



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE de TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

*Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire
à l'environnement et au biomédical (LAMAABE)*

MEMOIRE

Présenté par

Benyahia Yasmina

En vue de l'obtention du

Diplôme De MASTER En Biologie

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

***Activité antimicrobienne des composés phénoliques : Application
à l'inhibition de biofilm des bacilles thermophiles d'origine
laitière***

Soutenu le 22/06/2017, devant le jury composé de :

Présidente	Benariba Nabila	Maitre de conférences classe A	Tlemcen
Encadreur	Malek Fadila	Maitre de conférences classe A	Tlemcen
Examineur	Bensalah Fatima	Maitre de conférences classe B	Tlemcen

Année universitaire : 2016-2017

ملخص

قمنا بدراسة مدى فعالية الجزيئات الفعالة حمض التانيك حمض الغاليك والكاتيشين وقد تم اختبارها لنشاطها المضاد للبكتيريا و المضاد لتشكيل الشريط الحيوي على خمس سلالات من عصيات أليفة الحرارة و متوسطة الحرارة معزولة من الحليب المبستر بالإضافة الى خمس سلالات مرجعية *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *K. pneumoniae*. أظهرت نتائج الارومتغرام ان البكتيريا الإيجابية هي اكثر حساسية من البكتيريا السلبية. كما بينت النتائج امكانية جميع البكتيريا المدروسة على تشكيل الشريط الحيوي بشكل جيد و بكثافة بصرية تتجاوز 1 باستثناء عصية أليفة الحرارة « س » كما اظهرت النتائج ان جميع الجزيئات اثبتت فعاليتها ضد تشكيل للشريط الحيوي والذي يختلف باختلافا تركيز و كذلك الأنواع البكتيرية حيث ان *E. coli* كانت الأكثر تأثرا بكثافة بصرية 0.01 بتركيز أقصى يقدر ب: 6ملغ/مل.

الكلمات المفتاحية: الشريط الحيوي، الجزيئات الفعالة ؛ عصيات أليفة الحرارة و متوسطة الحرارة، سلالات مرجعية

Résumé

L'effet antimicrobien et anti biofilm de molécules bioactives, acide tannique, acide gallique et de la catéchine a été testé sur cinq souches isolées à partir de lait pasteurisé recombinaison et frais (lait de vache): bacilles thermophiles et bacilles mésophiles ainsi que sur des souches de références d'intérêt clinique appartenant aux espèces *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* et *E. coli*. Les résultats obtenus par la méthode de l'aromatogramme montrent que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles que les bactéries à Gram négatif à l'égard de l'acide tannique et l'acide gallique. Par contre, l'ensemble des souches testées montre une résistance vis-à-vis la catéchine.

Le potentiel de formation du biofilm s'est révélé important pour tous les souches étudiées, les DO de la masse des biofilms étant supérieurs à 1 en exception la souche thermophile (S). Les différents composés phénoliques testés présentent un effet inhibiteur sur toutes les souches testées et qui varie en fonction des concentrations et de l'espèce bactérienne avec un effet plus marqué et celui de CMIB de *E. coli* avec une DO de 0.01 à la concentration maximale de 6 mg/ml de la catéchine.

Mots clés : molécules bioactives, biofilms, bacilles thermophiles, bacilles mésophiles, souches de références, aromatogramme, CMIB.

Summary

The antimicrobial and anti-biofilm effect of bioactive molecules, tannic acid, gallic acid and catechin was tested on five strains isolated from fresh and recombined pasteurized milk (cow's milk): thermophilic bacilli and mesophilic bacilli as well as on Strains of clinical interest belonging to *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* and *E. coli*. The results obtained by the method of the aromatogram show that Gram-positive bacteria are more sensitive than Gram-negative bacteria with respect to tannic acid and gallic acid. On the other hand, all the strains tested show a resistance to the catechin.

The biofilm formation potential was found to be important for all the strains studied, the OD of the mass of biofilms being greater than 1, with the exception of the thermophilic (S) strain. The various phenolic compounds tested have an inhibitory effect on all the strains tested and which varies according to the concentrations and the bacterial species with a more marked effect and that of *E. coli* CMIB with an OD of 0.01 at the maximum concentration of 6 mg / ml catechin.

