. pneumophila* sg 6 84
Figure 21 : Observation en MEB de la souche *L. pneumophila* Paris 113
Figure 22 : Observation en MEB de la souche *L. pneumophila* Lens.....113

Liste des tableaux

Tableau 1 : Espèces et sérogroupes de *Legionella* 10

Tableau 2 : Nombre de cas de légionelloses en Tunisie de 2001 à 2005 29

Tableau 3 : Principaux constituants des HE présentant des activités antibactériennes 39

Tableau 4 : Les différentes souches bactériennes utilisées dans ce travail 54

Tableau 5 : Les souches fongiques utilisées dans ce travail 55

Tableau 6 : Amorces utilisées pour les amplifications par PCR des gènes 16S et *mip* 60

Tableau 7 : amorces et sondes utilisées pour les amplifications par PCR Q des gènes 16S et *mip* 62

Tableau 8 : La composition chimique des 14 HE commerciale analysée par GC-MS 139

Partie 1 : Introduction générale

Introduction générale

Les eaux thermales puisent leurs origines dans les profondeurs de la terre. Les vertus de ces eaux sont connues depuis les civilisations antiques, grecques et romaines. De nos jours, le thermalisme représente une thérapie complémentaire dans le traitement de plusieurs maladies. Les établissements thermaux sont ainsi fréquentés par des patients curistes mais aussi par des sujets sains qui cherchent le repos et la relaxation loin du rythme stressant de la vie quotidienne.

Dans ce cadre, la Tunisie présente une grande diversité thermale et une richesse en sources d'eaux minérales naturelles. Les sources thermales de ce pays sont exploitées par des établissements thermaux médicalisés ou non et par les Hammams traditionnels. La fréquentation de ces endroits s'inscrit en effet dans la culture et les traditions locales.

Le contrôle sanitaire de ces établissements est donc essentiel et doit respecter des normes visant à prévenir les éventuels risques, en particulier le risque microbiologique. En effet, il existe des germes hydro-telluriques résistants aux différents traitements classiquement appliqués (physiques ou chimiques). Les légionelles, bactéries capables de vivre dans les eaux chaudes avec un optimum de croissance entre 35 et 40 °C, comptent parmi ces microorganismes. Les légionelles sont peu étudiées en Tunisie et leur surveillance n'est pas édictée par des réglementations ou normes propres au pays. Néanmoins, plusieurs normes françaises ou européennes sont respectées dans les établissements thermaux hospitaliers.

D'autre part, les plantes, et surtout les plantes aromatiques, représentent une source de molécules complexes à activités diverses. Utilisées depuis longtemps dans plusieurs domaines, les huiles essentielles (HE) restent encore peu utilisées en tant qu'agents pour combattre le risque microbiologique dans les secteurs alimentaire et du traitement des eaux. Nous avons donc souhaité évaluer l'activité d'un certain nombre d'HE contre le genre *Legionella*, comme première étape dans l'étude de l'utilisation des HE dans le traitement des eaux thermales ; cette approche pourrait ainsi élargir l'arsenal « thérapeutique », et devenir un outil complémentaire plus que de substitution.

De plus l'étude de *Legionella* et le contrôle de sa croissance est l'un des axes de recherche majeurs abordés par l'équipe de microbiologie de l'eau (MDE) du laboratoire d'Ecologie et

Biologie des Interactions (EBI, UMR CNRS 7267) de l'université de Poitiers. Les liens étroits entre mon laboratoire d'origine : l'« Unité de recherche de Mycotoxicologie et Maladies métaboliques héréditaires » de l'université de Sousse en Tunisie et lUMR 7267 ont encouragé cette collaboration.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient donc, dans un premier temps, d'établir un état des lieux sur l'occurrence des légionelles dans les eaux thermales en Tunisie et, dans un deuxième temps, d'évaluer les activités anti-*Legionella* et plus largement anti-microbiennes (antibactériennes et antifongiques) des HE extraites de plantes tunisiennes.

Pour atteindre ces objectifs, trois axes de recherche ont été développés:

- La première partie a consisté à isoler, identifier et quantifier les bactéries du genre *Legionella* et l'espèce *L. pneumophila* dans les eaux thermales chaudes. Cette partie nous a permis d'avoir une idée sur la présence et la fréquence de cette bactérie dans l'environnement thermal tunisien. Elle nous a également incité à essayer de trouver des solutions pour combattre le risque de contamination par *Legionella*.

- La deuxième partie était consacrée à l'extraction des HE de plantes d'origine tunisienne, à l'analyse de leur composition respective et à l'évaluation de leur activité contre des souches de *Legionella* isolées précédemment des eaux thermales. L'action d'une huile essentielle (*Thymus vulgaris*) sur *L. pneumophila* a fait l'objet d'une étude complémentaire par microscopie électronique à balayage et à transmission.

- La dernière partie de ce travail a porté sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne au sens large des HE tunisiennes et commerciales contre de nombreux microorganismes : bactéries (Gram positives et Gram négatives), et champignons (levures, moisissures et dermatophytes). La composition chimique des huiles commerciales a été également analysée par GC-MS.

Partie 2 : Etude bibliographique

Chapitre 1: Legionella

1. Généralités sur le genre *Legionella*

1.1 Historique

Lors de la 58^{ième} convention annuelle des vétérans de la légion américaine à Philadelphie, (Pennsylvanie) en juillet 1976, une épidémie de pneumonie a touché plusieurs participants entraînant 146 hospitalisations et 29 décès (Fields *et al.*, 2002; Fraser *et al.*, 1977; McDade *et al.*, 1977; Tsai *et al.*, 1979). Il a fallu attendre janvier 1977 pour que l'agent responsable de cette pneumonie soit isolé (Jacobson *et al.*, 1977), en utilisant un protocole adapté à la recherche de *Rickettsia* et en se servant d'un modèle animal : le cobaye (Brenner *et al.*, 1979; McDade *et al.*, 1977). Cette pneumonie a été nommée "maladie des légionnaires" et l'agent responsable "*Legionella pneumophila*" (Brenner *et al.*, 1979). Cette bactérie avait cependant été isolée dés 1943 par Tatlock puis par Jackson *et al*. en 1947, mais considérée à l'époque comme une bactérie appartenant au genre *Rickettsia* (Fields *et al.*, 2002).

1.2 Taxonomie

La famille des *Legionellaceae* appartient au phylum des *Proteobacteria*, à la classe des γ *Proteobacteria* et se compose uniquement du genre *Legionella* (Diederen, 2008; Fields *et al.*, 2002; Gomez-Valero *et al.*, 2009). Il a été proposé de classer les *Legionellae* en trois genres différents : *Legionella, Fluoribacter,* et *Tatlockia*. Cependant, des études récentes reposant sur l'analyse du 16S rRNA ont confirmé que la famille des *Legionellaceae* forme un groupe monophylétique au sein de la subdivision γ-2 des protéobactéries (Fields *et al.*, 2002; Gomez-Valero *et al.*, 2009). Du point de vue phylogénétique, l'espèce la plus proche des *Legionellaceae* est *Coxiella burnettii* (agent responsable de la fièvre Q). Ces microorganismes ont un mode de vie intracellulaire similaire et peuvent utiliser des gènes communs pour infecter leurs hôtes (Fields *et al.*, 2002). Au cours du temps, le nombre d'espèces et de sérogroupes a continuellement

augmenté et on compte actuellement 56 espèces et sous-espèces de légionelles, correspondant à plus de 70 sérogroupes (Diederen, 2008; Fields *et al.*, 2002; Gomez-Valero *et al.*, 2009). L'espèce *L. pneumophila* contient 15 sérogroupes, et les espèces *L. bozemanii, L. longbeachae, L. feeleii, L. hackeliae, L. sainthelensi, L. spritensis, L. erythra,* et *L. quinlivanii* présentent chacune 2 sérogroupes. Les autres espèces ne présentent qu'un seul sérogroupe (Fields *et al.*, 2002) **(Tableau 1)**. On trouve également dans la famille des *Legionellaceae* des bactéries non cultivables, y compris dans le milieu spécifique des légionelles (milieu Buffered Charcoal Yeast Extract ou BCYE). Ces dernières ont été nommées LLAPs (*Legionella*-like amaebal pathogens) (Rowbotham, 1993). Elles ont été isolées en les co-cultivant avec des amibes. L'analyse du gène codant l'ARN 16S des LLAPs montre qu'ils sont proches génétiquement du genre *Legionella* (de 91,2% à 97% d'homologie) (Adeleke *et al.*, 1996; Diederen, 2008; Fields *et al.*, 2002; Gomez-Valero *et al.*, 2009).

Tableau 1 : Espèces et sérogroupes de *Legionella* [a] (Fields *et al.*, 2002)

Espèce	Nombre de sérogroupes	Nombre associé avec des pathologies
1. *L. pneumophila*	15	15
2. *L. bozemanii*	2	2
3. *L. dumoffii*	1	1
4. *L. micdadei*	1	1
5. *L. longbeachae*	2	2
6. *L. jordanis*	1	1
7. *L. wadsworthii*	1	1
8. *L. hackeliae*	2	2
9. *L. feeleii*	2	2
10. *L. maceachernii*	1	1
11. *L. birminghamensis*	1	1
12. *L. cincinnatiensis*	1	1
13. *L. gormanii*	1	1
14. *L. sainthelensi*	2	2
15. *L. tucsonensis*	1	1
16. *L. anisa*	1	1
17. *L. lansingensis*	1	1
18. *L. erythra*	2	1[b]
19. *L. parisiensis*	1	1
20. *L. oakridgensis*	1	1
21. *L. spiritensis*	1	0
22. *L. jamestowniensis*	1	0
23. *L. santicrucis*	1	0
24. *L. cherrii*	1	0
25. *L. steigerwaltii*	1	0
26. *L. rubrilucens*	1	0
27. *L. israelensis*	1	0

28. *L. quinlivanii*	2	0
29. *L. brunensis*	1	0
30. *L. moravica*	1	0
31. *L. gratiana*	1	0
32. *L. adelaidensis*	1	0
33. *L. fairfieldensis*	1	0
34. *L. shakespearei*	1	0
35. *L. waltersii*	1	0
36. *L. genomospecies*	1	0
37. *L. quateirensis*	1	0
38. *L. worsleiensis*	1	0
39. *L. geestiana*	1	0
40. *L. natarum*	1	0
41. *L. londoniensis*	1	0
42. *L. taurinensis*	1	0
43. *L. lytica*	1	0
44. *L. drozanskii*	1	0
45. *L. rowbothamii*	1	0
46. *L. fallonii*	1	0
47. *L. gresilensis*	1	0
48. *L. beliardensis*	1	0

a : les espèces sont citées selon un ordre chronologique de leurs date d'isolement ou identification.

b : le sérogroupe 2 de *L. erythra* a été associé avec des pathologies humaines.

1.3 Caractéristiques

Les légionelles sont des coccobacilles Gram négatif **(Figure 1)**, aérobies, non capsulés et non sporulés. Leur taille est comprise entre 0,3 et 0,9 µm de largeur et entre 2 à 20 µm de longueur. Ces bactéries peuvent se présenter sous forme allongée et filamenteuse en culture (Diederen, 2008).

Les légionelles sont des bactéries mobiles : leur mobilité est assurée par un ou plusieurs flagelles situés en position polaires ou subpolaires (Fields *et al.*, 2002). Toutefois, trois espèces font exceptions : *L. oakridgensis,(Orrison et al., 1983), L. londiniensis* et *L. nautarum* (Dennis *et al.*, 1993) sont immobiles.

Les légionelles ne peuvent pas hydrolyser les sucres et utilisent les acides aminés comme source de carbone et d'énergie. Cependant, elles sont auxotrophes pour certains acides aminés comme la cystéine, la sérine et la thréonine (Pine *et al.*, 1979; Tesh *et al.*, 1983).

Les légionelles sont des bactéries mésophiles. Elles ont une température de croissance comprise entre 25 et 42°C (optimum à 35°C), avec un pH à 6,9, en présence de 2,5% de CO_2 durant 2 à 5 jours (Diederen, 2008; Fields *et al.*, 2002).

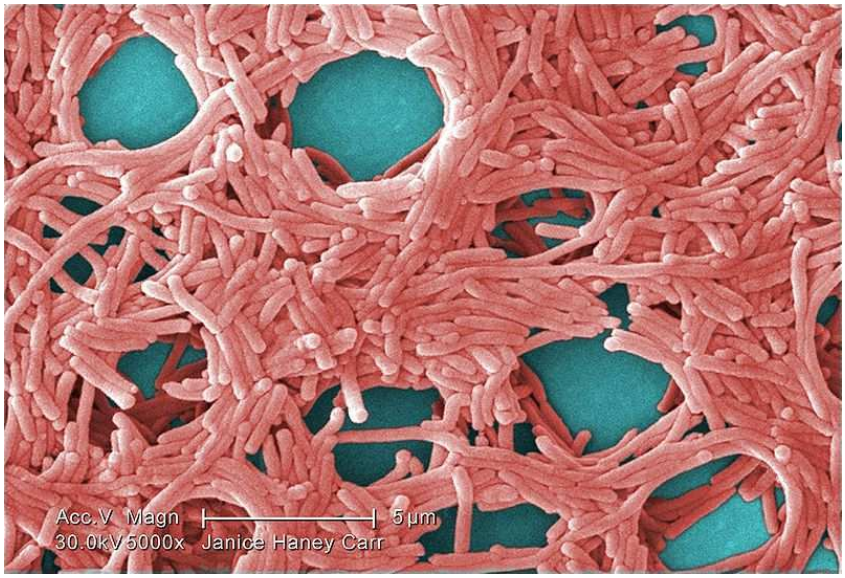


Figure 1 : *Legionella pneumophila* observée au microscope électronique

(CDC, Public Health Image Library : http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=11148)

Un milieu spécifique appelé BCYE a été développé pour la culture de cette bactérie. Il est composé d'extrait de levure, de tampon ACES (N-2-acetamido-2-aminoethansulfonicacid), de α-cétoglutarate et de charbon activé. De la L-cysteine et du pyrophosphate de fer sont ajoutés pour permettre une croissance optimale des bactéries. Le charbon activé est utilisé afin de neutraliser l'effet toxique du peroxyde d'hydrogène et des radicaux superoxides, et d'empêcher l'oxydation photochimique de l'extrait de levure et de la cystéine (Hoffman *et al.*, 1983).

2. Legionella pneumophila

Les données de la littérature montrent que 84% à 98% des infections à *Legionella* sont dues à l'espèce *L. pneumophila* ; 84 à 95% des cas étant dus à des souches du sérogroupe 1 (Harrison et al., 2007; Steinert et al., 2007; Yu et al., 2002). Ceci explique que *L. pneumophila* soit l'espèce la

plus étudiée, dans le but notamment de déterminer ses facteurs de virulence et l'influence des sérogroupes.

2.1 Sérogroupes

L'espèce *L. pneumophila* comporte 15 sérogroupes ; les sérogroupes 6, 3 et 4 étant les plus virulents après le sérogroupe 1 (Helbig *et al.*, 2002; Helbig *et al.*, 2006). Les spécificités des sérogroupes de *L. pneumophila* sont liées aux caractéristiques de ses lipopolysaccharides (LPS) ; des chaînes *O* de différentes longueurs peuvent porter des épitopes variables, ce qui entraîne une hétérogénéité des LPS (Helbig *et al.*, 2006). La spécificité des sérogroupes est due à la configuration de l'homomère, à la structure chimique du sucre en position terminale, aux degrés de *N*-méthylations et *O*-acétylations (Wagner *et al.*, 2007). L'identification du sérotype des souches de *L. pneumophila* est basée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux (reconnaissance des épitopes spécifiques), l'analyse des différents profils de restriction de l'ADN par électrophorèse en champ pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE) (Helbig *et al.*, 1997), ou plus récemment, sur la méthode de « Sequence-Based Typing » ou SBT) (Gaia *et al.*, 2005; Thurmer *et al.*, 2009).

2.2 Facteurs de virulence de *L. pneumophila*

2.2.1 Facteurs de surfaces

- Le **LPS** : c'est un déterminant immunogène de la surface cellulaire de *Legionella*. Il est impliqué dans l'adhérence de la bactérie à la muqueuse respiratoire (Steinert *et al.*, 2002).
- La protéine **MOMP** (Major Outer Membran Protein) : il s'agit d'une porine (24 à 33 kDa) capable de s'insérer dans les membranes des cellules hôtes, et d'ouvrir des canaux permettant le passage des ions (Dowling *et al.*, 1992; Gabay *et al.*, 1985). Elle joue un rôle important dans l'attachement de *Legionella* aux macrophages (Hacker *et al.*, 1993).

Sans cette protéine les légionelles perdent leur capacité à infecter les cellules hôtes (Cianciotto *et al.*, 1989).

- Le **pilus de type IV** : il est impliqué dans l'attachement de *L. pneumophila* à la cellule hôte (Rossier *et al.*, 2004; Soderberg *et al.*, 2004). La biogénèse et l'assemblage des pili de type IV sont assurés grâce à la protéine PilD (Péripiline peptidase) (De Buck *et al.*, 2007).

- Les **flagelles** : ils augmentent les probabilités de rencontre de *Legionella* avec des cellules hôtes et de les infecter. Les flagelles n'interviennent pas dans le processus d'adhérence et ne sont pas nécessaires à la réplication intracellulaire de cette bactérie (Dietrich *et al.*, 2001; Vogel & Isberg, 1999).

- La protéine **MIP** (Macrophage Infectivity Potentiator) est une protéine de 24 kDa codée par le gène *mip*. Elle est exprimée à la surface de la bactérie et est nécessaire aux premières étapes d'infection (Cianciotto, 2001). C'est une peptidyl prolyl-cis-trans-isomerase (PPIase) impliquée dans la survie de *Legionella* à l'intérieur des cellules hôtes (macrophages, protozoaires) (Hacker *et al.*, 1993; Steinert *et al.*, 2002).

- La protéine de choc thermique **Hsp60 (**60 kDa) est sécrétée par *L. pneumophila* pendant la croissance à l'intérieur des macrophages. Elle peut être induite, *in vitro*, sous l'action de la chaleur, du peroxyde d'hydrogène ou d'un choc osmotique. Elle assure l'adhérence et l'entrée des légionelles dans les cellules épithéliales HeLa (Garduno *et al.*, 1998; Hoffman *et al.*, 1990).

2.2.2 Facteurs de sécrétion

Le système ***Dot/Icm*** (Defective in organelle trafficking / intracellular multiplication) est un système de sécrétion de type IV impliqué dans la virulence et la multiplication intracellulaire des légionelles et permet à la bactérie de libérer les molécules effectrices dans la cellule hôte (Lavigne *et al.*, 2006). Il s'agit de l'un des systèmes de sécrétion les plus importants chez *Legionella* puisqu'il inhibe la fusion du complexe phagosome-lysosome et permet de reprogrammer la vacuole des légionelles (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007; Cianciotto, 2001;

Zink *et al.*, 2002). Le système Dot/Icm est codé par 25 gènes localisés dans 2 régions génomiques (région I qui contient 7 gènes et région II composée de 18 gènes) (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007).

Le système de sécrétion de type II **PilD** dépendant assure le développement de l'appareil de sécrétion de type II par assemblage des pseudopilines. La protéine PilD est impliquée dans la multiplication intracellulaire des légionelles dans les cellules hôtes (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007; De Buck *et al.*, 2007). Ce système permet aussi aux légionelles de croître à de basses températures (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007).

La protéine **legiolysin** (Lly) n'est pas impliquée dans la virulence ou l'infection, mais son absence entraîne une diminution de la résistance des légionelles à la lumière naturelle, suggérant un rôle dans l'adaptation des légionelles à leur environnement (Steinert *et al.*, 1995; Steinert *et al.*, 2001).

2.3 Analyse génomique de *L. pneumophila*

Le génome de 12 souches de *Legionella*, dont 11 de *L. pneumophila* et une de *L. longbeachae*, a été complètement séquencé et possède une taille comprise entre 2,68 Mb et 3,64 Mb (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/).

Le génome de *L. pneumophila* est composé d'un seul chromosome circulaire dont le contenu en G-C est d'environ 38% (Albert-Weissenberger *et al.*, 2007; Gomez-Valero *et al.*, 2009). Les souches *L. pneumophila* Lens et Paris, qui contiennent chacune un plasmide de 132 kpb et 60 kpb respectivement (Gomez-Valero *et al.*, 2009; Jules & Buchrieser, 2007), intéressent plus particulièrement la partie expérimentale de ce travail et seront donc détaillées ici. Ces deux souches ont été isolées lors d'épidémies de légionellose survenues en France en 2000-2004 (Cazalet *et al.*, 2004).

La souche Paris, mise en évidence lors de l'épidémie nosocomiale survenue à l'Hôpital Georges Pompidou en 2000, est une souche endémique isolée dans les réseaux de distribution d'eau à Paris depuis au moins 1987. Elle est impliquée dans plus de 30% des cas de légionellose

dans cette ville (Lawrence *et al.*, 1999). Elle était également responsable de plus de 12% des cas de légionellose en France en 2003 (Aurell *et al.*, 2003) et a été reconnue comme une souche épidémique et sporadique à distribution mondiale en 2008 (Cazalet *et al.*, 2004). La souche Lens a été responsable de l'épidémie de légionellose survenue à Lens durant l'hiver 2003-2004, associée à 17 cas mortels sur 87 cas signalés (Nguyen *et al.*, 2006).

La souche Philadelphia a été isolée lors de la première épidémie de légionellose survenue à Philadelphie aux Etats-Unis en 1976 (Chien *et al.*, 2004) et la souche Corby, a été isolée d'un cas de légionellose (Jepras *et al.*, 1985; Steinert *et al.*, 2007).

La **Figure 2** compare le génome de 4 souches de *L. pneumophila* (Paris, Lens, Philadelphia et Corby) en se basant sur la recherche des gènes orthologues (deux séquences génétiques homologues de deux espèces différentes et qui descendent d'une séquence unique présente dans le dernier ancêtre commun aux deux espèces).

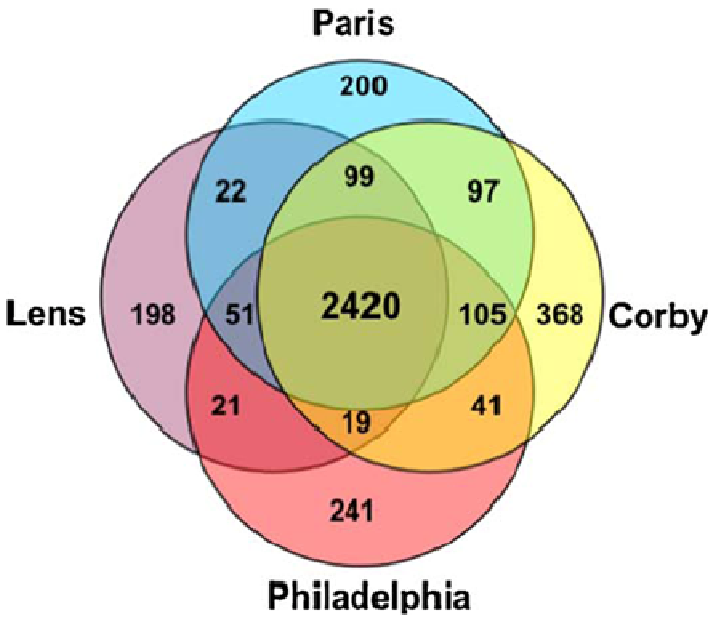


Figure 2 : Diagramme comparant le génome de 4 souches de *L. pneumophila* (Paris, Lens, Philadelphia et Corby) (Gomez-Valero *et al.*, 2009). Les gènes orthologues ont été définis par la meilleure correspondance réciproque (en utilisant le programme d'alignement FASTA). Le seuil est défini avec un minimum d'identité de séquence de 80% et un rapport de longueur de 0,75 - 1,33 kb

Cette comparaison inter-souches du génome montre qu'environ 2400 gènes (80%) sont conservés et que 10% des gènes sont souche-spécifique. La plupart de ces derniers gènes codent des fonctions indéterminées, toutefois certains pourraient être impliqués dans des phénomènes d'adaptation aux conditions environnementales (Cazalet *et al.*, 2004; Gomez-Valero *et al.*, 2009; Jules & Buchrieser, 2007).

On compte environ 3000 gènes chez *L. pneumophila* ; 60% d'entre eux ont des similarités avec des gènes d'autres genres microbiens dont le génome a été complètement séquencé et les 40% restants seraient spécifiques du genre *Legionella* ou de l'espèce *L. pneumophila* (Glockner *et al.*, 2008).

Le génome de *L. pneumophila* subit des transferts horizontaux de gènes (2,4% du génome dérive de phages ou d'insertion de séquences), ce qui contribue à la grande plasticité du génome de cette espèce (Glockner *et al.*, 2008).

Le génome de *L. pneumophila* contient des gènes qui codent pour des protéines semblables à celles retrouvées chez les eucaryotes (Jules & Buchrieser, 2007).

Parmi ces protéines, on peut citer:

- Les Ecto-NTPDases impliquées dans l'entrée de *L. pneumophila* dans la cellule hôte et qui lui permettrait de s'y répliquer.

- Une Sphingosine-1-phosphate lyase qui est un modulateur du métabolisme de la sphingosine-1 phosphate et de la céramide. Ces deux molécules sont impliquées dans l'apoptose et l'autophagie qui sont une réponse immédiate du macrophage suite à l'infection par *L. pneumophila*. Cette protéine pourrait être impliquée dans la régulation de la signalisation cellulaire de la cellule hôte.

- Une glucomylase potentiellement impliquée dans la dégradation du glycogène.

- 3 protéines kinases à sérine et thréonine probablement impliquées dans la modulation du signal de transduction eucaryote et le changement des voies d'échanges cellulaires. Chez d'autres bactéries, ces protéines kinases inhibent la fusion phagosome–lysosome et favorisent la survie intracellulaire (par exemple: PknG chez *Mycobacterim*

tuberculosis) ou détournent les défenses de la cellule hôte eucaryote en interférant avec ses voies de transduction du signal (par exemple YpkA chez*Yersinia pseudotuberculosis*).

- 2 apyrases qui sont présentes dans les vacuoles de l'autophagie, elles pourraient influencer le phagosome contenant *L. pneumophila* en augmentant la concentration des nucléotides triphosphates et diphosphates.

Ce grand nombre de gènes similaires aux gènes trouvés chez les eucaryotes est probablement le résultat de la co-évolution de *L. pneumophila* avec les cellules eucaryotes qu'elles colonisent. Ces gènes sont très conservés chez cette espèce (Bruggemann *et al.*, 2006; Cazalet *et al.*, 2004; Jules & Buchrieser, 2007).

2.4 Écologie des *Legionella*

Les légionelles sont des bactéries hydro-telluriques ; elles sont retrouvées dans des environnements aquatiques naturels (lacs, rivières, sol humide) et également dans des sites hydriques artificiels tels que les tours aéro-réfrigérantes (TAR), les circuits d'eau chaude sanitaires et les systèmes de climatisation (Borella et al., 2005; Fliermans et al., 1981; Taylor et al., 2009). Elles peuvent également vivre dans des environnements marins (3% NaCl entre 4 et 20°C) (Heller et al., 1998).

En général, les légionelles ne sont pas capables de se multiplier de manière extracellulaire, donc leur présence dans l'environnement est favorisée par la formation de biofilms naturels et leur interaction avec des protozoaires telles que les amibes libres.

2.4.1 Interaction avec les protozoaires

Il a été largement décrit dans la littérature que les amibes libres et d'autres protozoaires sont des hôtes naturels de *Legionella* (Fields *et al.*, 2002; Greub & Raoult, 2003; Rowbotham, 1980). Actuellement, on décrit dans la littérature plus de 20 espèces d'amibes libres, dont *Dictyostelium discoideum* et deux espèces de protozoaires ciliés (*Tetrahymena pyriformis* et *T.*

thermophila) (Lau & Ashbolt, 2009) capables d'être infectés par *L. pneumophila*. Les amibes libres les plus fréquemment impliquées appartiennent aux genres *Acanthamoeba, Hartmannella* et *Naegleria* (Abu Kwaik *et al.*, 1998; Philippe *et al.*, 2006; Rowbotham, 1980). Ces amibes sont connues pour leur capacité à ingérer les légionelles et à favoriser leur multiplication et ainsi leur dissémination dans l'environnement.

L'infection des amibes par les légionelles se fait en plusieurs étapes **(Figure 3).**

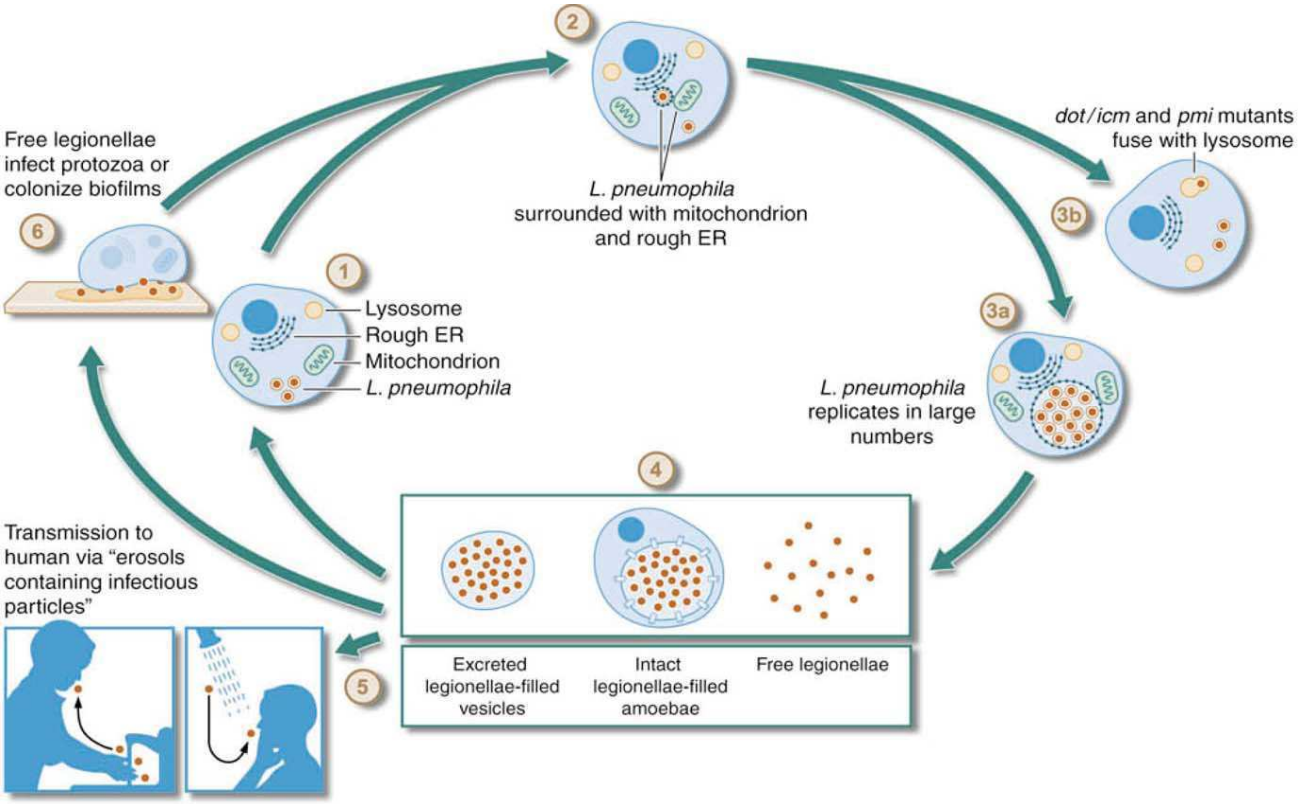


Figure 3 : Cycle de vie de *Legionella pneumophila* (Molmeret et al., 2004). (1), internalisation de *L. pneumophila* par phagocytose. (2), formation de la vacuole réplicative qui permet d'échapper à la fusion du phagosome avec les lysosomes. (3a), réplication de *L. pneumophila*. (3b), mutation génétique entraînant la fusion du phagosome avec le lysosome. (4), dissémination dans l'environnement. (5), infection humaine par inhalation. (6), colonisation d'un biofilm ou infection d'un nouveau protozoaire.

Les amibes internalisent les légionelles libres par phagocytose **(Figure 3-1)**, les phagosomes recrutent rapidement des organites (réticulum endoplasmique, mitochondries, ribosome) ce qui entraîne la formation d'une vacuole réplicative **(Figure 3-2)**. Dans le même temps, les légionelles inhibent la maturation du phagosome et sa fusion avec les lysosomes ce qui leur permet de se multiplier dans la vacuole réplicative jusqu'à épuisement du milieu **(Figure 3-3a)**. En réponse à la limitation de nutriment, la protéine RelA de la bactérie (associée au ribosome) convertit le GTP en ppGpp (alarmone guanosine 3'-5'-bispyrophosphate). Cette molécule se comporte comme signal de carence pour la cellule ce qui entraîne des changements physiologiques. Le taux de facteur sigma RpoS (sigma de phase stationnaire) augmente et entraîne le passage de la bactérie de la phase de croissance à la phase post-exponentielle. Dans ces conditions, la synthèse de l'ARN et des protéines est inhibée, le taux de croissance diminue immédiatement et les facteurs de virulence et de résistance sont alors exprimés (Bachman & Swanson, 2001; Bachman & Swanson, 2004).

Les légionelles dans des cellules hôtes possèdent donc un cycle biphasique :

- une phase de réplication durant laquelle la bactérie est sans flagelle et résistante au sodium. La bactérie est alors peu virulente.
- une phase de transmission, à la suite d'une carence en nutriments, la bactérie devient virulente, mobile et sensible au sodium (Byrne & Swanson, 1998; Molmeret *et al.*, 2004). Il a été suggéré que la limitation en acide aminé induit le phénotype de virulence (Molmeret *et al.*, 2004).

Les légionelles utilisent le système de sécrétion Dot/Icm à différents stades de leurs infections. Elles créent des pores dans la membrane de la cellule hôte pour l'invasion et le transfert d'effecteurs impliqués dans l'infection intracellulaire. Puis, une fois la multiplication bactérienne achevée, le système Dot/Icm est impliqué dans la sécrétion de cytolysine. Cette dernière conduit à la lyse de la cellule hôte soit par apoptose, soit par nécrose et ainsi à la libération des bactéries (Molmeret & Abu Kwaik, 2002). L'inactivation du système (Dot/Icm) entraîne l'incapacité des légionelles à empêcher la fusion phagosome - lysosome **(Figure 3-3b)**.

Les bactéries peuvent être libérées directement dans l'environnement ou dans des vésicules à l'intérieur desquelles elles peuvent survivre pendant des longues périodes et résister aux traitements biocides (Abu Kwaik *et al.*, 1998; Bouyer *et al.*, 2007) **(Figure 3-4).** Une fois libérées, les légionelles libres ou dans les vésicules peuvent infecter l'homme via les aérosols **(figure 3-5)**; les légionelles peuvent également coloniser un biofilm ou infecter de nouveau un protozoaire **(Figure 3-6)**.

Les protozoaires procurent donc aux légionelles plusieurs avantages. Ils leurs permettent d'échapper à l'action de différents traitements utilisés pour les éradiquer (antibiotiques, biocides, température élevée) (Bouyer *et al.*, 2007; Greub & Raoult, 2003; Rowbotham, 1980). Les légionelles libérées des protozoaires sont plus virulentes et plus résistantes aux changements de température et de pH, comparées aux légionelles cultivées *in vitro* et n'ayant pas préalablement infecté des amibes (Abu Kwaik *et al.*, 1998).

2.4.2 Interaction avec les biofilms

Les biofilms se définissent comme des communautés microbiennes complexes attachées à des surfaces et intégrées dans une matrice polymérique extracellulaire (Declerck, 2010; Donlan & Costerton, 2002). Les biofilms sont dynamiques, leur composition est donc en perpétuel changement selon leur âge et leur localisation (Watnick & Kolter, 2000).

Généralement, la formation d'un biofilm se déroule en trois étapes (**Figure 4**) : l'attachement ou l'adhérence des bactéries à la surface **(Figure 4-1)**, la maturation du biofilm **(Figure 4-2)**, le détachement du biofilm et la dissémination dans l'environnement **(Figure 4-3)** (Donlan, 2002).

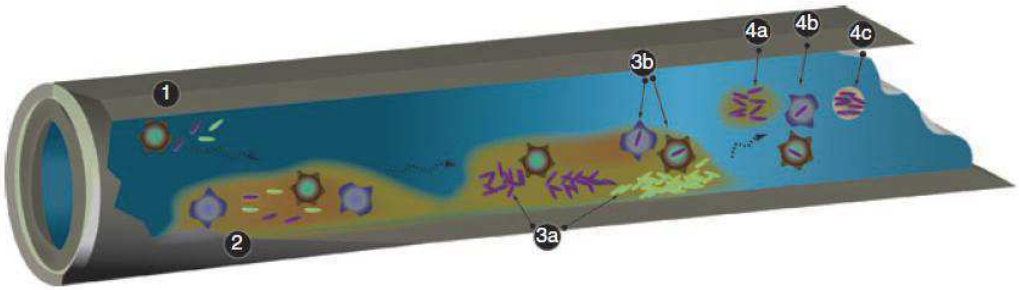


Figure 4 : Développement et relargage de *Legionella* spp dans un système d'eau potable (Lau & Ashbolt, 2009). (1), *Legionella* spp et certaines espèces de protozoaires entrent dans le système de distribution d'eau. (2), ils adhèrent à la surface en s'intégrant dans le biofilm. (3a), *Legionella* spp se multiplie directement dans le biofilm, (3b) ou en « passant » par des protozoaires. *Legionella* spp est ensuite libérée du biofilm: (4a) enchâssée dans la matrice du biofilm, (4b) ou à l'intérieur des protozoaires, (4c) ou dans des vésicules de réplication après passage par les protozoaires.

Les installations d'eau chaude telles que les tours aéro-réfrigérantes, les douches et les spas sont, dans la plupart des cas, à l'origine des épidémies dues à *Legionella*. En effet, cette bactérie est associée aux biofilms qui recouvrent l'intérieur des parois de ces circuits. Ces biofilms représentent une source de nutriments (débris cellulaires, matière organique) (Lau & Ashbolt, 2009). Dans une autre étude, les auteurs ont montré que *L. pneumophila,* des bactéries telles que *Mycobacterium avium* et *Escherichia coli* ainsi que des Calicivirus sont capables de survivre pendant plusieurs semaines dans des biofilms même dans des conditions d'écoulement turbulent en présence de forces de cisaillement élevées (Lehtola *et al.*, 2007). De plus, *L. pneumophila* est capable de survivre de façon nécrotrophe dans des biofilms traités et contenant des cellules mortes (Temmerman *et al.*, 2006).

Par ailleurs, Pryor *et al.* (2004) ont montré que les bactéries du genre *Legionella* étaient détectées dans des biofilms même après des traitements chimiques par le chlore et la monochloramine, avec juste une diminution de la diversité des espèces (Pryor *et al.*, 2004). Il est important de signaler que la co-existence des légionelles avec des protozoaires semble jouer un rôle important dans la colonisation des biofilms (Declerck *et al.*, 2009) et la survie bactérienne (Farhat *et al.*, 2012), surtout en cas de carence en nutriments dans l'environnement (Taylor *et al.*,

2009), au delà du fait que la multiplication extracellulaire des *Legionella* n'est pas encore confirmée.

D'une manière générale, les biofilms présentent plusieurs avantages pour les bactéries. Ils les protègent vis-à-vis des agressions de l'environnement par le biais de matrice qui les entoure. De plus, le biofilm n'est pas une masse compacte et il existe des canaux formés dans la structure du biofilm. Ils permettent les échanges de nutriments et de métabolites avec la phase aqueuse, facilitant ainsi la disponibilité en nutriments et permettent l'élimination des métabolites potentiellement toxique. Il est aussi à noter que les légionelles sont naturellement compétentes et peuvent donc acquérir de nouveaux caractères génétiques par récupération d'ADN dans l'environnement (transfert de gènes par transformation naturelle) (Charpentier *et al.*, 2011; Sexton & Vogel, 2004; Stone & Kwaik, 1999).

2.5 Thermalisme et légionelles

2.5.1 Thermalisme

Les vertus du thermalisme sont connues depuis l'époque gréco-romaine. Les sources d'eau ont toujours été liées avec les divinités de la Terre, et le recours à l'eau minérale naturelle (EMN), chaude et froide, était un art de guérir et de vivre (Melillo, 1995). Les indications du thermalisme incluent le traitement de maladies telles que le psoriasis, les faiblesses musculaires, les rhumatismes, les inflammations des ganglions lymphatiques… Le thermalisme se définit donc aujourd'hui par l'utilisation des EMN à des fins thérapeutiques. C'est une activité qui s'adresse à des curistes de tous âges.

En Tunisie, le thermalisme est connu depuis plus de deux mille ans, le pays disposant d'un patrimoine riche en sources naturelles d'eaux minérales chaudes et froides. On compte à peu près 50 sources thermales chaudes ayant des compositions chimiques qui leurs permettent d'être utilisées pour les cures thermales.

La fréquentation des établissements thermaux en Tunisie, tout particulièrement des hammams, n'a cessé d'augmenter au cours du temps. En 2012, les bains thermaux ont reçu

environ 3,3 millions de curistes (site de l'Office National du Thermalisme Tunisien : http://www.thermalisme.nat.tn/site/publish/content/article.asp?ID=134&).

En France, le Décret 89-369 du 06 Juin 1989 relatif aux eaux minérales naturelles et aux eaux potables pré-emballées définit une EMN comme étant "*une eau possédant un ensemble de caractéristiques qui sont de nature à lui apporter ses propriétés favorables à la santé. Elle se distingue nettement des autres eaux destinées à la consommation humaine : par sa nature, caractérisée par sa teneur en minéraux, oligo-éléments ou autres constituants et par certains effets ; par sa pureté originelle, l'une et l'autre caractéristique ayant été conservée intacte en raison de l'origine souterraine de cette eau qui a été tenue à l'abri de tout risque de pollution. Elle provient d'une nappe ou d'un gisement souterrain exploité à partir d'une ou plusieurs émergences naturelles ou forées. Elle témoigne, dans le cadre des fluctuations naturelles connues, d'une stabilité de ses caractéristiques essentielles, notamment de composition et de température à l'émergence, qui n'est pas affectée par le débit de l'eau prélevée."*

Les EMN ne peuvent donc pas subir de traitements susceptibles de modifier leur composition initiale. Cependant, les établissements thermaux doivent mettre en place un système de contrôle afin de maîtriser les risques liés aux EMN, notamment le risque microbiologique.

2.5.2 Risques microbiologiques liés au thermalisme

Le risque microbiologique, directement lié à l'EMN, est considéré comme le risque le plus délicat à maîtriser. La flore hydro-tellurique peut être à l'origine de pathologies graves en cas de prolifération dans les circuits d'eau (source, stockage, point d'usage).

La circulaire DGS/VS4 N°2000-336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux français impose l'absence de microorganismes à partir de la source d'EMN, jusqu'au point d'usage. Les microorganismes recherchés sont les bactéries revivifiables après 72 h à 22°C et 24 h à 37°C, les coliformes à 37°C, les coliformes thermo-tolérants (*Escherichia coli*) à 44,5°C, les Streptocoques fécaux (entérocoques), les bactéries anaérobies sporulées sulfito-réductrices, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella* spp et *L. pneumophila*, les amibes et les virus. La source d'EMN peut être l'objet d'une

contamination environnementale (*P. aeruginosa*), ou d'origine fécale (*E. coli*, entérocoques, bactéries anaérobies sporulées sulfito-réductrices).

Les légionelles peuvent facilement se développer dans l'eau des établissements thermaux qui présentent des températures favorables à leur croissance, entre 30°C et 45°C. Les sujets sains ou fragilisés qui fréquentent ces établissements sont donc tous potentiellement exposés à une contamination par ces bactéries via les aérosols générés lors d'une cure thermale. De plus, une mauvaise gestion des canalisations et un nettoyage insuffisant des pommeaux de douches et des robinets peuvent augmenter ce risque (Circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 du 19 juin 2000**).**

2.5.3 Normes applicables à *Legionella* et *L. pneumophila* dans le contexte des stations thermales

En France, la recherche des légionelles dans les eaux thermales est devenue obligatoire depuis 1992 avec l'arrêté du 20 juillet 1992 et avec la circulaire DGS/SD1.D92/N°513 du 20 juillet 1992 relatifs au contrôle de sources d'eaux minérales et à la qualité des eaux minérales dans les établissements thermaux. Ces textes ont été remplacés par la circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux et par l'arrêté du 19 juin 2000 modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié, relatif au contrôle des sources d'eaux minérales.

Dans les eaux thermales, la concentration de *Legionella* et *L. pneumophila* par litre d'eau doit être inférieure au seuil de détection de la méthode normalisée et ce à l'émergence et aux points d'usage.

Les normes microbiologiques de référence sont précisées dans les Normes NF T 90-431 (2003), norme NF T 90-431/A1 (2006) et norme NF EN ISO 11731-2 (juillet 2008).

En Tunisie, il n'existe pas à notre connaissance de norme nationale concernant la recherche de légionelles. Cependant, les établissements thermaux qui disposent d'équipements à la pointe du progrès appliquent les normes françaises et européennes pour les EMN.

Il est à noter que ces normes ne sont pas applicables aux réseaux de distribution d'eau chaude sanitaire et tours aéro-réfrigérantes humides (TAR). En effet, la concentration de *L. pneumophila* à partir de laquelle les autorités interviennent dans les réseaux d'eau chaude sanitaire est de 10^3 UFC/L. Pour les TAR, une action corrective (nettoyage et désinfection de la station) est envisagée si la concentration en *Legionella* spp. est $\geq 10^3$ UFC/L (arrêt du fonctionnement de la TAR si $> 10^5$ UFC/L).

3. La légionellose

La légionellose est une maladie à déclaration obligatoire en France depuis 1987 (Benhamou et al., 2005)**.**

3.1 Source de contamination

La contamination se fait par inhalation d'aérosols contaminés par *Legionella* (Fields et al., 2002). Ces aérosols doivent avoir des diamètres compris entre 2 et 5 µm pour pouvoir contenir une charge bactérienne suffisante, c'est-à-dire pouvant atteindre les alvéoles et infecter par la suite les macrophages pulmonaires (Baron & Willeke, 1986; Bollin et al., 1985; Girod et al., 1982). La transmission inter-humaine ou manuportée de la légionellose n'a pas été signalée (Atlas, 1999; Benhamou et al., 2005; Fields, 1996).

Les principales sources de contaminations sont les installations artificielles générant des aérosols, telles que les TAR, spas, douches, bains bouillonnants, conditionneurs d'air, fontaines, machines à glace (Atlas, 1999). Les TAR de taille modeste, surtout celles dont le fonctionnement a été interrompu ou celles en cours de construction, ont été impliquées dans la plupart des épidémies de légionellose (Atlas, 1999; Benhamou *et al.*, 2005; Bentham & Broadbent, 1993; Mermel *et al.*, 1995). Ces installations ont la capacité de disperser des aérosols contaminés à des distances plus ou moins importantes (Ishimatsu *et al.*, 2001). En effet, lors de l'épidémie de Lens (France), survenue en 2003-2004, des cas ont été signalés à 12 kilomètres de la source de contamination (Nguyen *et al.*, 2006).

3.2 Formes cliniques

La légionellose se présente sous deux formes cliniques distinctes :

- **La fièvre de Pontiac** est la forme clinique bénigne associée à l'infection par *Legionella* spp. Il s'agit d'un syndrome pseudo-grippal se manifestant après une incubation de 2 à 5 jours, et guérissant spontanément. Parmi les symptômes, on retrouve : fièvre, céphalées, myalgies, toux sèche, maux de gorge, douleurs musculaires,… La fièvre de Pontiac a été décrite pour la première fois en 1968 suite à l'épidémie de Pontiac, Michigan (Etats Unis) (Glick *et al*., 1978).

- **La maladie du légionnaire** est la forme clinique sévère de l'infection par *Legionella* spp. couramment appelée légionellose. Les individus à haut risque sont les personnes immunodéprimés sévères, immunodéprimés après transplantation ou greffe d'organe, et immunodéprimés par corticothérapie prolongée ou récente à haute dose. Sont également à risque les immunodéprimés atteints d'hémopathie maligne, de cancer ou sous traitement immuno-dépresseur. Enfin, d'autres facteurs associés à la maladie sont retrouvés dans la littérature, tels que l'âge (>50 ans), le sexe (masculin), le tabagisme, le diabète, certaines pathologies chroniques, … La légionellose se manifeste comme une pneumonie aigüe, après une période d'incubation de 2 à 10 jours (Ching & Meyer, 1987).

Elle débute par des malaises, de la fièvre, une dyspnée, une rhinite légère, une toux importante, parfois de symptômes neurologiques (céphalées, hallucinations, amnésies…), gastro-intestinaux (diarrhées, vomissement, douleurs abdominales…), et biologiques (insuffisance respiratoire, insuffisance rénale, protéinurie, hématurie, cytolyse hépatique…). Dans certains cas, les patients présentent des expectorations striées de sang (Benhamou *et al*., 2005; Jarraud *et al*., 2007).

La légionellose est associée à des taux de mortalité entre 15 à 20% en absence d'une prise en charge (traitements par des antibiotiques adaptés, hospitalisation dans les cas sévères) (Bartram *et al*., 2007).

3.3 Épidémiologie

En France, depuis 1987, la surveillance de la légionellose repose sur la démarche de déclaration obligatoire (Benhamou *et al.*, 2005). Depuis le renforcement de sa surveillance en 1997, le nombre de cas de légionellose déclarés auprès des autorités sanitaires a considérablement augmenté, et était de 1500 cas en 2010 **(Figure 5)**.

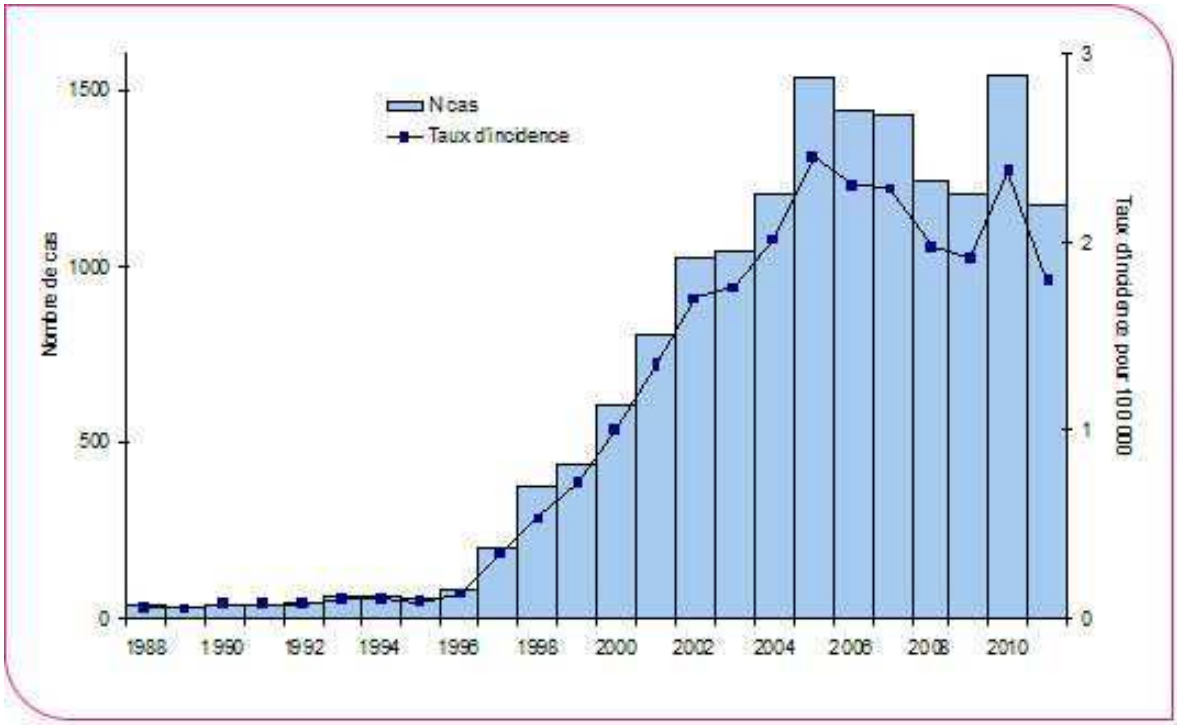


Figure 5 : Évolution du nombre de cas et du taux annuel d'incidence de la légionellose en France, 1988-2011.

(http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-respiratoires/Legionellose/Donnees/Bilan-des-cas-de-legionellose-survenus-en-France-en-2011)

L'étude menée entre 1988 et 2011 suggère que la répartition des cas de légionellose au cours de l'année n'est pas homogène, et que les mois les plus chauds (juin à septembre) présentent le plus de risque (53% des cas) (www.invs.sante.fr).

En Tunisie, les données et chiffres issus des articles médicaux concernant la légionellose sont rares et parfois anciens. Il faut noter que la maladie a été déclarée chez quelques personnes et continue à sévir sous forme sporadique (Ben M'Rad *et al.*, 2004). Entre 2001 et 2005 seuls 5 cas de légionelloses ont été diagnostiqués en Tunisie et 28 cas ont été associés à un voyage en Tunisie, d'après le Groupe de travail européen sur les infections à *Legionella* (European Working Group on *Legionella* Infections, EWGLI) **(Tableau 1)**. Il faut noter également que même si les données recueillies reflètent une incidence faible, il est important de rappeler que cette maladie n'est pas à déclaration obligatoire en Tunisie; et par conséquent les chiffres peuvent sous-estimer cette pathologie.

Tableau 2 : Nombre de cas de légionelloses en Tunisie de 2001 à 2005 (Mehiri-Zghal *et al.*, 2009)

Nombre de cas	1990-1995	1996-2000	2001-2005	Total
Cas suspectés	72	473	489	1034
Cas diagnostiqués	4	14	5	23
Cas reportés par EWGLI	10	22	28	60

4. Lutte contre les *Legionella*

4.1 Agents désinfectants

L'utilisation d'agents désinfectants constitue l'approche la plus courante pour le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau. Il existe plusieurs produits actifs contre *Legionella* spp., parmi lesquels les biocides oxydants qui regroupent les produits chlorés (chlore, monochloramine, dioxyde de chlore) ou bromés (bromure d'ammonium, bromure de sodium, acide hypobromeux). Le chlore est le plus utilisé pour la désinfection du fait de son action rapide

même à faible teneur, et de son pouvoir oxydant (Loret et al., 2005; Small et al., 2007). Le chlore peut être utilisé de deux manières : (1) soit en mode continu où la concentration recommandée pour le contrôle de *L. pneumophila* en chlore ou d'hypochlorite de sodium est de 2 – 6 mg/L au point d'usage, (2) soit en forte concentration pour créer une sorte de choc chloré périodique avec des concentrations de 20 - 50 mg/L de chlore libre. Cette dernière approche est utilisée pour le nettoyage des canalisations, elle est suivie par le remplacement de l'eau dans le système après 1 – 2h. La concentration de chlore est maintenue à 1 mg/L par la suite (Kim et al., 2002). Il a été montré que le chlore est plus efficace à des températures élevées : 43°C par rapport à 25°C bien que sa décomposition est plus importante quand on augmente la température (Muraca et al., 1987). De plus, pour traiter les légionelles associées à des protozoaires, des concentrations plus importantes sont demandées : > 4 mg/L dans le cas d'*Hartmanella vermiformis* et > 50 mg/L dans le cas de kyste d'*Acanthamoeba polyphaga* (Kilvington & Price, 1990). Cependant le chlore présente des inconvénients : (1) il permet de supprimer les légionelles mais rarement de les éradiquer à cause de la présence de ces bactéries dans des protozoaires qui peuvent être, eux-même, résistants au chlore ou du fait que le chlore ne peut pas bien pénétrer dans les biofilms ; (2) le chlore est corrosif, ceci doit être pris en considération pour protéger les tuyaux et les matériaux de construction utilisés dans les systèmes d'eau chlorée. Parfois, un revêtement protecteur, le silicate de sodium par exemple, peut être appliqué. (3) la découverte de sous-produits chlorés dans l'eau potable domestique au début des années 1970, a augmenté les inquiétudes concernant leurs effets néfastes sur la santé, notamment la cancérogénicité des trihalométhanes. L'utilisation de concentrations élevées de chlore (en continu ou en traitement de choc) induit la production de composés organochlorés. Il faut considérer leurs impacts potentiels sur les travailleurs dans les installations concernées et la qualité de l'eau (Kim et al., 2002).

L’utilisation de monochloramine dans la désinfection des établissements et des systèmes d’eau publics a été proposée en alternative au chlore (Fields et al., 2002).

Trois chloramines sont générés lorsque le dichlore (Cl_2) réagit avec l'ammoniac (NH_3) dans l'eau : la monochloramine (NH_2Cl), dichloramine ($NHCl_2$), et la trichloramine (NCl_3). Ces chloramines sont appelés "chlore combiné". La monochloramine est généralement l'espèce prédominante à pH neutre (Flannery et al., 2006; Kim et al., 2002; Vikesland et al., 2001). La monochloramine est plus stable que le chlore libre, mais se montre moins efficace en tant que

désinfectant. Des études ont montré que les hôpitaux approvisionnés en eau potable contenant du chlore libre étaient plus susceptibles d'avoir un foyer signalé de légionelles que ceux qui ont utilisé l'eau contenant de la monochloramine (Heffelfinger et al., 2003; Kool et al., 1999). Cependant, il a été suggéré que la monochloramine pénètre mieux dans les biofilms que le chlore libre, résultant en une meilleure inactivation des bactéries dans le biofilm (LeChevallier et al., 1988a; 1988b; Samrakandi et al., 1997).

La désinfection peut également être réalisée grâce à des agents non oxydants renfermant des molécules organiques, tels que des aldéhydes, des thiazolones, des amines halogénées… (Kim et al., 2002).

4.2 Traitements thermiques

Il s'agit d'augmenter la température de l'eau jusqu'à 70°C pendant 30 minutes. Il a été montré que pour réussir à réduire l'inoculum de *Legionella* d'un log, il faut maintenir la température de l'eau à 45, 50, 60 et 70°C pendant 2500, 380, 5 et 1 minutes, respectivement (Lin et al., 1998). Plusieurs études montrent que pour éliminer les légionelles, la température de l'eau doit être supérieure à 60°C. Le traitement thermique permet de limiter la formation des biofilms ; cependant, ce mode de traitement des circuits d'eau n'est appliqué efficacement que dans les installations d'eau de petite dimension. De plus, le traitement thermique consomme beaucoup d'énergie et n'est pas adaptable à tous les types de matériaux (problèmes de thermo-résistance). Par ailleurs, la biomasse dégradée produit de la matière organique qui constitue une source de nutriments utilisable par les microorganismes (Blanc et al., 2005; Temmerman et al., 2006).

4.3 Traitements biologiques

Les agents chimiques, utilisés à forte dose et en grande quantité, ont des effets négatifs sur l'environnement. De ce fait le recours à d'autres méthodes de désinfection moins nocives, alliant efficacité et biodégradabilité, est recherché. Seules quelques molécules anti-*Legionella* ont été décrites dans la littérature, parmi lesquelles :

- La lactoferine qui est une glycoprotéine qui lie le fer disponible dans différents fluides de l'organisme (lait, salive, larmes…) (Bortner et al., 1986). Sous sa forme non saturée en fer, elle permet de limiter la quantité de fer disponible induisant l'inhibition de la multiplication intracellulaire de *L. pneumophila* dans les monocytes humains (Byrd & Horwitz, 1989; Byrd & Horwitz, 1991).

- Le LBM415, un inhibiteur de peptides déformylases, présente une activité anti-*Legionella* in vitro (CMI 4 µg/mL) (Edelstein et al., 2005). Cette activité n'est pas spécifique, ce peptide étant par exemple actif sur les genres *Streptococcus, Staphylococcus* et *Enterococcus* (CMI de l'ordre de 8 µg/mL) (Fritsche *et al*., 2005). Ce peptide inhibe réversiblement la croissance de *L. pneumophila* dans les macrophages alvéolaires (Edelstein *et al*., 2005).

- La warnéricine RK, peptide produit par *Staphylococcus warneri* RK, inhibe *Legionella* spp. en déstabilisant la membrane composée de phosphatidylcholine, induisant sa perméabilisation aux cations (Verdon *et al*., 2008; Verdon *et al*., 2009).

Récemment, des huiles essentielles (HE) extraites d'une part des feuilles de *Cinnamomum osmophloeum* et de *Cryptomeria japonica* (Chang *et al.*, 2008) et d'autre part de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Mondello *et al*., 2009) ont montré une activité anti-*Legionella*. L'utilisation d'HE pourrait s'avérer une alternative pertinente à l'utilisation des agents chimiques largement appliqués de nos jours.

Chapitre 2 : Les huiles essentielles (HE)

1. Généralités

D'après la pharmacopée européenne, une HE est «*un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition*» (Pharmacopée Européenne, 2008).

Les HE peuvent être retrouvées dans tous les types d'organes végétaux : fleurs, feuilles, écorces, racines, rhizomes, graines…mais dans un nombre limité de familles botaniques telles que les *Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Myrtaceae*, *Piperaceae, Rutaceae*… (Bruneton, 2009; Burt, 2004). Les HE seraient synthétisées par les plantes en réponse à des conditions de stress et pour lutter contre des agressions parasitaires et microbiennes, elles peuvent aussi attirer quelques insectes afin de faciliter la dispersion du pollen et des graines, ou repousser les insectes indésirables (Bakkali *et al.*, 2008). La teneur en HE est généralement faible et ne dépasse pas 10 mL/kg, à l'exception de certaines parties de plantes, comme le bouton floral de giroflier qui peut contenir jusqu'à 150 mL/kg d'HE.

2. Méthodes d'extraction des HE

Plusieurs approches méthodologiques permettent d'extraire et de produire des HE (Bruneton, 2009) :

2.1 Extraction des HE par entraînement à la vapeur d'eau

- L'hydrodistillation est la méthode la plus anciennement utilisée. Il s'agit d'immerger directement le matériel végétal dans un alambic rempli d'eau qui sera ensuite portée à ébullition. La chaleur permet aux cellules végétales d'éclater et de libérer les molécules odorantes; ces

dernières forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique. Ce mélange est condensé sur une surface froide (réfrigérant). La séparation se fait par différence de densité. L'hydrodistillation peut nécessiter plusieurs heures en fonction de la matière végétale et du dispositif utilisé, ceci influençant le rendement et la composition de l'extrait obtenu.

- La distillation à vapeur saturée, à la différence de la méthode citée précédemment, ne met pas la matière végétale en contact avec l'eau. En effet, la vapeur d'eau est injectée au travers du matériel végétal disposé sur des plaques perforées au dessus de la base de l'alambic. Ce procédé réalisé en surpression modérée permet de réduire le temps de traitement, de limiter l'altération de l'huile essentielle et d'assurer une économie d'énergie.

- L'hydrodiffusion est une méthode très proche de la distillation à vapeur saturée. En effet, dans ce cas, la vapeur d'eau traverse la matière végétale de haut en bas, à pression réduite (0,02-0,15 bar). La composition des huiles essentielles obtenues est qualitativement différente de celle obtenue par les autres procédés. Cette technique permet de réduire la durée de l'extraction et par conséquent d'économiser l'énergie nécessaire.

2.2 Extraction des HE par expression à froid

Ce procédé, réservé aux citrus (agrumes), fait appel à un traitement mécanique qui permet de dilacérer l'épicarpe (zeste) riche en glandes à essences et d'en récupérer le contenu par un procédé physique. Classiquement, cela consiste à exercer, sous un courant d'eau, une action abrasive sur la surface du fruit. Après élimination des déchets solides, l'HE est séparée de la phase aqueuse par centrifugation.

2.3 Autre procédé

L'hydrodistillation par micro-ondes sous vide est une technique récente, développée au cours des dernières décennies. Elle consiste à chauffer la plante sélectivement par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. L'HE est entraînée dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée. Ce

procédé permet de réduire la durée de distillation, la consommation d'énergie ainsi que la température employée, conduisant à l'obtention d'un produit de qualité supérieure à celle du produit d'hydrodistillation classique.

D'autres procédés, développés ci-après, permettent l'obtention de concrètes et résinoides, deux extraits obtenus à partir d'une matière première végétale respectivement fraîche ou sèche, par extraction à l'aide d'un solvant non aqueux :

2.4 Extraction des HE par solvants

Cette technique classique consiste à mettre un solvant en contact avec la matière végétale dans des installations de type extracteurs statiques, Soxhlet… Puis, des lavages successifs vont permettre d'épuiser la plante de ses composés aromatiques. Ensuite le solvant est distillé à pression atmosphérique. En fin d'opération, le solvant, qui imbibe la masse végétale, est récupéré par injection de vapeur d'eau dans celle-ci. Le solvant utilisé doit avoir une température d'ébullition faible pour être éliminé facilement, un pouvoir solvant à l'égard des constituants aromatiques, ne doit pas réagir chimiquement avec les molécules extraites, doit être stable et assurer une sécurité de manipulation. L'inconvénient majeur de cette méthode est le manque de sélectivité des solvants, solubilisant de nombreuses substances lipophiles dans les concrètes. Cette technique présente aussi des risques de toxicité.

2.5 Cas particulier : extraction par un corps gras fondu

Le matériel végétal est immergé à chaud dans un corps gras fondu, mettant à profit la liposolubilité des composants odorants.

2.6 Extraction des HE par les gaz supercritiques

Cette méthode est basée sur la solubilité des composés odorants dans les gaz à l'état supercritique. En effet, au-delà du point critique, un fluide peut avoir la densité d'un liquide et la viscosité d'un gaz d'où une bonne aptitude à diffuser dans le matériel végétal et un bon pouvoir

solvant. Le dioxide de carbone est le solvant le plus utilisé en raison de son inertie chimique, son ininflammabilité, son accès et élimination facile, sa sélectivité et son faible coût. Le CO_2 à l'état supercritique va extraire les composés d'intérêt puis son retour à l'état gazeux permettra de le séparer du soluté.

Cette méthode conduit à l'obtention d'extraits de composition proche de celle des produits naturels et permet de faire varier la sélectivité et la viscosité sans risque d'hydrolyse.

Le mode d'obtention conditionne les caractéristiques de l'HE, en particulier : viscosité, couleur, solubilité, volatilité, enrichissement ou appauvrissement en certains constituants. Ceci influence par conséquent leurs utilisations et applications.

3. Les activités antimicrobiennes des HE

L'action des HE contre les bactéries a été mise en évidence par Delacroix dès 1881 (Burt, 2004). Depuis, les propriétés antibactériennes d'une grande variété d'HE ont été définies. Les HE ont un large spectre d'action, agissant contre des bactéries Gram positives et négatives appartenant à différents phyla bactérien. Toutefois, des études suggèrent que les bactéries Gram négatives seraient moins sensibles à l'action des HE, en lien avec la structure et la composition de leur membrane externe **(Figure 6)** qui empêcheraient la diffusion des composés hydrophobes à travers la couche lipopolysaccharidique (Burt, 2004; Vaara, 1992).

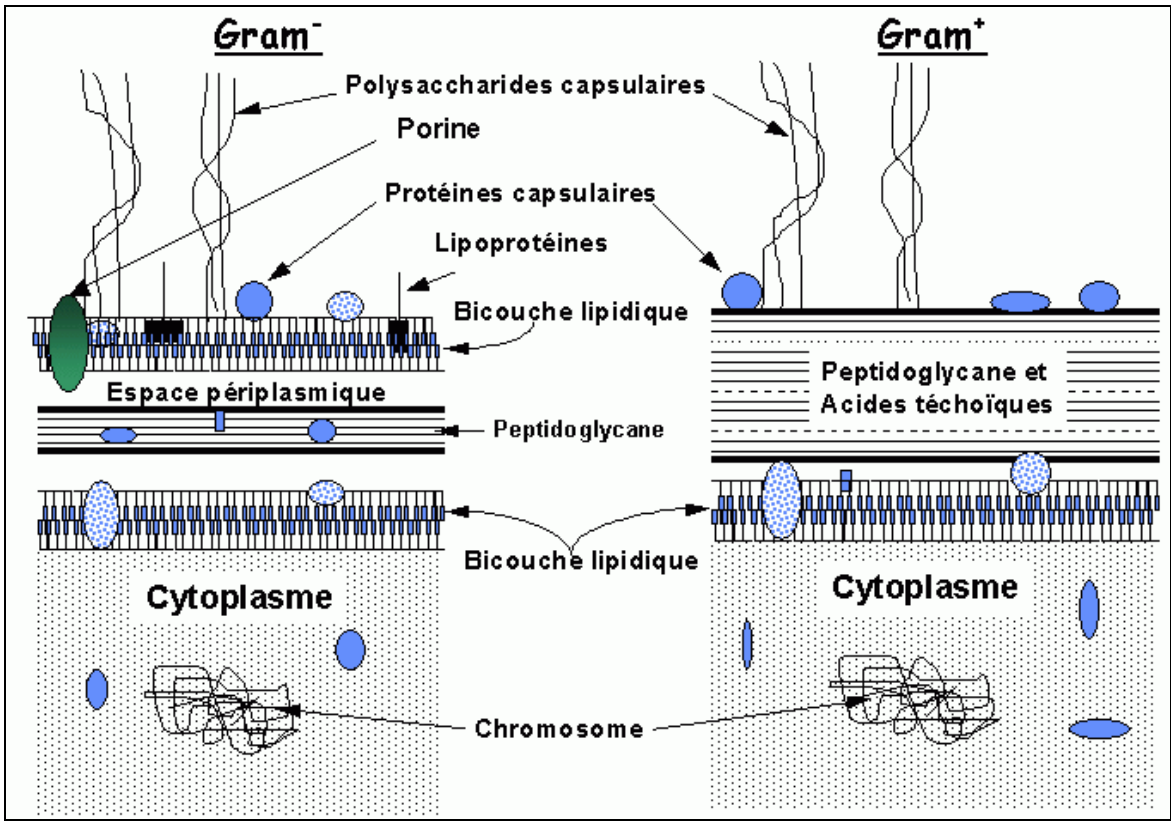


Figure 6 : Comparaison de la structure de la membrane des bactéries Gram positives et Gram négatives.

(http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2001/BisognanoC/these_body.html)

Cependant, des exceptions ont été rapportées : les bactéries Gram négatives *Aeromonas hydrophila* (Wan *et al.*, 1998) et *Campylobacter jejuni* (Wannissorn *et al.*, 2005) seraient sensibles à l'action des HE. Par ailleurs, dans une étude récente, Solorzano-Santos et Miranda-Novales (2012) suggèrent que les bactéries Gram positives seraient les plus résistantes à l'action des HE (Solorzano-Santos & Miranda-Novales, 2012). L'efficacité de l'activité antibactérienne varie ainsi d'une HE à une autre et en fonction des souches bactériennes.

Certaines HE peuvent inhiber la croissance de bactéries pathogènes résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques. Shin et Kim (2005) ont montré l'action antibactérienne d'HE isolées de deux espèces de thym de Corée sur *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *S. entereditis* (Shin & Kim, 2005). De même, certaines HE extraites

de menthe, de thym, de lavande, d'eucalyptus, d'agrumes, d'arbre à thé, seraient particulièrement efficaces contre les *S. aureus* résistants à la méthicilline (SARM) et les entérocoques résistants à la vancomycine (Fisher & Phillips, 2009; May *et al.*, 2000; Nostro *et al.*, 2004; Tohidpour *et al.*, 2010). Certaines HE peuvent inhiber la croissance des bactéries planctoniques mais également la formation de biofilms bactériens (Nostro *et al.*, 2007).

Des propriétés antifongiques d'une grande variété d'HE, incluant les huiles de thym, de cannelle, d'arbre à thé, de citronnelle ont également été identifiées, agissant contre les levures du genre *Candida* (*C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei*), les champignons filamenteux (*Aspergillus flavus, A. niger Fusarium* sp., *Penicillium islandicum*), les dermatophytes (*Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes, Microsporum gypseum, Epidermophyton floccosum*) (L. M. Lopes *et al.*, 2011; Ooi *et al.*, 2006).

4. La composition des HE

4.1 La composition chimique des HE

Les HE sont principalement des mélanges complexes de terpénoïdes (composés majoritaires) et de composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Les terpènes dérivent de la condensation d'unités isopréniques (à 5 carbones branchés) et sont classés selon le nombre d'unités qui les composent (Dorman & Deans, 2000). Les HE incluent les terpènes les plus volatils, de faibles poids moléculaires: les monoterpènes (C_{10}) et sesquiterpènes (C_{15}) et, en moindre quantité, les diterpènes (C_{20}) (Bakkali *et al.*, 2008; Bruneton, 2009; Dorman & Deans, 2000).

Les monoterpènes sont formés par deux unités isopréniques (C_5H_8). Ce sont les molécules les plus représentées dans les HE (environ 90%) et elles présentent une grande variété de structures (alcools, aldéhydes, cétones, esters, etc). Les sesquiterpènes ($C_{15}H_{22}$), quant à eux, sont formés par l'assemblage de trois unités isopréniques. Ces molécules présentent également une grande variété structurale, avec plus d'une centaine de squelettes différents décrits (Bakkali *et al.*, 2008; Bruneton, 2009).

Les composés aromatiques, dérivés du phénylpropane (C_6-C_3), sont nettement moins fréquents que les terpénoïdes. Ils regroupent cependant des composés odorants bien connus, comme par exemple: l'estragole, l'apiol ou l'anéthole présents dans certaines HE d'*Apiaceae* (anis, fenouil, persil, …) (Bakkali *et al.*, 2008; Bruneton, 2009).

La chromatographie en phase gazeuse (CPG), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM), la résonnance magnétique nucléaire (RMN) permettent d'identifier les constituants des HE (Salzer, 1977; Tomi *et al.*, 1995; Tomi & Casanova, 2006). Ces différentes techniques ont permis de montrer la composition complexe des HE. En effet, plus de 60 molécules différentes peuvent entrer dans la composition chimique d'une HE **(Tableau 3)**. Certains composés sont présents à l'état de traces alors que des composés majoritaires peuvent représenter plus de 80% de l'HE (Senatore, 1996).

Tableau 3 : Principaux constituants des HE présentant des activités antibactériennes (Burt, 2004)

Nom commun de l'HE	**Nom latin des plantes**	**Composés majoritaires des HE**	**Composition (%)**
Coriandre	*Coriandrum sativum* (feuilles immatures)	linalol	26%
		E-2-decanal	20%
	Coriandrum sativum (graines)	linalol	70%
Cannelle	*Cinnamomum zeylanicum*	trans-cinnamaldéhyde	65%
Origan	*Origanum vulgare*	carvacrol	trace à 80%
		thymol	trace à 64%
		γ-terpinène	2 à 52%
		p-cymène	trace à 52%
Romarin	*Rosmarinus officinalis*	α-pinène	2 à 25%
		acétate de bornyl	0 à 17%
		camphre	2 à 14%
		1,8-cinéole	3 à 89%
Sauge	Salvia officinalis	camphre	6 à 15%
		α-pinène	4 à 5%
		β-pinène	2 à 10%
			6 à 14%

		1,8-cinéole	20 à 42%
		α-thujone	
Girofle	*Syzygium aromaticum*	eugénol	75 à 85%
		acétate d'eugénol	8 à 15%
Thym	*Thymus vulgaris*	thymol	10 à 64%
		carvacrol	2 à 11%
		γ-Terpinène	2 à 31%
		p-Cymène	10 à 56%

Différents facteurs font varier la composition des HE : l'organe végétal prélevé (feuille, graine, fruit, tronc…), le stade de développement de la plante, la saison et la zone géographique de récolte, le procédé d'obtention (Bruneton, 2009; Burt, 2004).

4.2 Les composants des HE

Les HE sont classées selon la nature chimique des principes actifs majeurs. Ci après sont cités les composés les plus décrites dans la littérature :

- Les **phénylpropanoïdes ou composés phénoliques :** ils sont synthétisés à partir d'acides aminés aromatiques : la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. Les composés phénoliques comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol **(Figure 7)** présents dans les HE de thym, d'origan et de clou de girofle sont considérés comme les composés antibactériens les plus actifs en raison du caractère acide de leur substituant hydroxyle (Burt, 2004; Cosentino *et al.*, 1999; Ultee *et al.*, 2002).

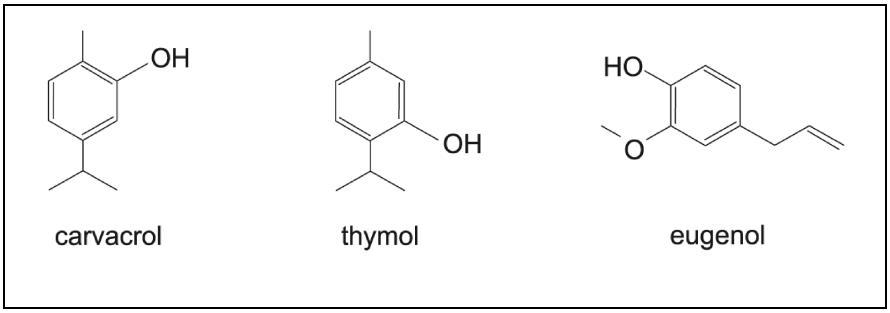


Figure 7 : Structure chimique du carvacrol, du thymol et de l'eugénol (Burt, 2004)

- Les **composés carbonylés**, appartenant aux familles chimiques des aldéhydes (formaldéhyde et glutaraldéhyde) et des cétones présentent également une activité antimicrobienne importante (Naigre *et al.*, 1996; Ngarmsak *et al.*, 2006; Oosterhaven *et al.*, 1995). Les propriétés antimicrobiennes de la vanilline (aldéhyde), de la trans-cinnamaldéhyde (aldéhyde) et la S-carvone (cétone) **(Figure 8)**, du camphre (cétone) ont été décrites (Burt, 2004; Ngarmsak *et al.*, 2006; Oosterhaven *et al.*, 1995). Les HE riches en aldéhydes comprennent les HE de cannelle, de citronnelle, d'eucalyptus; tandis que les HE de sauge, de thuya et de camphrier sont des HE riches en cétones.

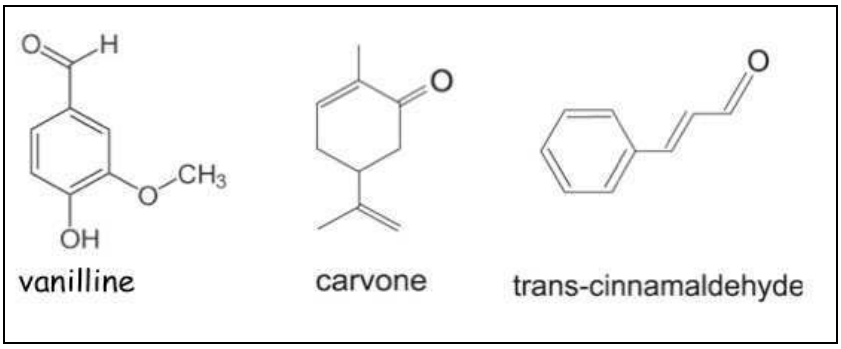


Figure 8 : Structure chimique de la vanillline, de la carvone et de la trans-cinnamaldéhyde (Burt, 2004)

- De nombreuses HE présentent une forte teneur **en alcools** comme l'HE de coriandre, de rose, de géranium, de l'arbre à thé. Les alcools seraient légèrement moins actifs que les composés phénoliques et carbonylés (Dorman & Deans, 2000; Ultee *et al.*, 2002) mais plus actifs que les composés hydrocarbonés. Le α-terpinéol, le terpinène-4-ol, le citronellol, le géraniol, le linalol (**Figure 9**) sont notamment décrits comme possédant des propriétés anti-bactériennes (Kalemba & Kunicka, 2003). Certaines HE présentent un mélange d'esters et d'alcools comme l'HE de lavande qui comprend de l'acétate de linalyle et du linalol possédant également des propriétés antiseptiques (Kalemba & Kunicka, 2003).

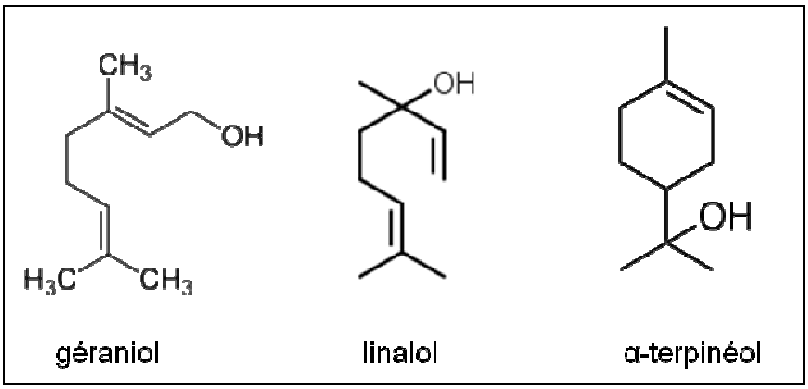


Figure 9 : Structure chimique de quelques composants d'HE possédant des groupements alcool (http://fr.wikipedia.org/wiki).

- De nombreuses HE présentent une forte teneur en **carbures terpéniques et sesquiterpéniques** comme l'HE de térébenthine, de genévrier, de citron. Les terpénoïdes dérivent de l'isopenténylpyrophosphate.

4.3 Interactions entre les différents composants des HE

Les interactions entre les constituants des HE peuvent influer sur leur activité antimicrobienne. La synergie entre le carvacrol et le thymol présent dans l'HE de thym permet d'augmenter l'efficacité antibactérienne contre *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Lambert *et al.*, 2001). Différents travaux ont montré la synergie entre le carvacrol et son précurseur (le p-cymène) sur des cellules de *Bacillus cereus* (Kisko & Roller, 2005; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010). Inversement, une réduction de l'activité antibactérienne a été observée entre des molécules actives et des composés non-oxygénés. Cox et al. (2001) ont ainsi montré que le γ-terpinène réduisait la solubilité du terpinène-4-ol (Cox *et al.*, 2000; Cox *et al.*, 2001).

5. Les modes d'action des HE

Les activités antibactériennes et antifongiques sont directement conditionnées par la structure chimique des constituants de l'HE. Compte tenu de la diversité des groupements

fonctionnels identifiés dans une HE **(§ 4.2)**, l'activité antimicrobienne va résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action et cibler plusieurs sites cellulaires.

Les principaux mécanismes et sites d'action des différents constituants des HE sur les cellules bactériennes sont présentés dans la **figure 10** (Burt, 2004) et inclus :

- l'altération de la paroi cellulaire la dégradation de la membrane cytoplasmique
- l'altération des protéines membranaires
- la fuite du contenu cellulaire (ions, métabolites, acides nucléiques,…)
- l'épuisement de la force proto-motrice
- la coagulation du cytoplasme

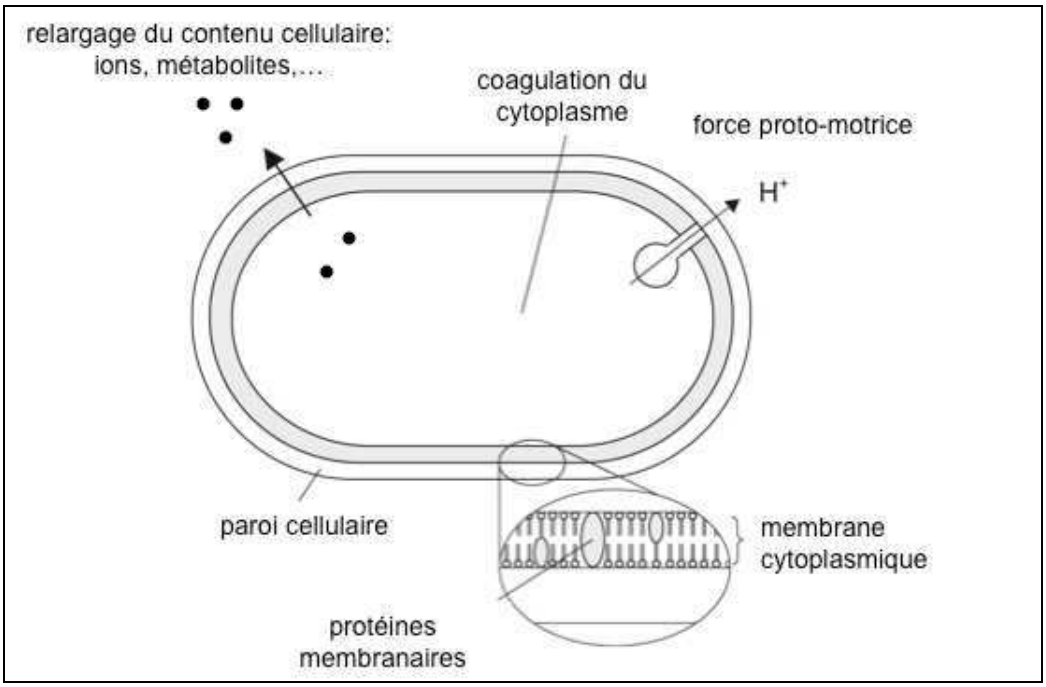


Figure 10 : Principales localisations des sites d'action des constituants des HE sur une cellule bactérienne (Burt, 2004).

L'activité anti-microbienne dépend du caractère lipophile du squelette carboné des composants des HE et du caractère hydrophobe de leurs groupements fonctionnels (Burt, 2004;

Ultee *et al.*, 1999). Ces caractéristiques permettent aux composants des HE de s'insérer dans les couches lipidiques des membranes cellulaires bactériennes et des mitochondries, perturbant les structures et augmentant la perméabilité membranaire. La fuite des ions et métabolites intracellulaires peut ensuite entraîner la mort cellulaire (Helander *et al.*, 1998; Lambert *et al.*, 2001).