Key words: bioactive molecules, biofilms, thermophilic bacilli, mesophilic bacilli, reference strains, aromatogram, CMIB.

Remerciements

*Je tiens tout d'abord à remercier **DIEU** le tout puissant, maître des cieux et de la terre, qui m'a donné la Force, la patience et m'a permis de mener à bien ce travail.*

*Mes remerciements les plus profonds vont à mon encadreur **Mme Malek Fadila** Maître de conférences classe A au département de Biologie Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, je la remercie, qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses conseils judicieux.*

*J'adresse mes sincères remerciements à **mademoiselle Benariba Nabila** Maître de conférences classe A au département de Biologie Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, de me faire l'honneur de présider le jury.*

*Mes chaleureux remerciements vont à **Mme Bensalah Fatima** Maître de conférences classe B au département de Biologie Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Dédicaces

Je voudrais dédie ce modeste travail à :

A mes parents :

Sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Tout ce que j'ai accompli dans ma vie, c'est grâce à vous, à votre soutien, votre amour et vos sacrifices. Merci infiniment

A mon frère : Mohammed Aymen

A ma sœur : Amel

A mes chères amies : Safae, Nadjet, Houda, Dounia, Houria, Farah, Nour El Houda, Samia, Bessma, Hadjer, Nesrine, Fatiha.

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

Yasmina

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale01

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les bacilles thermophiles

1. Généralités03

2. Définition03

2.1. Les thermophiles obligatoires.....03

2.2. Les thermophiles facultatifs.....03

3. Position taxonomique04

4. Les caractéristiques générales des bacilles thermophiles 04

4.1. *Anoxybacillus flavithermus*.....06

4.2. *Geobacillus*07

4.2.1-Interet biotechnologique de *Geobacillus*07

5. Propriétés des spores des bacilles thermophiles 08

5.1. Définition.08

5.2. Structure des spores des bacilles thermophiles.....08

5.3. Propriétés de thermo résistances des bacilles thermophiles 10

6. Les conditions de germinations des spores des bacilles thermophiles en industrie
laitière.....11

Chapitre II : Le biofilm des bacilles thermophiles.....11

1. Généralité sur les biofilms.....13

2. Composition.....14

2.1. Les microorganismes.....14

2.2. La matrice (EPS).....15

3. Etapes de formation du biofilm.....15

3.1. Attachement réversible des bactéries16

3.2. Adhésion irréversible.....16

3.3. Formation de micro-colonie et production des EPS.....17

3.4. Maturation du biofilm.....17

2.3.5. Détachement et dispersion du biofilm.....	18
4. Biofilm dans l'industrie laitière.....	19
5. Les biofilm des bacilles thermophiles.....	19
5.1. Caractéristiques du Biofilm des bacilles thermophiles.....	19
5.2. Développement du biofilm des bacilles thermophiles	20
6. La résistance du biofilm aux agents antimicrobiens.....	21
Chapitre III : Activité antimicrobienne des composés phénoliques	23
1. Les tannins.....	23
1.1- Généralités.....	23
1.2- Définition	23
1.3. Structure et Classification.....	24
1.4. Propriétés physico- chimiques des tannins	25
1.4.1. La solubilité	25
1.4.2. Réaction de précipitation.....	25
1.5. Intérêt	25
1.5.1. Usages thérapeutiques	25
1.5.2. Usages industriels	26
1.6. Rôle des tannins dans les plantes.....	26
1.7. Activité antimicrobienne.....	26
2. Les catéchines	27
2.1. Généralités	27
2.2. Différents types des catéchines	27
2.3. Les bienfaits des catéchines	28
2.4. Biosynthèse des catéchines du thé vert	28
3. L'acide gallique.....	29
3.1. Origine	29
3.2. Structure de l'acide gallique.....	30