Le mode d'action de certaines molécules antibactériennes et antifongiques est plus particulièrement décrit dans la littérature :

- Le **thymol** est le composé majoritaire de l'HE de thym. L'efficacité du thymol dépend de la composition et de la charge nette de la membrane bactérienne (Trombetta *et al.*, 2005). Lorsque le thymol pénètre dans les cellules de *Salmonella typhimurium* et *S. aureus*, il peut interagir avec les protéines membranaires grâce à des liaisons hydrogènes et entraîner un changement de la perméabilité membranaire. L'activité du thymol est améliorée à pH acide (5,5) permettant de préserver sa structure et ses propriétés hydrophobes (Juven *et al.*, 1994). Chez des cellules de *L. monocytogenes* exposées à des HE de thym, le thymol provoque notamment une diminution de la taille des bactéries **(Figure 11.b**), une altération de la paroi bactérienne **(Figure 11.c)**, et une agrégation du cytoplasme (Rasooli *et al.*, 2006).

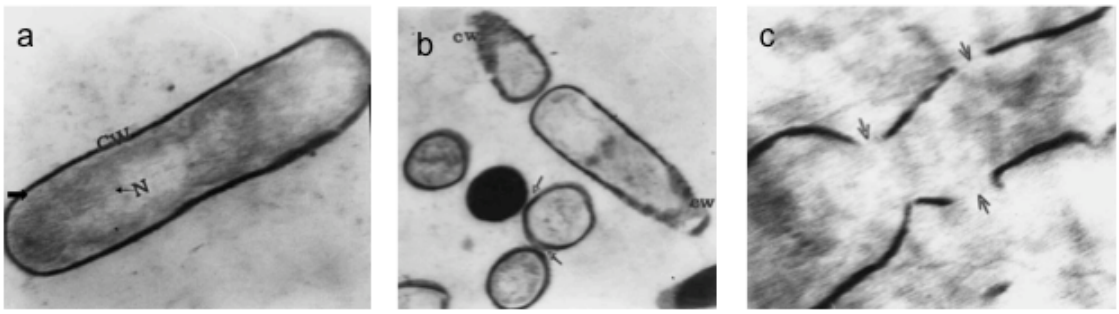


Figure 11 : Observations par microscopie électronique de cellules de *L. monocytogenes* (Rasooli *et al.*, 2006). (a) contrôle (x50 000 ; N : chromosome ; CW : paroi cellulaire), (b) et (c) cellules exposées à des HE de thym (x 80 000).

Le thymol peut également affecter la surface des membranes cellulaires fongiques et générer des tensions de membrane asymétriques (Pina-Vaz *et al.*, 2004). En effet, il a été montré

que les composés phénoliques s'incorporent entre les chaînes d'acides gras acyles des bicouches lipidiques membranaires perturbant ainsi l'emballage des lipides, et inhibant la synthèse d'ergostérol. La modification des propriétés des membranes fongiques est associée à une augmentation de la fluidité membranaire et un changement de sa perméabilité. Ceci réduit l'adhésion des champignons aux muqueuses et par conséquent, leur virulence (Braga & Ricci, 2011; Pinto *et al.*, 2009). Cette observation confirme l'hypothèse de l'étude de Braga et *al*. (2008) qui suggère que le thymol interfère avec la production de formes filamenteuses viables de *C. albicans* au cours des premières étapes de la formation du biofilm **(Figure 12)** (Braga *et al.*, 2008). Le thymol inhibe également la respiration de *Candida* sp., ce qui suggère des effets négatifs sur le fonctionnement des mitochondries (Uribe *et al.*, 1985).

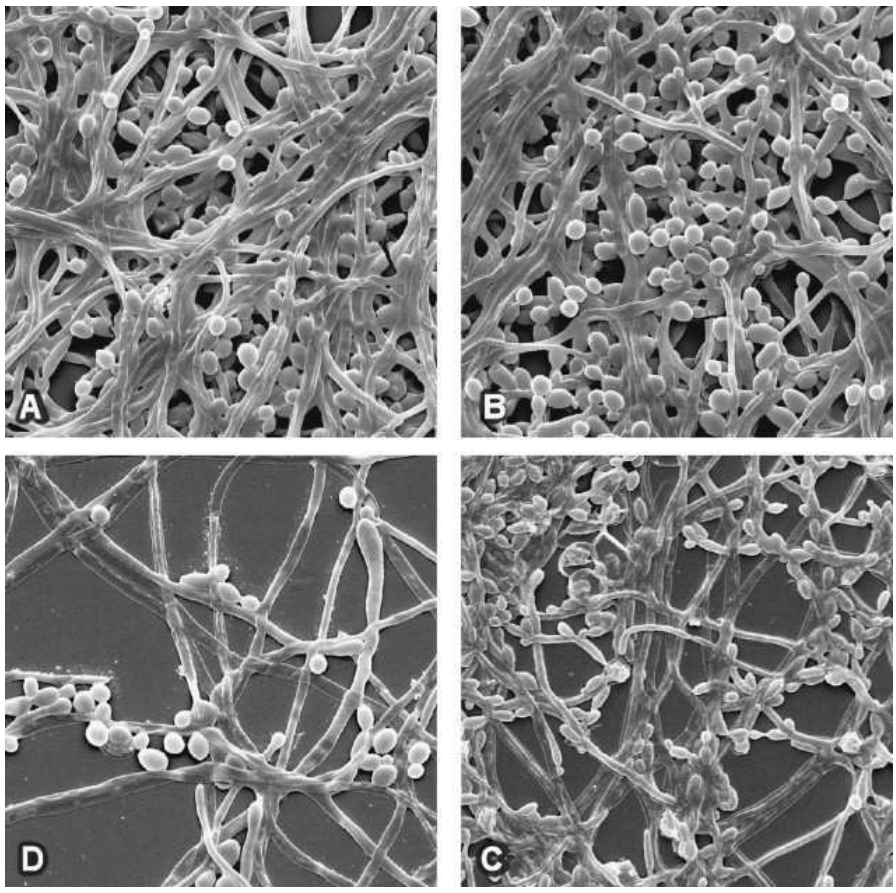


Figure 12 : Microscopie électronique en balayage d'un biofilm mature *de C. albicans*. (A) : avant traitement par thymol ; (B) : après traitement avec le thymol CMI / 2 pendant 24 h ; (C) : après traitement avec le thymol à la CMI ; (D) : après traitement avec le thymol à la CMI x 2. Grossissement x1250 (Braga *et al.*, 2008)

- Le **carvacrol** est un des composés majoritaires des HE de thym et d'origan. Sa structure chimique est similaire à celle du thymol à l'exception du positionnement du groupement hydroxyle **(Figure 7)**. Le carvacrol possède une activité antibactérienne à large spectre d'hôtes (Fadli *et al.*, 2012; Nazer *et al.*, 2005; Nostro *et al.*, 2007). Comme le thymol, le carvacrol a la capacité d'endommager l'intégrité de la membrane bactérienne, ce qui entraîne des variations de pH et un déséquilibre des ions inorganiques intracellulaires (Lambert *et al.*, 2001). Les travaux de Helander *et al.* (1998) ont montré que le carvacrol, grâce à ses propriétés lipophiles, pouvait altérer la membrane externe de *E. coli* libérant le lipopolysaccharide (LPS) et augmenter ainsi la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) (Helander *et al.*, 1998). Ultee *et al.* (2002) ont montré que le carvacrol et le *p*-cymène, agissaient plus précisément comme échangeurs de protons réduisant ainsi le gradient de pH à travers la membrane cytoplasmique. De ce fait, la force proto-motrice diminue ainsi que le pool d'ATP, ce qui entraîne la mort cellulaire (Ultee *et al.*, 2002).

Chez *B. cereus*, le carvacrol inhibe la production de la toxine diarrhéique. Le mécanisme d'inhibition n'est encore que partiellement élucidé. Cette molécule pourrait intervenir au niveau de la régulation des gènes, de la transcription, de la traduction ou du transport et de l'excrétion de la toxine intracellulaire. Toutefois, Ultee et Smid, (2001) ont montré que le carvacrol rendait la membrane cellulaire bactérienne perméable aux ions K^+ et H^+ inhibant la synthèse de l'ATP et dissipant la force proto-motrice. Ainsi la sécrétion de la toxine diarrhéique par *B. cereus* ne peut être réalisée par manque de force, ce qui entraîne son accumulation à l'intérieur de la cellule (Ultee & Smid, 2001).

- L'**eugénol** est le composé majoritaire de l'HE de clou de girofle (environ 85%). L'eugénol provoquerait également une dégradation de la paroi cellulaire bactérienne et une inhibition de l'activité des ATP synthétases membranaires. A des concentrations sub-létales, l'eugénol inhibe la production d'amylase et des protéases par *B. cereus* (Thoroski *et al*., 1989). Chez *Enterobacter aerogenes*, le groupemement hydroxyle de l'eugénol semble se lier aux protéines empêchant ainsi l'activité enzymatique des cellules (Burt, 2004).

L'eugénol peut inhiber la croissance d'*Aspergillus sp* et de dermatophytes en agissant sur l'ergostérol et la formation du tube germinatif. Une lésion importante de la membrane cellulaire

fongique est observée (Pinto *et al.*, 2009). Cet effet a été également remarqué sur des biofilms formés par des *Candida* sp, mais il semble être dose-dépendante (He *et al.*, 2007).

- Le **cinnamaldéhyde** est le composé majoritaire de l'HE de cannelle. Il inhibe les ATP synthétases bactériennes et provoque une diminution de la production d'ATP intracellulaire (Gill & Holley, 2004; Gill & Holley, 2006). Chez *E. aerogenes*, le cinnamaldéhyde pourrait interférer avec les mécanismes du quorum-sensing (Niu *et al.*, 2006). Chez *B. cereus*, le cinnamaldéhyde provoque un changement de la morphologie cellulaire (Kwon *et al.*, 2003).

Le cinnamaldéhyde agit sur la croissance, l'ultra-structure des hyphes et les facteurs de virulence d'*A. fumigatus*, *A. niger* et *T. rubrum*. Les membranes cellulaires et certaines structures endo-membranaires de la cellule fongique sont des sites d'action possibles (Khan & Ahmad, 2011).

- Le **terpène-4-ol** est le composé majoritaire de l'HE de l'arbre à thé (*Malaleuca alternifolia*). D'après les travaux de Cox et al. (2000), le terpène-4-ol entraîne une perte d'ions K+ chez *S. aureus* dû à une augmentation de la perméabilité des membranes cellulaires (Cox *et al.*, 2000). Partant du même principe, Crason *et al.*, (2002) ont évalué l'activité de cette même plante sur la même espèce (*S. aureus*). Cette bactérie devient sensible au chlorure de sodium quand elle est traitée à la valeur de la CMI ou 2x CMI par l'HE de *Malaleuca alternifolia* ou l'un de ses composés (1,8-cinéole, terpinèn-4-ol, α-terpinéol). L'observation par microscopie électronique montre que les cellules traitées par le terpinèn-4-ol forment des mésosomes et perdent leurs contenus cellulaires **(Figure 13.B et C)** par rapport aux cellules non traitées **(Figure 13.A)** (Carson *et al.*, 2002). Plus généralement, les composés à forte teneur en alcool agiraient comme des agents dénaturants des protéines (Goetz & Ghedira, 2012).

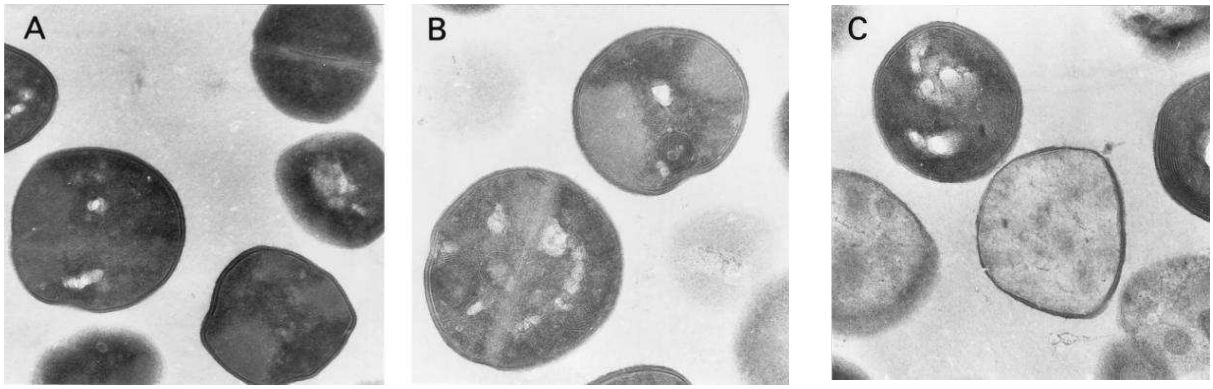


Figure 13 : Micrographies électronique en microscopie à transmission des cellules de *S. aureus* contrastées à l'acétate d'uranyl (A) : témoin ; (B et C) : après traitement avec 0,3 % de terpinen-4-ol pendant 10 min. Grossissements : x 11 500 (A) ; x 14 200 (B et C) (Carson *et al.*, 2002)

Ainsi, les modes d'action des HE semblent principalement cibler la paroi et la membrane cytoplasmique, toutefois la diversité chimique des constituants des HE suggère l'existence de mécanismes cellulaires qui restent à caractériser.

6. Applications actuelles

Les HE sont connues depuis l'antiquité pour leurs propriétés odorantes, aromatiques et de conservation. La diversité moléculaire des métabolites contenus dans les HE leur confère des propriétés biologiques variées :

- des propriétés anti-oxydantes, observées dans les huiles de cannelle, de piment, de laurier et d'origan (Mantle *et al.*, 1998).
- des propriétés anti-inflammatoires et anti-histaminiques (Dordevic *et al.*, 2007; Siani *et al.*, 1999).
- des propriétés antiseptiques : anti-bactériennes et antifongiques (Burt, 2004)
- des propriétés anti-tumorales (Ait Mbarek *et al.*, 2007; Bostancioglu *et al.*, 2012; de Sousa *et al.*, 2004) ; bien que d'autres études évoquent une action cancérigène (Bakkali *et al.*, 2008).
- des effets sur l'activité neurologique : analgésiques, anxiolytiques, sédatifs, … (Zhao *et al.*, 2005).

- des effets sur l'activité digestive: diurétique, laxatif,…
- des effets sur le système cardio-vasculaire : anti-hypertenseurs, …

Elles sont également largement utilisées dans plusieurs domaines, en particulier, cosmétique, parfumerie, pharmaceutique (aromathérapie), « bien-être » et aussi alimentaire (conservation, aromatisation) ou agronomique : anti germinatif de pommes de terre (carvone) (Burt, 2004) répulsif d'insectes (Burt, 2004; Nerio *et al.*, 2010). Leurs propriétés antimicrobiennes ont été largement exploitées comme antiseptique ou agent conservateur. Toutefois, dans le secteur alimentaire en particulier, l'utilisation des HE et de leurs composants est souvent limitée du fait de leurs propriétés olfactives et gustatives.

Enfin, l'emploi des HE et de leurs composants est réglementé par l'Union Européenne et par la Food and Drug Administration (FDA). En France, des structures telles que l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM, anciennement AFSSAPS) et l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) assurent une veille pour le bon usage des HE.

7. Toxicité des HE

Il est important de connaître l'aspect toxique des HE et de distinguer la toxicité de la plante de celle de son HE. En effet, l'innocuité d'une plante à HE est presque toujours un fait établi et la toxicité des HE est démontrée dans la plupart des cas (Bruneton, 2009).

7.1 Toxicité orale aiguë

Elle est mesurée par la dose létale 50 (DL_{50}), qui représente la dose à laquelle 50% d'une population test décède (généralement des rongeurs). Cette dose est exprimée en unités de masse de la substance testée (HE) par masse corporelle (g/kg).

Les HE ont, en général, une toxicité aiguë par voie orale faible ; la majorité des HE les plus utilisées ont une DL_{50} comprise entre 2 et 5 g/kg (exemple : anis, eucalyptus, girofle) ou

supérieure à 5 g/kg (exemple : camomille, citronnelle, lavande). Certaines HE ont une DL_{50} entre 1 et 2 g/kg (exemple: basilic, estragon, origan).

L'HE est considérée comme dépourvue de toxicité orale aiguë si la DL_{50} est supérieure ou égale à 1 g/kg, tout en étant dans les limites d'utilisations autorisée en aromathérapie (Bruneton, 2009 ; Kaloustian & Hadji-Minaglou, 2012).

Des calculs équivalents sont réalisés avec les composants des HE et sont retrouvées des valeurs telles que: carvacrol (0,81 g/kg), carvone (1,64 g/kg), pulégone (0,47 g/kg), thujones (≅ 0,2 g/kg).

Toutefois, ces données restent indicatives et ne reflètent pas le comportement des HE et de leurs composants chez l'Homme. En effet, des intoxications aiguës ont été signalées chez l'Homme avec les composés ou les HE ayant une DL_{50} élevée.

7.2 Toxicité cutanée aiguë

Il s'agit de l'effet néfaste apparaissant rapidement après application dermique d'une dose unique de l'HE considérée. La DL_{50} dermique correspond à une valeur statistique de la dose unique de l'HE considérée qui entraîne la mort de 50 % des rongeurs traités. Elle est exprimée en mg/kg (Kaloustian & Hadji-Minaglou, 2012).

De plus, l'utilisation considérable des HE dans la parfumerie et l'industrie de cosmétique a induit la réalisation d'études de toxicité et l'élaboration de recommandations pour leur utilisation (Bruneton, 2009).

7.3 Toxicité chronique

Elle correspond à la dose tolérée maximale (DTM) et concerne les effets secondaires survenus lors de l'utilisation répétée d'une substance (HE) quelle que soit la voie d'administration. Elle dépend de plusieurs facteurs : posologie, dose, temps d'application, … Suivant l'HE considérée, la DTM est 3 à 10,7 fois moins élevée que la DL_{50} (Kaloustian & Hadji-Minaglou, 2012).

Partie 3 : Matériel et Méthodes

Chapitre 1 : Techniques de microbiologie et tests biochimiques

1. Milieux de culture :

1.1 Culture des légionelles

Les milieux de culture utilisés pour *Legionella* sont le BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract*) en milieu gélosé et le BYE (*Buffered Yeast Extract*) en milieu liquide. Ces deux milieux sont supplémentés avec la *L*-cystéine et le pyrophosphate de fer. La température de croissance de cette bactérie est de 37 °C.

Le milieu BCYE est composé, pour 1 litre, de : 10 g d'extrait de levure, 5 g de tampon ACES, 2 g de charbon actif, 2,8 g d'hydroxyde de potassium, 15 g d'agar, puis le pH est ajusté à 6,9. Le milieu est ensuite autoclavé pendant 15 minutes à 121 °C. Puis, quand le milieu est plus au moins refroidi (≅ 50 °C), on ajoute la *L*-cystéine filtrée (0,4 g/L final) et le pyrophosphate de fer filtré (0,25 g/L final). Les boites ensemencées sont incubées à 37 °C pendant 3 à 4 jours à 5% de CO_2.

A la différence du milieu BCYE, le milieu BYE ne contient ni charbon actif ni agar. Ce milieu est stérilisé par filtration (filtre de 0,22 µm de diamètre). Puis complémenté, comme précédemment, par la *L*-cystéine filtrée et le pyrophosphate de fer filtré. Les légionelles sont incubées sous agitation à 150 rpm pendant 24 à 48 h.

Le milieu GVPC (*Gélose Vancomycine Polymyxine Cycloheximide*) : BCYEα additionné de glycine, vancomycine, polymixine B et cycloheximide. Il s'agit d'un milieu sélectif pour *Legionella*.

1.2 Culture des autres bactéries

Les bactéries appartenant à d'autres genres que *Legionella* ont été cultivées en milieu BHI (*Brain Heart Infusion*) (Bacto^{TM}) liquide ou gélosé (15 g d'agar / L) à 37 °C pendant 24 h.

1.3 Culture des champignons

Les champignons ont été mis en culture en milieu Sabouraud gélosé incliné (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, France) pendant 48 à 96 h à 37°C. Des cultures en milieu liquide ont été préparées pour chaque souche par transfert en RPMI / MOPS d'un échantillon de cette culture à l'aide d'une pipette pasteur ; la concentration finale a été ajustée à 0.5 Mac Farland avant dilution 1:1000 en RPMI / MOPS (*Candida* spp. et *C. neoformans*) ou 10^5 CFU/mL après filtration pour *Aspergillus* et *Trichophyton* spp.

2. Souches bactériennes

2.1 Souches de *Legionella*

Les souches de *Legionella* sont isolées à partir de 3 stations thermales au nord de la Tunisie (77 échantillons d'eau prélevés entre Mai 2009 et Mars 2010) (**Figure 14).**

A : Korbos

B : Djebel Oust

C : Hammam Bourguiba

Figure 14 : Localisation des stations thermales en Tunisie (http://www.conseils-avocats.com/avocat-tunisie.html)

La culture conventionnelle de *Legionella* est faite selon la norme française NF T 90-431. Les échantillons d'eau (1 litre) sont filtrés à l'aide de membrane de polycarbonate de 0,45 µm de porosité (Millipore Corporation, Bedford, USA). Une membrane est stockée à -80 °C pour les analyses moléculaires et une membrane est utilisée pour la culture sur milieu GVPC ; en pratique, cette dernière est placée dans une boite de pétri stérile avec 5 mL d'eau stérile, grattée afin de libérer les bactéries collées à cette membrane. L'inoculum obtenu est réparti dans trois tubes : un traité avec acide, un traité avec un choc thermique à 50 °C, et un dernier tube non traité. Le contenu de ces trois tubes est mis en culture sur milieu GVPC, en boite, à 37 °C pendant 10 jours. Par la suite les colonies qui poussent sont repiquées à la fois sur milieu BCYE avec ou sans cystéine. Les colonies qui poussent uniquement sur le milieu BCYE avec cystéine sont présumées appartenir au genre *Legionella* et sont conservées dans 15 % glycérol (v/v) à -80 °C. Les souches obtenues sont colorées par la coloration Gram de ces souches et un test d'agglutination au Latex est effectué (Oxoid Ltd) afin de confirmer les *L. pneumophila* sg 1, et les souches sg 2-14 et quelques autres espèces de *Legionella*. *L. pneumophila* Lens et Paris sont utilisées comme souches de références dans les différents tests.

2.2 Les autres souches bactériennes

Tableau 4 : Les différentes espèces bactériennes utilisées dans ce travail

Souche bactérienne	**Référence**
Gram positive	
Bacillus megaterium	F04
Listeria monocytognes	EGDe
Staphylococcus epidermidis	567
Staphylococcus hemolyticus	694
Staphylococcus saprophyticus	715
Staphylococcus xylosus	Collection MDE
Gram négative	
Escherichia coli	27325
Klebsiella pneumoniae	0502083

Pseudomonas aeruginosa	910704
Salmonella thyphimurium	Collection MDE

Toutes les souches font partie de la collection du Laboratoire (MDE)

3. Souches fongiques

Sept espèces fongiques ont été étudiées: quatre espèces de levures : *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *Cryptococcus neoformans* ; trois espèces de champignon filamenteux, dont une de moisissure : *Aspergillus fumigatus* et deux de dermatophytes : *Tricophyton mentagrophytes* et *T. rubrum*.

Tableau 5 : Les souches fongiques utilisées dans ce travail

Souche	**Référence de la souche**
Candida albicans	ATCC 3153
Candida glabrata	IHEM 9556
Candida parapsilosis	ATCC 22019
Cryptococcus neoformans	IP2008/00709
Aspergillus fumigatus	ATCC 16424
Trichophyton mentagrophytes	Clinique (CHU La Milétrie, Poitiers)
Trichophyton rubrum	Clinique (CHU La Milétrie, Poitiers)

4. Tests de survie en conditions de stress

Ces essais sont réalisés avec trois souches : *L. pneumophila* Lens, GC-A8 et GC-A11. Ces souches sont initialement cultivées sur boite BCYE pendant 3 jours, puis inoculées en milieu liquide (5 mL de BYE) à 37 °C, à 5 % de CO_2 pendant 3 jours pour atteindre la phase

exponentielle de croissance. Les culots de bactéries sont ensuite remis en suspension dans du tampon phosphate salin (PBS) stérile et ajusté à 10^6 CFU/mL à 600 nm.

4.1 Choc thermique

Des aliquots de *L. pneumophila* Lens, GC-A8 et GC-A11 sont incubés à 48 °C pendant 0, 30, 60, et 90 min.

4.2 Choc osmotique

Des aliquots de *L. pneumophila* Lens, GC-A8 et GC-A11 sont incubés en présence de 5 M de NaCl pendant 60 min.

4.3 Choc acide

Des aliquots de *L. pneumophila* Lens, GC-A8 et GC-A11 sont mis en suspension dans 0,1 M d'acide citrique (pH 3) pendant 90 min.

4.4 Choc oxydatif

Des aliquots de *L. pneumophila* Lens, GC-A8 et GC-A11 sont exposés à 15 mM de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pendant 0, 30, 60, et 90 min.

Pour ces 3 derniers tests (4.2 à 4.4) les bactéries sont incubées dans un bain marie maintenu à 37 °C. Des essais avec les bactéries non traitées et servant de contrôle sont réalisés durant l'étude. Ces expérimentations ont été réalisées au moins 3 fois, les valeurs moyennes sont exploitées.

5. Ensemenceur spiral (WASP)

Le dénombrement des bactéries, avant et durant les intervalles des expérimentations, est réalisé à l'aide d'un ensemenceur spiral WASP (AES Chemunex, France) sur des boites de BCYE. La quantification par cet appareil se fait par comptage des CFU de deux secteurs opposés

de la gélose contenant au moins 20 CFU chacun. Cet appareil est utilisé pour le comptage d'un échantillon de bactéries dont la concentration est comprise entre 4.10^2 et 4.10^5 CFU/mL.

Figure 15 : Ensemenceur en spiral WASP

(http://fr.aeschemunex.com/nos-produits,18/67,ensemenceur-spiral-wasp.html)

6. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en CFU/mL ou UG/L (unité génome par litre) de bactérie (*Legionella*) par litre et sont exprimés comme la moyenne de trois répétitions indépendantes. Ces résultats sont analysés par régression linéaire et le test exact de Fisher afin de vérifier s'il y a des différences statistiques significatives dans les contaminations. Le logiciel TANGARA, logiciel de statistiques gratuit est utilisé pour réaliser ces tests.

7. Tests biochimiques

Les tests à l'oxydase, à la catalase, à l'uréase, à la gélatinase, la capacité à hydrolyser l'hippurate et la réduction de nitrate ont été effectués pour les souches de *Legionella* isolées comme décrit précédemment (Adeleke *et al.*, 1996; Fliermans *et al.*, 1981; Hebert, 1981).

Chapitre 2 : Techniques de biologie moléculaire

1. Extraction de l'ADN génomique

Pour la réaction de polymérisation en chaine (PCR) standard, l'extraction de l'ADN génomique des *Legionella* est réalisée grâce au kit Nucleospin® Tissue (Macherey-Nagel, Germany).

La concentration de l'ADN est déterminée grâce au kit Quant-iT™ ds DNA assay selon les recommandations du fournissuer (Invitrogen, France). On a également utilisé un spectrophotomètre de type "BioSpec-nano" (Shimadzu Biotech, France).

2. Électrophorèse sur gel d'agarose

L'étape d'électrophorèse est importante afin de s'assurer de la pureté de nos échantillons et de la présence des fragments à amplifier ou déjà amplifié.

Pour cela un gel à 0,8 % est réalisé, composé de 0,16 g d'agarose, 20 mL de TBE (0,5 X), 1,5 µl de BET ; remplacé depuis par "Midori Green" (Nippon Genetics Europe GmbH), non cancérigène, ayant la même sensibilité que le BET et s'utilisant de la même manière en gel d'agarose ; on dépose, après la prise en masse du gel, 5 µL de marqueur de poids moléculaire (1 Kb) et 3 ou 4 µL de l'échantillon avec 2 µL de tampon de charge. La lecture des bandes est réalisée sous lampe UV.

3. Purification

Le kit QIAquick PCR purification kit (Nucleospin® ExtractII, Macherey-Nagel, Germany) est utilisé pour purifier les échantillons amplifiés par PCR.

4. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

L'amplification d'ADN par PCR est réalisée dans un volume final de 50 µL en utilisant l'ADN polymérase « GoTaq » (Promega). Le mélange réactionnel est composé de :

- Amorce 1 (10 µM) 2,5 µL
- Amorce 2 (10 µM) 2,5 µL
- Tampon PCR 5x 10 µL
- dNTP (2mM chaque) 5 µL
- GoTaq polymérase (5U/ µL) 0,1 µL
- ADN matrice 5 µL
- H_2O q.s.p 50 µL

L'amplification de l'ADN ribosomique 16S est réalisée avec les amorces universelles : 27F et 1492R (Eurogentec) qui permettent d'amplifier l'ADNr presque entier : 1465 pb.

Les cycles sont programmés comme suit : une étape de dénaturation (94 °C / 5 min), suivie par 30 cycles de dénaturation (94 °C / 1 min), hybridation (60 °C / 1 min), élongation (72 °C / 1 min) et terminés à la fin par une élongation (72 °C / 10 min).

Pour le gène *mip* les amorces utilisées sont Legmip_f (27-mer) et Legmip_r (23-mer) (Eurogentec). Elles permettent d'amplifier un fragment de 661 à 715 pb. Le mélange réactionnel est composé de :

- Amorce 1 (10 µM) 2 µL
- Amorce 2 (10 µM) 2 µL
- Tampon PCR 5x 10 µL
- dNTP (2mM chaque) 4 µL
- GoTaq polymérase (5U/ µL) 0,1 µL
- ADN matrice 5 µL
- H_2O q.s.p 50 µL

Les cycles sont programmés comme suit : une étape de dénaturation (96 °C / 3 min), suivie par 35 cycles de : dénaturation (94 °C / 1 min), hybridation (58 °C / 2 min), élongation (72 °C / 2 min) et terminés à la fin par une élongation (72 °C / 5 min).

Tableau 6 : Amorces utilisées pour les amplifications par PCR des gènes 16S et *mip*

Amorce	**Séquence (5' → 3')**
27F	AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG
1492R	TAC-GGC-TAC-CAT-TGT-TAC-GAC-TT
Legmip_f	GGG-RAT-TVT-TTA-TGA-AGA-TGA-RAY-TGG
Legmip_r	TCR-TTN-GGD-CCD-ATN-GGN-CCD-CC

5. Séquençage

Une quantité d'ADN initiale de 60 ng est requise. 3,2 pmol d'amorce (27F ou 1492R pour le 16S ou Leg mip-fs (5'-TTT-ATG-AAG-ATG-ARA-YTG-GTC-RCT-GC) pour le gène *mip* à10 mM) sont ensuite ajoutés ainsi que l'un des trois mélanges suivants :

- 8 µL du kit de séquençage et le volume de H_2O nécessaire pour 20 µL final.
- 2 µL du kit de séquençage + 2 µL tampon de séquençage + le volume de H_2O nécessaire pour 10 µL final.
- 2 µL du kit de séquençage + le volume de H_2O nécessaire pour 5 µL final.

Une étape d'amplifiaction de 25 ou 30 cycles est réalisée (96 °C / 1 min, 94 °C / 15 sec, 50 °C / 15 sec et 60 °C / 4 min).

Après l'ADN est précipité selon deux méthodes :

- Reprendre l'échantillon dans 50 µL d'acétate de sodium (0,3 M), on ajoute 100 µL d'éthanol (95 % ou 100 %) ou d'isopropanol. Le mélange est incubé à température ambiante pendant 20 min, puis centrifugé (13000 *g* / 20 min) à température ambiante. Le

culot est récupéré et on lavé avec de l'éthanol (70 %) à température ambiante. Une nouvelle centrifugation est réalisée (13000 *g* / 20 min) et le culot est récupéré et laissé sécher. Enfin, ce culot est remis en suspension dans 15 à 20 µL de formamide déionisée et subit une étape de dénaturation (95 °C / 2 min).

- En utilisant le kit : BigDye®XTerminator™Purification Kit.

Les échantillons seront par la suite analysés par électrophorèse capillaire à l'aide d'un analyseur de type Applied Biosystems 3130 DNA (Foster City, CA, USA). Les séquences sont par la suite comparées avec celles de la banque des gènes en utilisant le programme d'alignement Blastn (Basic Local Alignment Search Tool, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

6. Analyse phylogénétique et sauvegarde des souches

Les analyses de la phylogénie sont réalisées grâce au logiciel gratuit Mega 5 (2011). L'arbre phylogénétique est construit par la méthode « neighbour-joining ». Les analyses sont limitées 1000 pb et les valeurs de « bootstrap » sont indiquées avec des nœuds avec > 50 % de similitudes.

Les séquences 16 S des différentes souches sont soumises à la base de données GenBank et un numéro est attribué (**Tableau 2 de la publication 1).**

7. PCR en temps réel (RT-PCR)

Les amorces et les sondes utilisées dans la PCR en temps réel sont décrites par **Joly et al. (2006)**. La quantification des *Legionella* dans les échantillons d'eau est réalisée par les amorces et sondes spécifiques de l'ARNr 16S **(Tableau 7)**. Les réactions de RT-PCR sont réalisées en utilisant un appareil de type LightCycler® (Roche Diagnostics) dans les conditions suivantes : 50 °C pendant 2 min, 95 °C pendant 10 min, suivie par 40 cycles de 95 °C pendant 15 s et 60 °C pour 1 min. Une courbe standard est générée à partir de dilutions 10 fois de l'ADN contrôle (de 3.10^5 jusqu'à 3.10^1 µg/ réaction). La courbe de *L. pneumophila* est générée automatiquement par

le système du LightCycler® par traçage de la courbe du cycle seuil (Ct) et au cours de laquelle on note l'augmentation du produit de l'amplification à l'opposé de la concentration logarithmique de l'ADN contrôle. Les concentrations des échantillons d'ADN sont calculées à partir de cette courbe et la limite de détection est déterminée. La détection des inhibiteurs internes de la PCR est déterminée à l'aide d'un contrôle interne d'inhibition CI Duo comme décrit précédemment (Joly *et al.*, 2006). Ces essais sont effectués au moins trois fois et les valeurs moyennes sont utilisées pour les analyses.

Les coefficients de corrélation ($|r^2|$) des courbes standard étaient entre 0,99 et 1,0 pour le nombre de copies initial des fragments de PCR standard indiquant que les modèles de l'amplification exponentielle sont fiables dans ces conditions.

Tableau 7 : amorces et sondes utilisées pour les amplifications par PCR Q des gènes 16S et *mip* (Joly *et al.*, 2006)

Amorce ou sonde (Eurogentec)	**Nom**	**Séquence (5' → 3')**
Amorce sens de l'ARNr 16S	16S1-A	AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC
Amorce inverse de l'ARNr 16S	16S2-A	CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG
Amorce sens du *mip*	mip1-A	GCA TTG GTG CCG ATT TGG
Amorce inverse du *mip*	mip2-A	G[CT]T TTG CCA TCA AAT CTT TCT GAA
Sonde sens de l'ARNr 16S	16S1-S	AGT GGC GAA GGC GGC TAC CT-fluoresceine
Sonde inverse de l'ARNr 16S	16S2-S	LC Red 640-TAC TGA CAC TGA GGC ACG AAA GCG T
Sonde sens du *mip*	mip1-S	CCA CTC ATA GCG TCT TGC ATG CCT TTA-fluoresceine
Sonde inverse du *mip*	mip2-S	LC Red 640-CCA TTG CTT CCG GAT TAA CAT CTA TGC C
Sonde sens du CI Duo	C1-S	GGT GCC GTT CAC TTC CCG AAT AAC-fluoresceine
Sonde inverse du CI Duo	C2-S	LC Red 705-CGG ATA TTT TTG ATC TGA CCG AAG CG

Les amorces sont à 10 pmol / µL et les sondes sont à 2 pmol / µL.

8. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)

Le typage moléculaire des souches de *Legionella* a été réalisé par électrophorèse en champ pulsé (appareil DrIII - Bio-Rad) en utilisant l'enzyme *Sfi* I. Les profils de restriction de l'ADN obtenus ont ensuite été analysés avec le logiciel Gel-Compar II. Enfin, l'analyse des clusters a été obtenue en utilisant l'algorithme UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) avec un seuil de tolérance de 1,5 %.

Chapitre 3 : Extraction des Huiles Essentielles et évaluation de leurs activités antimicrobiennes

1. Plantes

Les parties aériennes de 6 plantes (*Artemisia herba-alba* Asso, *Citrus sinensis* (L.) *Osbeck*, *Juniperus phoenicea* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Ruta graveolens* L., *Thymus vulgaris*) ont été collectées, durant la période de Mars jusqu'à Mai 2010 et 2012. *Artemisia herba alba, Citrus sinensis, Ruta graveolens,* et *Thymus vulgaris* ont été collectés dans la région du Sahel (Sousse, Tunisie), *Juniperus phoeniciea* dans le nord de la Tunisie (Aïn Drahem, Tunisie) et *Rosmarinus officinalis* dans la région de Zaghouan, Tunisie.

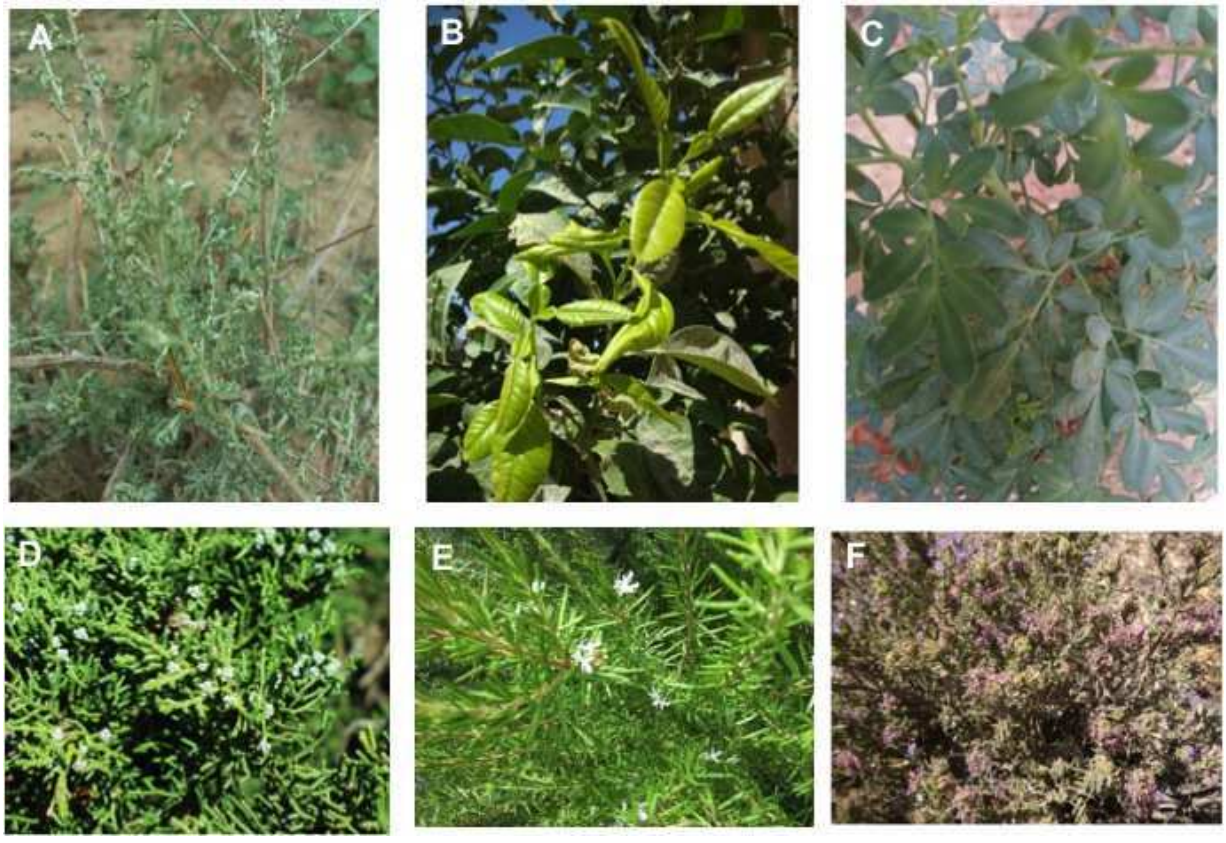


Figure 16 : Les plantes tunisiennes utilisées pour extraire les HE. **A :** *Artemisia herba-alba* Asso, **B :** *Citrus sinensis* (L.) *Osbeck*, **C :** *Ruta graveolens* L., **D :** *Juniperus phoenicea* L., **E :** *Rosmarinus officinalis* L., **F :** *Thymus vulgaris* (photos prises pour cette étude).

2. Extraction des HE

On laisse les plantes sécher durant 2 semaines dans l'ombre. Les HE sont extraites par hydrodistillation **(Figure 17)** pendant 4 heures conformément aux normes de la pharmacopée européenne (Council of Europe, 1997). Les HE obtenues sont ensuite stockées dans des vials en verre opaque à l'obscurité et à 4°C jusqu'à utilisation.

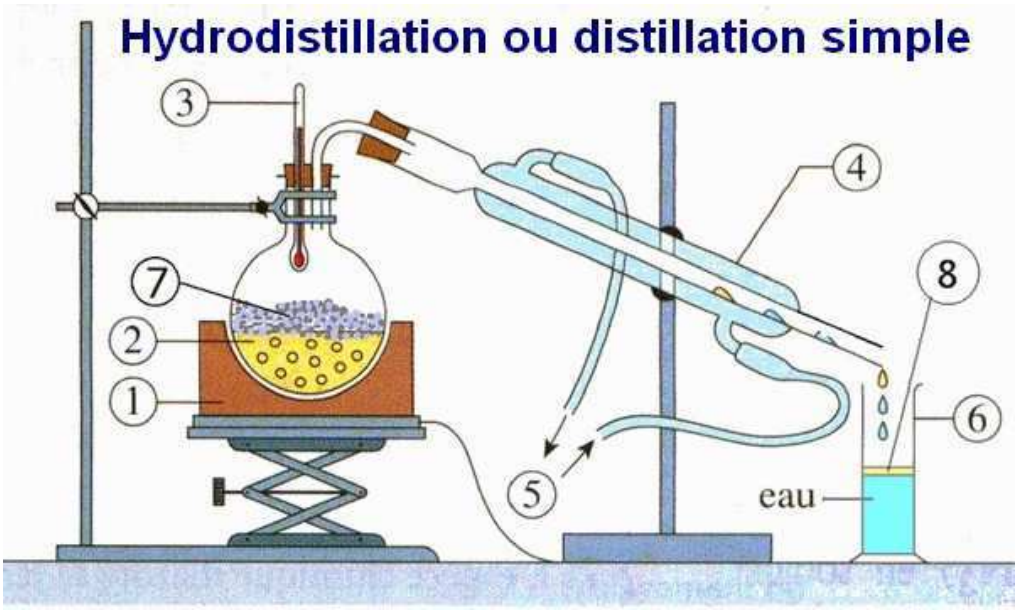


Figure 17 : Montage de l'hydrodistillation. **1 :** chauffe ballon, **2 :** eau en ébullition, **3 :** thermomètre, **4 :** réfrigérant, **5 :** arrivée et sortie de l'eau, **6 :** éprouvette, **7 :** plante à distiller, **8 :** HE. (http://tpe-phytotherapie.e-monsite.com/pages/etude-d-une-plante-medicinale-le-thym-et-experiences.html)

14 HE commerciales ont été incluses dans notre étude. Ces HE ont été achetées aux laboratoires HYTECK (Clermont-Ferrand, France).

3. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS)

Les analyses GC-MS ont été assurées par un chromatographe de type HP 6890 series couplé à un détecteur de masse sélectif de type HP 5973. Le programme de la température du four est:

50°C durant 1 min, après 5°C/min jusqu'à 180°C, laisser 2 min, après 10°C/min jusqu'à 250°C, laisser 1 min. L'injecteur est de type pulsed splitless (25 psi - 05 min). Le flux est à 1 mL/min. On a utilisé une colonne Varian VF-5MS (30m, 0.25mm, 0.25µm). Les échantillons ont été dilués et injectés directement. Les échantillons sont identifiés en tenant compte de leurs temps de rétention, leurs indices de Kovats, en se référant à une base de données (NIST Mass Spectral Search Programm for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library database version 2.0 d build Dec 2 2005) et les données de la littérature. Chaque composé est identifié en intégrant l'aire du pic du chromatogramme.

4. Évaluation de l'activité antimicrobienne des HE

4.1 Activité anti-*Legionella*

Des tests préliminaires ont été réalisés afin de déterminer la concentration minimale d'acétonitrile nécessaire pour solubiliser les différentes HE, sans affecter la croissance bactérienne. Les HE sont diluées dans de l'acétonitrile (50% v/v). Des témoins contenant les solutions d'acétonitrile avec les différentes concentrations sont également préparées.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de chaque HE est déterminée selon la méthode de micro dilution en milieu liquide dans des microplaques rapporté précédemment (Verdon *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2004). La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'HE qui inhibe la croissance visible de la souche testée. En pratique, on prépare les dilutions des HE dans des tubes à part et on ajoute 10 µL de chaque dilution d'HE dans des microplaques de 96 puits ; ensuite 100 µL du milieu BYE, complémenté avec la *L*-cystéine et le pyrophosphate de fer, et supplémenté avec la suspension de *Legionella* à tester ajustée à 10^6 CFU/ mL sont ajoutés dans les puits. Les concentrations d'HE testées dans les puits varient de 1,1 mg/mL à 0,02 mg/mL. Des puits de contrôle de la croissance bactérienne sans HE sont également préparés. Le milieu seul représente un témoin pour vérifier la non-contamination du milieu. Les microplaques sont incubées à 37°C à 5 % de CO_2 et analysées après 3 jours, grâce à un lecteur de microplaques de type TECAN-SUNRISE, à une longueur d'onde égale à 595 nm et avec une légère agitation, pendant quelques secondes. Ces expériences ont été répétées 2 fois, en triplet dans chaque plaque,

et pas le même jour. Les expériences ayant donné des résultats distincts ont été répétés jusqu'à obtenir une valeur fiable.

Les microplaques sont disposées sur des blocs de glace afin de limiter l'évaporation des HE ; de plus, elles sont recouvertes d'un film adhésif avant incubation, afin d'éviter la diffusion des HE entre les différents puits.

4.2 Activité anti-bactérienne autres qu'anti-*Legionella*

Une colonie prélevée d'une culture sur milieu BHI gélosé agée de 24 h est mise en suspension dans du milieu BHI liquide et la densité optique (DO) à 600 nm est ajustée à 10^6 CFU/mL (1 DO ≅ 10^9 CFU/mL). Les concentrations testées d'HE varient entre 0,5 et 5 mg/mL. Les CMI sont déterminées comme décrit précédemment.

4.3 Activité antifongique

Les activités antifongiques ont été évaluées selon les techniques de référence développées par le CLSI : protocoles adaptés M27-A3 et M38-A2. Les HE ont été dilués dans le diméthylsulfoxide (DMSO) (4:5 v/v).

Le milieu RPMI / MOPS est distribué dans une microplaque à 96 puits à raison de 100 µL par puits, à l'exception de la première colonne (200 µL / puits) ; 4 µL des huiles testées sont ajoutés dans la première colonne et une dilution en série est réalisée. Ensuite, 100 µL de la pré-culture fongique (0,5 Macfarland) sont ajoutés à chaque puits. La plaque est incubée pendant 24-48 heures (*Candida* spp.), 48-72h (*C. neoformans* et *A. fumigatus*) ou 96h (*Trichophyton* spp.) à 27 °C, à l'exception de *Candida* spp. (37 °C). Tous ces tests sont réalisés en trois exemplaires et au moins deux fois distinctes. Les antifongiques conventionnels Fluconazole et Amphotéricine B sont utilisés comme molécules actives de référence. La CMI est définie comme étant la plus faible concentration d'HE qui peut inhiber la croissance fongique visible.

5. Microscopie électronique

5.1 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les souches étudiées de *Legionella* sont mises en culture en milieux liquide BYE pendant 48 h avec agitation (150 rpm). L'HE de *Thymus vulgaris* est ensuite ajoutée à la concentration testée. Après incubation à 37 °C pendant 24 h et sous agitation (150 rpm), la suspension bactérienne est centrifugée à 3000 *g* pendant 20 min. Le milieu de culture est éliminé, les bactéries sont fixées avec 3% de glutaraldéhyde dans du PBS (0,1 M ; pH 7,4) pendant 1 h à 4°C, puis sont lavées trois fois par du PBS et déshydratées dans des bains successifs d'acétone en concentration croissante dans l'eau, comme décrit ci-dessous :

- 50% acétone 50% H2O, 2 fois pendant 1 min
- 70% acétone 30% H2O, 2 fois pendant 5 min
- 90% acétone 10% H2O, fois pendant 15 min
- 100% acétone, 4 fois pendant 15 min.

Après l'étape de la déshydratation, les lamelles sont transférées dans un appareil à point critique (BAL-TEC CPD 030) où le CO_2 liquide sera injecté progressivement pour remplacer l'acétone 100%, cette étape permet de sécher nos échantillons. Les lamelles déshydratées sont déposées sur des plots qui seront par la suite disposés dans un métalliseur (BAL-TEC LCD 005) afin de les recouvrir d'une fine couche d'or (25-35 nm). L'observation des cellules est réalisée avec le microscope électronique JEOL JSM-840 (Jeol Ltd, Tokyo, Japan).

5.2 Microscopie électronique à transmission (MET)

Comme décrit précédemment, la suspension de *Legionella* traitée ou on traitée par les huiles essentielles étudiées est centrifugée à 3000 *g* pendant 20 min et le culot est ensuite fixé avec 3% de glutaraldéhyde dans du PBS (phosphate buffer saline) (0,1 M ; pH 7,4) pendant 2 h à 4°C. Après fixation, les échantillons sont rincés trois fois avec du PBS puis post fixés dans 1% d'osmium pendant 1 h à 4°C. Cette fixation est suivie d'une étape de déshydratation dans 4 bains d'acétone en concentration croissante dans l'eau comme décrit pour le MEB. Après

déshydratation, les culots cellulaires sont inclus dans une résine époxy et hydrophobe, l'araldite (Fluka, Buchs, Switzerland) et mis à polymériser toute la nuit à 60°C. Les blocs obtenus sont ensuite coupés à l'aide d'un ultra-microtome ayant un couteau en diamant. Cette étape permet de réaliser des coupes ultra-fines (60 nm) qui sont récupèrées sur des grilles de cuivre et qui seront, ensuite, contrastées à l'acétate d'uranyle et aux sels de plomb. L'observation microscopique sera réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission JEOL 1010 (Jeol Ltd, Tokyo, Japan).

Partie 4 : Résultats et Discussion

Introduction des résultats et de la discussion

La partie 4 de ce manuscrit sera présentée sous forme de 3 articles :

- un article paru dans "*Research in Microbiology*", et qui présente les résultats relatifs au premier axe de notre recherche : Il inclut en effet la recherche de la présence de *Legionella et L. pneumophila* dans 3 stations thermales tunisiennes, leur quantification par RT-PCR et leur identification et caractérisation moléculaire par séquençage et électrophorèse en champ pulsé.

- Le deuxième article, récemment soumis à *« PlosOne »* (septembre 2013). Ce manuscrit porte sur la deuxième partie de nos travaux de recherche : évaluation de l'activité anti-*Legionella* des HE obtenues de plantes d'origine tunisienne. L'activité des HE étudiées a été mise en évidence par des observations au microscope électronique (balayage et trasnmission) des altérations morphologiques des légionelles induites par le traitement par une HE (*T. vulgaris*), en particulier au niveau de la membrane cellulaire.

- Le troisième article, actuellement en fin de préparation, sera très prochainement soumis également à un journal international. Celui-ci présente la troisième et dernière partie de notre travail de thèse : l'évaluation de l'activité des HE extraites de plantes tunisiennes, mais aussi d'une sélection d'HE d'origine commerciale, vis à vis d'une grande variété de microorganismes incluant des bactéries (Gram positives et Gram négatives) et des champignons (levures, moisissures et dermatophytes). La composition des HE étudiées a été analysée par GC-MS.

Chacune de ces trois parties est suivie d'un paragraphe présentant des résultats complémentaires, relatifs à l'approche développée dans l'article, mais qui n'ont pas été inclus dans le manuscrit.

Chapitre 1 : Occurrence des légionelles dans les stations thermales Tunisienne

La Tunisie est un pays doté d'un riche patrimoine thermal. On compte une dizaine de sources, la plupart sont réparties dans les régions montagneuses du nord tunisien **(Figure 14).** Ces établissements reçoivent un grand nombre de baigneurs et curistes, d'où l'importance d'évaluer le risque lié aux légionelles dans ces établissements.

1. Principaux résultats de la publication 1 : Diversity of *legionellae* strains from Tunisian hot spring water

La première partie de mon travail de thèse a porté sur l'isolement el l'identification des souches de *Legionella* prélevées dans des stations thermales de Tunisie. Il s'agit d'un premier état des lieux sur l'occurrence des légionelles en Tunisie.

Dans ce travail, 77 échantillons ont été prélevés de 3 stations thermales : A (Korbos), B (Djebel Oust), et C (Hammam Bourguiba) de Mai 2009 jusqu'en Mars 2010 **(Figure 14)**. Le plus haut taux de contamination par *Legionella* a été enregistré dans le site C avec une valeur de 8,2 x 10^3 CFU/L. L'absence de *Legionella* dans les sources d'eau a été démontrée par la méthode de culture conventionnelle (milieux GVPC et BCYE) ainsi que par quantification par PCR Q. La contamination par cette bactérie a donc lieu en aval de la source, au cours de la circulation de l'eau dans les différents points d'usages ou bains. On a pu isoler 18 souches de *Legionella* avec une faible diversité puisque le séquençage de l'ADN 16S a montré la présence de 16 souches de *L. pneumophila* (sérogroupes : 1, 4, 5, 6 et 8) et 2 souches de *L. londiniensis*. L'analyse par PFGE montre que ces souches présentent des pulsotypes différents de ceux présents dans la base de données du Centre National de Référence des Légionelles (CNRL, Lyon). Les différentes souches isolées montrent une tolérance au traitement thermique à 48 °C, ce qui explique leur présence dans ces installations d'eau chaude. L'ensemble des résultats obtenus confirme l'existence de *Legionella* dans les établissements thermaux en Tunisie, établissement fréquentés en partie par des sujets fragilisés et qui peuvent être de ce fait plus facilement infectés par cette bactérie. Il est donc important de prendre ce risque en considération et de renforcer les mesures de contrôle et de prévention de ce germe.

Publication 1

Diversity of *legionellae* strains from Tunisian hot spring water

Research in Microbiology

2013

Author's personal copy

ELSEVIER

Institut Pasteur

Research in Microbiology 164 (2013) 342–350

www.elsevier.com/locate/resmic

Diversity of *legionellae* strains from Tunisian hot spring water

Taoufik Ghrairi [a,*,1], Nawel Chaftar [a,c,1], Sophie Jarraud [b], Jean Marc Berjeaud [c], Khaled Hani [a], Jacques Frere [c]

[a] *UR08-45, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine of Sousse, 4002 Sousse, Tunisia*
[b] *Centre National de Référence des légionelles (CNRL), Hospices Civils de Lyon, Groupe Hospitalier Est, 69 677 Bron Cedex, France*
[c] *UMR-CNRS 7267 Ecology and Biology of Interactions, Water Microbiology Team, University of Poitiers, 40 Street of Recteur Pineau, 86022 Poitiers Cedex, France*

Received 26 August 2012; accepted 16 January 2013
Available online 4 February 2013

Abstract

The aim of this study was to evaluate the frequency of *Legionella pneumophila* in three hot spring water recreation areas by conventional culture on GVPC and by Real Time-PCR. No legionellae were isolated from the spring water upstream the distribution system suggesting strongly that the thermal area was the probable source of these pathogens. *L. pneumophila* was present at high level in some samples, reaching values of 8.2×10^3 CFU/l at the site C. We observed a low diversity among the 18 isolated *Legionella* strains according to 16S DNA analysis, since only *L. pneumophila* and *Legionella londiniensis* were identified. All of the *L. pneumophila* strains belong to five serogroups (1, 4, 5, 6 and 8). Pulsed-field gel electrophoresis analysis identified various genotypes among these serogroups and showed that these strains had pulsotypes distinct from *L. pneumophila* present in the CNRL *Legionella*-database. These environmental strains showed higher tolerance to heat shock stress at 48 °C than *L. pneumophila* clinical strain, which may explain their presence in warm waters. Our data suggested that potential pathogen legionellae are present in Tunisian medicalized thermal spas and emphasized the importance of adopting control measures to prevent infection.
© 2013 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Legionella pneumophila*; *Legionella londiniensis*; Hot spring water; RT-PCR; Stress; Genetic variability

1. Introduction

Legionella pneumophila causes a severe and sometimes lethal pneumonia known as Legionnaires' disease, transmitted by inhalation of an aerosol containing bacteria or by aspiration of contaminated water. The bacteria were first identified as a pathogen through a large outbreak at an American Legion Convention in Philadelphia in 1976 (Brenner et al., 1978). Since then several outbreaks and sporadic cases of nosocomial and community-acquired of Legionnaires disease have been reported over the world (Garcia-Fulgueiras et al., 2003; von Baum et al., 2008). *Legionella* are Gram-negative, nonspore-forming, rod-shaped bacteria of the γ-proteobacterial lineage existing in a wide range of natural and human-made aquatic habitats, posing a significant public health concern (Leoni et al., 2001; Rivera et al., 2007). Moreover, in these diverse aquatic environments the bacteria survives within aquatic biofilms, often within free-living protozoa (Declerck, 2010). These naturals host cells provide nutrients, protect the bacteria from adverse conditions and serve as a vehicle for the colonization of new habitats (Wright, 2000). Likewise, the intracellular growth of *Legionella* within aquatic protozoa seems to have generated a pool of virulence traits during evolution, which allow the bacterium to also infect human alveolar macrophages (Cazalet et al., 2004).

The genus *Legionella* comprises at least 56 species with 70 serogroups and among them *L. pneumophila* serogroup 1 strains are the most common causative agent linked with clinical cases of legionellosis (Gomez-Valero et al., 2009). Diverse water

* Corresponding author. Tel.: +216 73 219 632; fax: +216 73 224 899.
E-mail address: taoufik_ghrairi@yahoo.fr (T. Ghrairi).
[1] These authors contributed equally to this work.

0923-2508/$ - see front matter © 2013 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2013.01.002

Author's personal copy

sources have been correlated with legionellosis (cooling towers, showers, spas, decorative fountains, hot spring water and others) (Marston et al., 1994; Riffard et al., 2001) and in all cases, water temperature was the main factor involved in *Legionella* development. In general, *Legionella* are able to grow between 20 and 45 °C, and can remain viable at much higher temperatures, even up to 60 °C (Fliermans et al., 1981). This bacterium was very difficult or even impossible to avoid entirely and permanently in water systems (Napoli et al., 2009). Risk of infection can be minimized by controls measures and application of preventive actions. Actually, various biocides were used in the treatment of *Legionella* contaminations on cooling towers and in potable water systems (Kim et al., 2002).

The spring water has multiple virtues and it's recognised that Tunisia has exceptional thermal springs. Therefore, Tunisian people enjoy bathing in medicalized thermal spas or in traditional hammam. Currently the prevalence of the *L. pneumophila* infections is not worrying. Although Legionnaires' disease have so far been generally underestimated, largely because of lack of clinical awareness. Several legionellosis cases are linked to hot spring water facility (Hsu et al., 2006; Kurosawa et al., 2010). Therefore, it is quite interesting to undergo legionellae particularly in medicalized thermal spas and leisure establishments where the bacterium can amplify and disseminate. *Legionella* screening is a crucial step in ecological study and epidemiological surveillance of the disease (Boccia et al., 2006; Lee et al., 2010).

Numerical data showing the occurrence of *L. pneumophila* in Tunisian medicalized thermal spas have not been reported. In this full research paper, we try to study the frequency of legionellae strains in three Tunisian medicalized thermal spas in order to assess strains diversity and their dynamics.

2. Material and methods

2.1. Media and reagents

Culture media used were obtained from Difco Laboratories (USA) and bioMérieux (France) while all chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (USA).

Legionella strains were cultured at 37 °C in buffered charcoal yeast extract agar plates (BCYE) or in buffered yeast extract (BYE) broth and supplemented with α-ketoglutarate, L-cysteine and ferric pyrophosphate (Edelstein and Edelstein, 1993).

2.2. Sample collection

From May 2009 through Mars 2010, a total of 77 samples were collected in the north of Tunisia from three therapeutic spas designated A (Korbos), B (Djebel Oust) and C (Hammam Bourguiba) supplied only by thermal water from deep springs which has not undergone any treatment. Each sample was composed of 2 l of spring hot water taken from various locations: springs appearance (A25, B25, C25), reservoirs (A18–24, B18–22, C18), cooling water tank (A5–6, B3, C4), swimming pool (A7, B7, C7) and bathroom outlets (A9, B9, C9). Samples were placed in sterile glass bottles and stored at 4 °C.

2.3. Measuring temperature and pH

Water temperature and its pH were measured at the time of collection using a portable pH metre (Hanna Instruments, USA).

2.4. Bacteriological analysis

Isolation of *Legionella* was performed by concentrating 1 l of water through a polycarbonate membrane (0.45 μm pore size, Millipore Corporation, Bedford, USA). One membrane was stored at −80 °C for nucleic acids extraction and the other was resuspended in 5 ml of sterile water, shaken for 5 min and scraped manually to remove bacteria. The concentrate was divided into three portions and cultured without pre-treatment, after acid treatment, and after heat treatment at 50 °C, on GVPC agar plates (BCYEα supplemented with glycine, vancomycin, polymyxin B and cycloheximide) in a normal atmosphere at 37 °C for 10 days. Colonies on GVPC that showed the characteristic ground glass appearance of *Legionella* sp. were counted and subcultured onto BCYE and BCYE without cysteine. Only isolates that grew on BCYE alone were recognized as *Legionella* strains and were maintained at −80 °C in BYE supplemented with 15% (v/v) glycerol.

All *Legionella* isolates were Gram-stained, examined microscopically for cell morphology and characterized using a commercially available latex agglutination test kit (Oxoid Ltd). Reagent supplied with the kit allows confirmation of isolates as *L. pneumophila* sg1, *L. pneumophila* sg2–14, or some other *Legionella* species. *L. pneumophila* Lens sg-1 was used as reference strain (Nhu-Nguyen et al., 2006). Results were given in number of colony forming units of *Legionella* spp. and *L. pneumophila* per litre of water (CFU/l).

2.5. Biochemical tests

Biochemical tests for Oxidase, catalase, urease, and gelatinase, as well as for hippurate hydrolysis and nitrate reduction were performed as described previously (Orrison et al., 1981; Hebert, 1981; Benson et al., 1996).

2.6. Genomic DNA extraction and purification

For standard PCR, genomic DNA was purified from *Legionella* isolates and *L. pneumophila* Lens grown on a BCYE agar plates using a Nucleospin® Tissue kit (Macherey–Nagel, Germany).

Concentration of DNA was determined by a Quant-iT™ ds DNA assay kit (Invitrogen, France), and then used to prepare a set of standard dilutions.

For Real-time PCR, nucleic acids were extracted from the frozen filters using a DNA extraction kit (High Pure PCR template preparation kit; Roche Diagnostics, Meylan, France). The frozen filters were thawed, cut into small strips with a sterile scalpel, transferred to a sterile tube, and total genomic DNA was extracted according to the manual kit. The extracted DNA was resuspended in 50 μl of elution buffer and stored at −20 °C until use.

Author's personal copy

2.7. Primers, probes and real-time PCR conditions

Real-time PCR primers and probes were described by Joly et al. (2006). *Legionellae* were detected in water by genus-specific PCR assay with primers and probes designed based on the gene encoding for 16S rRNA. Real-time PCR was performed and analysed using the LightCycler® instrument (Roche Diagnostics) under the following conditions: 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. A standard curve was generated using 10-fold dilutions of positive control DNA ranging from 3×10^5 to 3×10^1 µg/reaction. The *L. pneumophila* standard curve was automatically generated by the LightCycler® system by plotting the cycle number (Ct), at which significant increase in amplification product occurs, versus the logarithmic concentration of positive control DNA. Sample DNA concentrations were calculated from this standard curve and Detection limit was determined. Detection of PCR inhibitors was carried out using internal inhibitor control Ci Duo as previously described Joly et al. (2006). All assays were performed at least in triplicate and the average values were used for analysis.

The correlation coefficients ($|r^2|$) of the standard curves were between 0.99 and 1.0 for the initial copy numbers of standard PCR fragments indicating that the exponential amplification patterns were reliable under these conditions.

2.8. Pulsed-field gel electrophoresis

Total DNA was extracted from all isolates as described above. Typing was performed using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Sfi*I DNA digests in a DrIII electric field apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). PFGE types were evaluated by computer analysis using the GelCompar II software. Cluster analysis of electrophoretic band patterns was performed using the unweighted-pair group matching algorithm (UPGMA) with a tolerance of 1.50%.

2.9. PCR amplification of microbial DNA, sequencing and data analysis

For the presumptive phylogenetic identification of legionellae strains, multiple series of PCR reactions were conducted to amplify approximately 1465 pb of the 16 S rDNA gene locus through the combined use of 2 primers 27F and 1492R (Lane, 1991). Amplicons for sequencing were purified with a QIAquick PCR purification kit (NucleoSpin® ExtractII, Macherey–Nagel, USA). All sequence analyses were carried out with an Applied Biosystems 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA). The resulting sequences were compared with those stored in the Gene bank using the Blastn alignment software (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Phylogenetic analysis was performed using the Mega 5 free software (2011). A phylogenetic tree of the 16S rRNA gene sequences was constructed by the neighbour-joining method. The analysis was restricted to 1000 bp and bootstrap values are indicated at nodes with >50% support.

2.10. Nucleotide sequence accession numbers

Nucleotide sequences have been submitted in the GenBank database under the accession numbers (Table 2).

Table 1
Comparison of bacterial enumeration in hot spring water samples from three sites obtained by the plate count method and molecular quantification.

Samples	pH, temperature[a]	Water type[b]	Bacterial count (CFU/l)[c]	Number of bacterial cells determined by PCR (GU/l)[d]	Strains isolated, reference
A5	8.4; 66 °C	Ca:Na–Cl	3.8×10^3	2.0×10^5	GC-A1, -A6, -A11
A6			<50	3×10^3	GC-A7
A7			3.0×10^2	1.9×10^5	GC-A9
A9			10^2	10^3	GC-A8, -A14
A18			<50	2.4×10^1	GC-A10
A22			<50	1.38×10^2	GC-A13
A24			<50	3.5×10^2	GC-A12
A25			<50	<100	–
B3	7.9; 58 °C	Na–SO_4:Cl	4.2×10^3	3.1×10^4	GC-B1
B7			3.2×10^2	1.12×10^3	GC-B2
B9			2.0×10^3	1.1×10^4	GC-B3
B18			<50	10^4	GC-B3
B20			<50	2.2×10^2	GC-B3
B22			<50	6.03×10^2	GC-B10
B25	8.33; 48 °C	Ca:Na–SO_4	<50	<100	–
C4			8.2×10^3	4.2×10^5	GC-C3
C7			3.5×10^3	1.39×10^5	GC-C4
C9			<50	1.79×10^2	GC-C5
C18			<50	1.19×10^2	GC-C5
C25			<50	<100	–

[a] From the source.
[b] Data from the "Office du Thermalisme et Hydrothérapie Tunisien" (http://www.thermalisme.nat.tn/).
[c] CFU: colony-forming unit per litre.
[d] PCR: bacterial cell number per liter obtained by molecular quantification taking into account the number of 16S rRNA genes per chromosome.

Author's personal copy

2.11. Assays for survival under stress conditions

The response of environmental *Legionella* isolates to various stress conditions was checked by measuring survival after various shock stress exposition. In brief, legionellae isolates and *L. pneumophila* Lens were grown for 3 days on BCYE agar plates and used to inoculate 5 ml of BYE broth medium. The culture was then grown at 37 °C in 5% CO_2 for another 3 days to reach the exponential phase of growth.The bacteria were then pelleted, resuspended at an optical density of 0.8 at 600 nm in sterile PBS and adjusted 10^6 CFU/ml.For measuring the abilities of *Legionellae* isolates and *L. pneumophila* Lens to survive exposure to heat shock stress aliquots were incubated at 48 °C for increasing periods of time (0, 30, 60 and 90 min). For oxidative stress, aliquots were exposed to 15 mM H_2O_2 for 0, 30, 60 and 90 min. For osmotic shock, aliquots were exposed to 5 M NaCl for 60 min. For acid shock, aliquots were resuspended in 0.1 M citric acid (pH 3) for 90 min. Experiments with untreated control bacteria were performed throughout the study. Excepting heat shock, cells were incubated in a 37 °C water bath. Before and during various intervals after exposure of the bacteria to stress conditions, viable cells counts were determined (CFU/ml) on BCYE agar plates. Three repetitions were performed and an average value was reported.

2.12. Statistical analysis

Results were calculated as CFU/l or GU/l (Genomic Unities per litre) of microorganisms per litre and expressed as mean of three independent replicates. The results were analysed by linear regression analysis and Fisher's exact test to determine whether statistically significant differences existed in the contamination. TANGARA, a free statistical program was used.

3. Results

3.1. Detection and quantification of Legionella in hot spring water

L. pneumophila occurrence was investigated in 77 hot spring water samples from three thermal medicalized stations located in three Tunisian regions, from May 2009 through Mars 2010. Microbial counts, pH and temperature values of the different sites are shown in Table 1. The quantification of *Legionella* by conventional culture on GVPC medium shows the presence of *Legionella* in several samples of water. Of the 77 samples analysed, 60 (78%) tested negative and 17 (22%) positive for *L. pneumophila.* In general, counts of legionellae on GVPC agar were low in water samples near the groundwater source, whereas counts levels became dominant in samples from storage tank and bathroom outlets, increasing approximately to $8.2 \cdot 10^3$ CFU/l (Table 1). Samples collected from site A were found to be more contaminate. However, the number of legionellae didn't exceed that found in samples collected from site C. The highest levels of legionellae contamination were found in water samples A5, B3, B9, C4 and C9 (Table 1).

No legionellae were detected in groundwater spring by the culture method (<50 CFU/l) or by RT-PCR (<100 GU/l) indicating that the thermal area was the source of the organisms in the water. In other samples, the quantification of *Legionella* by RT-PCR revealed the presence of this bacterium in 54 out of 77 (70.1%). Legionellae level was $\leq 10^2$ GU/l in 37 water samples and above 10^2 GU/l in 17 water samples and ranged from 10^2 to 4.2×10^5 GU/l. The site C more contaminated than the other sites was found to have GU/l between 10^2 and 4.2×10^5.

Statistical analysis of our results showed that the number of positive samples for *Legionella* was significantly higher in

Table 2
Identification, serogroups, urease and gelatinase reactions and accession number of the 16S rRNA sequence of *Legionella* strains isolated from hot springs.

Sites	Strain	Identification	Serogroup	Urease	Hippurate hydrolysis	Gelatinase	Gene bank access no.
A	GC-A1	*L. londiniensis*	−	−	−	+	JQ731619
	GC-A2	*L. londiniensis*	−	−	−	+	JN983394
	GC-A6	*L. pneumophila*	8	−	−	−	JN983395
	GC-A7	*L. pneumophila*	8	−	−	−	JN210572
	GC-A8	*L. pneumophila*	8	−	−	−	JN210573
	GC-A9	*L. pneumophila*	6	−	−	−	JN983396
	GC-A10	*L. pneumophila*	6	−	−	−	JN983397
	GC-A11	*L. pneumophila*	1	−	−	−	JN983400
	GC-A12	*L. pneumophila*	nd[a]	−	−	−	JN983401
	GC-A13	*L. pneumophila*	6	−	−	−	JN983398
	GC-A14	*L. pneumophila*	6	−	−	−	JN983399
B	GC-B1	*L. pneumophila*	8	−	−	−	JQ478489
	GC-B2	*L. pneumophila*	8	−	−	−	JQ478490
	GC-B3	*L. pneumophila*	8	−	−	−	JN983402
	GC-B10	*L. pneumophila*	8	−	−	−	JQ478488
C	GC-C3	*L. pneumophila*	5 or 8	−	−	−	JN983405
	GC-C4	*L. pneumophila*	5 or 8	−	−	−	JN983404
	GC-C5	*L. pneumophila*	4	−	−	−	JN983403

[a] nd: not determined.

Author's personal copy

water samples from the site A (Fisher's exact test $p = 0.003$) and from the site C (Fisher's exact test $p = 0.015$) than samples of site B. Moreover, the results of the simple linear regression analysis showed that no statistically significant associations between legionellae counted for both methodologies ($r = 0.16$).

3.2. Microbial, biochemical tests and serotypage

Legionella isolates were characterised by various biochemical and microbial assays (Table 2). All the 18 *Legionella* isolates were bacilli in shape and existed in short chains. All strains excepting GC-A1 and -A2 isolates were Gram-negative, catalase-positive, oxidase-positive, hippurate hydrolysis positive, gelatinase negative, urease-negative and did not reduce nitrate. GC-A1 and -A2 isolates were positive for oxidase, catalase and gelatinase activities.

According to latex agglutination test kit, among the 18 legionellae isolates, one strain was assigned to *L. pneumophila* sg-1, 15 strains to *L. pneumophila* sg2–14 and two strains termed GC-A1 and -A2 were undetermined. Beside the legionellae species observed, *Pseudomonas putida*, and *Bacillus* sp. have also been isolated from different water samples.

Monoclonal antibody (Mabs) has been used to identify and characterize *L. pneumophila* sg-2/14 strains isolated from hot springs water samples (Table 2). Of the 16 *L. pneumophila* strains, seven isolates were sg-8, four were sg-6, one was sg-4, two were indistinguishable sg-5 or 8 and one isolate was not determined. Therefore, the predominant strain in the hot spring water facilities was *L. pneumophila* sg-8; the secondarily dominant strain was the sg-6.

It was observed that each site showed a different distribution of legionellae serogroups, and only pipes system of site A showed mixed contamination where, in sample A5 a *L. pneumophila* sg-1 was found with strains from sg-8 and specific *Legionella* strain type was also isolated (*Legionella londiniensis*), and in sample A15 a *L. pneumophila* sg-6 strain was found with a *L. pneumophila* sg-8 strain.

The strain *L. pneumophila* sg-1 belongs to the subgroup Olda (typing by Dresden monoclonal antibodies) and has the SBT type: 31, 10, 20, 10, 21, 4, 11.

3.3. Identification and phylogeny based on the 16S rRNA gene

16S rDNA PCR amplifications on genomic DNA preparations of these isolates generated amplicons of expected sizes for all isolates examined (data not shown). Subsequent sequencing of the amplicons and sequence analysis allowed for reliable identifications to be made. Several of the obtained legionellae isolates sequences were very closely related to each other, and most of them were phylogenetically placed within the *L. pneumophila* family (Table 2). However, two clones from the outlet pipe of the site A was clustered with the type strain of *L. londiniensis*. Thus, the strains GC-A1 and GC-A2 belonged to the *L. londiniensis* species and were designated *L. londiniensis* GC-A1 and GC-A2, respectively.

Fig. 1 shows the phylogenetic tree obtained with the 16S rRNA aligned sequences of the 18 legionellae strains, as well as of the type and reference strains used in this study; *Coxiella* sp. strain was used as an outgroup reference. Strains were grouped into two well-supported main clusters. In the first phylogenetic branch, all *L. pneumophila* strains, except GC-C5 strain, were clustered with *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* with a bootstrap support of 68%. GC-5 strain was clustered with *L. pneumophila* subsp. *fraseri* with a bootstrap support of 99%. The second phylogenetic branch (II) grouped GC-A1 and -A2 strains with type strain of *L. londiniensis*.

3.4. PFGE and phylogenetic analyses

Pulsed-field gel electrophoresis after digestion with *Sfi*I of chromosomal DNA has been used to analyse epidemiological relationships among environmental *L. pneumophila* strains. Genotyping results of PFGE were classified as dendrogram, and cluster analysis was used to compare the genetic characteristics of different strains (Fig. 2). Only the strain GC-A12 was not analysed. A total of 10 different PFGE patterns were observed among the 15 strains tested. Three strains GC-A6, -A7 and -A8 from the site A shared the same PFGE patterns, whereas from the site B strains also shared the same PFGE patterns. Within the most predominant sg-8 strains, four distinct patterns were generated (Fig. 3), meanwhile, four distinct patterns were observed for the sg-6 strains (Data not shown). Most of these new strains were recovered from

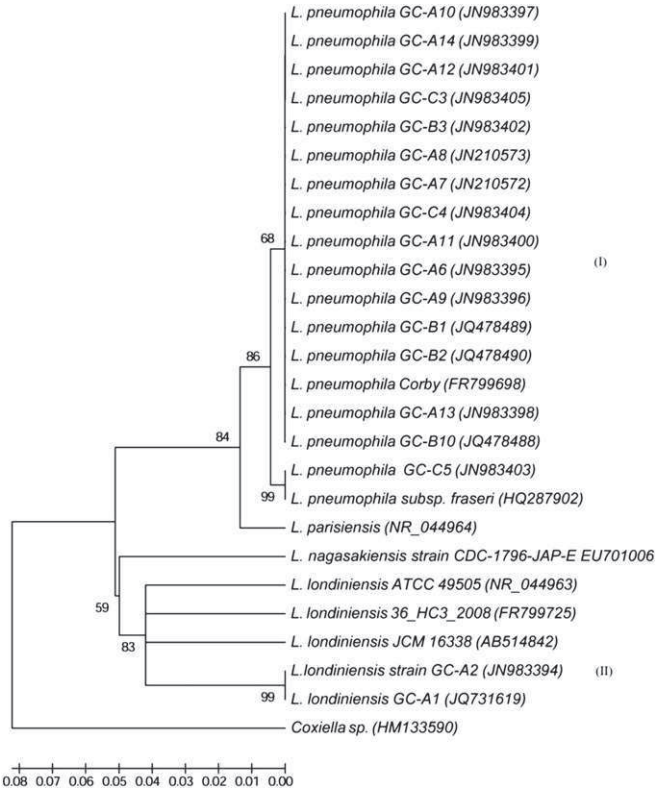


Fig. 1. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of the legionellae strains isolated from hot spring water samples. GenBank accession number is given in brackets.

Author's personal copy

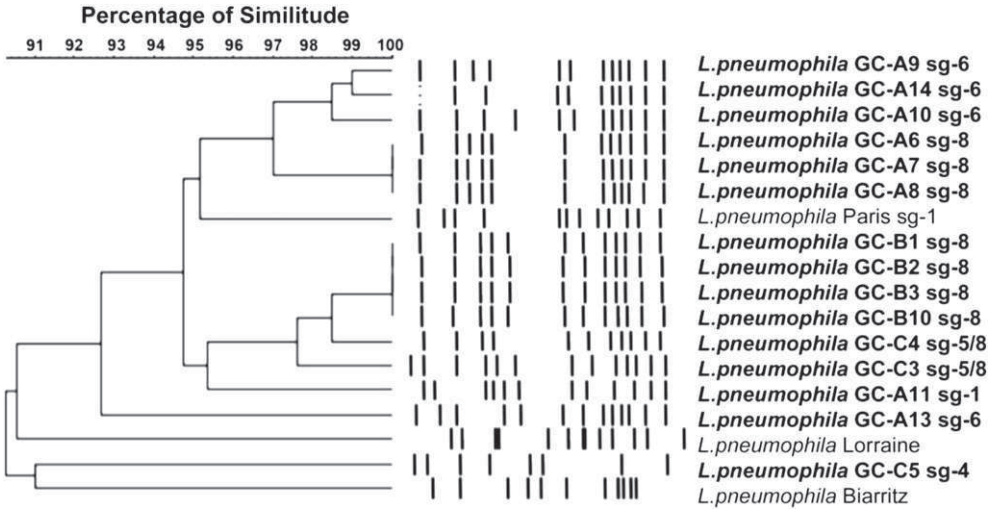


Fig. 2. Dendrogram and schematic representation of PFGE types showing *L. pneumophila* isolates clustering together at 91% similarity.

cooling tanks, swimming pools and shower outlets and don't correspond to any previously described *L. pneumophila* strains.

The comparisons of genomic profiles of our new strains with clinical and environmental strains isolated in France (CNRL data bank) have shown that our strains are different.

3.5. Assays for survival under stress conditions

The effect of various shock stress exposition on the count of *L. pneumophila* Lens sg-1 and two environmental strains, *L. pneumophila* GC-A8 and -A11, is shown in Fig. 4. The growth of *L. pneumophila* Lens and the two environmental strains GCA-8 and -A11 in acid and osmotic stress conditions showed no differences (Fig. 4, panel A and B). In heat shock stress, a slight decrease of the CFU of *L. pneumophila* Lens and the two environmental strains GC-A8 and -A11 per millilitre was observed after 60 min (Fig. 4, panel C). However, at 90 min of treatment *Legionella* counts reached levels of 0.6 and 1.17 log CFU/ml, respectively. Finally, a comparison of the growth curves obtained from the cultures incubated with 15 mM H_2O_2 at 37 °C for 60 min (Fig. 4, panel D) indicated

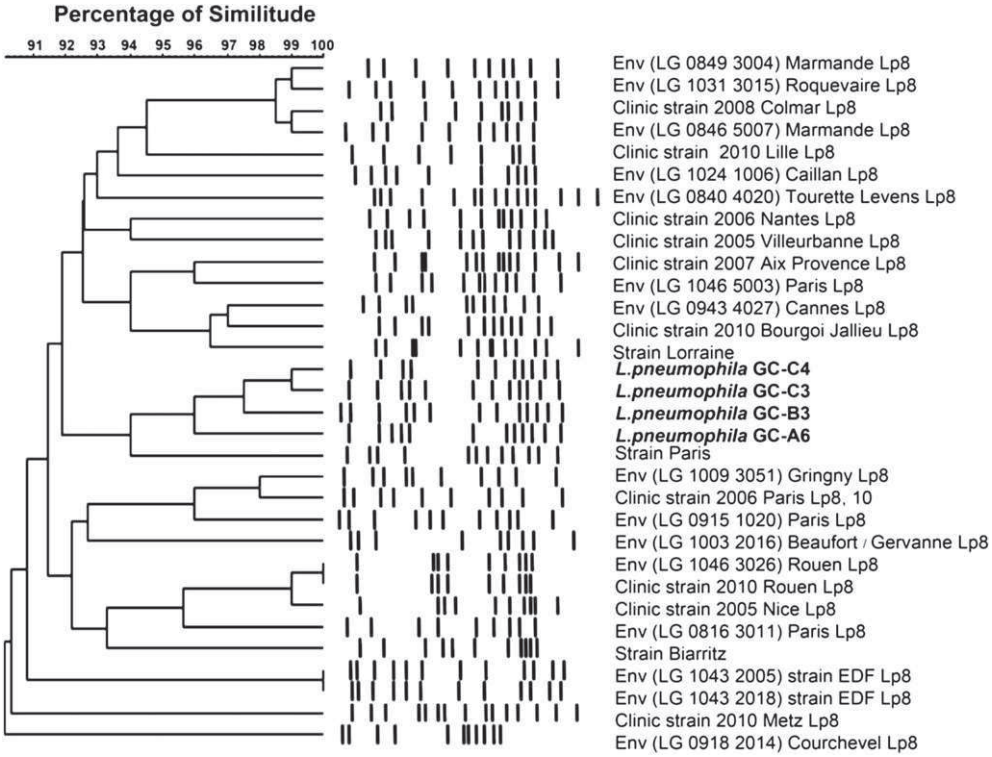


Fig. 3. Dendrogram and schematic representation of PFGE types for *L. pneumophila* sg-8.