3.3. Caractéristiques de l'acide gallique	30
3.4. Activité antimicrobienne de l'acide gallique	31

Partie II : Matériel et méthodes

1. Isolement des bacilles thermophiles	32
1.1. Prélèvement	32
1.2. Préparation des dilutions décimales	32
1.3. Isolement des bactéries thermophiles/mésophiles	32
1.3.1. Sans enrichissement.....	32
13.1.1. Ensemencement	32
1.3.2. Après enrichissement.....	32
2. Identification des isolats.....	34
2.1. Critères morphologiques	34
2.1.1. Examen macroscopique.....	34
2.1.2. Examen microscopique	34
2.1.3. Coloration de gram	34
2.1.4. Observation de la spore	35
2.2. Critères biochimiques	35
2.2.1. Test de catalase.....	35
3. Conservation des souches.....	35
4. Formation de biofilm.....	35
4.1. Inoculation des microplaques	35
4.2. Coloration au cristal violet.....	36
4.3. Lecture des plaques.....	36
5. Détermination de l'activité antimicrobienne des composés phénoliques	38
5.1. Préparation des solutions des molécules bioactives	38
5.2. Préparation des cultures	38
6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de biofilm(CMIB).....	39

Partie III : Résultats et discussion

Résultats	41
------------------------	----

1. Identification phénotypique des souches isolées	41
1.1. Les caractères cultureux	41
1.2. Les caractères microscopiques	42
1.3. Les caractères biochimiques	43
2. Evaluation du potentiel de formation de biofilm.....	43
2.1. Lecture directe.....	43
2.2. Lecture indirecte	44
2.2.1. Formation de biofilm des bacilles thermophiles et mésophiles.....	45
2.2.1.1. Les bacilles thermophiles	45
2.2.1.2. Les bacilles mésophiles	46
2.2.2. Formation du biofilm des souches de références.....	46
4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des composés phénoliques.....	47
4.1. Détermination des diamètres d'inhibitions.....	47
4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	49
4.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du biofilm (CMIB).....	51
Discussion	54
Conclusion	57
Références bibliographiques.....	58
Annexes.....
Résumés.....

Liste des figures

Figure 01 : Photographie en microscopie électronique à transmission d'une spore de <i>B. Licheniformis</i> produite à 45°C (a, x72 000), de <i>B. subtilis</i> (b) et de <i>B. anthracis</i> (c).....	09
Figure 02 : Photomicrographies des motifs de localisation des spores de <i>B. cereus</i> et de <i>B. megaterium</i>	10
Figure 03 : Micrographe électronique de balayage d'un biofilm indigène qui s'est développé sur une surface d'acier doux dans une période de huit semaines dans un circuit de refroidissement industriel	14
Figure 04 : Les étapes de développement du biofilm bactérien.....	16
Figure 05 : Photographie en microscopie électronique d'un canal de transport des nutriments.....	18
Figure 06 : Micrographie électronique à balayage d'un <i>A.flavithermus</i> 18h biofilm sur la surface d'acier inoxydable.....	20
Figure 07 : Drogue à tannins hydrolysables (<i>Hamamelis virginiana</i>).....	24
Figure 08 : Drogue à tannins condensés (<i>Pinus maritima</i>).....	24
Figure 09 : La plante <i>Camellia sinensis</i> (catéchine).....	27
Figure 10 : La structure des différents types de catéchines.....	28
Figure 11 : Biosynthèse des catéchines dans les feuilles de thé vert « <i>Camellia sinensis</i> ».....	29
Figure 12 : Structure chimique de L'acide gallique.....	30
Figure 13 : Le protocole de la mise en culture des bacilles mésophiles et thermophiles.....	33
Figure 14 : Schémas représentant le protocole de formation des biofilms par la méthode au cristal violet.....	37
Figure 15 : Aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA.....	41
Figure 16 : Observation microscopique des bacilles thermophiles après la coloration de Gram (G x 100 a immersion).....	42
Figure 17 : Formation de biofilm dans les microplaques de titration.....	44
Figure 18 : Biomasse des biofilms des formes par les bacilles mésophiles et thermophiles.....	45
Figure 19 : Biomasse des biofilms de cinq souches de référence.....	46