Author's personal copy

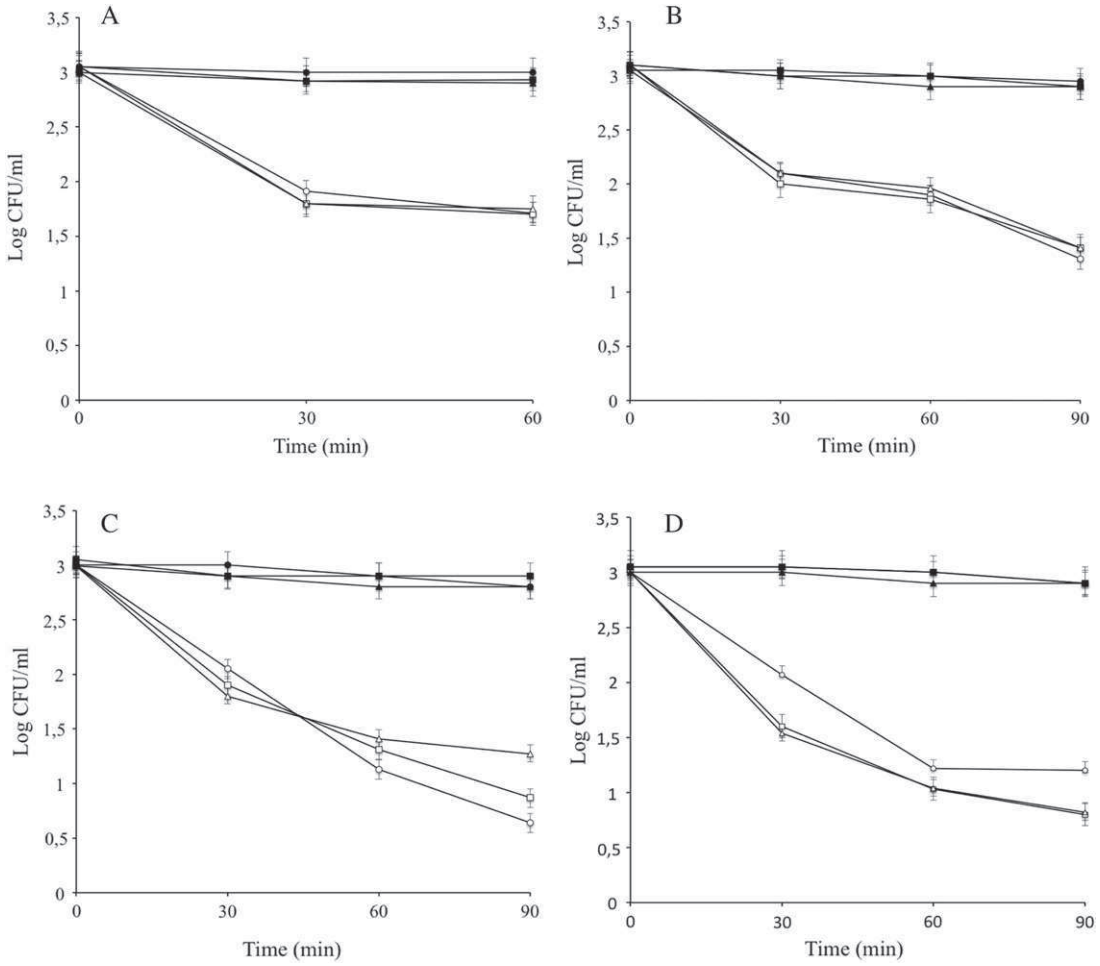


Fig. 4. Effect of osmotic (A), acidic (B), temperature (C) and oxydative stress (D) on the viability cell counts of *L. pneumophila* Lens (O), *L. pneumophila* GC-A8 (Δ) and GC-A11 (□) environmental strains. Closed symbols: Control experiment without stress. The values given are the mean and standard deviation of three experiments.

that the two environmental strains, *L. pneumophila* GC-A8 and GC-A11 showed a higher reduction in log CFU per millilitre (0.4 log CFU/ml). The results indicated that the clinical isolate *L. pneumophila* Lens was most susceptible to heat shock stress and that *L. pneumophila* GC-A8 and -A11 environmental strains appeared more sensitive to oxidative stress. Additionally, the environmental isolate *L. pneumophila* GC-A8 which was a sg-8 strain resist more to a treatment of 55 °C for 30 min than the tested GC-A11 sg-1 legionellae strains (data not shown).

4. Discussion

At the moment, little is known about the legionellae population in Tunisian hot spring water. In this investigation, 77 hot spring water samples from 3 thermal stations located in 3 regions of Tunisia were characterized and identified using microbial conventional culture and RT-PCR. The methods applied allowed to obtain information about the occurrence of legionellae strains in the hot spring water samples. These data confirming that *L. pneumophila* and so *L. londiniensis* inhabits hot spring water in Tunisia, even at very high temperatures. Microbial conventional culture detected a weak biodiversity in terms of species and serogroups, and the absence of recurrent dominant strains in the different samples sites.

Highest counts of *L. pneumophila* were found in five water samples by microbial conventional culture. With RT-PCR positive results were recorded in 18 samples. Therefore RT-PCR is often considered as the most sensitive of the new methods for bacterial enumeration. In addition, in environmental samples only a part of collected cells are usually capable of colony formation and it is possible that some bacteria adapt to a certain environment so well that they do not grow in any other media, even rich in nutrients (Wellinghausen et al., 2001).

The real-time PCR detection results were compared to the classic method of bacterial enumeration cultivation-based assay used in the study. In general, bacterial estimates were usually l00-fold higher with the real-time PCR method. For the sites A and C, The PCR quantification and the standard cultivation-based method differ significantly in seven out of the positive samples analysed. In three samples, A7, C4 and

Author's personal copy

C9, significant differences reached 9×10^4, 3×10^4 and 1.3×10^5, respectively (PCR quantification compared to bacterial enumeration).

In this study, *Legionella* was found in water samples from sites A and C with a pH of 8.4 and 8.33 respectively. This is in disagreement with the findings of Huang et al. (2010) who reported that *Legionella* species were not observed in Taiwan hot spring water at pH 8–9.

Based on the sequencing of the 16S rRNA genes, 16 *Legionella* isolates have been classified into the specie *L. pneumophila* and two subclusters were observed. Two other strains were grouped with the specie *L. londiniensis* and it's the first report of this specie in Tunisian hot spring water. However, this specie is known to be of low pathogenicity (Furuhata et al., 2010).

In this study, only two species of legionellae were recovered from the three sites by culture method. The observed results may be explained by major functional limitations of the culture technique (Yamamoto et al., 1993) or the possible low diversity of legionellae in hot spring water samples. Although, this finding can only be hypothesized and related to the particular physicochemical characteristics of hot spring water and eventual interaction with protozoa flora (Devos et al., 2005).

Most of these legionellae strains were recovered from cooling tanks, swimming pools and shower outlets. However, the cooling tower appeared to be a critical point in the entire distribution system, since the main contaminated samples in the three sites were observed in the cooling tank.

The strain *L. pneumophila* sg8 was widespread disseminate in the three thermal stations, whereas other microbial serogroups or species were typical to certain sampling site, such as sg4 found in the site C or *L. londiniensis* discovered only in site A. As can be seen from Table 2, in the three sites explored, *L. pneumophila* sg-1 occurred only in the site A with a lesser frequency, contrary to other study where this serogroup type was predominant in many aquatic environments (Oberdorfer et al., 2008). Similarly, in a study of hot spring water in South Korea, *L. pneumophila* sg-1 predominated in all of the public facilities except for the springs (Lee et al., 2010).

Ten distinctive PFGE patterns were identified in the 15 *L. pneumophila* strains examined (Fig. 2). Based on the criteria of Tenover et al. (1995) for the interpretation of PFGE banding patterns, one clone of sg1 and sg8 and four clones of sg6 were predominant throughout the pipe system of the site A, whereas in the site B only one clone sg8 subsist. In the site C, one clone sg4 and two clones sg5/8 cohabit. Our data suggest that unrelated *L. pneumophila* subpopulation can coexist in thermal water system mostly at low concentration. Although, this degree of PFGE pattern diversity is unusually high for environmental legionellae isolates. With regard to the isolates from Tunisian hot springs water, PFGE patterns were different according to the country. Although, in this study only one clone from each positive sample was collected and identified; this can limit the diversity of the *L. pneumophila* recovered.

The *L. pneumophila* sg1 GC-A11 strain from the site A yielded a unique PFGE pattern and SBT type different from any previously described serogroup 1.

In Tunisia, Mehiri-Zghal et al. (2008) analysed PFGE patterns of thirty-five *L. pneumophila* sg1 obtained from clinical and environmental water sources. Two or more kinds of PGFE patterns were present in environmental strains from these establishments (Mehiri-Zghal et al., 2008). PFGE pattern of our strain GC-A11 sg-1 was different to any type recorded. However, PFGE conditions used in this study were different from our conditions.

The naturally occurring strains of *L. pneumophila* present in the hot spring water samples was found to be more resistant to heat shock treatment than was the clinical isolate *L. pneumophila* Lens. This behaviour could explain the presence of these strains in Tunisian hot spring water. Although, presence of certain nutriments or protozoa have been shown to allow the proliferation of legionellae in stress conditions and therefore more researches are necessary to clarify the role of different compounds (Guerrieri et al., 2005).

In summary, elucidation of the structure of *L. pneumophila* population is needed to assess their potential public health significance and explain the conditions favouring their growth in the aquatic environments including water treatment. The results obtained in our study indicate variability of these organisms in Tunisian hot spring water, a rise concern about the risk of *L. pneumophila* in Tunisian hot spring water recreation areas and highlight the importance of adopting control measures to prevent legionellae infection.

Acknowledgements

This research was partially funded by grants from the CMCU (09G0824). Taoufik Ghrairi was supported by "la Région du Poitou-Charente" Undergraduate Internship Program 2011. We thank Dr. Kolsi Fayçal from the "Office du Thermalisme et Hydrothérapie Tunisien" for helpful assistance.

References

Benson, R.F., Thacker, W.L., Daneshvar, M.I., Brenner, D.J., 1996. *Legionella waltersii* sp. nov. and an unnamed *Legionella* genomospecies isolated from water in Australia. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 631–634.

Boccia, S., Laurenti, P., Borella, P., Moscato, U., Capalbo, G., Cambieri, A., Amore, R., Quaranta, G., Boninti, F., Orsini, M., Branca, G., Fadda, G., Spica, V.R., Ricciardi, G., 2006. Prospective 3-year surveillance for nosocomial and environmental *Legionella pneumophila*: implications for infection control. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 27, 459–465.

Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., Weaver, R.E., McDade, J.E., Feeley, J.C., Mandel, M., 1978. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: an interim report. Curr. Microbiol. 1, 71–75.

Cazalet, C., Rusniok, C., Bruggemann, H., Zidane, N., Magnier, A., Ma, L., Tichit, M., Jarraud, S., Bouchier, C., Vandenesch, F., Kunst, F., Etienne, J., Glaser, P., Buchrieser, C., 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. Nat. Genet. 36, 1165–1173.

Declerck, P., 2010. Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila*. Environ. Microbiol. 12, 557–566.

Devos, L., Boon, N., Verstraete, W., 2005. *Legionella pneumophila* in the environment: occurrence of a fastidious bacterium in oligotrophic conditions. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 4, 61–74.

Author's personal copy

Edelstein, P.H., Edelstein, M.A.C., 1993. Comparison of three buffers used in the formation of buffered charcoal yeast extract medium. J. Clin. Microbiol. 31, 3329–3330.

Fliermans, C.B., Cherry, W.B., Orrison, L.H., Smith, S.J., Tison, D.L., Pope, D.H., 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 41, 9–16.

Furuhata, K., Ogihara, K., Ishizaki, N., Oonaka, K., Yoshida, Y., Goto, K., Hara, M., Hiroshi, M., Shin-Ichi, Y., Masafumi, F., 2010. Identification of *Legionella londiniensis* isolated from hot spring water samples in Shizuoka, Japan, and cytotoxicity of isolates. J. Infect. Chemother. 16, 367–371.

Garcia-Fulgueiras, A., Navarro, C., Fenoll, D., Garcia, J., Gonzales-Diego, P., Jimenez-Bunuelas, T., Rodriguez, M., Lopez, R., Pacheco, F., Ruiz, J., Segovia, M., Balandron, B., Pelaz, C., 2003. Legionnaires disease outbreak in Murcia, Spain. Emerg. Infect. Dis. 9, 915–921.

Gomez-Valero, L., Rusniok, C., Buchrieser, C., 2009. *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. Infect. Genet. Evolut. 9, 727–739.

Guerrieri, E., Bondi, M., Ciancio, C., Borella, P., Messi, P., 2005. Micro- and macromethod assays for the ecological study of *Legionella pneumophila*. FEMS Microbiol. Lett. 252, 113–119.

Hebert, G.A., 1981. Hippurate hydrolysis by *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 13, 240–242.

Hsu, B.-M., Chen, C.-H., Wan, M.-T., Cheng, H.-W., 2006. *Legionella* prevalence in hot spring recreation areas of Taiwan. Water Res. 40, 3267–3273.

Huang, S.W., Hsu, B.M., Wu, S.F., Fan, C.W., Shih, F.C., Lin, Y.C., Ji, D.D., 2010. Water quality parameters associated with prevalence of *Legionella* in hot spring facility water bodies. Water Res. 44, 4805–4811.

Joly, P., Falconnet, P.A., André, J., Weill, N., Reyrolle, M., Vandenesch, F., Maurin, M., Etienne, J., Jarraud, S., 2006. Quantitative real-time *Legionella* PCR for environmental water samples: data interpretation. Appl. Environ. Microbiol. 72, 2801–2808.

Kim, B.R., Anderson, J.E., Mueller, S.A., Gaines, W.A., Kendall, A.M., 2002. Literature review-efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. Water Res. 3951, 1–12.

Kurosawa, H., Fujita, M., Kobatake, S., Kimura, H., Ohshima, M., Nagai, A., Kaneko, S., Iwasaki, Y., Kozawa, K., 2010. A case of *Legionella* pneumonia linked to a hot spring facility in Gunma prefecture, Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 63, 78–79.

Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Wiley, Chichester, UK, pp. 115–175.

Lee, H.K., Shim, J.I., Kim, H.E., Yu, J.Y., Kang, Y.H., 2010. Distribution of *Legionella* species from environmental water sources of public facilities and genetic diversity of *L. pneumophila* serogroup 1 in South Korea. Appl. Environ. Microbiol. 76, 6547–6554.

Leoni, E., Legnani, P.P., Bucci-Sabattini, M.A., Righi, F., 2001. Prevalence of *Legionella* spp. in swimming pool environment. Water Res. 35, 3749–3753.

Marston, B.J., Lipman, H.B., Breiman, R.F., 1994. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. Arch. Intern. Med. 154, 2417–2422.

Mehiri-Zghal, E., Essalah, L., Ghariani, A., Mahjoubi, W., Reyrolle, M., Meugnier, H., Forey, F., Jarraud, S., Freney, J., Etienne, J., Slim-Saidi, L., 2008. Comparaison moléculaire de *Legionella pneumophila* sérogroupe 1 isolées en Tunisie. Pathol. Biol. 56, 279–282.

Napoli, C., Iatta, R., Fasano, F., Marsico, T., Montagna, M.T., 2009. Variable bacterial load of *Legionella* spp. in a hospital water system. Sci. Total Environ. 408, 242–244.

Nhu-Nguyen, T.M., Ilef, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., Haeghebaert, S., Ganiayre, F., Marcel, F., Etienne, J., Desenclos, J.C., 2006. A Community-wide outbreak of Legionnaires disease linked to industrial cooling towers-how far can contaminated aerosols spread? J. Infect. Dis. 193, 102–111.

Oberdorfer, K., Mussigbrodt, G., Wendt, C., 2008. Genetic diversity of *Legionella pneumophila* in hospital water systems. Int. J. Hyg. Environ. Health 211, 172–178.

Orrison, L.H., Cherry, W.B., Fliermans, C.B., Dees, S.B., McDougal, L.K., Dodd, D.J., 1981. Characteristics of environmental isolates of *Legionella pneumophila*. Appl. Environ. Microbiol. 42, 109–115.

Riffard, S., Douglass, S., Brooks, T., Springthorpe, S., Filion, L.G., Sattar, S.A., 2001. Occurrence of *Legionella* in groundwater: an ecological study. Water Sci. Technol. 43, 99–102.

Rivera, J.-M., Aguilar, L., Granizo, J.J., Vos-Arenilla, A., Giménez, M.-J., Aguiar, J.-M., Prieto, J., 2007. Isolation of Legionella species/serogroups from water cooling systems compared with potable water systems in Spanish healthcare facilities. J. Hosp. Infect. 67, 360–366.

Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J. Clin. Microbiol. 33, 2233–2239.

von Baum, H., Ewig, S., Marre, R., 2008. Community-acquired *Legionella pneumonia*: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia. Clin. Infect. Dis. 46, 1356–1364.

Wellinghausen, N., Frost, C., Marre, R., 2001. Detection of *Legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time lightcycler PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67, 3985–3993.

Wright, J.B., 2000. *Legionella* biofilms: their implications, study and control. In: Evans, L.V. (Ed.), Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, the Netherlands, pp. 291–310.

Yamamoto, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., 1993. Comparison of detection methods for *Legionella* species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining and polymerase chain reaction. Microbial. Immunol. 37, 617–622.

2. Résultats complémentaires :

1.1 RT-PCR

Le test de CiDuo se fait pour détecter la présence ou non d'un inhibiteur interne dans les échantillons analysés, il peut s'agir d'une contamination environnementale ; ci dessous **(Figure 18)** un exemple de la courbe générée par le LightCycler :

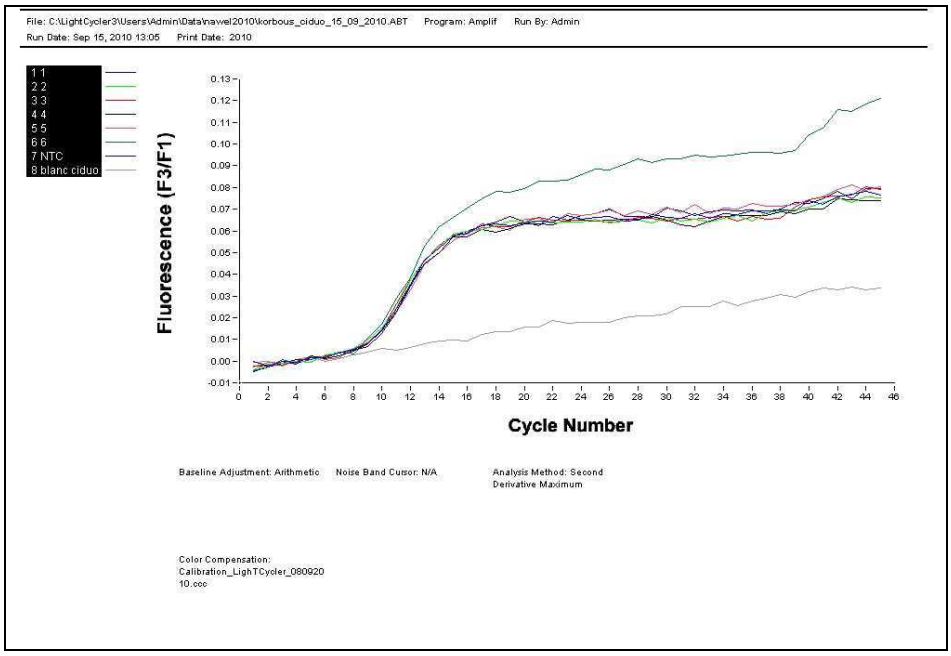


Figure 18 : Recherche de la présence d'inhibiteurs internes dans les échantillons à quantifier par RT-PCR

1.2 PFGE

L'analyse par électrophorèse en champ pulsé a permis d'établir les dendrogrammes et les pulsotypes des souches de *L. pneumophila* isolées. La technique PFGE consiste à extraire de l'ADN total qui est ensuite digéré par une enzyme de macro-restriction (*SfiI*) suivant un protocole comparable aux protocoles standardisés proposés par PulseNet (http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols). Les profils générés sont systématiquement analysés et comparés aux profils de la base de données du CNRL. Les **figures 19 et 20** montrent les résultats d'analyse des souches appartenant aux sérogroupes 4 et 6.

Un seul profil est associé à la souche de sérogroupes 4. Ce profil est unique et est différent des autres profils des souches de références. D'ou la précision et le bon pouvoir discriminatoire de cette méthode.

Les résultats présentés sur la **Figure 20** suggèrent la présence de 4 pulsotypes différents associés aux 4 souches isolées de sérogroupe 6. Ces résultats montrent que ces souches ne sont pas les mêmes et sont génétiquement différentes.

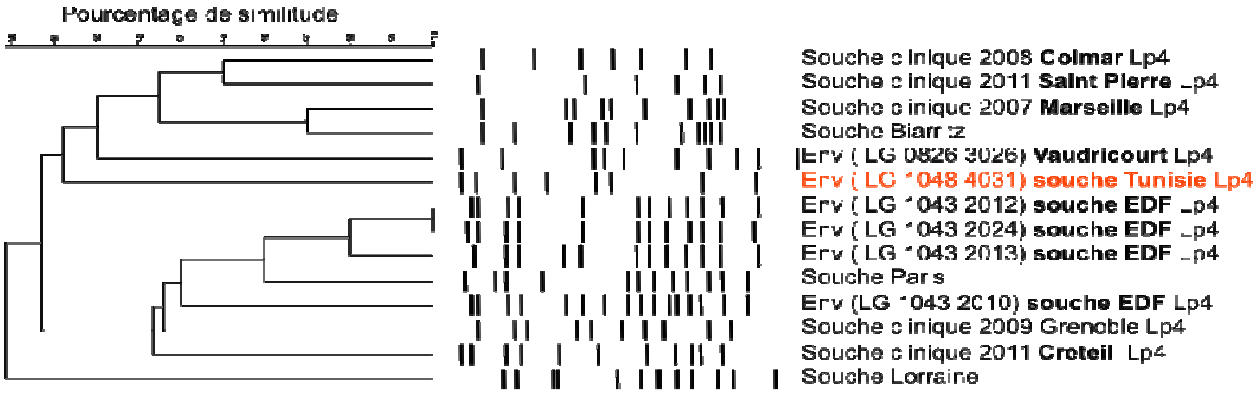


Figure 19 : Dendrogramme et pulsotype des souches *L. pneumophila* sg 4

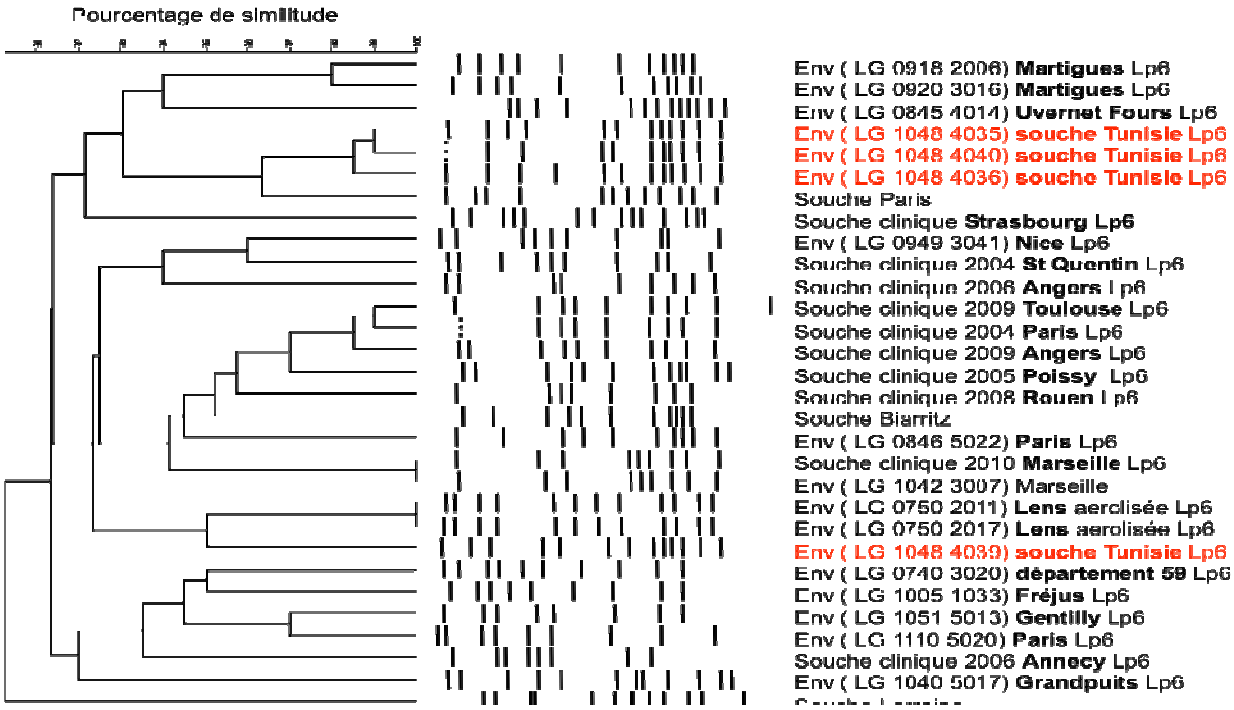


Figure 20 : Dendrogramme et pulsotype des souches *L. pneumophila* sg 6

Chapitre 2 : Évaluation de l'activité anti-Legionella des huiles essentielles de plantes tunisiennes

L'éradication des légionelles dans les eaux est basée principalement sur des méthodes physiques et chimiques. Nous avons cherché une « alternative » à ces méthodes, qui soit moins nocive pour l'environnement et les équipements des établissements thermaux et pour laquelle l'élimination du principe actif serait facilitée (biodégradable). Dans ce contexte, les HE de plantes représentent une approche encore peu exploitée. Les HE sont connues depuis longtemps pour leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications dans le domaine de la cosmétique. Il s'agit de substances naturelles à large spectre d'activité, d'où l'idée de les tester contre les légionelles afin d'envisager une application dans le domaine thermal (vaporisateur, bougies, …). De plus, la Tunisie est un pays présentant une grande diversité végétale et les applications à base d'huiles essentielles pourraient participer à la valorisation de ce patrimoine.

1. Principaux résultat de la publication 2 : Anti *Legionella pneumophila* activity of 6 essential oils of Tunisian plants

Ce travail a porté sur l'étude de six plantes tunisiennes : *Artemisia herba-alba* Asso, *Citrus sinensis* (L.) *Osbeck, Juniperus phoenicea* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Ruta graveolens* L., *Thymus vulgaris* **(Figure 16)**. Les HE de chaque plante ont été extraites et leur composition chimique a été analysée par GC-MS. Ces HE ont ensuite été testées contre 8 souches de *L. pneumophila* : deux souches de références *L. pneumophila* Lens et Paris et six souches environnementales isolées de stations thermales en Tunisie (sérogroupes : 1, 4, 5, 6 et 8). Les HE étaient actives contre ces souches avec une plus forte activité pour les HE de *Juniperus phoenicea* L. et *Thymus vulgaris* (CMI < 0.03 mg/mL et ≤ 0.07 mg/mL respectivement). L'observation par microscopie électronique à balayage et à transmission des souches *L. pneumophila* Lens et Paris traitées par l'HE de *T. vulgaris*, a montré un aspect modifié : bactéries plus courtes, aplaties et moins denses aux électrons comparativement aux témoins. L'analyse des compositions chimiques des HE a montré que l'isobornéol (20.91%), le 1S α-pinène (18.30%), le β-phellandrène (8.08%), le α-campholénal (7.91%), et le α-

phellandrène (7.58%) étaient les composés majoritaires de l'HE de *J. phoenicea*. Le carvacrol (88.50%) était le composé majoritaire de l'HE de *T. vulgaris*, suivi du *p*-cymene (7.86%).

Cette étude montre l'efficacité des HE extraites de plantes tunisienne ; il s'agit d'une première étape pour étudier la faisabilité de l'utilisation des HE comme biocides dans la lutte contre les légionelles.

Publication 2

Anti *Legionella pneumophila* activity of 6 essential oils of Tunisian plants

Soumis à *PLOS One*

2013

Anti *Legionella pneumophila* activity of six essential oils of Tunisian plants

Nawel Chaftar [a,b] , Marion Girardot [a], Nathalie Quellard [c], Jérôme Labanowski [d], Tawfik Ghrairi [b], Khaled Hani [b], Jacques Frère [a], Christine Imbert [a]

[a] *University of Poitiers, EBI, UMR CNRS 7267, 6 rue de la Milètrie, BP 199, 86034 Poitiers Cedex, France ;* [b] *UR08-45, Department of Biochemistry, Faculty of Medecine of Sousse, Avenue Mohamed Karoui, 4002 Sousse,Tunisia ;* [c] *Service of Microscopy CHU Poitiers, 2 rue de la Milétrie 86021 Poitiers Cedex, France;* [d]*University of Poitiers, IC2MP, UMR CNRS 7285, 4 rue Michel Brunet, 86022 Poitiers Cedex, France.*

Corresponding author. Nawel Chaftar
Tel.: +33 5 49 44 37 00; fax: +33 5 49 44 39 08.
E-mail address: nawelchaftar@yahoo.fr

Abstract:

The aim of this study was to investigate the composition and evaluate the anti-*Legionella* activity (microdilution assays) of six essential oils extracted from Tunisian plants: *Artemisia herba-alba* Asso*, Citrus sinensis* (L.) Osbeck*, Juniperus phoenicea* L.*, Rosmarinus officinalis* L.*, Ruta graveolens* L.*, Thymus vulgaris* L. Eight *Legionella pneumophila* strains were studied, the two well known serogroup 1 Lens and Paris strains as a control and six environmental strains isolated from Tunisian spas belonging to serogroups 1, 4, 5, 6 and 8. Essential oils were generally active against *Legionella pneumophila*; the activity of *Artemisia herba-alba, Citrus sinensis* and *Rosmarinus officinalis* oils was strain dependent. *Juniperus phoenicea* and *Thymus vulgaris* essential oils had the highest anti-*Legionella* activity with minimum inhibitory concentration less than 0.03 mg/mL and less or equal to 0.07 mg/mL respectively, regardless of the strains' serogroup. The microorganisms treated by *Thymus vulgaris* essential oils were both shorter, swollen and less electron-dense compared to the untreated control. Results showed that isoborneol (20.91%), 1S α-pinene (18.30%) β-phellandrene (8.08%), α-campholenal (7.91%), and α-phellandrene (7.58%) were the major components for *Juniperus phoenicea* essential oil. Carvacrol (88.50%) was the leading component of *Thymus vulgaris* essential oil, followed by *p*-cymene (7.86%).

This study highlights the interest of some essential oils extracted from Tunisian plants, which could be useful as biocides to prevent the *Legionella* risk.

Introduction

Legionella genus is composed of Gram-negative bacteria and was discovered in July 1976 in Philadelphia. This genus consists in approximately 56 species/subspecies belonging to over 70 serogroups [1].

Legionella pneumophila is responsible for 2 clinical forms of diseases, Pontiac fever and Legionnaires' disease, which is a severe form of pneumonia [2].

Legionella bacteria are associated with aquatic environments such as hot spring water, air-conditioners, cooling towers and showers, and are able to survive to temperatures up to 60°C [3]. This thermal resistance enables *Legionella* bacteria to survive and possibly to proliferate; so it may represent an infectious risk for patients, tourists and staff in public health resorts and thermal spa where people go for therapeutic vacations as well as rest periods.

Numerous thermal springs are found in Tunisia; most of them are used to supply water for public baths (hammam), swimming pools as well as thermal establishments. Public awareness of the risks of containing *Legionella* started emerging in recent years. Indeed, some studies reported cases of legionellosis related to hot spring water facilities [4], [5]**.** *L. pneumophila* strains belonging to serogroup 1 are the most often isolated in case of legionellosis [6], [7].

In order to prevent the risk of human contamination by *Legionella* bacteria, many chemical treatments, as well as biocides, may be applied to cooling towers and drinking water systems [8]. However, such molecules are not allowed to be used for water spa treatments due to current legislation. It is essential to find both alternative and effective treatments to prevent infection risks associated with *Legionella* survival and proliferation.

Essential oils (EOs) are already well known for their aromatic properties. The antimicrobial interest of numerous EOs was also demonstrated [9], [10]. EOs consist of a complex mixture of components, including terpenic derivatives, which are usually present in large numbers. Regarding EOs from some Mediterranean plants, the oregano EO, and terpenes such as carvacrol and thymol have already demonstrated antimicrobial activity against methicillin-resistant staphylococci [11]**.** They were also active against *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* biofilms [12]**.** It was also reported that the EOs of *Thymus maroccanus* and *T. broussonetii* had antimicrobial

activity against many Gram-positive (*Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Micrococcus luteus*, *S. aureus*) and Gram-negative bacterial species (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*) [13]**.** The anti-*Legionella* activity of EOs has been poorly investigated up to now. EOs from *Cinnamomum osmophloeum* and *Cryptomeria japonica* were shown to be active against one strain of *L. pneumophila* (serogroup 1, ATCC 33152) [14]**.** EO from *Chamaecyparis obtusa* was also showed to be active against *L. pneumophila* [15]. In addition, *L. pneumophila* belonging to different serogroups (1, 3, 6 and 8) and having a clinical or an environmental origin were shown to be sensitive to the *Melaleuca alternifolia* Cheel EO [16]**.**

EOs are characterized by their hydrophobic properties which may be an obstacle to their application as water treatment. However, their use as micellar solutions may overcome this issue [17], [18].

The aim of this study was to investigate the anti-*Legionella* interest of six EOs from selected Tunisian plants against a relatively large number of strains belonging to different serogroups in order to develop innovative strategies to fight the *Legionella* risk in recreational water-related. In addition, the chemical composition of these EOs was investigated in order to establish a potential link between anti-*Legionella* activity and specific compounds.

Material and methods

Ethics Statement:

The plant material was carried out on private lands belonging to Tunisian co-authors who gave permission to collect the plants. This study did not involve endangered or protected plant species.

Plant material:

Aerial parts of five plants (*Artemisia herba-alba* Asso, *Juniperus phoenicea* L.*, Rosmarinus officinalis* L.*, Ruta graveolens* L.*, T. vulgaris* L.) and leaves of one plant (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) were collected, from March to May 2010 and 2012. *A. herba-alba, C. sinensis, R. graveolens* and *T. vulgaris* were collected from the region

of Sahel (Sousse, Tunisia), *R. officinalis* from the Tunisian northeast (region of Zaghouan) and *J. phoenicea* from the Tunisian northwest (Aïn Drahem).
A voucher specimen of each plant was deposited at the Herbarium of the School of Pharmacy at the University of Poitiers (France).
After 2 weeks of drying in the shade, essential oils were extracted by hydrodistillation for 4 hours using a modified Clevenger-type apparatus according to the procedure described in the European Pharmacopoeia [19]. The oils were then collected and stored at 4°C in tight vials in the dark until analysis.

Gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis:

GC-MS analyses were performed using a HP 6890 series chromatograph coupled to a HP 5973 mass selective detector. Owen temperature program: 50°C hold 1min, then 5°C/min until 180°C - hold 2 min, then 10°C/min until 250°C - hold 1 min. Injector was working in pulsed splitless (25 psi - 05 min) mode. Flow was at 1 mL/min. A Varian VF-5MS column (30 m, 0.25 mm, 0.25 µm) was used.

Samples were diluted and injected automatically. The components were identified by comparing both their retention times with those of reference samples and their linear retention indices related to the series of *n*-hydrocarbons (Kovats retention index), as well as by computer matching against commercial library mass spectra (NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library database version 2.0 d build Dec 2 2005) and mass spectra literature data [20], [21], [22], [23], [24], [25], [26], [27], [28], [29], [30], [31], [32]. Each component was quantified by integrating the peak area of the chromatograms.

Bacterial strains:

The antibacterial activity of the EOs was evaluated against six strains of *L. pneumophila* isolated from three Tunisian spas located on the north of Tunisia (Korbous, Hammam Bourguiba and Djebel el Oust) and two reference strains of *L. pneumophila*: Paris and Lens strains. The tested reference strains belonged to serogroup 1 and have been shown to be sensitive to erythromycin and rifampicin [33], [34], [35]. Each strain was first cultured in buffered charcoal-yeast extract (BCYE) agar medium for 3 days at 37°C. One colony of this 72h agar culture was

then suspended in buffered yeast extract (BYE) medium to obtain a bacterial suspension at 10^6 CFU/ mL by measuring optical density (OD) at 600 nm (1OD ~ 10^9 CFU/ mL).

Antibacterial test:

Preliminary tests were performed in order to evaluate the minimal concentrations of acetonitrile required to solubilize the EOs that were not harmful for bacteria growth. The 6 EOs were diluted in acetonitrile (50% v/v). The tested concentrations of EOs ranged from 1.1 mg/mL to 0.02 mg/mL. Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) were determined as previously described [36]. 10 µL of each oil were added in wells of the 96 well microplates, then 100 µL of the BYE medium supplemented with the tested strain (10^6 CFU/ mL) were added to these wells. Growth controls without EO were prepared. Negative controls corresponded to the medium alone. All experiments were performed twice, in triplicate, on separate days. The microplates were incubated for 3 days at 37°C in 5% of CO_2. The MIC was defined as the lowest concentration of EO inhibiting the visible growth of the tested strain.

Electron microscopic analysis:

Strains were first grown on BYE medium for 2 days with gentle shaking, and then *T. vulgaris* EO was added at the tested concentration. After 24 hours of incubation at 37°C with gentle shaking, the cell suspension was centrifuged (20 min; 3000g). The culture medium was eliminated and bacteria were fixed with 3% glutaraldehyde in phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4). Samples for Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM) observations were prepared according to the previously described protocols [37], [38].

Results and Discussion

Compositions of the volatile fractions obtained from the 6 extracted EOs are shown in Table 1. Compounds were listed in according to their retention time (RT) on a Varian VF-5MS column. The GC-MS analyses of the oil samples showed the presence of a

total of 12, 17, 28 and 17 compounds for *A. herba-alba, C. sinensis, J. phoenicea,* and *R. graveolens* oils, respectively. Only 6 and 8 compounds were obtained for *R. officinalis* and *T. vulgaris* respectively, collectively representing over 90% of these oils. Most of the studied oils were mainly composed of monoterpene fractions (over 90%), oxygen-containing monoterpenes being the main compounds in *A. herba-alba, C. sinensis, R. officinalis,* and *T. vulgaris* oils (Table 1).

The *A. herba-alba* EO was composed of 96.68% of oxygenated monoterpenes, mainly divided among α-thujone (36.38%), β-thujone (22.24%), camphor (19.12%), chrysanthenone (10.88%) and 1,8-cineole (3.58%) (Table 1). Mighri et al. [23] have studied the chemical composition of 4 tunisian *A. herba-alba* EOs and characterized 4 different types of oils based on their specific content: indeed, these oils from the same origin (southern Tunisia) had α- and β-thujone, 1,8-cineole and camphor, but at different concentrations. These components were also described in other oils from Algerian and Moroccan plants. Belhattab et al. [26] analyzed by GC-MS the composition of 4 EOs made with *A. herba-alba* from 4 different regions of Algeria. They also described a dominance of oxygen containing monoterpenes (72-80%), and camphor (17-33%), α-thujone (7-28%) and chrysanthenone (4-19%) were the major components.

The EO extracted from *C. sinensis* leaves was mainly composed of *cis*-linalooloxide (24.90%), linalool (16.50%), *trans*-linalooloxide (15.82%) and β-myrcene (6.69%) (Table 1). Little data is available in the literature regarding the composition of leaves-related *C. sinensis* EOs as they are usually extracted from peels. The EOs extracted from leaves of 8 cultivars of Nigerian *C. sinensis* (L.) Osbeck were recently studied by Kasali et al. [20] and contained fifty four compounds, sabinene (20.9 – 49.1%), δ-3-carene (0.3 – 14.3%), E-β-ocimene (4,4 – 12.6%), linalool (3.7 – 11.1%) and terpinen-4-ol (1.7 – 12.5%) being the major common compounds. Blanco Tirado et al. [27] previously investigated the composition of an EO produced with leaves of *C. sinensis* and showed that sabinene (47.68%) was the major component, followed by *trans*-β-ocimene (8.31%), 3-carene (7.38%), limonene (5.95%) and linalool (4.38%).

Regarding *J. phoenicea* EO, the monoterpene hydrocarbure and the oxygen-containing monoterpene fractions were approximately balanced (45.19% and 43.72% respectively). Isoborneol (20.91%) and 1S α-pinene (18.30%) were the major components (Table 1). Ait-Ouazzou et al. [25] recently reported a quite different

chemical composition for an EO from Moroccan *J. phoenicea*; this oil was dominated by monoterpenoids (hydrocarbons: 62.50% and oxygenated monoterpenes: 14.20%). The predominant compounds were α-pinene (24.90%), β-phellandrene (24.40%), α-terpinyl acetate (12.90%), and authors also found myrcene, D-germacrene, terpinolene, β-caryophyllene, etc in concentration ≤ 4% [25]. Another study focusing on EOs from *J. phoenicea* from Corsica showed a variable composition depending on the studied EO sample, and the main difference was based on the α-pinene quantity (about 59% versus about 33%) [21]. These authors suggested that there was no relation between oil composition and habitat in this case.

In our study *R. officinalis* EO was mainly composed of oxygenated monoterpenes (96.66%), and 1,8-cineol (59.18%), camphor (21.60%) and borneol (11.95%) were the major components (Table 1). Zaouali et al. [22] also studied the composition of two Tunisian *R. officinalis* EOs corresponding to different varieties, and found for both a predominance of 1,8-cineole, camphor, α-pinene and camphene although respective concentrations of each considered component were different among oils. So these authors suggested that the chemical composition of these EOs depended on varieties rather than bioclimatic variations. However, this hypothesis doesn't support other results suggesting that the variation in the composition of *R. officinalis* essential oils could be attributed to the variations of climatic parameters since the used plants had grown in different habitats [39]**.**

Pintore et al. [32] have reported that *R. officinalis* oils with over 40% of 1,8-cineole were characteristically from Mediterranean countries such as Tunisia, Morocco, Turkey, Italy, France, Greece and Yugoslavia. Okoh et al. [31] studied comparatively two methods for extraction of *R. officinalis* EO: by hydrodistillation or using a solvent free microwave method. Higher amounts of oxygenated monoterpenes were obtained using the second method demonstrating the influence of the methods on the obtained composition. Generally, major components were camphene, camphor, verbenone, borneol, bornyl acetate and 1,8-cineole.

As shown in Table 1, the *R. graveolens* EO was mainly composed of fatty acid derivatives (over than 85%), 2-undecanone being the leading component (60.63%). De Feo et al. [28] have also studied the composition of an EO of *R. graveolens* and results showed the presence of 38 components, whose main components were ketones: 2-undecanone (46.8%) and the 2-nonanone (18.8%). So, here again two

compositions corresponding to an EO produced from the same plant species, even more from the same part of the plant, are not exactly identical. Close to this *Ruta* species, a recent study [24] reported the identification of 13 major compounds of the EO of *R. chalepensis* collected from the north of Tunisia. Here again, 2-undecanone was the leading component (77.18%).

Finally, the studied EO of *T. vulgaris* was mainly composed of carvacrol (88.50%), a phenolic compound, and its precursor *p*-cymene (7.86%), whereas thymol was weakly abundant (0.42%). On the contrary, Dimitrijevic et al. [29] showed that thymol was the major component (17.37%) of an EO of *T. vulgaris* from Serbia*;* the geographical origin was here again different. Carvacrol and *p*-cymene were also significant components of this EO, with concentrations of 15.30% and 12.10% respectively. In the same way, El-Nekeety et al. [30] reported that cravacrol (45%) and thymol (24.7%) were the major components of a *T. vulgaris* EO from Egypt.

So, to conclude on EO compositions, it's difficult to compare results obtained with oils produced from a plant species, even one growing within the same country because of the environmental conditions that are never the same depending both on the localization and the harvest period and because of different sub-species or varieties.

The antimicrobial interest of the Tunisian EOs was assessed against *L. pneumophila* strains belonging to various serogroups (1, 4, 5/8, 6, 8) in order to evaluate both strain and serogroup influences. Six strains were isolated from 3 Tunisian spas [40]. Two serogroup 1 reference strains (Paris and Lens strains) were also studied; Paris strain was an environmental strain [41], [42] whereas Lens strain had a clinical origin and was isolated during the epidemic in Lens (France, 2003/2004) [43]**.**

EOs of *A. herba-alba* and *C. sinensis* were the less active against the tested strains (Table 2). However, two *L. pneumophila* strains (GC-5 and Paris) were sensitive to these two EOs with MIC ranging from 0.11 mg/mL to 0.23 mg/mL; the activity of *A. herba-alba* and *C. sinensis* EOs appeared to be strain- and/or serogroup- dependant. Our results showed presence of α-thujone (36.38%), β-thujone (22.24%) as major compounds in *A. herba-alba* EO. Moreover, Mighri et al. [23] showed that an EO of *A. herba-alba* from Tunisia contained balanced amounts of α- and β-thujone (about 24%) and displayed a high activity against Gram-positive bacteria. *Cis*-linalooloxide (24.9%) and *trans*-linalooloxide (15.82%) were the main components of *C. sinensis*

EO. Only little data is available concerning the antimicrobial activities of EOs extracted from the leaf part of *C. sinensis*, these EOs being usually produced using peels. In addition the activities of oxidized forms of linalool are poorly known; recently linalool has been shown to strongly inhibit periodontopathic and cariogenic bacteria (MIC ≤ 0.8 mg/mL) [44]. Linalool is also the leading component of *Bursera aloexylon* EO (96.7%) which was shown to inhibit the growth of Gram-positive bacteria such as *Rhodococcus equi* (MIC=0.6 mg/mL) and *S. epidermidis* (MIC=0.15 mg/mL) [45].

The EO of *R. officinalis* was highly efficient against *L. pneumophila* strains GC-4, GC-5, GC-6 and GC-11 (MIC ≤ 0.55 mg/mL) and less active against strains GC-3 and GC-13 (MIC ≥ 1.10 mg/mL) (Table 2). Its activity against serogroup 1 strains was heterogeneous: this EO was much more active on the Paris strain (MIC = 0.13 mg/mL) than on the Lens strain (MIC > 1.10 mg/mL), suggesting that the observed variability may not be directly linked to the serogroup; it would be necessary to study a larger sample of strains belonging to each serogroup to conclude. To our knowledge, this is the first study focusing on the anti-*Legionella* activity of *R. officinalis* EO. However, other *R. officinalis* EOs, with a specific origin and composition, have been previously shown to significantly inhibit the growth of Gram-negative bacteria [46], [47], [48], [49].

R. graveolens' EO demonstrated a promising anti-*Legionella* activity with MIC ≤ 0.06 mg/mL except for *L. pneumophila* GC-6 (MIC= 0.40 mg/mL) (Table 2). Once again, the anti-*Legionella* interest of *R. graveolens* EO has not been investigated yet to our knowledge. However, it has been shown that *R. graveolens* extracts obtained using methanol, petroleum ether, ethyl acetate and water-methanol had no activity against both a Gram-negative bacterial species (*E. coli*) and a yeast species (*C. albicans*) [50]. Many *Ruta* species are known for being a source of natural products (coumarins and alkaloids, especially furanocoumarins, quinolines and furoquinolines) with a wide range of biological properties: antifungal, antidotal and phytotoxic activities [51], [52]. The 2-undecanone which was the leading component (60.63%) of the studied *Ruta* EO may be responsible for the observed high anti-*Legionella* activity.

Finally, EOs of *J. phoenicea* and *T. vulgaris* were the most active against all the tested strains, with MIC<0.03 mg/mL and ≤ 0.07 mg/mL respectively, regardless of the serogroup. The observed inhibitory activity of *J. phoenicea* EO against a Gram-

negative bacteria does not support the results of Angioni et al. [53] and Ait-Ouazou et al. [25] who suggested that *J. phoenicea* EOs were not active against some Gram-negative bacteria (*E. coli*, *P. aeruginosa*…). However, *Legionella* species was not included in these studies.

Regardless of their exact composition, literature data suggests that *Thymus spp* EOs would have significant antimicrobial activities, even if anti-*Legionella* activity has not been shown yet to our knowledge. The antimicrobial properties of these EOs would be related to their high content of phenolic compounds [54]**.** Our results supported this hypothesis: the studied oil had a very high content of carvacrol (88.5%), also contained another phenolic compound (thymol) at a low concentration, and displayed a MIC ≤ 0.07 mg/mL. Carvacrol is well known for its wide spectrum of antibacterial properties [12], [13], [55]

Microscopic observations (SEM and TEM) of *L. pneumophila* cells treated or not with *T. vulgaris* EO confirmed the anti-*Legionella* interest of this EO. SEM highlighted the morphological alteration induced by *Thymus* EO (data not shown): Paris strain treated by *T. vulgaris* EO used at 0.03 and 0.15 mg/mL was both shorter, flattened and expanded compared to untreated control-strain. Similar morphological modifications were observed studying the Lens strain treated with increasing concentrations of *T. vulgaris* EO. TEM was used to screen for ultrastructural differences between the external membrane and inner cellular components of treated and untreated bacteria. TEM highlighted that *Legionella* cells treated with *T. vulgaris* EO (MIC) were significantly less homogeneous and electron-dense compared with untreated controls, as shown for Lens strain (Fig. 1), highly suggesting a membrane disruption. *T. vulgaris* EO would be active against *L. pneumophila* even at a sub-inhibitory concentration (MIC/2) as suggested by the little homogenous cellular content (data not shown)**.** The hypothesis that thymol would act by altering the cell membrane is supported by previous studies [56], [57]**.** Moreover, thanks to its lipophylic properties, carvacrol has already been shown to alter the fluidity and the permeability of cell membranes [57]. Carvacrol would destabilize the cytoplasmic membrane and would act as a proton exchanger; the pH gradient across the membrane would be therefore reduced: collapse of the proton motive force and depletion of the ATP pool would lead to cell death [56].

Conclusion

We have characterized the chemical composition of EOs from six Tunisian plants. They were mainly composed of oxygenated compounds. This class is known for having generally good antibacterial and antifungal activities. Some of these EOs displayed leading components whereas others were composed of several compounds in balanced concentrations. It may be quite difficult to make a direct connection between activity levels and EO chemical composition as the antimicrobial activity depends not only on the major components, but also on its less abundant components. The EOs activities were evaluated against different *L. pneumophila* strains, taking into account the strains' serogroup. According to the observed MIC, all the tested EOs were relatively efficient. *J. phoenicea* and *T. vulgaris* EOs were the most active with MIC $\leq$ 0.07 mg/mL, showing their potential interest to fight *L. pneumophila*. Our results suggest that *J. phoenicea* and *T. vulgaris* from Tunisia may be useful to control the legionellosis risks associated with water used for recreational purposes.

Acknowledgments

The authors want to thank Emile BERE and Béatrice FERNANDEZ for their helpful assistance in microscopy and Deborah BELL for the English revision.

References

1. Gomez-Valero L, Rusniok C, Buchrieser C (2009) *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. Infect Genet Evol 9: 727-739.
2. Ching WT, Meyer RD (1987) *Legionella* infections. Infect Dis Clin North Am 1: 595-614.
3. Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, et al. (1981) Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. Appl Environ Microbiol 41: 9-16.
4. Kurosawa H, Fujita M, Kobatake S, Kimura H, Ohshima M, et al. (2010) A case of *Legionella* pneumonia linked to a hot spring facility in Gunma Prefecture, Japan. Jpn J Infect Dis 63: 78-79.
5. Hsu BM, Chen CH, Wan MT, Cheng HW (2006) *Legionella* prevalence in hot spring recreation areas of Taiwan. Water Res 40: 3267-3273.
6. Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, et al. (2004) Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. J Clin Microbiol 42: 458-460.
7. Yu V, Plouffe J, Pastoris M, Stout J, Schousboe M, et al. (2002) Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. J Infect Dis 186: 127-128.
8. Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM (2002) Literature review--efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. Water Res 36: 4433-4444.
9. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils--a review. Food Chem Toxicol 46: 446-475.
10. Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G (2006) Characterization of the volatile composition of essential oils of some *Lamiaceae* spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. J Agric Food Chem 54: 1822-1828.
11. Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, et al. (2004) Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. FEMS Microbiol Lett 230: 191-195.

12. Nostro A, Sudano Roccaro A, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, et al. (2007) Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J Med Microbiol 56: 519-523.
13. Fadli M, Saad A, Sayadi S, Chevalier J, Mezrioui NE, et al. (2012) Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics. Phytomedicine 19: 464-471.
14. Chang CW, Chang WL, Chang ST, Cheng SS (2008) Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. Water Res 42: 278-286.
15. Park MJ, Choi WS, Kang HY, Gwak KS, Lee GS, et al. (2010) Inhibitory effect of the essential oil from *Chamaecyparis obtusa* on the growth of food-borne pathogens. J Microbiol 48: 496-501.
16. Mondello F, Girolamo A, Scaturro M, Ricci ML (2009) Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions. J Microbiol Methods 77: 243-248.
17. Edris AE, Malone CF (2012) Preferential solubilization behaviours and stability of some phenolic-bearing essential oils formulated in different microemulsion systems. Int J Cosmet Sci 34: 441-450.
18. Terjung N, Loffler M, Gibis M, Hinrichs J, Weiss J (2011) Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. Food Funct 3: 290-301.
19. Council of Europe (1997) Methods of Pharmacognosy. In: European Pharmacopoeia. 3rd ed. pp.121-122.
20. Kasali AA, Lawal OA, Eshilokun AO, Olaniyan AA, Opoku AR, et al. (2011) *Citrus* essential oil of Nigeria. Part V: Volatile constituents of sweet orange leaf oil (*Citrus sinensis*). Nat Prod Commun 6: 875-878.
21. Rezzi S, Cavaleiro C, Bighelli A, Salgueiro L, Da Cunha AP, et al. (2001) Intraspecific chemical variability of the leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* from Corsica. Biochem Syst Ecol 29: 179-188.
22. Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M (2010) Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food Chem Toxicol 48: 3144-3152.

23. Mighri H, Hajlaoui H, Akrout A, Najjaa H, Neffati M (2010) Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. C R Chim 13: 380-386.
24. Mejri J, Abderrabba M, Mejri M (2010) Chemical composition of three essential oils of *Ruta chalepensis* L: influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. Ind Crops Prod 32: 671–673.
25. Ait-Ouazzou A, Lorán S, Arakrak A, Laglaoui A, Rota C, et al. (2012) Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. Food Res Int 45: 313-319.
26. Belhattab R, Amor L, Barroso J, Pedro L, Figueiredo A (2012) Essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and comparison with an updated literature Survey. Arab J Chem In Press.
27. Blanco Tirado C, Stashenko EE, Combariza MY, Martinez JR (1995) Comparative study of Colombian *citrus* oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatography A 697: 501-513.
28. De Feo V, De Simone F, Senatore F (2002) Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. Phytochem 61: 573-578.
29. Dimitrijević SI, Mihajlovski KR, Antonović DG, Milanović-Stevanović MR, Mijin DZ (2007) A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. . Food Chem 104: 774-782.
30. El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hathout AS, Hassan NS, Aly SE, et al. (2011) Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats. Toxicon 57: 984-991.
31. Okoh OO, Sadimenko AP, Afolayan AJ (2010) Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food Chem 120: 308-312.
32. Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, et al. (2002) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oil from Sardinia and Corsica. . Flav Fragr J 17: 15-19.

33. Bruin JP, Ljzerman EP, Den Boer JW, Mouton JW, Diederen BM (2012) Wild-type MIC distribution and epidemiological cut-off values in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 72: 103-108.
34. Ferhat M, Atlan D, Vianney A, Lazzaroni JC, Doublet P, et al. (2009) The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion. PLoS One 4: e7732.
35. Roch N, Maurin M (2005) Antibiotic susceptibilities of *Legionella pneumophila* strain Paris in THP-1 cells as determined by real-time PCR assay. J Antimicrob Chemother 55: 866-871.
36. Verdon J, Berjeaud JM, Lacombe C, Hechard Y (2008) Characterization of anti-*Legionella* activity of warnericin RK and delta-lysin I from *Staphylococcus warneri.* Peptides 29: 978-984.
37. Mogoa E, Bodet C, Morel F, Rodier MH, Legube B, et al. (2011) Cellular response of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* to chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine treatments. Appl Environ Microbiol 77: 4974-4980.
38. Barbot V, Migeot V, Quellard N, Rodier MH, Imbert C (2012) *Hartmannella vermiformis* can promote proliferation of *Candida* spp. in tap-water. Water Res 46: 5707-5714.
39. Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Alipoor AS, et al. (2007) Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chem 102: 898-904.
40. Ghrairi T, Chaftar N, Jarraud S, Berjeaud JM, Hani K, et al. (2013) Diversity of *legionellae* strains from Tunisian hot spring water. Res Microbiol 164: 342-350.
41. Aurell H, Etienne J, Forey F, Reyrolle M, Girardo P, et al. (2003) *Legionella pneumophila* serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France. J Clin Microbiol 41: 3320-3322.
42. Lawrence C, Reyrolle M, Dubrou S, Forey F, Decludt B, et al. (1999) Single clonal origin of a high proportion of *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. J Clin Microbiol 37: 2652-2655.

43. Cazalet C, Rusniok C, Bruggemann H, Zidane N, Magnier A, et al. (2004) Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. Nat Genet 36: 1165-1173.
44. Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, et al. (2012) Antimicrobial effect of linalool and alpha-terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. Anaerobe 18: 369-372.
45. Queiroga CL, Duarte MC, Ribeiro BB, de Magalhaes PM (2007) Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. Fitoterapia 78: 327-328.
46. Fernandez-Pan I, Royo M, Ignacio Mate J (2012) Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne pathogens. J Food Sci 77: M383-390.
47. Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, et al. (2007) Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytother Res 21: 989-994.
48. Wanner J, Schmidt E, Bail S, Jirovetz L, Buchbauer G, et al. (2010) Chemical composition, olfactory evaluation and antimicrobial activity of selected essential oils and absolutes from Morocco. Nat Prod Commun 5: 1349-1354.
49. Jordán MJ, Lax V, Rota MC, Lorán S, Sotomayor JA (2013) Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Food Control 30: 463-468.
50. Ivanova A, Mikhova B, Najdenski H, Tsvetkova I, Kostova I (2005) Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. Fitoterapia 76: 344-347.
51. Stashenko EE, Acosta R, Martinez JR (2000) High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (*Ruta graveolens* L.). J Biochem Biophys Methods 43: 379-390.
52. Meepagala KM, Schrader KK, Wedge DE, Duke SO (2005) Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. Phytochem 66: 2689-2695.
53. Angioni A, Barra A, Russo MT, Coroneo V, Dessi S, et al. (2003) Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. J Agric Food Chem 51: 3073-3078.

54. Cosentino S, Tuberoso CI, Pisano B, Satta M, Mascia V, et al. (1999) *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. Lett Appl Microbiol 29: 130-135.

55. Nazer AI, Kobilinsky A, Tholozan JL, Dubois-Brissonnet F (2005) Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. *Typhimurium*: a synergistic effect? . Food Microbiol 22: 391-398.

56. Ultee A, Bennik MH, Moezelaar R (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol 68: 1561-1568.

57. Braga PC, Sasso MD, Culici M, Alfieri M (2007) Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. Fitoterapia 78: 396-400.

Figure Legends

Figure 1. Transmission electron micrographs of *L. pneumophila* (strain Lens).

Control (A) and cells treated by *Thymus vulgaris* EO at 0.070 mg/mL (MIC) (B) *Legionella* cells treated with *T. vulgaris* EO (MIC) were significantly less homogeneous and electron-dense compared with untreated controls, suggesting a membrane disruption.

Tables

Table 1. Chemical composition of the six EOs from the Tunisian plants (%)

Component	**RT**	**KI**	***Artemisia herba-alba***	***Citrus sinensis***	***Juniperus phoenicea***	***Rosmarinus officinalis***	***Ruta graveolens***	***Thymus vulgaris***
Tricyclene	6.06	930	-	-	0.15	-	-	-
1S α-pinene	6.33	941	-	3.00	18.30	-	-	-
1R α-pinene	6.73	957	-	-	0.53	-	-	-
Camphene	6.78	958	-	-	0.67	-	-	-
β-pinene	7.52	985	-	-	0.25	-	-	-
β-myrcene	7.80	994	-	6.69	1.04	-	-	-
1.6-octadiene. 2.6-dimethyl (Z)	8.21	1009	-	2.86	-	-	-	-
α-phellandrene	8.35	1015	-	-	7.58	-	-	-
p-menth-1-ene	8.53	1022	-	0.38	-	-	-	-
β-phellandrene	8.82	1033	-	-	8.08	-	-	-
p-cymene	8.83	1033	2.03	-	-	3.31	0.32	7.86
p-menth-3-ene	8.92	1036	-	1.80	-	-	-	-
D-limonene	8.94	1037	-	1.66	3.52	-	-	-

1.8-cineol	9.06	1041	3.58	2.52	-	59.18	0.20	0.93
β-*trans*-ocimene	9.42	1054	-	1.58	-	-	-	-
γ-terpinene	9.77	1066	-	-	2.36	-	-	-
2-nonanone	10.70	1096	-	-	-	-	4.85	-
cis-linalooloxide	10.16	1079	-	24.90	-	-	-	0.26
trans-linalooloxide	10.62	1093	-	15.82	-	-	-	-
Terpinolene	10.73	1097	-	-	2.71	-	-	-
linalool	10.97	1105	1.37	16.50	-	-	-	-
α-thujone	11.22	1115	36.38	2.98	-	-	1.49	0.82
β-thujone	11.55	1127	22.24	-	-	-	0.65	-
Chrysantheno ne	11.66	1131	10.88	-	-	-	0.36	-
lilac alcohol A	11.79	1136	-	2.43	-	-	-	-
α-campholenal	11.80	1136	-	-	7.91	-	-	-
cis-limonene oxide	11.98	1142	-	-	0.73	-	-	-

camphor	12.42	1158	19.12	-	-	21.60	1.68	0.52
cis-chrysanthenol	12.85	1172	0.79	-	-	-	-	-
isoborneol	12.99	1177	-	-	20.91	-	-	-
nonanol	13.05	1178	-	6.04	-	-	-	-
borneol	13.13	1181	1.33	-	-	11.95	0.99	0.24
pinocamphone	13.25	1185	-	-	0.91	-	-	-
2-decanone	13.63	1197	-	-	-	-	1.39	-
α-terpineol	13.76	1201	-	3.48	-	-	-	-
trans-carveol	13.93	1208	-	-	-	2.70	-	-
fenchyl acetate	14.44	1227	-	-	3.03	-	-	-
linalyl acetate	14.64	1235	-	-	1.77	-	-	-
exo-2-hydroxycineol	14.65	1235	-	0.99	-	-	-	-
tridecanol	14.72	1237	-	-	-	-	4.19	-
linalyl butyrate	15.20	1255	-	5.66	-	-	-	-
cis-chrysanthenyl	15.44	1263	0.60	-	-	-	-	-

acetate								
isobornyl acetate	16.21	1289	0.39	-	0.19	1.23	0.33	-
Thymol	16.40	1296	-	-	-	-	-	0.42
2-undecanone	16.42	1296	-	-	-	-	60.63	-
Carvacrol	16.63	1304	-	-	-	-	-	88.50
Tridecane	16.83	1312	-	-	-	-	0.46	-
mirtenyl acetate	16.86	1313	-	-	3.11	-	-	-
α-longipinene	17.18	1326	1.25	-	-	-	-	-
δ-elemene	17.56	1340	-	-	1.48	-	-	-
α-cubebene	17.70	1345	-	-	1.21	-	-	-
trans-carvyl acetate	17.87	1352	-	-	1.63	-	-	-
α-terpinyl acetate	18.18	1363	-	-	3.53	-	-	-
2-dodecanone	18.31	1368	-	-	-	-	3.74	-
β-caryophyllene	19.72	1421	-	-	0.32	-	-	-

1-dodecanol	19.93	1430	-	-	-	-	7.90	-
humulen	20.61	1457	-	-	0.38	-	-	-
2-tridecanone	21.67	1497	-	-	-	-	2.43	-
D-germacrene	22.12	1516	-	-	0.39	-	-	-
γ-cadinene	22.31	1524	-	-	0.75	-	-	-
cedrol	24.47	1614	-	-	3.68	-	1.68	-
identified components	-	-	99.96	99.29	97.12	99.97	93.29	99.55
monoterpene hydrocarbons	-	-	2.03	17.97	45.19	3.31	0.32	7.86
oxygenated monoterpenes	-	-	96.68	75.28	43.72	96.66	5.70	91.69
sesquiterpenes hydrocarbons	-	-	1.25	-	4.53	-	-	-
oxygenated sesquiterpenes	-	-	-	-	3.68	-	1.68	-
other	-	-	-	6.04	-	-	85.59	-

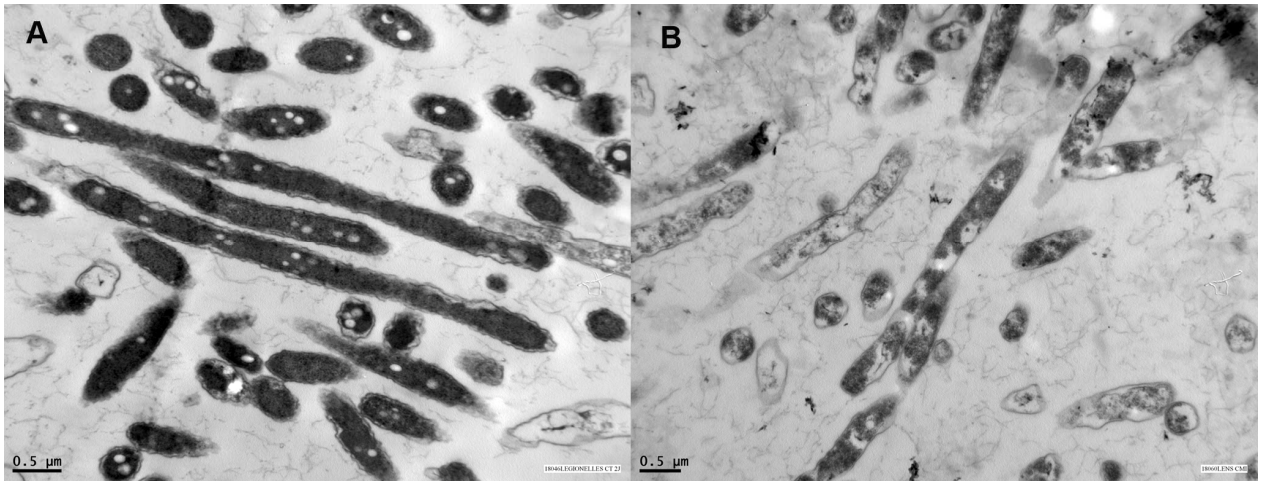
RT: Retention Time; KI: Kovats Index

- : not detected

Compounds occupying more than 0.2% are listed in order of their elution on the Varian VF-5MS column

Table 2. Minimal Inhibitory Concentrations (mg/mL) of Essential Oils against eight strains of *Legionella pneumophila*

Legionella pneumophila strains	Serogroup	Minimal Inhibitory Concentrations (mg/mL)					
		Artemisia herba-alba	*Citrus sinensis*	*Juniperus phoenicea*	*Rosmarinus officinalis*	*Ruta graveolens*	*Thymus vulgaris*
GC-3	5/8	>0.90	>0.90	<0.03	>1.10	0.05	<0.03
GC-4	5/8	>0.90	0.45	<0.03	0.28	<0.02	<0.03
GC-5	4	0.23	0.11	<0.03	0.07	<0.02	<0.03
GC-6	8	>0.90	0.90	<0.03	0.55	0.40	<0.03
GC-11	1	>0.90	>0.90	<0.03	0.55	<0.02	<0.03
GC-13	6	>0.90	0.90	<0.03	1.10	0.06	0.07
Lens	1	>0.90	>0.90	<0.03	>1.10	<0.02	0.07
Paris	1	0.23	0.23	<0.03	0.13	<0.02	<0.03



2. Résultats complémentaires : Microscopie électronique

L'HE de *Thymus vulgaris* a été évaluée à différentes concentrations (CMI/2, CMI et CMI x 5) contre les deux souches de référence : *L. pneumophila* Lens et Paris. Les observations en microscopie électronique à balayage (MEB) et à transmission (MET) sont illustrées dans **les figures 21 et 22.**

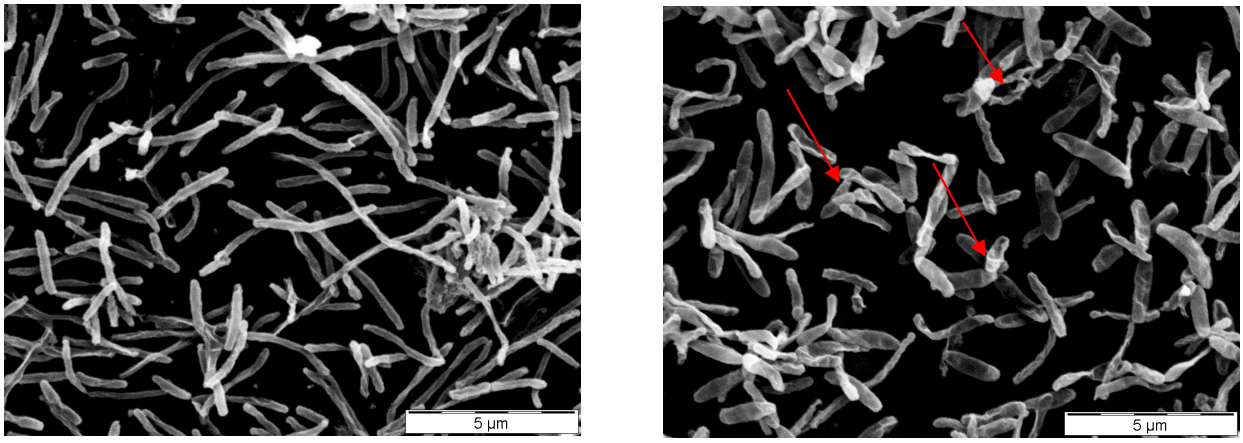


Figure 21 : Observation en MEB de la souche *L. pneumophila* Paris (A) : contrôle, (B) : traitée par l'HE de *Thymus vulgaris* à la CMI.

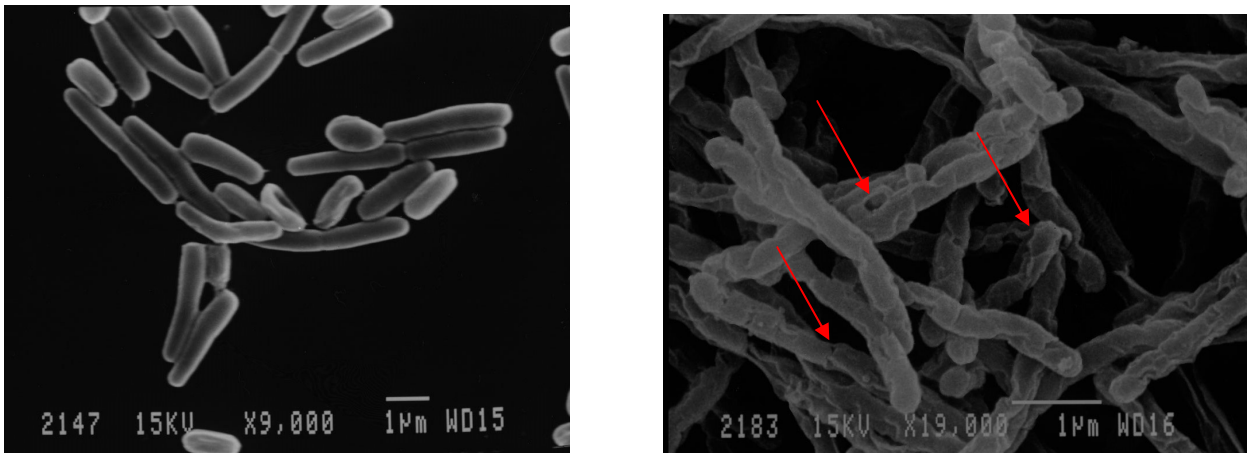


Figure 22 : Observation en MEB de la souche *L. pneumophila* Lens (A) : contrôle, (B) : traitée par l'HE de *Thymus vulgaris* à la CMI.

Ces observations montrent que les bactéries traitées perdent leur intégrité membranaire. Elles deviennent plus courtes, dégonflées, et plus transparentes par rapport aux témoins. Ceci suggère une activité létale ou bactéricide de l'HE de thym. Cette propriété bactéricide pourrait être liée à l'action des composant actifs des HE : Le thymol et le carvacrol, perméablisent la membrane ce qui entraine la mort de la bactérie.

Chapitre 3 : activité antimicrobienne des huiles essentielles

L'intérêt des applications des HE ne cesse d'augmenter. Elles sont utilisées aussi bien dans les produits cosmétiques, par exemple les parfums, que dans le domaine pharmaceutique, mais également dans le domaine alimentaire comme ingrédient de saveur ou encore comme agent de protection contre les microorganismes pathogènes. Elles sont donc évaluées pour leurs activités antimicrobiennes en général ; leur activité antifongique est également étudiée.

Le but de ce chapitre est donc d'étudier plus largement les propriétés antimicrobiennes des HE des plantes d'origine tunisienne ayant préalablement démontré une activité anti-*Legionella* et d'élargir cette étude à d'autres HE d'origine commerciale.

1. Principaux resultants de la publication 3 : Essential oils with a broad spectrum antifungal and antibacterial activity: 20 essential oils on test bench

Au cours de ce travail, nous avons essayé d'évaluer le spectre d'activité antimicrobienne de 20 HE ; 6 HE ont été extraites de plantes tunisiennes (*Artemisia herba-alba* Asso, *Citrus sinensis* (L.) *Osbeck, Juniperus phoenicea* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Ruta graveolens* L., *Thymus vulgaris*) et 14 d'HE commerciales. Ces HE ont été testées contre 11 espèces bactériennes (6 Gram positives et 5 Gram négatives) et 7 espèces fongiques (4 levures, 1 moisissure et 2 dermatophytes). Nos résultats montrent qu'au moins 2 HE extraites de plantes tunisiennes (*J. phoenicea* et *T. vulgaris*) étaient significativement actives contre *L. pneumophila* (CMI ≤ 0,03 mg/mL, CMI $_{\text{HE commerciales}}$ ≤ 0,23 mg/mL). L'HE de *T. vulgaris* tunisien est la plus active contre tous les microorganismes testés (Gram – : CMI ≤ 0,34 mg/mL ; Gram + : CMI ≤ 0,7 mg/mL ; levures : CMI ≤ 0,55 mg/mL ; moisissure : CMI = 0,3 mg/mL ; dermatophites : CMI ≤ 0,07 mg/mL). D'une manière générale, *Bacillus megaterium*, *L. pneumophila* et *Listeria monocytogenes* étaient les espèces bactériennes les plus sensibles. Parmi les HE commerciales testées, nous avons noté une action importante de quatre HE ; il s'agit de *T. vulgaris* (bactéries : CMI ≤ 5 mg/mL, champignons : CMI ≤ 0,5 mg/mL),

Origanum vulgare (bactéries : CMI ≤ 1,13 mg/mL, champignons : CMI ≤ 1,8 mg/mL), *Pinus laricio* (bactéries : CMI ≤ 2,25 mg/mL, champignons : CMI ≤ 3,6 mg/mL) et *Cymbopogon martinii var. motia* (bactéries : CMI ≤ 1 mg/mL, champignons : CMI ≤ 0,8 mg/mL). Nos résultats montrent que les HE de *T. vulgaris* tunisien et commercial n'ont pas les mêmes activités. En effet, l'HE de *T. vulgaris* tunisien est de loin le plus actif; ceci pourrait être expliqué par leurs compositions différentes, le carvacrol étant le composé majoritaire dans le cas de l'HE de *T. vulgaris* tunisien (85 %). Ces résultats démontrent l'intérêt antimicrobien de l'HE de *T. vulgaris* tunisien sur un très large panel de germes et suggère son intérêt possible dans le traitement des eaux ou la conservation des aliments.

Publication 3

Essential oils with a broad spectrum antifungal and antibacterial activity: 20 essential oils on test bench

En préparation

Essential oils with a broad spectrum antifungal and antibacterial activity: 20 essential oils on test bench

Nawel Chaftar [a,b], Marion Girardot [a], Jérôme Labanowski [b], Tawfik Ghrairi [c], Khaled Hani [c], Jacques Fère [a], Christine Imbert [a,]

[a] *Laboratoire Ecologie Biologie des Interactions, UMR CNRS 7267, équipe Microbiologie de l'Eau, 6 rue de la Milètrie, BP 199, 86034 Poitiers Cedex, France ;* [b] *Université de Poitiers, IC2MP, UMR CNRS 7285,* [c] *Tunisie*

Keywords: bacteria ; Gram + ; Gram - ; fungi ; essential oil ; antimicrobial ; antifungal

* Corresponding author. Tel.: +33 5 49 44 37 47; fax: +33 5 49 44 39 08.

E-mail address: christine.imbert@univ-poitiers.fr

Abstract

The antimicrobial activity of 20 essential oils was investigated against 11 bacterial species (6 Gram positive, 5 Gram negative) and 7 fungal species (2 dermatophytes, 1 mould, 4 yeasts) using microdution assays. Six essential oils (EO) were obtained from tunisian plants (EO_{tun}; *Artemisia herba-alba* Asso*, Citrus sinensis* (L.) Osbeck*, Juniperus phoenicea* L.*, Rosmarinus officinalis* L.*, Ruta graveolens* L.*, Thymus vulgaris* L.) whereas *o*thers were commercial products (EO_{com}). Overall, *T. vulgaris* EO_{tun} was the most efficient tunisian EO against both bacteria (Gram negative: MIC ≤ 0.34 mg/mL; Gram positive: MIC ≤ 0.7 mg/mL) and fungi (yeasts: MIC ≤ 0.55 mg/mL ; mould: MIC = 0.3 mg/mL; dermatophytes: MIC ≤ 0.07 µL/mL). *Bacillus megaterium*, *L. pneumophila* and *Listeria monocytogenes* were the most sensitive species to both EO_{com} and EO_{tun}. Four EO_{com} displayed both acceptable antibacterial and antifungal potency, although weaker than *T. vulgaris* EO_{tun} activity: *T. vulgaris* EO_{com} (bacteria: MIC ≤ 5 mg/mL, fungi: MIC ≤ 0,5 mg/mL), *Origanum vulgare* EO_{com} (bacteria: MIC ≤ 1.13 mg/mL, fungi: MIC ≤ 1.8 mg/mL), *Pinus lariccio* EO_{com} (bacteria: MIC ≤ 2.25 mg/mL, fungi: MIC ≤ 3.6 mg/mL) and *Cymbopogon martinii var. motia* EO_{com} (bacteria: MIC ≤ 1 mg/mL, fungi: MIC ≤ 0.8 mg/mL). This study demonstrated the antimicrobial activity of three commercial EOs and points out the exceptional efficiency of *T. vulgaris* EO_{tun} on all tested bacterial and fungal species, certainly associated with its high content in carvacrol (85%). *T. vulgaris* EO_{tun} could thus represent a promising candidate for applications in water and food protections.

Introduction

As part of investigations to obtain new antimicrobial compounds that escape the resistance mechanisms typically observed with currently available antimicrobial agents, a particular focus is on essential oils (EOs) all over the word. In recent years, it has been an increased interest for EOs produced from Tunisian plants which may represent promising drugs, including *Thymus vulgaris*, and *Rosmarinus officinalis* (Ahmed *et al.*, 2011; Besbes *et al.*, 2012; Bourgou *et al.*, 2012; Bouzenna & Krichen, 2012; Mighri *et al.*; Mohsen & Ali, 2009; Zouari *et al.*, 2012). The strong antimicrobial activity of some terpenic components of these EOs has also been widely described, especially carvacrol and thymol (Fadli *et al.*; Gomes Neto *et al.*, 2012; Mondello *et al.*, 2006; Tampieri *et al.*, 2005).

However the composition of EOs may vary depending on the geographic location, season, part of the plant, etc, determining different chemotypes (Baatour *et al.*, 2012; Bourgou *et al.*, 2012; Mighri *et al.*; Mohsen & Ali, 2009; Rouis *et al.*, 2012; Zouari *et al.*, 2012). So, the therapeutic interest of these EOs should be described related with their own composition to hypothesize which components are specifically responsible for the activity. EOs could be of interest to elaborate new drugs (Fadli *et al.*, 2012; Mugnaini *et al.*, 2013) and also find a new way to treat water. In addition, there is a current research on the feasibility of using EOs and their components in food preservation, such as vegetables, fruit juices (de Sousa *et al.*, 2012; Espina *et al.*, 2013; Irkin & Korukluoglu, 2009; Raybaudi-Massilia *et al.*, 2006) or meat (Fernandez-Pan *et al.*, 2012; Gomes Neto *et al.*, 2012; Hulankova *et al.*, 2013). They could be combined with conventional biocidal molecules. For food applications, the development of antimicrobial films would be a key technology: the volatile molecules

would be incorporated directly into the packaging material and released into the headspace surrounding the food. Apart from their potential toxicity according to the considered mode of use, the current limitations of the use of EOs and their components are mainly their intense aroma which may damage food organoleptic properties. The hydrophobicity drawback of these molecules may be overcome using a nanocapsular dispersion strategy, as recently suggested by Shah et al (Shah *et al.*, 2012). The aim of this study was to investigate whether 14 commercial EOs samples and 6 EOs obtained in our lab from tunisian plants displayed expanded antibacterial (against Gram positive and Gram negative bacteria) and antifungal (against both mould, dermatophytes and yeasts) potency, taking into account their specific chemical composition. Tunisian plants such as *Artemisia herba-alba* and *Ruta graveolens* were included in this study because their antimicrobial interest was poorly described. Tested microbial species were chosen because of their involvement in human bacterial or fungal infections, people being usually contaminated by food or water, especially through recreational waters.

Materials and methods

Essential oils

*A*erial parts of 6 plants (*A. herba-alba* Asso*, Citrus sinensis* (L.) Osbeck*, Juniperus phoenicea* L.*, R. officinalis* L.*, R. graveolens* L.*, T. vulgaris* L.) were collected from March to May 2010 and 2012. *A. herba alba* Asso*, C. sinensis* (L.) Osbeck*, R. graveolens* L. and *T. vulgaris* L. were collected from the region of Sahel (Sousse, Tunisia), *R. officinalis* L. from the Tunisian northeast (region of Zaghouan), *J. phoeniciea* L. from the Tunisian northwest (Aïn Drahem). A Voucher specimen of

each plant was deposited at the Herbarium of the school of Pharmacy of Poitiers (France).

After two weeks of drying in the shade, EOs were extracted by hydrodistillation for four hours using a modified Clevenger-type apparatus according to the procedure described in the European Pharmacopoeia (Council of Europe, 1997). The oils were collected, called EO_{tun} and stored at 4°C in tight vials until analysis.

14 commercial EOs (EO_{com}) purchased from HYTECK laboratories (Clermont-Ferrand, France) were also studied.

GC/MS analysis

GC-MS analysis were performed using an HP 6890 series chromatograph coupled to a HP 5973 mass selective detector. Owen temperature program: 50°C hold 1min, then 5°C/min until 180°C - hold 2 min, then 10°C/min until 250°C - hold 1 min. Injector was working in pulsed splitless (25 psi - 05 min) mode. Flow was at 1mL/min. Column Varian VF-5MS (30m, 0.25mm, 0.25µm) was used. Samples were diluted and injected automaticcaly. Components were identified by comparing both their retention times with those of reference samples and their linear retention indices related to the series of *n*-hydrocarbons (Kovats retention index), as well as by computer matching against commercial library mass spectra (NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Libray database version 2.0 d built DEC 2 2005) and literature data. Concentrations were obtained by semi-quantification by integrating the peak area of chromatograms.

Organisms and growth conditions

In total, 18 strains were studied, including five of Gram negative species (*Legionella pneumophila* GC-A11, *Klebsiella pneumoniae* 0502083, *Salmonella thyphimurium* (MDE collection)*, Escherichia coli* 27325 and *Pseudomonas aeruginosa* 910704), six of Gram positive bacteria species (*Bacillus megaterium* F04, *Staphylococcus epidermidis* 567, *S. xylosus* (MDE collection)*, S. hemolyticus* 694, *S. saprophyticus* 715 and *Listeria monocytogenes* EGDe) and seven of fungal species (four yeast species: *Candida albicans* ATCC 3153*, C. glabrata* IHEM 9556, *C. parapsilosis* ATCC 22019 and *Cryptococcus neoformans* IP2008/00709; one mould species: *Aspergillus fumigatus* ATCC 16424 and two dermatophyte species: *Tricophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* (both clinic, University hospital of Poitiers)).

Bacterial strains, except *L. pneumophila*, were grown in Brain Heart Infusion (BHI) (Bacto^{TM}) agar medium for 24 h at 37°C. *L. pneumophila* was grown on Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar medium supplemented with iron pyrophosphate (50 g/L) and L-cysteine (80 g/L) for 3 days at 37°C in 5% of CO_2. One colony was then suspended in buffered yeast extract (BYE) broth medium for *Legionella* or in BHI broth medium for other bacterial species. Optical density (OD) was adjusted to 10^6 CFU/mL (OD measured at 600 nm; 1 OD $\cong$ 10^9 CFU/mL), wathever species. Fungi were first grown on Sabouraud agar slants (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, France) for 48 to 96 h at 37° C. Broth cultures of each strain were then prepared transferring a loopful of this culture in RPMI /MOPS and the final concentration was adjusted to 0.5 Mac farland before dilution 1:1000 in RPMI /MOPS (*Candida* spp. and *C. neoformans*) or 10^5 CFU/mL after filtration for *Aspergillus* and *Trichophyton* spp.

Minimal inhibitory concentrations

Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) were performed by microdilution assay in 96 well-microplates. MIC was defined as the lowest EO concentration inhibiting visible microbial growth. Experiments were performed in triplicate and repeated twice.

For antibacterial activity, preliminary tests were performed in order to evaluate the minimal concentration of acetonitrile requiered to solubilise each EO which was not harmful for bacteria growth. The 18 EOs were first diluted in acetonitrile (50%). The EOs tested concentrations ranged from 4.5 mg/mL to 0.17 mg/mL except for *Legionella* (range: 0.9 mg/mL to 0.02 mg/mL)., microwells were inoculated with 100 µl of the bacterial suspension at 10^6 CFU/ml and 10 µl of each EO (serial concentrations), and incubated at 37° C for 24 h except for *Legionella* (3 days in 5% of CO_2). OD was then measured at 600 nm. For each tested strain, both growth conditions and sterility of the medium were checked in control wells.

The antifungal activity was evaluated according to the CLSI references M27-A3 and M38-A2 micromethods adapted protocols. EOs were first diluted 4:5 in DMSO. RPMI/MOPS was distributed in a 96-well microplate at 100 µl per well, except for the first column (200 µl/well); 4 µl of the tested oils were added in the first column and a serially dilution was performed. Then 100 µl of the preculture were added to each well. The EOs tested concentrations ranged from 8.8 mg/mL to 0.02 mg/mL. The plate was incubated for 24-48 hours (*Candida* spp.), 48-72h (*C. neoformans* and *A. fumigatus*) or 96h (*Trichophyton* spp.) at 27° C, except for *Candida* spp. (37° C).