Figure 20 : Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques et des puits	49
Figure 21 : Effet inhibiteur des composés phénoliques sur la formation de biofilm bacille thermophile (24).....	51
Figure 22 : Effet inhibiteur des composés phénoliques sur la formation de biofilm de bacille mésophile (Y).....	51
Figure 23 : Effet inhibiteur des composés phénoliques sur la formation de biofilm de <i>S.aureus</i>	52
Figure 24 : Effet inhibiteur des composés phénoliques sur la formation de biofilm de <i>E.</i> <i>coli</i>	52
Figure 25 : Effet inhibiteur des composés phénoliques sur la formation de biofilm de <i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	52

Liste des tableaux

Tableau 01 : Reclassification taxonomique du genre <i>Bacillus</i> (1986- 2004)	05
Tableau 02 : Caractéristiques de quelques bacilles thermophiles	06
Tableau 03 : Activité antimicrobienne du tannin isolé à partir de <i>S.trilobatum</i>	26
Tableau 04 : Concentration minimale inhibitrice (MIC) de l'acide gallique	31
Tableau 05 : Préparation des solutions des molécules bioactives	38
Tableau 06 : Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.....	39
Tableau 07 : Aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA après 24h d'incubation.....	42
Tableau 08 : Diamètre d'inhibition des acides phénoliques et de la catéchine sur les souches testées.....	48
Tableau 09 : Activité antimicrobienne des acides phénoliques et de la catéchine exprimée en concentration minimale inhibitrice (mg/ ml).....	50

Liste des abréviations

PIA : Polysaccharide intercellular adhesin

PNAG : Polysaccharide poly-N-acetylglucosamine

TSA : Trypticase Soja —agar

UV : Ultraviolet

PAS : Petites protéines solubles

DPA : L'acide dipicolinique

QS : Quorum-Sensing

PM : Poids moléculaire

EGCG : L'épigallocatechine gallate

TSB : Trypticase soja bouillon

DO : Densité optique

UFC : Unité formatrice colonie

EDS : Eau distillé stérile

DO_f: Densité optique de la formation du biofilm

Introduction générale

L'industrie laitière est considérée comme l'une des principales industries alimentaires dans le monde qui commercialise une large gamme de différents produits laitiers dont le lait.

Le lait occupe une place stratégique dans l'alimentation quotidienne de l'homme, grâce à sa richesse en éléments nutritifs, c'est aussi un milieu de culture idéal pour plusieurs types de microorganismes. Parmi eux, les bactéries sporulées sont très présentes dans l'environnement laitier, où elles peuvent persister pendant des années. Cette flore bactérienne particulière est caractérisée par le grand pouvoir d'adhésion des spores sur les surfaces en acier inoxydable des équipements laitiers et leur capacité de former des biofilms difficiles à éliminer par les procédures de nettoyage et désinfection traditionnelles.

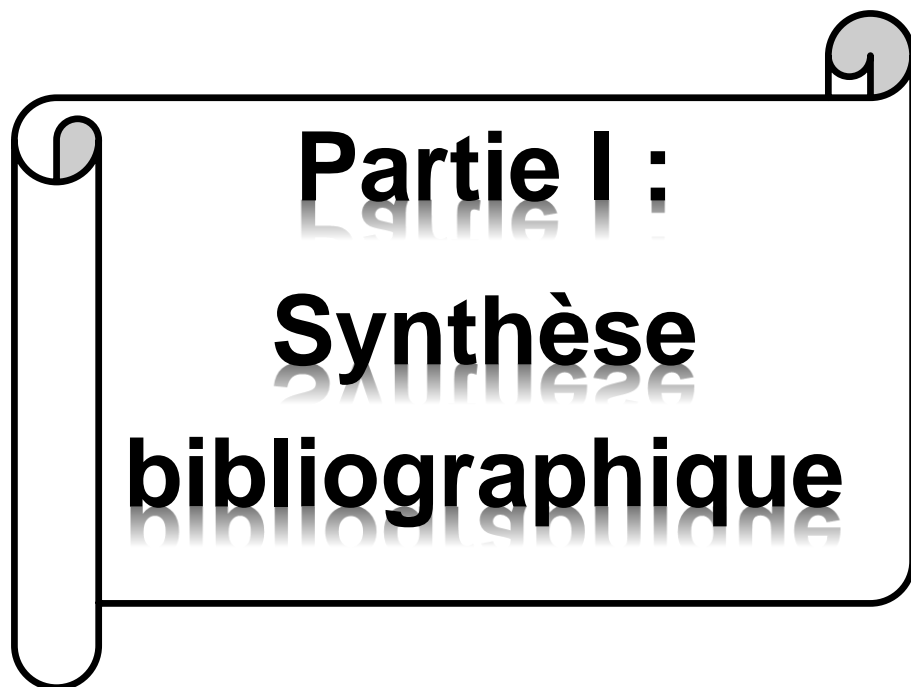
Un biofilm est défini comme une communauté microbienne sessile caractérisée par l'adhésion à une surface solide, qui se forme sur tous les types de surfaces des systèmes technologiques dans l'industrie laitière ce qui entraîne une altération de la qualité et de la sécurité des produits finis (Marchand *et al.*, 2012). Les microorganismes organisés en biofilm ont la capacité de résister aux agents antimicrobiens classiques (antibiotiques, biocides). L'utilisation des agents antimicrobiens naturels peut être une alternative ou un complément efficace pour le contrôle des microorganismes, et fait l'objet d'une recherche scientifique intensive.