Results and discussion

The chemical composition and antimicrobial activity spectrum of 20 EOs were investigated. *T. vulgaris* EO_{tun} was highly active against all tested fungal species (MIC ≤ 0.55 mg/mL). It was more promising than *T. vulgaris* EO_{com} which was poorly active against *Candida* and *Aspergillus* strains and displayed higher MICs against other fungal species. The main components (concentration ≥4%) of thyme oils were ρ-cymene (EO_{tun}: 7.86%/EO_{com}: 33.14%), γ-terpinene (none/4.22%), thymol (0.42%/33.63%) and carvacrol (88.5%/20.71%). These differences confirmed the influence of both geographical origin (Tunisia versus France) and harvesting time on the chemical composition of plants. Interestingly, *O. vulgare* EO_{com} had both an antifungal activity and a composition close to those of *T. vulgaris* EO_{com}: 21.2% ρ-cymene, 3.56% γ-terpinene, 4.65% thymol and 66.89% carvacrol. The composition of this *O. vulgare* oil was rather different from those reported by other authors: carvacrol: 3.9%; thymol: 53.2%; ρ-cymene: 10.3% (Bisht *et al.*, 2011). Thymol and carvacrol have a wide antimicrobial activity (Lambert *et al.*, 2001; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010; Xu *et al.*, 2008) and a limited occurrence in nature (Pinto *et al.*, 2006), therefore the great interest in essential oils containing these monoterpenes, particularly in some thyme oils. They would act by disrupting and altering the morphogenesis of bacterial and fungal membranes (Braga *et al.*, 2007; Lambert *et al.*, 2001; Trombetta *et al.*, 2005; Ultee *et al.*, 1999). Due to their hydrophobic nature, these terpenes interact with the lipid bilayer of cytoplasmic membranes causing loss of integrity and leakage of cellular material such as ions, ATP and nucleic acid; cytoplasmic membranes are both permeabilized and depolarized (Lambert *et al.*, 2001; Trombetta *et al.*, 2005; Ultee *et al.*, 1999; Xu *et al.*,

2008). The high carvacrol content in both *T. vulgaris* EO_{tun} (88.5%) and *O. vulgare* EO_{com} (66.89%) could explain the clearly superior activity of these oils compared to *T. vulgaris* EO_{com}. Oregano and thyme EOs also contained a significant proportion (in the range of 7.86% to 33.14%) of the monoterpene ρ-cymene which is a precursor of carvacrol naturally present in these oils. It has been reported that ρ-cymene itself would not have bactericidal effect on bacteria but would enhance the antimicrobial activity of carvacrol (Burt, 2004; Kisko & Roller, 2005; Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn, 2010; Ultee *et al.*, 2000). *T. vulgaris* EO_{tun} was also highly active against Gram positive (MIC ≤ 0.7 mg/mL) and Gram negative (MIC ≤ 0.34 mg/mL) bacteria suggesting a potential for both food, water and drug applications (Table 1). Among commercial products *O. vulgare* EO_{com} had the broadest spectrum of antibacterial activity with MIC ≤ 0.56 mg/mL for both all Gram negative and three Gram positive species (*S. hemolyticus*; *S. saprophyticus*; *L. monocytogenes*).

Trachyspermum ammi EO_{com} (Indian thyme) also contained ρ-cymene (40.75%) and thymol (49.29%). This EO was active against Gram negative bacteria (MIC ≤ 2.25 mg/mL) and Gram positive bacteria (MIC ≤ 1.13 mg/mL) except for *S. epidermidis* (MIC = 4.5 mg/mL). Fungi were also sensitive to this EO (MIC ≤ 1.8 mg/mL) except *C. parapsilosis* (MIC = 3.6 mg/mL). Both dermatophytes were the most sensitive fungal strains (MIC = 0.45 mg/mL).

Eugenol was the leading component of *Eugenia caryophyllus* EO_{com} (99.7%). All bacteria strains were sensitive to this EO (MIC ≤ 2.5 mg/mL) except those of *S. epidermidis* and *S. xylosus*; MICs obtained for dermatophytes were dramatically low (MIC ≤ 0.25 mg/mL) whereas other fungi displayed MICs ranging from 1 mg/mL to 4 mg/mL. The activity of *E. caryophyllus* EO_{com} could be related to eugenol which is a

phenylpropanoid component, as thymol and carvacrol. Eugenol was previously shown to be responsible for bacteria cell wall deterioration and cell lysis (Burt, 2004).

EOs_{com} of *C. citratus* and *C. martinii* var *motia* were significantly active on dermatophytes (MIC ≤ 0.2 mg/mL; Table 1); about 98% of their components were determined by GC/MS analysis and their leading components were geranial (citral A): 49.15% and neral (citral B): 33.16% for *C. citratus* oil and geraniol: 77.4% and nerol acetate: 13.07% for *C. martinii* var *motia* oil. Other main components were α-pinene, D-limonene, linalool, citronellol and trans-carveol. Their compositions were thus completely different from those of thyme and oregano oils. Citral is a monoterpene with known antifungal properties (Khan *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2009); it was reported that exposition of *T. mentagrophytes* hyphea to citral leaded to irreversible cellular disruption (Park *et al.*, 2009). We observed that *C. martinii* var *motia* EO_{com} was also slightly active against two Gram positive bacteria: *B. megaterium* and *L. monocytogenes* (CMI = 0.5 mg/mL). This confirmed results of Friedman *et al.* who reported that carvacrol, citral, geraniol and thymol were active against *L. monocytogenes* (Friedman *et al.,* 2002*)*. Lima et al (2012) showed that citral inhibited *C. albicans* growth and suggested that the mechanism of action may not involve cell wall or ergosterol ; they also observed that citral was able to interact with cholesterol increasing by this way its anti-*Candida* activity. *O. vulgare* L. EO and citral are classified as Generally Recognised As Safe (GRAS) by the Food Drug Administration (FDA) and as food additives by the European Union.

In addition to its antifungal potential, *P. lariccio* oil was relatively active against Gram positive and Gram negative bacteria, with MICs ranging between 0.23 mg/mL and 2.25 mg/mL. 99.41% of the components of *P. lariccio* oil were determined ; the

leading one was S α-pinene (68.79%) whereas its isomer, R α-pinene, was weakly present (2.19%), as typically observed in pine oils from Europe. α-pinene was found in other EOs, such as *Melaleuca alternifolia* EO (Tea tree**)** and would be active in inhibiting the growth of *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* (Raman *et al.,* 1995). In our study**,** *M. alternifolia* EO_{com} (Australian origin) contained 7.77% of 1S α-pinene. Major components of *M. alternifolia* EO_{com} were γ-terpinene (25.56%), ρ-cymene (24.22%), β-cadinene (17.76%) and α-terpineol (12.04%); this oil was obtained from australian plants. It contained only 2.22% of terpinen-4-ol; so this composition differed from those of other *M. alternifolia* EO of which the main component was terpinen-4-ol. Compared to other tested oils, *M. alternifolia* EO_{com} appeared poorly active against both bacteria (Gram negative: MIC≥ 0.9 mg/mL; Gram positive: MIC≥ 2.25 mg/mL; Table 1) and yeasts and mould fungi (MIC≥ 1.8 mg/mL); these MICs were in accordance with those described by Hammer *et al.* for *M. alternifolia* EO also obtained from Australian plants: MICs typically between 0.125% and 2% (Hammer *et al.*, 2012). However, the anti-*Candida* activity of *M. alternifolia* EO (MIC = 1.8 mg/mL) was significantly lower to those obtained by Nenoff et al (≤ 4.4 µg/mL) (Nenoff *et al.*, 1996). This oil has been shown to reduce *Candida* cell surface hydrophobicity (Sudjana *et al.*, 2012). Here again, the composition was certainly determining; the γ-terpinene content was believed to more correlate with the inhibition of filamentation than to the antimicrobial activity (Vale-Silva *et al.*, 2012), and as previously said, ρ-cymene would not have itself an antimicrobial activity. These two compounds representing about 50% of the composition, it was not surprising to observe a limited anti-*Candida* activity. Dermatophytes were more susceptible (MIC≥ 0.45 mg/mL; Table 1) than yeasts confirming the potential interest of *M. alternifolia* oil to treat tineas or ringworm

(Pisseri *et al.*, 2009). It is of interest that Thomsen *et al.* found that habituation to *M. alternifolia* EO did not affect subsequent staphylococci susceptibility to antimicrobial agents such as chloramphenicol, linezolid and vancomycin (Thomsen *et al.*, 2013).

Two EO_{com} and one EO_{tun} of *R. officinalis* were studied and showed limited anti-microbial activity (Table 1); *R. officinalis* EO_{com} was only active against *L. monocytogenes* (MIC = 2.25 mg/mL) and *T. rubrum* (MIC = 1.8 mg/mL) and was mainly composed of 1,8-cineole (55.74%), camphor (14.53%) and 1S α-pinene (12.06%). *R. officinalis* L, *camphoriferum* EO_{com} was only active against *Trichophyton* spp. (MIC $\leq$ 0.9 mg/mL) and contained balanced amounts of 1,8-cineole (26.87%), camphor (26.07%), and to a lesser extent 1S α pinene (18.82%). Finally, *L. pneumophila* (MIC = 0.55 mg/mL) and *L. monocytogenes* (MIC = 0.7 mg/mL) were the most sensitive bacteria to *R. officinalis* EO_{tun} (Table 1). This oil was mainly composed of 1,8-cineole (59.18%), camphor (21.60%) and borneol (11.95%).

Cinnamomum tamala EO_{com} was mainly composed of 1,8-cineole (13.28%), linalool (29.64%) and *cis*-linalooloxide (11.72%). MICs values ranged from 1.13 mg/mL to 4.5 mg/mL for bacteria and 0.45 mg/mL to 7.2 mg/mL for fungi. Linalool could be mainly responsible for its activity as its antimicrobial effect was previously demonstrated (Pattnaik *et al.*, 1997).

Two *Citrus sinensis* EOs were investigated. *C. sinensis* EO_{tun} contained also linalool (16.5%), and *cis*-linalooloxide (24.9%) and *trans*-linalooloxide (15.82%). It was quite active against bacteria (MIC $\leq$ 2.25 mg/mL) except *S. hemolyticus* (MIC = 4.5 mg/mL). our results showed that *C. sinensis* EO_{tun} displayed a higher antibacterial activity compared to *C. sinensis* EO_{com}. The latter was efficient against fungi (MICs between 1.6 mg/mL and 6.4 mg/mL), dermatophytes being the most susceptible

species (MIC ≤ 0.1 mg/mL). *C. sinensis* EO_{com} was mainly composed of D-limonene (83.62%). This monoterpene, tested against different food contaminating moulds, was shown to have aflatoxin inhibitory efficacy (Singh *et al.*, 2010).

L. monocytogenes was the most sensitive Gram positive bacterial strain to *Mentha piperita Franco-Mitcham* EO_{com} (MIC = 1.13 mg/mL). *B. megaterium, S. xylosus and S. hemolyticus* were also sensitive (MIC ≤ 4.5 mg/mL). Gram negative and fungal strains were sensitive to this EO too (MIC ≤ 4.5 mg/mL), dermatophytes and mould being the most sensitive fungi (MIC ≤ 0.9 mg/mL). GC-MS analysis showed that *M. piperita Franco-Mitcham* EO_{com} mainly contained menthol (51.43%) and D-*cis*-menthone (23.44%). Menthol has been reported to have significant antimicrobial activity (Pattnaik *et al.*, 1997).

EO_{tun} from *R. graveolens* contained a high amount of 2-undecanone (60.63%) and was weakly active against all tested strains (bacteria: MIC ≤ 4 mg/mL ; fungi: MIC ≥ 6.4 mg/mL). Up to now, *R. graveolens* EO was poorly studied even if *Ruta* species are a source of active natural products (some coumarins and alkaloids) (Meepagala *et al.*, 2005; Stashenko *et al.*, 2000).

Overall, the most active EOs_{com} against both yeasts, moulds and dermatophytes were those obtained from *T. vulgaris*, *P. lariccio*, *C. martinii* var *motia* (palmarosa) and, at a lower level, *C citratus* (lemongrass). While *P. lariccio* EO was mainly composed of monoterpene hydrocarbons (82.12%), these components represented a small or intermediate part of *C. martinii* var *motia*: 2.35%, *C. citratus*: 3.21% and *T. vulgaris* EOs_{com}: 39.43%. Their composition was thus specific and it was impossible to identify one or more shared components that could explain the presence of such an antifungal activity.

Regarding bacteria, *L. monocytogenes* was the most susceptible of the tested Gram positive bacteria, with MIC ≤ 0.56 mg/mL for four EOs_{com} (*O. vulgare*; *P. laricci*; *C. citratus*; *C. martinii* var *motia*) and 3 EOs_{tun} (*T. vulgaris*; *R. officinalis*; *J. phoeniciea*) (Table 1). *L. pneumophila* strain was the most susceptible Gram negative strain (MIC ≤ 0.4 mg/mL for eight of the 20 tested EOs), *T. vulgaris* and *J. phoeniciea* EOs_{tun} being the most active oils (MIC ≤ 0.03 mg/mL) (Table 1) ; *J. phoeniciea* EOs_{tun} was mainly composed of isoborneol (20.91%) and 1S α-pinene (18.30%).

Conclusion

Results confirmed the potential interest of EOs as antimicrobial agents. Among the tested EOs, *T. vulgaris* EO_{tun} showed the widest spectrum of activity. This EO was mainly composed of carvarcol which is a phenolic compound well known for its antimicrobial properties. In addition, the significant anti-*Legionella* activity of most of the tested EOs constitutes a promising way to fight against the *Legionella* risk, particularly in the case of recreational water. Dermatophytes were the most susceptible fungi to both commercial and tunisian EOs. The tested EOs were generally efficient against food pathogens. Accordingly, and since numerous EOs and EO components have been already recognized as GRAS ; so, our observations encourage investigation of strategies based on use of EOs as food preservatives,especially as previous studies have reported the effectiveness of EOs in foods: eugenol and some EOs (coriander, cloves, oregano and thyme) were shown to be effective in the preservation of meat and meat products, oregano EO in fish, mint EO in dairy products, cinnamaldehyde, thymol and oregano EO in vegetables, and carvacrol in rice and fruits (Burt, 2004). Furthermore, complementary

researches are required in pursuit of these results for the direct use of EOs in foods, but also in water treatment strategies..

Acknowledgments

This Work was partially supported by grants from the CMCU (09G824), PHC Utique and the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Tunisia.

References

Ahmed, S. B., Sghaier, R. M., Guesmi, F., Kaabi, B., Mejri, M., Attia, H., Laouini, D. & Smaali, I. (2011). Evaluation of antileishmanial, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from the leishmaniasis-endemic region of Sned (Tunisia). *Nat Prod Res* **25**, 1195-1201.

Baatour, O., Tarchoune, I., Mahmoudi, H. & other authors (2012). Culture conditions and salt effects on essential oil composition of sweet marjoram (Origanum majorana) from Tunisia. *Acta Pharm* **62**, 251-261.

Bellete, B., Raberin, H., Flori, P., El Akssi, S., Tran Manh Sung, R., Taourirte, M. & Hafid, J. (2012). Antifungal effect of the essential oil of Thymus broussonetii Boiss endogenous species of Morocco. *Nat Prod Res* **26**, 1692-1696.

Besbes, M., Omri, A., Cheraif, I., Daami, M., Jannet, H. B., Mastouri, M., Aouni, M. & Selmi, B. (2012). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Scabiosa arenaria Forssk: growing wild in Tunisia. *Chem Biodivers* **9**, 829-839.

Bisht, D., Pal, A., Chanotiya, C. S., Mishra, D. & Pandey, K. N. (2011). Terpenoid composition and antifungal activity of three commercially important essential oils against Aspergillus flavus and Aspergillus niger. *Nat Prod Res* **25**, 1993-1998.

Bourgou, S., Rahali, F. Z., Ourghemmi, I. & Saidani Tounsi, M. (2012). Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. *ScientificWorldJournal* **2012**, 528593.

Bouzenna, H. & Krichen, L. (2012). Pelargonium graveolens L'Her. and Artemisia arborescens L. essential oils: chemical composition, antifungal activity against Rhizoctonia solani and insecticidal activity against Rhysopertha dominica. *Nat Prod Res* **27**, 841-846.

Braga, P. C., Sasso, M. D., Culici, M. & Alfieri, M. (2007). Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of Candida albicans. *Fitoterapia* **78**, 396-400.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol* **94**, 223-253.

Cabral, C., Francisco, V., Cavaleiro, C., Goncalves, M. J., Cruz, M. T., Sales, F., Batista, M. T. & Salgueiro, L. (2012). Essential oil of Juniperus communis subsp. alpina (Suter) Celak needles: chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity. *Phytother Res* **26**, 1352-1357.

de Sousa, J. P., de Azeredo, G. A., de Araujo Torres, R., da Silva Vasconcelos, M. A., da Conceicao, M. L. & de Souza, E. L. (2012). Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. *Int J Food Microbiol* **154**, 145-151.

Espina, L., Garcia-Gonzalo, D., Laglaoui, A., Mackey, B. M. & Pagan, R. (2013). Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. *Int J Food Microbiol* **161**, 23-30.

Fadli, M., Chevalier, J., Bolla, J. M., Mezrioui, N. E., Hassani, L. & Pages, J. M. Thymus maroccanus essential oil, a membranotropic compound active on Gram-negative bacteria and resistant isolates. *J Appl Microbiol* **113**, 1120-1129.

Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pages, J. M. & Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of Thymus maroccanus and Thymus broussonetii essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* **19**, 464-471.

Fernandez-Pan, I., Royo, M. & Ignacio Mate, J. (2012). Antimicrobial activity of whey protein isolate edible films with essential oils against food spoilers and foodborne pathogens. *J Food Sci* **77**, M383-390.

Friedman, M., Henika, P. R. & Mandrell, R. E. (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, and Salmonella enterica. *J Food Prot* **65**, 1545-1560.

Gomes Neto, N. J., Luz, I. S., Honorio, W. G., Tavares, A. G. & de Souza, E. L. (2012). Rosmarinus officinalis L. essential oil and the related compound 1,8-cineole do not induce direct or cross-protection in Listeria monocytogenes ATCC 7644 cultivated in meat broth. *Can J Microbiol* **58**, 973-981.

Hammer, K. A., Carson, C. F. & Riley, T. V. (2002). In vitro activity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* **50**, 195-199.

Hammer, K. A., Carson, C. F. & Riley, T. V. (2012). 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* **56**, 909-915.

Hulankova, R., Borilova, G. & Steinhauserova, I. (2013). Combined antimicrobial effect of oregano essential oil and caprylic acid in minced beef. *Meat Sci* **95**, 190-194.

Irkin, R. & Korukluoglu, M. (2009). Growth inhibition of pathogenic bacteria and some yeasts by selected essential oils and survival of L. monocytogenes and C. albicans in apple-carrot juice. *Foodborne Pathog Dis* **6**, 387-394.

Khan, M. S., Malik, A. & Ahmad, I. (2012). Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of Candida albicans. *Med Mycol* **50**, 33-42.

Kisko, G. & Roller, S. (2005). Carvacrol and p-cymene inactivate Escherichia coli O157:H7 in apple juice. *BMC Microbiol* **5**, 36.

Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J. & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol* **91**, 453-462.

Lima, I. O., de Medeiros Nobrega, F., de Oliveira, W. A., de Oliveira Lima, E., Albuquerque Menezes, E., Cunha, F. A. & Formiga Melo Diniz Mde, F. (2012). Anti-Candida albicans effectiveness of citral and investigation of mode of action. *Pharm Biol* **50**, 1536-1541.

Meepagala, K. M., Schrader, K. K., Wedge, D. E. & Duke, S. O. (2005). Algicidal and antifungal compounds from the roots of Ruta graveolens and synthesis of their analogs. *Phytochemistry* **66**, 2689-2695.

Mighri, H., Akrout, A., El-jeni, H., Zaidi, S., Tomi, F., Casanova, J. & Neffati, M. Composition and intraspecific chemical variability of the essential oil from Artemisia herba-alba growing wild in a Tunisian arid zone. *Chem Biodivers* **7**, 2709-2717.

Mohsen, H. & Ali, F. (2009). Essential oil composition of Artemisia herba-alba from southern Tunisia. *Molecules* **14**, 1585-1594.

Mondello, F., De Bernardis, F., Girolamo, A., Cassone, A. & Salvatore, G. (2006). In vivo activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of Melaleuca alternifolia Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic Candida species. *BMC Infect Dis* **6**, 158.

Mugnaini, L., Nardoni, S., Pistelli, L., Leonardi, M., Giuliotti, L., Benvenuti, M. N., Pisseri, F. & Mancianti, F. (2013). A herbal antifungal formulation of Thymus serpillum, Origanum vulgare and Rosmarinus officinalis for treating ovine dermatophytosis due to Trichophyton mentagrophytes. *Mycoses* **56**, 333-337.

Nenoff, P., Haustein, U. F. & Brandt, W. (1996). Antifungal activity of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil) against pathogenic fungi in vitro. *Skin Pharmacol* **9**, 388-394.

Park, M. J., Gwak, K. S., Yang, I., Kim, K. W., Jeung, E. B., Chang, J. W. & Choi, I. G. (2009). Effect of citral, eugenol, nerolidol and alpha-terpineol on the ultrastructural changes of Trichophyton mentagrophytes. *Fitoterapia* **80**, 290-296.

Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M. & Kole, C. R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* **89**, 39-46.

Pepeljnjak, S., Kosalec, I., Kalodera, Z. & Blazevic, N. (2005). Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (Juniperus communis L., Cupressaceae). *Acta Pharm* **55**, 417-422.

Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Goncalves, M. J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A. & Martinez-de-Oliveira, J. (2006). Antifungal activity of the essential oil of Thymus pulegioides on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. *J Med Microbiol* **55**, 1367-1373.

Pisseri, F., Bertoli, A., Nardoni, S., Pinto, L., Pistelli, L., Guidi, G. & Mancianti, F. (2009). Antifungal activity of tea tree oil from Melaleuca alternifolia against Trichophyton equinum: an in vivo assay. *Phytomedicine* **16**, 1056-1058.

Raman, A., Weir, U. & Bloomfield, S. F. (1995). Antimicrobial effects of tea-tree oil and its major components on Staphylococcus aureus, Staph. epidermidis and Propionibacterium acnes. *Lett Appl Microbiol* **21**, 242-245.

Rattanachaikunsopon, P. & Phumkhachorn, P. (2010). Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against Vibrio cholerae in food. *J Biosci Bioeng* **110**, 614-619.

Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J. & Martin-Belloso, O. (2006). Antimicrobial activity of essential oils on Salmonella enteritidis, Escherichia coli, and Listeria innocua in fruit juices. *J Food Prot* **69**, 1579-1586.

Rouis, Z., Elaissi, A., Abid, N. B., Lassoued, M. A., Cioni, P. L., Flamini, G. & Aouni, M. (2012). Chemical composition and intraspecific variability of the essential oils of five populations of Hypericum triquetrifolium Turra growing in North Tunisia. *Chem Biodivers* **9**, 806-816.

Shah, B., Davidson, P. M. & Zhong, Q. (2012). Nanocapsular dispersion of thymol for enhanced dispersibility and increased antimicrobial effectiveness against Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in model food systems. *Appl Environ Microbiol* **78**, 8448-8453.

Singh, P., Shukla, R., Prakash, B., Kumar, A., Singh, S., Mishra, P. K. & Dubey, N. K. (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of Citrus maxima Burm. and Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food Chem Toxicol* **48**, 1734-1740.

Stashenko, E. E., Acosta, R. & Martinez, J. R. (2000). High-resolution gas-chromatographic analysis of the secondary metabolites obtained by subcritical-fluid extraction from Colombian rue (Ruta graveolens L.). *J Biochem Biophys Methods* **43**, 379-390.

Sudjana, A. N., Carson, C. F., Carson, K. C., Riley, T. V. & Hammer, K. A. (2012). 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* **50**, 863-870.

Tampieri, M. P., Galuppi, R., Macchioni, F., Carelle, M. S., Falcioni, L., Cioni, P. L. & Morelli, I. (2005). The inhibition of Candida albicans by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia* **159**, 339-345.

Thomsen, N. A., Hammer, K. A., Riley, T. V., Van Belkum, A. & Carson, C. F. (2013). 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* **41**, 343-351.

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G. & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 2474-2478.

Ultee, A., Kets, E. P. & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4606-4610.

Ultee, A., Slump, R. A., Steging, G. & Smid, E. J. (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward Bacillus cereus on rice. *J Food Prot* **63**, 620-624.

Vale-Silva, L., Silva, M. J., Oliveira, D., Goncalves, M. J., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. & Pinto, E. (2012). Correlation of the chemical composition of essential oils from Origanum vulgare subsp. virens with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *J Med Microbiol* **61**, 252-260.

Xu, J., Zhou, F., Ji, B. P., Pei, R. S. & Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against Escherichia coli. *Lett Appl Microbiol* **47**, 174-179.

Zouari, N., Ayadi, I., Fakhfakh, N., Rebai, A. & Zouari, S. (2012). Variation of chemical composition of essential oils in wild populations of Thymus algeriensis Boiss. et Reut., a North African endemic species. *Lipids Health Dis* **11**, 28.

EOs	Distilled part	Minimal inhibitory activity (mg/mL) depending on tested microorganisms																
		GRAM NEGATIVE BACTERIA					GRAM POSITIVE BACTERIA						FUNGI					
		K. pneumoniae, strain 0502083	*S. thyphimurium*, (MDE collection)	*E. coli*, strain 27325	*P. aeruginosa*, strain 910704	*L Pneumophila*, strain GC-A11	*B. megaterium*, strain F04	*S. epidermidis*, strain 567	*S. xylosus*, (MDE collection)	*S. hemolyticus*, strain 694	*S. saprophyticus*, strain 715	*L.monocytognes*, strain EGDe	*C. albicans*, strain ATCC 3153	*C. glabrata*, strain IHEM 9556	*C. parapsilosis*, ATCC 22019	*C. neoformans*, strain IP2008/00709	*A. fumigatus*, strain ATCC 16424	*T. mentagrophytes*, clinical strain	*T. rubrum*, clinical strain
Trachyspermum ammi	seeds	2.25	2.25	2.25	2.25	0.11	0.56	4.50	1.13	1.13	1.13	1.13	1.80	1.80	3.60	1.80	1.80	0.45	0.45
Thymus vulgaris	aerial parts	2.50	2.50	1.25	2.5	0.12	0.31	5.00	1.25	5.00	5.00	1.25	1.00	2.00	1.00	0.50	1.00	0.13	0.25
Rosmarinus officinalis L. camphoriferum	aerial parts	>4.50	4.50	4.50	4.5	>0.90	>4.50	>4.50	>4.50	4.50	4.50	4.50	7.20	3.60	7.20	3.60	>7.20	0.90	0.45
Eucalyptus globulus	leaves	>4.50	>4.50	>4.50	>4.5	>0.90	>4.50	>4.50	>4.50	>4.50	>4.50	>4.50	7.2 0	7.20	7.20	7.20	>7.20	0.45	0.90
origanum vulgare	aerial parts	0.3	0.3	0.3	0.3	0.11	1.13	1.13	1.13	0.56	0.56	0.3	0.90	0.90	1.80	0.90	0.90	0.11	0.06
Citrus sinensis	Zest	>4.00	>4.00	>4.00	>4	>0.80	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	6.40	3.20	3.20	1.60	1.60	0.10	0.05
Eugenia caryophyllus	leaves	2.50	2.50	1.25	2.5	0.25	1.25	>5.00	>5.00	2.50	2.50	1.25	4.00	1.00	2.00	1.00	2.00	0.13	0.25
Cinnamomum tamala	leaves	>4.50	2.25	>4.50	>4.5	>0.90	2.25	4.50	4.50	4.50	>4.50	1.13	3.6 0	3.60	7.20	1.80	7.20	0.45	0.45

Melaleuca alternifolia	leaves	2.25	2.25	2.25	2.25	0.90	2.25	4.50	4.50	4.50	4.50	2.25	3.60	3.60	3.60	1.80	1.80	0.45	0.45
Pinus lariccio	Needles	1.13	2.25	1.13	1.13	0.23	0.56	1.13	0.56	1.13	1.13	0.56	3.60	0.45	1.80	0.23	1.80	0.23	0.23
Cymbopogon citratus	aerial parts	>4.00	>4.00	>4.00	>4.00	0.40	1.00	2.00	2.00	2.00	2.00	0.50	0.80	0.80	1.60	0.40	0.80	0.05	0.01
Rosmarinus officinalis	aerial parts	>4.50	4.50	4.50	4.50	>0.90	>4.50	>4.50	>4.50	>4.50	4.50	2.25	7.20	7.20	7.20	7.20	>7.20	3.60	1.80
Cymbopogon Martinii var. Motia	aerial parts	1.00	1.00	1.00	1.00	0.80	0.50	1.00	1.00	1.00	1.00	0.50	0.40	0.80	0.80	0.40	0.80	0.20	0.20
Mentha piperita Franco-Mitcham	aerial parts	4.50	2.25	2.25	2.25	>0.90	2.25	>4.50	2.25	4.5	>4.5	1.13	1.8	3.6	3.6	1.8	0.9	0.11	0.03
Thymus vulgaris	aerial parts	0.34	0.34	0.34	0.34	<0.03	<0.17	0.7	0.34	0.7	0.7	0.34	0.3	0.55	0.55	0.02	0.3	0.07	0.02
Rosmarinus officinalis	aerial parts	5.50	5.50	2.75	2.75	0.55	2.75	5.50	5.50	5.50	>5.50	0. 7	8.80	8.80	8.80	8.80	>8.80	8.80	8.80
Artemisia herba alba	aerial parts	>4.50	>4.50	2.25	2.25	>0.90	>4.50	>4.50	>4.50	>4.50	>4.50	2.25	7.20	7.20	7.20	3.60	7.20	7.20	1.80
Juniperus phoeniciea	aerial parts	>4.50	>4.50	4.50	4.50	<0.03	0.56	>4.50	2.25	>4.50	>4.50	0.3	3.60	>3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60
Ruta graveolens	aerial parts	>4.00	>4.00	4.00	>4.00	<0.02	0.50	4.00	2.00	>4.00	4.00	>4.00	6.40	>6.40	>6.40	6.40	6.40	6.40	6.40
Citrus sinensis	leaves	2.25	2.25	1.13	2.25	>0.90	0.3	2.25	1.13	4.50	2.25	2.25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

2. Résultats complémentaires

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe et soumise à de très nombreuses variables. La composition chimique des 14 HE d'origine commerciale inclues dans notre étude (Laboratoires HYTECK, Aroma-Zone, Clermont Ferrand, France) a été établie par chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse ; les composés identifiés sont listés suivant leur temps de rétention (TR) et indices de Kovats (IK) **(Tableau 8).**

Tableau 8 : La composition chimique des 14 HE commerciale analysée par GC-MS

Composé	**TR**	**IK**	***Cinnamomum tamala*** (cannelle)	*Citrus sinensis* (orange sanguine)	*Cymbopogon citratus* (lemongrass)	*Cymbopogon Martinii var, Motia* (palmarosa)	*Eucalyptus globulus* (eucalyptus)	*Eugenia caryophyllus* (girofle)	*Melaleuca alternifolia* (arbre à thé)	*Mentha piperita Franco-Mitcham* (menthe poivrée)	*origanum vulgaris* (origan)	*Pinus laricio* (pin)	*Rosmarinus officinalis* (romarin à cineole)	*Rosmarinus officinalis L, camphoriferum* (romarin à camphre)	*Thymus vulgaris* (thym)	*Trachyspermum ammi (ajowan)*
1S α -pinène	6,33	941	6,55	0,56	0,32	0,26	1,72	-	7,77	0,66	1,23	68,79	12,06	18,82	0,77	-
1R α -pinène	6,73	957	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	2,19	-	0,64	-	-
Camphène	6,78	958	1,35	-	1,95	-	-	-	0,24	-	0,42	1,53	4,37	8,72	0,47	-
β-thujène	6,88	962	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,36	-	-	-	-
β-pinène	7,52	985	0,11	-	-	-	-	-	-	0,12	-	1,62	0,75	0,58	-	-
β-myrcène	7,8	994	0,2	0,9	-	0,68	-	-	-	-	0,25	0,33	0,32	1,62	0,83	-
1,3,8-p- menthatriène	8,82	1033	-	-	0,39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
para-cymène	8,83	1033	4,59	0,42	-	-	5,61	-	24,22	1,4	21,2	1,47	2,83	3,51	33,14	40,75
D-limonène	8,94	1037	1,85	83,62	0,55	-	3,01	-	0,73	1,17	-	3,57	-	1,57	-	-
1,8-cinéol	9,06	1041	13,28	-	-	-	88,91	-	0,97	6,3	-	-	55,74	26,87	2,4	-
β-cis-ocimène	9,12	1044	-	-	-	0,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-trans-ocimène	9,42	1054	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
γ-terpinène	9,77	1066	0,24	-	-	-	0,73	-	25,56	0,21	3,56	-	0,25	0,2	4,22	-
cis-linalooloxide	10,16	1079	11,72	-	-	1	-	-	-	-	0,54	-	-	-	0,5	-
trans-linalooloxide	10,62	1093	8,33	-	-	0,37	-	-	-	-	0,2	-	-	-	0,33	-
Terpinolène	10,73	1097	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalool	10,97	1105	29,64	-	-	2,52	-	-	-	-	0,31	-	-	-	1	-
α –thujone	11,22	1115	-	-	-	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-campholenal	11,8	1136	0,39	-	-	-	-	-	-	-	-	3,45	0,74	1,07	-	-
cis-limonène oxide	11,98	1142	-	0,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
trans-limonène oxide	12,1	1147	-	0,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-verbénol	12,22	1151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,49	-	-	-
L-trans-Pinocarvéol	12,23	1151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,89	-	1,05	-	-
Camphre	12,42	1158	7,85	-	-	-	-	-	-	-	0,46	-	14,53	26,07	0,44	-

D-cis-menthone	12,65	1165	-	-	-	-	-	-	-	23,44	-	-	-	-	-	-
δ 3 carène	12,83	1171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,26	-	-	-	-
D-trans-menthone	12,91	1174	-	-	-	-	-	-	-	8,78	-	-	-	-	-	-
Isobornéol	12,99	1177	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,46	0,59	0,59	-	0,39
Epoxy linalool	13,02	1178	7,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bornéol	13,13	1181	-	-	0,34	-	-	-	-	-	0,26	-	4,83	3,57	1,06	-
Menthol	13,29	1186	-	-	-	-	-	-	-	51,43	-	-	-	-	-	-
terpinen-4-ol	13,35	1188	-	-	-	-	-	-	2,22	-	-	-	-	-	-	-
Isomenthol	13,57	1195	-	-	-	-	-	-	-	0,75	-	-	-	-	-	-
Cryptone	13,64	1197	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,43	-	-	-	-
Citronellol	13,73	1200	-	-	3,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-terpinéol	13,76	1201	0,77	-	-	-	-	-	12,04	-	-	-	0,34	0,78	-	-
Myrtenal	13,81	1203	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-
trans carvéol	13,93	1208	-	-	2,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Verbénone	14,18	1217	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,11	-	1,17	-	-
Cis-carvéol	14,43	1227	-	-	0,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
fenchyl acetate	14,44	1227	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Thymol methyl ether	14,67	1236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,11	-	-	-	0,99
Acétate de bornyl	14,69	1236	-	-	-	-	-	-	0,61	-	-	-	-	-	-	-
Néral	14,95	1246	-	-	33,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
linalyl butyrate	15,2	1255	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,66	-	-	-	-
Géraniol	15,3	1258	-	-	-	77,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis chrysanthenyl acétate	15,44	1263	-	-	-	-	-	-	2,33	-	-	-	-	-	-	-
Piperitone	15,5	1265	-	-	-	-	-	-	-	0,22	-	-	-	-	-	-
Géranial	15,78	1275	-	-	49,15	0,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate d'isobornyl	16,21	1289	2,13	-	-	-	-	-	-	-	-	1,15	1,82	2,37	0,24	-
3-menthene	16,33	1293	-	-	-	-	-	-	-	4,6	-	-	-	-	-	-
Thymol	16,4	1296	-	-	-	-	-	-	-	-	4,65	-	-	-	33,63	49,29
Non identifié	16,45	1297	-	-	-	-	-	-	2,95	-	-	-	-	-	-	-
Carvacrol	16,63	1304	-	-	-	-	-	-	-	-	66,89	-	-	-	20,71	-
Non identifié	16,77	1310	-	-	-	-	-	-	1,45	-	-	-	-	-	-	-
β-elemene	17,68	1345	-	9,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Non identifié	17,68	1345	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,98
trans-carvyl acétate	17,87	1352	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,83

Eugénol	18,11	1361	-	-	-	-	-	99,7	-	-	-	-	-	-	-	-
Myrtenol	18,18	1363	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,68	-	0,46	-	-
E-Patchenol	18,27	1367	-	4,24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ylangène	18,47	1374	0,29	-	0,71	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-
Copaène	18,64	1380	1,08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,27	0,11	-	-
Acétate de nérol	18,65	1380	-	-	-	13,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acétate de géraniol	18,68	1381	-	-	2,89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-bourbonène	18,86	1388	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-
β caryophyllène	19,72	1421	0,93	-	-	1,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-santalène	19,74	1422	0,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isocaryophyllène	20,28	1444	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Humulen	20,61	1457	-	-	-	-	-	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-
β-cadinène	21,66	1497	-	-	-	-	-	-	17,76	-	-	-	-	-	-	-
D- germacrène	22,12	1516	-	-	1,42	-	-	-	-	-	-	0,48	-	-	-	-
manoyl oxide	32,68	1992	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,82	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
composés identifiés	-	-	99,49	99,96	97,93	98,44	99,98	99,99	98,85	99,68	99,97	99,41	99,93	99,94	99,74	99,23
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hydrocarbures monoterpèniques	-	-	15,1	85,5	3,21	2,35	11,07	-	58,52	8,16	26,66	82,12	20,58	35,66	39,43	40,75
monoterpènes oxygenés	-	-	81,33	5,24	89,7	95,05	88,91	-	18,17	90,92	73,31	14,99	79,08	64	60,31	54,5
hydrocarbures sesquiterpèniques	-	-	3,06	9,22	3,6	1,04	-	0,29	17,76	0,6	-	0,48	0,27	0,28	-	-
diterpènes oxygenés	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,82	-	-	-	-
Dérivés d'acide gras	-	-	-	-	1,42	-	-	99,7	-	-	-	-	-	-	-	-
Non identifié	-	-	-	-	-	-	-	-	4,4	-	-	-	-	-	-	3,98

TR : temps de rétention ; IK : indice de kovats.

Nous détaillerons ci après uniquement les composés représentant au minimum 10% de l'HE considérée.

- L'HE de cannelle (*Cinnamomum tamala*) est extraite à partir des feuilles. Elle est majoritairement composée de monoterpènes oxygénés (81,33%). 23 composés sont identifiés. Les composés majoritaires pour cette HE sont : linalool (29,64%), 1,8-cinéole (13,28%) et *cis*-linalooloxide (11,72%).

- L'HE de l'orange sanguine (*Citrus sinensis*), extraite à partir du zeste, est majoritairement composée d'hydrocarbures monoterpéniques (85,5%) ; le D-limonène est le composé majoritaire (83,62%) des 8 composés identifiés.

- L'HE de lemongrass (*Cymbopogon citratus*) est extraite à partir des parties aériennes de la plante. Elle est majoritairement composée de monoterpènes oxygénés (89,7%). Les composés majoritaires sont le géranial (49,15%) et le néral (33,16%).

- L'HE de palmarosa (*Cymbopogon Martinii var, Motia*) est extraite à partir des parties aériennes de la plante. Elle est majoritairement composée de monoterpènes oxygénés (95,05%). Les composés majoritaires sont le géraniol (77,4%) et l'acétate de nérol (13,07%).

- L'HE de l'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*), extraite à partir des feuilles, est majoritairement composée de monoterpènes oxygénés (88,91%) représentés par le 1,8-cinéole.

- L'HE du girofle (*Eugenia caryophyllus*) a l'eugénol comme composant majoritaire (99,7%). Elle contient 99,7% de dérivés d'acide gras. Elle est extraite à partir des feuilles.

- L'HE de l'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*) renferme 58,52% d'hydrocarbures monoterpéniques ; les γ-terpinène (25,56%), *p*-cymène (24,22%), β-cadinène (17,76%) et α-terpinéol (12,04%) sont les composés majoritaires. Cette HE est extraite à partir des feuilles.

- L'HE de menthe poivrée (*Mentha piperita Franco-Mitcham*) est composée majoritairement de monoterpènes oxygénés (90,92%). Les composés majoritaires sont le menthol (51,43%) et le D-*cis*-menthone (23,44).

- L'HE d'origan (*origanum vulgaris*) est extraite à partir des parties aériennes de la plante. Elle est composée majoritairement de monoterpènes oxygénés (73,31%). Le carvacrol (66,89%) et son précurseur le *p*-cymène (21,2%) sont les composés majoritaires pour cette HE.
- L'HE du pin (*Pinus laricio*), extraite à partir des aiguilles, est majoritairement composée d'hydrocarbures monoterpéniques (82,12%). Le 1S α–pinène (68,79%) est le composé majoritaire de cette HE.

- L'HE du romarin à cinéole (*Rosmarinus officinalis*) est majoritairement composée de monoterpènes oxygénés (79,08%). Le 1,8-cinéole (55,74%), le camphre (14,53%) et le 1S α–pinène (12,06%) sont les composés majoritaires.

- L'HE de romarin à camphre (*Rosmarinus officinalis L, camphoriferum*) contient des hydrocarbures monoterpéniques (35,66%) et des monoterpènes oxygénés (64%). Le 1,8-cinéole (26,87%), le camphre (26,07%) et le 1S α–pinène (18,82%) sont les composés majoritaires.

- L'HE de thym (*Thymus vulgaris*) contient des hydrocarbures monoterpéniques (39,43%) et des monoterpènes oxygénés (60,31%). Les composés majoritaires sont le thymol (33,63%), le *p*-cymène (33,14%) et le carvacrol (20,71%).

- L'HE de thym indien, encore appelé ajowan (*Trachyspermum ammi*) présente des proportions voisines d'hydrocarbures monoterpéniques (40,75%) et de monoterpènes oxygénés (54,5%) ; le thymol (49,29%) et le *p*-cymène (40,75%) sont les composés majoritaires. Cette HE est extraite à partir des graines.

Partie 5 : Conclusion générale et Perspectives

Conclusion générale et perspectives

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'une part d'étudier et de caractériser l'occurrence des légionelles dans les eaux thermales tunisiennes, et d'autre part d'extraire les HE de plantes d'origines tunisiennes et d'évaluer leur potentiel antimicrobien, tout particulièrement contre les bactéries du genre *Legionella*. L'activité antimicrobienne d'une sélection d'HE d'origine commerciale a également été évaluée dans ce travail.