En effet, les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs qui ont reçu un grand intérêt en phytothérapie. Elles sont capables de produire de nombreux métabolites secondaires parmi lesquels on distingue les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques ou polyphénols. Avec leur diversité structurale remarquable, les polyphénols sont considérés comme des composés universels des végétaux. Structurellement, ils constituent les principes actifs de nombreuses plantes médicinales. D'une manière générale, ils sont présents dans toutes les plantes vasculaires et sont caractérisés par des activités anti-oxydantes, anti-inflammatoires et antimicrobiennes.

L'objectif principal assigné à ce travail est l'évaluation de l'activité antimicrobienne et anti biofilm des composés phénoliques sur des bacilles sporulés

aérobies mésophile et thermophiles d'origine laitière, en comparaison avec des souches bactériennes de référence. Le plan expérimental est le suivant :

1. Isolement des bacilles thermophiles et mésophiles à partir de lait pasteurisé recombinaé et frais (lait de vache).
2. Identification phénotypique des souches isolées.
3. Evaluation du potentiel de formation du biofilm des souches isolées (bacilles thermophiles, bacilles mésophiles) et des souches de références.
4. Evaluation de l'activité antimicrobienne des acides phénoliques : acide tannique, acide gallique et de la catéchine sur les souches isolées et les souches de référence selon deux approches :
 - Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la méthode de l'aromatogramme.
 - Détermination de la concentration minimale inhibitrice de la formation de biofilm (CMIB) en utilisant la méthode au cristal violet dans les microplaques de titration a 96 puits.



Partie I :
Synthèse
bibliographique



Chapitre I :
Les bacilles
thermophiles

Chapitre I : Les bacilles thermophiles

1. Généralités

Les bacilles thermophiles comme *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus* spp. constituent un groupe essentiel de contaminants dans l'industrie laitière. Leur présence dans les produits laitiers est un indicateur d'une mauvaise hygiène, inacceptable par les consommateurs. Ceci est dû à la capacité de ces bactéries de former des endospores et des biofilms sur les équipements laitiers. En effet, leur croissance peut entraîner des altérations des produits laitiers, causés par la production des acides ou des enzymes, conduisant potentiellement à des défauts saveurs. Les bacilles thermophiles présentent aussi une large gamme de température de croissance optimale, caractérisée par un taux de croissance rapide (temps de génération environ 15 à 20 min) et une aptitude à former des biofilms (**Burgess et al., 2010**).

2. Définition

Les bacilles thermophiles sont des contaminants potentiels dans une variété d'industries où les températures élevées (40-65°C) prévalent lors du processus de fabrication ou de stockage (**Burgess et al., 2010**). Dans l'industrie laitière, les bacilles thermophiles sont formés d'espèces qui se développent de façon optimale à 55°C sur l'acier inoxydable (**Parkar et al., 2004**). Ils peuvent être divisés en deux groupes :

2.1. Les thermophiles obligatoires

Les thermophiles obligatoires ne poussent qu'à des hautes températures entre 50 à 65°C et comprennent *Anoxybacillus flavithermus* et *Geobacillus* spp. (**Flint et al., 2001**).