La première partie de notre étude a permis d'avoir une idée de la présence de *Legionella* dans l'environnement thermal en Tunisie. Dix-huit souches de *Legionella*, dont seize de *L. pneumophila* et deux de *L. londiniensis* ont ainsi été isolées puis identifiés par séquençage de l'ARN 16S.

La détermination du sérogroupe de chaque souche a été faite par immunofluorescence et des tests d'agglutination au latex ont été réalisés dans le cas de réaction croisée entre des sérogroupes. Toutes les souches isolées de *L. pneumophila* appartiennent à 5 sérogroupes : 1, 4, 5, 6 et 8. L'analyse par électrophorèse en champ pulsé des souches de *L. pneumophila* a été faite au CNRL de Lyon et a permis de déterminer les génotypes de nos souches. Nous avons ainsi constaté que les souches isolées présentaient des pulsotypes différents de ceux de la base de données du CNRL **(voir article 1)**.

Ces résultats doivent encourager les autorités sanitaires tunisiennes à initier d'autres recherches afin de surveiller et maitriser le risque infectieux lié à *Legionella*.

La deuxième partie de ce travail était axée sur l'évaluation de l'activité anti-*Legionella* des HE extraites de plantes tunisiennes. Pour ce faire, nous avons choisi d'étudier six plantes : *Artemisia herba-alba* Asso, *Citrus sinensis* (L.) *Osbeck, Juniperus phoenicea* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Ruta graveolens* L., *Thymus vulgaris*. Les HE de ces plantes ont été extraites par hydrodistillation.

L'analyse de la composition chimique de chaque HE a été réalisée avec la technique GC-MS. La composition était, comme attendu, complexe et hétérogène. Les composés majoritaires étaient : α-thujone (36.38%), β-thujone (22,24%) et le camphre (19,12%) pour *A. herba-alba*

Asso ; *cis*-linalooloxide (24,90%), linalool (16,50%) et *trans*-linalooloxide (15,82%) pour *C. sinensis* (L.) *Osbeck* ; Isobornéol (20,91%) et 1S α-pinène (18,30%) pour *J. phoenicea* L. ; 1,8-cineole (59,18%), camphre (21,60%) et bornéol (11,95%) pour *R. officinalis* L. ; le 2-undecanone (60,63%) pour *R. graveolens* L. ; et le carvacrol (88,50 %) pour le *T. vulgaris*.

Les souches de *Legionella* testées étaient toutes sensibles à l'action de ces HE et les HE de *J. phoenicea* L. et de *T. vulgaris* (CMI < 0,03 mg/mL et ≤ 0,07 mg/mL respectivement) ont présenté les activités les plus élevées **(voir article 2)**.

Des observations par microscopie électronique ont été réalisées afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications morphologiques ou histologiques des bactéries (*L. pneumophila* Lens et Paris) traitées par l'HE de *T. vulgaris* ; cette étude microscopique a montré des altérations de la membrane cellulaire des bactéries traitées. En effet, les bactéries traitées apparaissaient moins denses aux électrons et présentaient un aspect plus court et surtout aplatie par rapport aux bactéries témoins, non traitées. Les concentrations d'HE testées correspondaient à CMI/2, CMI et CMI x 5.

L'ensemble de ces résultats montre l'efficacité des HE extraites des six plantes tunisiennes étudiées et l'intérêt potentiel de l'HE de *T. vulgaris* en particulier pour la lutte contre les légionelles.

La troisième partie de notre étude a concerné les activités antimicrobiennes au sens large de 20 HE (HE préparées au laboratoire à partir de plantes tunisiennes et HEcommerciales). Au total 18 espèces microbiennes ont été étudiées pour envisager d'éventuelles applications dans des secteurs incluant l'alimentaire, la cosmétologie ou le traitement des eaux : 6 espèces bactériennes Gram positives (*Bacillus megaterium, Staphylococcus epidermidis, S. xylosus, S. hemolyticus, S. saprophyticus* et *Listeria monocytogenes*), cinq Gram négatives (*L. pneumophila, Klebsiella pneumoniae, Salmonella thyphimurium, Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), sept espèces fongiques dont quatre levuriformes (*Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis* et *Cryptococcus neoformans*), et trois filamenteux - une moisissure (*Aspergillus fumigatus*) et 2 dermatophytes (*Tricophyton mentagrophytes* et *T. rubrum*). Ces dernières étaient les souches fongiques les plus sensibles à l'action des HE avec des CMI de l'ordre de 0,05 mg/mL pour *T. mentagrophytes* et 0,01 mg/mL pour *T. rubrum*.

De plus, les dermatophytes sont impliqués dans des mycoses superficielles, touchant la peau, les ongles, les poils et les cheveux, zones riches en chitine. Les HE pourraient, à terme, contribuer au traitement de ces mycoses superficielles. En effet, leur activité significative pourrait faire l'objet d'une valorisation sous forme de shampoings ou lotions cutanées pour traiter les dermatophyties, sous réserve de réaliser au préalable des études de toxicité approfondies. Certaines HE sont déjà retrouvées dans des préparations à usage topique, par exemple sous forme d'ovules pour traiter des infections gynécologiques, ou sous forme de lotion ou de crème pour traiter des infections cutanées. Ces HE peuvent être diluées dans une huile végétale comme celle de la nigelle, qui présente également des propriétés antifongiques. Enfin, certaines HE, telles que l'HE de clou de girofle, l'arbre à thé, peuvent être utilisées pour traiter des "onychomycoses",

Il serait par ailleurs intéressant de compléter notre travail par l'évaluation de l'activité des HE étudiées vis-à-vis des levures du genre *Malassezia* ; ceci constituerait une étude préliminaire pour d'envisager, à plus long terme, une utilisation pour le traitement d'autres mycoses superficielles, en particulier le pityriasis versicolor ou le pytiriasis capitis, qui sont des dermatoses de la peau et du cuir chevelu ayant souvent un caractère récidivant. Enfin, certains shampoings, lotions ou crèmes disponibles sur le marché contiennent déjà des extraits d'HE comme pour la marque commerciale "*Florame*" (http://www.florame.com/).

Parmi les bactéries, *B. megaterium* et *L. monocytogenes* étaient les souches Gram positives les plus sensibles à l'action des HE issues de plantes tunisiennes (CMI = 0,16 mg/mL et 0,34 ml/mL respectivement) **(voir article 3)**.

L. monocytogenes est un pathogène fréquemment associé aux problèmes de contamination des aliments pouvant causer la listériose, maladie potentiellement grave et qui peut toucher aussi bien l'Homme que les animaux. Dans ce contexte alimentaire, l'analyse de la bibliographie montre l'existence d'un nombre croissant d'études portant sur l'intérêt des HE pour la prévention des contaminations des aliments. Certains composés d'HE sont reconnus comme étant des agents aromatisants des aliments dans l'Union Européenne et aux États Unis.

Les études faites sur la viande crue, les produits carnés, le poisson, le lait, les produits laitiers, les légumes, les fruits et le riz cuit montrent que les concentrations requises pour obtenir une inhibition antibactérienne significative sont le plus souvent comprises entre 0,5 et 20 µl / g

dans les aliments et 0,5 et 10 µl / g dans l'eau pour laver les fruits et les légumes (Burt, 2004). L'eugénol et les HE de coriandre, girofle, origan et thym semblent être les plus efficaces dans la préservation de la viande et des produits carnés ; de même que l'HE d'origan pour le poisson ; l'HE de menthe pour les produits laitiers ; plusieurs composés d'HE tels que le cinnamaldéhyde, le thymol ou encore l'HE de l'origan pour les légumes ; et le carvacrol dans le cas du riz et des fruits. L'ensemble de ces études a permis de classer les composés d'HE par ordre décroissant selon leurs effet antibactérien : eugénol > carvacrol > acide cinnamique > cinnamaldéhyde > citral / géraniol (Burt, 2004).

Notre travail montre que la sensibilité des légionelles vis à vis des différentes HE testées, quelle que soit l'espèce végétale considérée, présente une piste future dans la lutte contre cette bactérie dans l'eau et l'environnement ; les HE pourraient venir en complément des traitements habituels qui ne sont malheureusement actuellement pas efficaces à 100%.

L'utilisation des HE chez l'Homme dans le but de traiter la légionellose n'a pas été envisagée dans cette étude. En effet, la toxicité des HE est peu ou pas compatible avec leur utilisation au niveau systémique.

Toutefois, leur utilisation en traitement topique est envisageable. Il est donc nécessaire de connaitre le mode d'action des ces substances en vue d'élaborer les formes galéniques les plus appropriées (pommades, lotion, shampoing, vaporisateur…).

L'étude de microscopie électronique a montré les altérations morphologiques et histologiques provoquées par une des HE étudiées (*T. vulgaris*); Toutefois, le mécanisme d'action mériterait d'être approfondi. Le traitement des souches de *L. pneumophila* Lens et Paris par l'HE de *T. vulgaris*, a suggère que l'HE de *T. vulgaris* agit suivant un mode bactéricide ; ce travail préliminaire a été réalisé par culture conventionnelle sur milieu BCYE des bactéries après contact avec cette HE. Ces essais restent toutefois à confirmer par d'autres techniques (coloration par le kit Backlight par exemple).

En conclusion, notre étude présente deux aspects directement en lien avec la Tunisie :

- Elle constitue une alerte invitant à prendre conscience du « risque *Legionella* » dans l'environnement thermal tunisien ; elle encourage également à étendre la recherche de ces germes

dans les hôpitaux et autres installations à risque fréquentés par des individus fragilisés. Enfin les résultats de ce travail suggèrent d'inclure le dépistage systématique de cette bactérie chez les patients présentant les symptômes d'une pneumopathie grave et fréquentant les eaux thermales tunisiennes.

- Elle met par ailleurs en évidence le potentiel des HE issues de plantes tunisiennes ; ce patrimoine pourrait être davantage valorisé. Plusieurs applications sont envisageables dans de nombreux domaines : alimentaire, pharmaceutique, aromathérapeutique, et bien sûr thermal pour permettre l'éradication des germes hydro-telluriques et surtout *Legionella*…

Partie 6 : Références bibliographiques

Références à partir de sites internet

1. http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=11148 **(figure 1)**
2. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/; extraction des données relatives à : Legionella/procaryote/status/complete ; consulté le 20/05/2013
3. http://www.thermalisme.nat.tn/site/publish/content/article.asp?ID=134& ; consulté le 07/06/2013
4. Circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 du 19 juin 2000 : http://www.sante.gouv.fr/fichiers/bo/2000/00-27/a0271905.htm
5. http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-respiratoires/Legionellose/Donnees/Bilan-des-cas-de-legionellose-survenus-en-France-en-2011 **(figure 5)**
6. www.invs.sante.fr
7. http://www.unige.ch/cyberdocuments/theses2001/BisognanoC/these_body.html **(figure 6)**
8. http://fr.wikipedia.org/wiki **(figure 9)**
9. http://www.conseils-avocats.com/avocat-tunisie.html **(figure 14)**
10. http://fr.aeschemunex.com/nos-produits,18/67,ensemenceur-spiral-wasp.html **(figure 15)**
11. Basic Local Alignment Search Tool : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
12. http://tpe-phytotherapie.e-monsite.com/pages/etude-d-une-plante-medicinale-le-thym-et-experiences.html **(figure 17)**

Abu Kwaik, Y., Gao, L. Y., Stone, B. J., Venkataraman, C. & Harb, O. S. (1998). Invasion of protozoa by Legionella pneumophila and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Appl Environ Microbiol***64**, 3127-3133.

Adeleke, A., Pruckler, J., Benson, R., Rowbotham, T., Halablab, M. & Fields, B. (1996). Legionella-like amebal pathogens--phylogenetic status and possible role in respiratory disease. *Emerg Infect Dis***2**, 225-230.

Ait Mbarek, L., Ait Mouse, H., Elabbadi, N. & other authors (2007). Anti-tumor properties of blackseed (Nigella sativa L.) extracts. *Braz J Med Biol Res***40**, 839-847.

Albert-Weissenberger, C., Cazalet, C. & Buchrieser, C. (2007). Legionella pneumophila - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell Mol Life Sci***64**, 432-448.

Atlas, R. M. (1999). Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ Microbiol***1**, 283-293.

Aurell, H., Etienne, J., Forey, F. & other authors (2003). Legionella pneumophila serogroup 1 strain Paris: endemic distribution throughout France. *J Clin Microbiol***41**, 3320-3322.

Bachman, M. A. & Swanson, M. S. (2001). RpoS co-operates with other factors to induce Legionella pneumophila virulence in the stationary phase. *Mol Microbiol***40**, 1201-1214.

Bachman, M. A. & Swanson, M. S. (2004). Genetic evidence that Legionella pneumophila RpoS modulates expression of the transmission phenotype in both the exponential phase and the stationary phase. *Infect Immun***72**, 2468-2476.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol***46**, 446-475.

Baron, P. A. & Willeke, K. (1986). Respirable droplets from whirlpools: measurements of size distribution and estimation of disease potential. *Environ Res***39**, 8-18.

Bartram, J., Chartlier, Y., Lee, J. V., Pond, K.&Surman-Lee, S. (2007). Legionella and the Prevention of Legionellosis. Geneva: World Health Organization.

Benhamou, D., Bru, J. P., Chidiac, C., Etienne, J., Leophonte, P., Marty, N., Poirier, R. & Rouquet, R. M. (2005). [Legionnaire's disease: definition, diagnosis and treatment]. *Med Mal Infect***35**, 1-5.

Ben M'Rad, S., Chaouch, N., Merai, S., Tritar, F. & Djenayah, F. (2004). [Pneumothorax complicating legionellosis]. *Rev Mal Respir* **21**, 602-603.

Bentham, R. H. & Broadbent, C. R. (1993). A model for autumn outbreaks of Legionnaires' disease associated with cooling towers, linked to system operation and size. *Epidemiol Infect***111**, 287-295.

Blanc, D. S., Carrara, P., Zanetti, G. & Francioli, P. (2005). Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control Legionella: seven years of experience in a university teaching hospital. *J Hosp Infect***60**, 69-72.

Bollin, G. E., Plouffe, J. F., Para, M. F. & Hackman, B. (1985). Aerosols containing Legionella pneumophila generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl Environ Microbiol***50**, 1128-1131.

Borella, P., Guerrieri, E., Marchesi, I., Bondi, M. & Messi, P. (2005). Water ecology of Legionella and protozoan: environmental and public health perspectives. *Biotechnol Annu Rev***11**, 355-380.

Bortner, C. A., Miller, R. D. & Arnold, R. R. (1986). Bactericidal effect of lactoferrin on Legionella pneumophila. *Infect Immun***51**, 373-377.

Bostancioglu, R. B., Kurkcuoglu, M., Baser, K. H. & Koparal, A. T. (2012). Assessment of anti-angiogenic and anti-tumoral potentials of Origanum onites L. essential oil. *Food Chem Toxicol***50**, 2002-2008.

Bouyer, S., Imbert, C., Rodier, M. H. & Hechard, Y. (2007). Long-term survival of Legionella pneumophila associated with Acanthamoeba castellanii vesicles. *Environ Microbiol***9**, 1341-1344.

Braga, P. C., Culici, M., Alfieri, M. & Dal Sasso, M. (2008). Thymol inhibits Candida albicans biofilm formation and mature biofilm. *Int J Antimicrob Agents***31**, 472-477.

Braga, P. C. & Ricci, D. (2011). Thymol-induced alterations in Candida albicans imaged by atomic force microscopy. *Methods Mol Biol***736**, 401-410.

Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G. & McDade, J. E. (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: Legionella pneumophila, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med***90**, 656-658.

Bruggemann, H., Cazalet, C. & Buchrieser, C. (2006). Adaptation of Legionella pneumophila to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr Opin Microbiol***9**, 86-94.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). *Lavoisier*, p 1268.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol***94**, 223-253.

Byrd, T. F. & Horwitz, M. A. (1989). Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of Legionella pneumophila by limiting the availability of iron. *J Clin Invest***83**, 1457-1465.

Byrd, T. F. & Horwitz, M. A. (1991). Lactoferrin inhibits or promotes Legionella pneumophila intracellular multiplication in nonactivated and interferon gamma-activated human monocytes depending upon its degree of iron saturation. Iron-lactoferrin and nonphysiologic iron chelates reverse monocyte activation against Legionella pneumophila. *J Clin Invest***88**, 1103-1112.

Byrne, B. & Swanson, M. S. (1998). Expression of Legionella pneumophila virulence traits in response to growth conditions. *Infect Immun***66**, 3029-3034.

Carson, C. F., Mee, B. J. & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother***46**, 1914-1920.

Cazalet, C., Rusniok, C., Bruggemann, H. & other authors (2004). Evidence in the Legionella pneumophila genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat Genet***36**, 1165-1173.

Charpentier, X., Kay, E., Schneider, D. & Shuman, H. A. (2011). Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in Legionella pneumophila. *J Bacteriol* **193**, 1114-1121.

Chang, C. W., Chang, W. L., Chang, S. T. & Cheng, S. S. (2008). Antibacterial activities of plant essential oils against Legionella pneumophila. *Water Res***42**, 278-286.

Chien, M., Morozova, I., Shi, S. & other authors (2004). The genomic sequence of the accidental pathogen Legionella pneumophila. *Science***305**, 1966-1968.

Ching, W. T. & Meyer, R. D. (1987). Legionella infections. *Infect Dis Clin North Am***1**, 595-614.

Cianciotto, N. P., Eisenstein, B. I., Mody, C. H., Toews, G. B. & Engleberg, N. C. (1989). A Legionella pneumophila gene encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. *Infect Immun***57**, 1255-1262.

Cianciotto, N. P. (2001). Pathogenicity of Legionella pneumophila. *Int J Med Microbiol***291**, 331-343.

Cosentino, S., Tuberoso, C. I., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Lett Appl Microbiol***29**, 130-135.

Council of Europe (1997). Methods of Pharmacognosy. In *In European Pharmacopoeia*, pp. 121-122.

Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R. & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). *J Appl Microbiol***88**, 170-175.

Cox, S. D., Mann, C. M. & Markham, J. L. (2001). Interactions between components of the essential oil of Melaleuca alternifolia. *J Appl Microbiol***91**, 492-497.

De Buck, E., Anne, J. & Lammertyn, E. (2007). The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen Legionella pneumophila. *Microbiology***153**, 3948-3953.

de Sousa, A. C., Alviano, D. S., Blank, A. F., Alves, P. B., Alviano, C. S. & Gattass, C. R. (2004). Melissa officinalis L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *J Pharm Pharmacol***56**, 677-681.

Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B. & Ollevier, F. (2009). Replication of Legionella pneumophila in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol Res***164**, 593-603.

Declerck, P. (2010). Biofilms: the environmental playground of Legionella pneumophila. *Environ Microbiol***12**, 557-566.

Dennis, P. J., Brenner, D. J., Thacker, W. L., Wait, R., Vesey, G., Steigerwalt, A. G. & Benson, R. F. (1993). Five new Legionella species isolated from water. *Int J Syst Bacteriol***43**, 329-337.

Diederen, B. M. (2008). Legionella spp. and Legionnaires' disease. *J Infect***56**, 1-12.

Dietrich, C., Heuner, K., Brand, B. C., Hacker, J. & Steinert, M. (2001). Flagellum of Legionella pneumophila positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect Immun***69**, 2116-2122.

Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis***8**, 881-890.

Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev***15**, 167-193.

Dordevic, S., Petrovic, S., Dobric, S., Milenkovic, M., Vucicevic, D., Zizic, S. & Kukic, J. (2007). Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of Carlina acanthifolia root essential oil. *J Ethnopharmacol***109**, 458-463.

Dorman, H. J. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol***88**, 308-316.

Dowling, J. N., Saha, A. K. & Glew, R. H. (1992). Virulence factors of the family Legionellaceae. *Microbiol Rev***56**, 32-60.

Edelstein, P. H., Hu, B. & Edelstein, M. A. (2005). In vitro and intracellular activities of LBM415 (NVP PDF-713) against Legionella pneumophila. *Antimicrob Agents Chemother***49**, 2533-2535.

Fadli, M., Saad, A., Sayadi, S., Chevalier, J., Mezrioui, N. E., Pages, J. M. & Hassani, L. (2012). Antibacterial activity of Thymus maroccanus and Thymus broussonetii essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine***19**, 464-471.

Farhat, M., Moletta-Denat, M., Frere, J., Onillon, S., Trouilhe, M. C. & Robine, E. (2012). Effects of disinfection on Legionella spp., eukarya, and biofilms in a hot water system. *Appl Environ Microbiol***78**, 6850-6858.

Fields, B. S. (1996). The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol***4**, 286-290.

Fields, B. S., Benson, R. F. & Besser, R. E. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev***15**, 506-526.

Fisher, K. & Phillips, C. (2009). In vitro inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant Enterococcus faecium and E. faecalis in the presence of citrus essential oils. *Br J Biomed Sci***66**, 180-185.

Flannery, B., Gelling, L. B., Vugia, D. J. & other authors (2006). Reducing Legionella colonization in water systems with monochloramine. *Emerg Infect Dis***12**, 588-596.

Fliermans, C. B., Cherry, W. B., Orrison, L. H., Smith, S. J., Tison, D. L. & Pope, D. H. (1981). Ecological distribution of Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol***41**, 9-16.

Fraser, D. W., Tsai, T. R., Orenstein, W. & other authors (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med***297**, 1189-1197.

Fritsche, T. R., Sader, H. S., Cleeland, R. & Jones, R. N. (2005). Comparative antimicrobial characterization of LBM415 (NVP PDF-713), a new peptide deformylase inhibitor of clinical importance. *Antimicrob Agents Chemother***49**, 1468-1476.

Gabay, J. E., Blake, M., Niles, W. D. & Horwitz, M. A. (1985). Purification of Legionella pneumophila major outer membrane protein and demonstration that it is a porin. *J Bacteriol***162**, 85-91.

Gaia, V., Fry, N. K., Afshar, B., Luck, P. C., Meugnier, H., Etienne, J., Peduzzi, R. & Harrison, T. G. (2005). Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol***43**, 2047-2052.

Garduno, R. A., Garduno, E. & Hoffman, P. S. (1998). Surface-associated hsp60 chaperonin of Legionella pneumophila mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect Immun***66**, 4602-4610.

Gill, A. O. & Holley, R. A. (2004). Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against Listeria monocytogenes and of eugenol against L. monocytogenes and Lactobacillus sakei. *Appl Environ Microbiol***70**, 5750-5755.

Gill, A. O. & Holley, R. A. (2006). Inhibition of membrane bound ATPases of Escherichia coli and Listeria monocytogenes by plant oil aromatics. *Int J Food Microbiol***111**, 170-174.

Girod, J. C., Reichman, R. C., Winn, W. C., Jr., Klaucke, D. N., Vogt, R. L. & Dolin, R. (1982). Pneumonic and nonpneumonic forms of legionellosis. The result of a common-source exposure to Legionella pneumophila. *Arch Intern Med***142**, 545-547.

Glick, T. H., Gregg, M. B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W. W., Jr. & Kassanoff, I. (1978). Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol***107**, 149-160.

Glockner, G., Albert-Weissenberger, C., Weinmann, E., Jacobi, S., Schunder, E., Steinert, M., Hacker, J. & Heuner, K. (2008). Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of Legionella pneumophila Corby localized on two mobile genomic islands. *Int J Med Microbiol* **298**, 411-428.

Goetz, P. & Ghedira, K. (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. *Collection : Phytotherapie Pratique*, 365.

Gomez-Valero, L., Rusniok, C. & Buchrieser, C. (2009). Legionella pneumophila: population genetics, phylogeny and genomics. *Infect Genet Evol***9**, 727-739.

Greub, G. & Raoult, D. (2003). Morphology of Legionella pneumophila according to their location within Hartmanella vermiformis. *Res Microbiol***154**, 619-621.

Hacker, J., Ott, M., Wintermeyer, E., Ludwig, B. & Fischer, G. (1993). Analysis of virulence factors of Legionella pneumophila. *Zentralbl Bakteriol***278**, 348-358.

Harrison, T. G., Doshi, N., Fry, N. K. & Joseph, C. A. (2007). Comparison of clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila obtained in the UK over 19 years. *Clin Microbiol Infect***13**, 78-85.

He, M., Du, M., Fan, M. & Bian, Z. (2007). In vitro activity of eugenol against Candida albicans biofilms. *Mycopathologia***163**, 137-143.

Hebert, G. A. (1981). Hippurate hydrolysis by Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol* **13**, 240-242.

Heffelfinger, J. D., Kool, J. L., Fridkin, S., Fraser, V. J., Hageman, J., Carpenter, J. & Whitney, C. G. (2003). Risk of hospital-acquired legionnaires' disease in cities using monochloramine versus other water disinfectants. *Infect Control Hosp Epidemiol***24**, 569-574.

Helander, I. M., Alakomı, H. L., Latva-Kala, K., Mat- tıla-Sandholm, T., Pol, I., Smıd, E. J., Gorrıs, L. G. M.&Von Wrıght, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***46**, 3590–3595.

Helbig, J. H., Kurtz, J. B., Pastoris, M. C., Pelaz, C. & Luck, P. C. (1997). Antigenic lipopolysaccharide components of Legionella pneumophila recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups. *J Clin Microbiol***35**, 2841-2845.

Helbig, J. H., Bernander, S., Castellani Pastoris, M. & other authors (2002). Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of Legionella pneumophila serogroups and monoclonal subgroups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis***21**, 710-716.

Helbig, J. H., Fernandez-Moreira, E., Jacobs, E., Lu¨ck, P. C. & Wittt, M. (2006). LPS architecture of Legionella pneumophila grown in broth and host cells. In Legionella: State of the Art 30 Years After its Recognition ed. Cianciotto,. *Washington, DC: ASM Press*, 261–264.

Heller, R., Holler, C., Sussmuth, R. & Gundermann, K. O. (1998). Effect of salt concentration and temperature on survival of Legionella pneumophila. *Lett Appl Microbiol***26**, 64-68.

Hoffman, P. S., Houston, L. & Butler, C. A. (1990). Legionella pneumophila htpAB heat shock operon: nucleotide sequence and expression of the 60-kilodalton antigen in L. pneumophila-infected HeLa cells. *Infect Immun***58**, 3380-3387.

Ishimatsu, S., Miyamoto, H., Hori, H., Tanaka, I. & Yoshida, S. (2001). Sampling and detection of Legionella pneumophila aerosols generated from an industrial cooling tower. *Ann Occup Hyg***45**, 421-427.

Jacobson, J. A., Chester, T. J. & Fraser, D. W. (1977). An epidemic of disease due to serogroup B Neisseria meningitidis in Alabama: report of an investigation and community-wide prophylaxis with a sulfonamide. *J Infect Dis* **136**, 104-108.

Jarraud, S., Reyrolle, M., Meugnier, H., Forey, F. & Etienne, J. (2007). [Legionnaires disease]. *Presse Med***36**, 279-287.

Jepras, R. I., Fitzgeorge, R. B. & Baskerville, A. (1985). A comparison of virulence of two strains of Legionella pneumophila based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *J Hyg (Lond)***95**, 29-38.

Joly, P., Falconnet, P. A., Andre, J., Weill, N., Reyrolle, M., Vandenesch, F., Maurin, M., Etienne, J. & Jarraud, S. (2006). Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: data interpretation. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2801-2808.

Jules, M. & Buchrieser, C. (2007). Legionella pneumophila adaptation to intracellular life and the host response: clues from genomics and transcriptomics. *FEBS Lett***581**, 2829-2838.

Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F. & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol***76**, 626-631.

Kalemba, D. & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem***10**, 813-829.

Kaloustian, J.&Hadji-Minaglou, F. (2012). La Connaissance Des Huiles Essentielles: Qualitologie Et Aromatherapie: Entre Science Et Tradition Pour Une Application Medicale Raisonnee. *Collection : Phytotherapie Pratique*, 210.

Khan, M. S. & Ahmad, I. (2011). In vitro antifungal, anti-elastase and anti-keratinase activity of essential oils of Cinnamomum-, Syzygium- and Cymbopogon-species against Aspergillus fumigatus and Trichophyton rubrum. *Phytomedicine***19**, 48-55.

Kilvington, S. & Price, J. (1990). Survival of Legionella pneumophila within cysts of Acanthamoeba polyphaga following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol***68**, 519-525.

Kim, B. R., Anderson, J. E., Mueller, S. A., Gaines, W. A. & Kendall, A. M. (2002). Literature review--efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. *Water Res***36**, 4433-4444.

Kisko, G. & Roller, S. (2005). Carvacrol and p-cymene inactivate Escherichia coli O157:H7 in apple juice. *BMC Microbiol***5**, 36.

Kool, J. L., Carpenter, J. C. & Fields, B. S. (1999). Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. *Lancet***353**, 272-277.

Kwon, J. A., Yu, C. B. & Park, H. D. (2003). Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on Bacillus cereus. *Lett Appl Microbiol***37**, 61-65.

L. M. Lopes, C., Goncalves e Sa, C., de Almeida, A. A., da Costa, J. P., Marques, T. H., Feitosa, C. M., Saldanha, G. B. & de Freitas, R. M. (2011). Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of Citrus limon (Burn) essential oil in mice. *Pharmazie***66**, 623-627.

Lambert, R. J., Skandamis, P. N., Coote, P. J. & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol***91**, 453-462.

Lau, H. Y. & Ashbolt, N. J. (2009). The role of biofilms and protozoa in Legionella pathogenesis: implications for drinking water. *J Appl Microbiol***107**, 368-378.

Lavigne, J. P., Botella, E. & O'Callaghan, D. (2006). [Type IV secretion system and their effectors: an update]. *Pathol Biol (Paris)***54**, 296-303.

Lawrence, C., Reyrolle, M., Dubrou, S., Forey, F., Decludt, B., Goulvestre, C., Matsiota-Bernard, P., Etienne, J. & Nauciel, C. (1999). Single clonal origin of a high proportion of Legionella pneumophila serogroup 1 isolates from patients and the environment in the area of Paris, France, over a 10-year period. *J Clin Microbiol***37**, 2652-2655.

LeChevallier, M. W., Cawthon, C. D. & Lee, R. G. (1988a). Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Appl Environ Microbiol***54**, 649-654.

LeChevallier, M. W., Cawthon, C. D. & Lee, R. G. (1988b). Inactivation of biofilm bacteria. *Appl Environ Microbiol***54**, 2492-2499.

Lehtola, M. J., Torvinen, E., Kusnetsov, J. & other authors (2007). Survival of Mycobacterium avium, Legionella pneumophila, Escherichia coli, and caliciviruses in drinking water-associated biofilms grown under high-shear turbulent flow. *Appl Environ Microbiol***73**, 2854-2859.

Lin, Y. S., Stout, J. E., Yu, V. L. & Vidic, R. D. (1998). Disinfection of water distribution systems for Legionella. *Semin Respir Infect***13**, 147-159.

Loret, J. F., Robert, S., Thomas, V., Cooper, A. J., McCoy, W. F. & Levi, Y. (2005). Comparison of disinfectants for biofilm, protozoa and Legionella control. *J Water Health***3**, 423-433.

Mantle, D., Anderton, J. G., Falkous, G., Barnes, M., Jones, P.&Perry, E. K. (1998). Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comparative Biochemistry and Physiology***121**, 385–391.

May, J., Chan, C. H., King, A., Williams, L. & French, G. L. (2000). Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J Antimicrob Chemother***45**, 639-643.

McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A. & Dowdle, W. R. (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med***297**, 1197-1203.

Melillo, L. (1995). [Thermalism in ancient world]. *Med Secoli***7**, 461-483.

Mehiri-Zghal, E., Mahjoubi, W., Essalah, L. & Slim-Saidi, L. (2009). *LEGIONELLA* : Clinical and environmental distribution in Tunisia. In *19 ème Congrès de la Société Tunisienne de Pathologie Infectieuse*. 24-25 Avril 2009, Hôtel des Congrés Tunis.

Mermel, L. A., Josephson, S. L., Giorgio, C. H., Dempsey, J. & Parenteau, S. (1995). Association of Legionnaires' disease with construction: contamination of potable water? *Infect Control Hosp Epidemiol***16**, 76-81.

Molmeret, M. & Abu Kwaik, Y. (2002). How does Legionella pneumophila exit the host cell? *Trends Microbiol***10**, 258-260.

Molmeret, M., Bitar, D. M., Han, L. & Kwaik, Y. A. (2004). Cell biology of the intracellular infection by Legionella pneumophila. *Microbes Infect***6**, 129-139.

Mondello, F., Girolamo, A., Scaturro, M. & Ricci, M. L. (2009). Determination of Legionella pneumophila susceptibility to Melaleuca alternifolia Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions. *J Microbiol Methods***77**, 243-248.

Muraca, P., Stout, J. E. & Yu, V. L. (1987). Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing Legionella pneumophila within a model plumbing system. *Appl Environ Microbiol***53**, 447-453.

Naigre, R., Kalck, P., Roques, C., Roux, I. & Michel, G. (1996). Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. *Planta Med***62**, 275-277.

Nazer, A. I., Kobilinsky, A., Tholozan, J. L. & Dubois-Brissonnet, F. (2005). Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of Salmonella sv. Typhimurium: a synergistic effect? . *Food Microbiol***22**, 391-398.

Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J. & Stashenko, E. (2010). Repellent activity of essential oils: a review. *Bioresour Technol***101**, 372-378.

Ngarmsak, M., Delaquis, P., Toivonen, P., Ngarmsak, T., Ooraikul, B. & Mazza, G. (2006). Antimicrobial activity of vanillin against spoilage microorganisms in stored fresh-cut mangoes. *J Food Prot***69**, 1724-1727.

Nguyen, T. M., Ilef, D., Jarraud, S. & other authors (2006). A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread? *J Infect Dis***193**, 102-111.

Niu, C., Afre, S. & Gilbert, E. S. (2006). Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Lett Appl Microbiol***43**, 489-494.

Nostro, A., Blanco, A. R., Cannatelli, M. A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Sudano Roccaro, A. & Alonzo, V. (2004). Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett***230**, 191-195.

Nostro, A., Sudano Roccaro, A., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., Cioni, P. L., Procopio, F. & Blanco, A. R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *J Med Microbiol***56**, 519-523.

Ooi, L. S., Li, Y., Kam, S. L., Wang, H., Wong, E. Y. & Ooi, V. E. (2006). Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb Cinnamomum cassia Blume. *Am J Chin Med***34**, 511-522.

Oosterhaven, K., Poolman, B. & Smid, E. J. (1995).S-Carvone as a natural potato sprout inhibiting, fungistatic and bacteristatic compound. *Industrial Crops and Products***4**, 23-31.

Orrison, L. H., Cherry, W. B., Tyndall, R. L., Fliermans, C. B., Gough, S. B., Lambert, M. A., McDougal, L. K., Bibb, W. F. & Brenner, D. J. (1983). Legionella oakridgensis: unusual new species isolated from cooling tower water. *Appl Environ Microbiol***45**, 536-545.

Pharmacopée Européenne (2008).6° Ed. version Française (inclus 6.0-6.2).

Philippe, C., Blech, M. F. & Hartemann, P. (2006). [Intra-amoebal development of Legionella pneumophila and the potential role of amoebae in the transmission of Legionnaires' disease]. *Med Mal Infect***36**, 196-200.

Pina-Vaz, C., Goncalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Goncalves, M. J. & Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *J Eur Acad Dermatol Venereol***18**, 73-78.

Pine, L., George, J. R., Reeves, M. W. & Harrell, W. K. (1979). Development of a chemically defined liquid medium for growth of Legionella pneumophila. *J Clin Microbiol***9**, 615-626.

Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C. & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from Syzygium aromaticum on Candida, Aspergillus and dermatophyte species. *J Med Microbiol***58**, 1454-1462.

Pryor, M., Springthorpe, S., Riffard, S., Brooks, T., Huo, Y., Davis, G. & Sattar, S. A. (2004). Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Sci Technol***50**, 83-90.

Rasooli, I., Rezaei, M. B. & Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on Listeria monocytogenes. *Int J Infect Dis***10**, 236-241.

Rattanachaikunsopon, P. & Phumkhachorn, P. (2010). Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against Vibrio cholerae in food. *J Biosci Bioeng***110**, 614-619.

Rossier, O., Starkenburg, S. R. & Cianciotto, N. P. (2004). Legionella pneumophila type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect Immun***72**, 310-321.

Rowbotham, T. J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol***33**, 1179-1183.

Salzer, U. J. (1977). The analysis of essential oils and extracts (oleoresins) from seasonings--a critical review. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr***9**, 345-373.

Samrakandi, M. M., Roques, C. & Michel, G. (1997). Influence of trophic conditions on exopolysaccharide production: bacterial biofilm susceptibility to chlorine and monochloramine. *Can J Microbiol***43**, 751-758.

Senatore, F. (1996). Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (Thymus puleigioides L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *J Agric Food Chem***44**, 1327-1332.

Sexton, J. A. & Vogel, J. P. (2004). Regulation of hypercompetence in Legionella pneumophila. *J Bacteriol* **186**, 3814-3825.

Shin, S. & Kim, J. H. (2005). In vitro inhibitory activities of essential oils from two Korean thymus species against antibiotic-resistant pathogens. *Arch Pharm Res***28**, 897-901.

Siani, A. C., Ramos, M. F., Menezes-de-Lima, O., Jr. & other authors (1999). Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of Protium. *J Ethnopharmacol***66**, 57-69.

Small, D. A., Chang, W., Toghrol, F. & Bentley, W. E. (2007). Toxicogenomic analysis of sodium hypochlorite antimicrobial mechanisms in Pseudomonas aeruginosa. *Appl Microbiol Biotechnol***74**, 176-185.

Soderberg, M. A., Rossier, O. & Cianciotto, N. P. (2004). The type II protein secretion system of Legionella pneumophila promotes growth at low temperatures. *J Bacteriol***186**, 3712-3720.

Solorzano-Santos, F. & Miranda-Novales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol***23**, 136-141.

Steinert, M., Engelhard, H., Flugel, M., Wintermeyer, E. & Hacker, J. (1995). The Lly protein protects Legionella pneumophila from light but does not directly influence its intracellular survival in Hartmannella vermiformis. *Appl Environ Microbiol***61**, 2428-2430.

Steinert, M., Flugel, M., Schuppler, M., Helbig, J. H., Supriyono, A., Proksch, P. & Luck, P. C. (2001). The Lly protein is essential for p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase activity in Legionella pneumophila. *FEMS Microbiol Lett***203**, 41-47.

Steinert, M., Hentschel, U. & Hacker, J. (2002). Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiol Rev***26**, 149-162.

Steinert, M., Heuner, K., Buchrieser, C., Albert-Weissenberger, C. & Glockner, G. (2007). Legionella pathogenicity: genome structure, regulatory networks and the host cell response. *Int J Med Microbiol***297**, 577-587.

Stone, B. J. & Kwaik, Y. A. (1999). Natural competence for DNA transformation by Legionella pneumophila and its association with expression of type IV pili. *J Bacteriol* **181**, 1395-1402.

Taylor, M., Ross, K. & Bentham, R. (2009). Legionella, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb Ecol***58**, 538-547.

Temmerman, R., Vervaeren, H., Noseda, B., Boon, N. & Verstraete, W. (2006). Necrotrophic growth of Legionella pneumophila. *Appl Environ Microbiol***72**, 4323-4328.

Tesh, M. J., Morse, S. A. & Miller, R. D. (1983). Intermediary metabolism in Legionella pneumophila: utilization of amino acids and other compounds as energy sources. *J Bacteriol***154**, 1104-1109.

Thoroski, J., Blank, G.&Biliaderis, C. (1989). Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus. J Food Prot***52**, 399-403.

Thurmer, A., Helbig, J. H., Jacobs, E. & Luck, P. C. (2009). PCR-based 'serotyping' of Legionella pneumophila. *J Med Microbiol***58**, 588-595.

Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A. & Nazemi, J. (2010). Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Phytomedicine***17**, 142-145.

Tomi, F., Bradesi, P., Bighelli, A. & Casanova, J. (1995). Computer-aided identification of individual components of essential oils using Carbon-13 NMR spectroscopy. *J Magn Reson Anal***1**, 25-34.

Tomi, F. & Casanova, J. (2006). 13C NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae - a review. *Acta Hortic***723**, 185-192.

Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G. & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother***49**, 2474-2478.

Tsai, T. F., Finn, D. R., Plikaytis, B. D., McCauley, W., Martin, S. M. & Fraser, D. W. (1979). Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. *Ann Intern Med***90**, 509-517.

Ultee, A., Kets, E. P. & Smid, E. J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Appl Environ Microbiol***65**, 4606-4610.

Ultee, A. & Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by Bacillus cereus. *Int J Food Microbiol***64**, 373-378.

Ultee, A., Bennik, M. H. & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Appl Environ Microbiol***68**, 1561-1568.

Uribe, S., Ramirez, J. & Pena, A. (1985). Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J Bacteriol***161**, 1195-1200.

Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol Rev***56**, 395-411.

Verdon, J., Berjeaud, J. M., Lacombe, C. & Hechard, Y. (2008). Characterization of anti-Legionella activity of warnericin RK and delta-lysin I from Staphylococcus warneri. *Peptides* **29**, 978-984.

Verdon, J., Falge, M., Maier, E., Bruhn, H., Steinert, M., Faber, C., Benz, R. & Hechard, Y. (2009). Detergent-like activity and alpha-helical structure of warnericin RK, an anti-Legionella peptide. *Biophys J* **97**, 1933-1940.

Vikesland, P. J., Ozekin, K. & Valentine, R. L. (2001). Monochloramine decay in model and distribution system waters. *Water Res***35**, 1766-1776.

Vogel, J. P. & Isberg, R. R. (1999). Cell biology of Legionella pneumophila. *Curr Opin Microbiol***2**, 30-34.

Wagner, C., Kronert, C., Luck, P. C., Jacobs, E., Cianciotto, N. P. & Helbig, J. H. (2007). Random mutagenesis of Legionella pneumophila reveals genes associated with lipopolysaccharide synthesis and recognition by typing monoclonal antibodies. *J Appl Microbiol***103**, 1975-1982.

Wan, J., Wilcock, A. & Coventry, M. J. (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of Aeromonas hydrophila and Pseudomonas fluorescens. *J Appl Microbiol***84**, 152-158.

Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T. & Thubthimthed, S. (2005). Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. *Fitoterapia***76**, 233-236.

Watnick, P. & Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol***182**, 2675-2679.

Yu, V. L., Plouffe, J. F., Pastoris, M. C. & other authors (2002). Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis***186**, 127-128.

Yu, J., Lei, J., Yu, H., Cai, X. & Zou, G. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Scutellaria barbata. *Phytochemistry* **65**, 881-884.

Zhao, R. J., Koo, B. S., Kim, G. W. & other authors (2005). The essential oil from Angelica gigas NAKAI suppresses nicotine sensitization. *Biol Pharm Bull***28**, 2323-2326.

Zink, S. D., Pedersen, L., Cianciotto, N. P. & Abu-Kwaik, Y. (2002). The Dot/Icm type IV secretion system of Legionella pneumophila is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect Immun***70**, 1657-1663.