2.2. Les thermophiles facultatifs

Appartiennent au genre *Bacillus* et ont tendance à croître à des températures à la fois mésophiles et thermophiles, selon la souche. Quelques exemples d'espèces comprennent *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sporothermodurans* (**Burgess et al., 2010**).

3. Position taxonomique

Le genre *Bacillus* est un groupe vaste et diversifié de bactéries Gram positives (à Gram-variable) aérobie et anaérobie facultatives, en forme de bâtonnet, formant des endospores. Ce genre comprend les bactéries thermophiles, psychrophiles, acidophiles et alcalophiles. Le genre *Bacillus* a connu de grands changements sur le plan taxonomique et a été divisé en plusieurs nouveaux genres. A titre d'exemples *Bacillus stearothermophilus* est reclassés dans le nouveau genre *Geobacillus*, et *B. flavothermus* reclassés en *A.flavithermus* (Nazina et al., 2001). Avant 2001, en industrie laitière *A.flavithermus* pouvait par défauts être identifiée comme *B.stearothermophilus* (Nazina et al., 2001 ; Burgess et al., 2010). Le tableau (01) montre les changements opérés dans la classification du genre *Bacillus*.

4. Les caractéristiques générales des bacilles thermophiles

Le genre *Bacillus* et les bacilles thermophiles obligatoires ont généralement des besoins nutritionnels simples. Par conséquent, ils n'ont pas besoins des acides aminés spécifiques pour leur croissance et sont capables de se développer sur des milieux simples. La température de croissance optimale des bacilles thermophiles comprise entre 50 et 65°C, mais varie entre les espèces et les souches. Les caractéristiques de certains des bacilles thermophiles sont décrites dans le tableau (02) (Burgess et al., 2010).

Tableau 01 : Reclassification taxonomique du genre *Bacillus* (1986- 2004)

(www.textbookofbacteriology.com).

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1ere ed .1986)	Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1ere ed .2004)
<i>Bacillus acidocalderius</i>	<i>Acyclobacillus acidocalderius</i>
<i>Bacillus agri</i>	<i>Brevibacillus agri</i>
<i>Bacillus algénolyticus</i>	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>
<i>Bacillus amylolyticus</i>	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
<i>Bacillus alvei</i>	<i>Paenibacillus alvei</i>
<i>Bacillus azotofixans</i>	<i>Paenibacillus azotofixans</i>
<i>Bacillus brevis</i>	<i>Brivibacillus brevis</i>
<i>Bacillus globisporus</i>	<i>Sporosarcina globisporus</i>
<i>Bacillus larvae</i>	<i>Paenibacillus larves</i>
<i>Bacillus laterosporus</i>	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
<i>Bacillus Lentimorbus</i>	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>
<i>Bacillus marcerans</i>	<i>Paenibacillus marcerans</i>
<i>Bacillus pasteurii</i>	<i>Sporosarcina pasteurii</i>
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
<i>Bacillus popiliae</i>	<i>Paenibacillus popiliae</i>
<i>Bacillus psychrophilus</i>	<i>Sporosarcina psychrophila</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>

Tableau 02 : Caractéristiques de quelques bacilles thermophiles (Burgess et al., 2010).

	Les thermophiles obligatoires		Les thermophiles facultatifs	
	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus Lichenformis</i>	<i>Bacillus Coagulans</i>
T max (° C)	65-72	65-68	50-55	57-61
T min (° C)	30-38	37	15	15-25
Croissance anaérobie	Oui	Non	Oui	Oui
PH	6.0-9.0	6.0-8.0	5.5-8.5	4.0-10.5
Sporange gonflé	Oui	Oui	Non	Variable
Position de Spore	Terminal	Terminal	Central	Sub-terminal

T max (° C) : température de croissance maximale.

T min (° C) : températures de croissance minimale.

4.1. *Anoxybacillus Flavithermus*

A.flavithermus est décrit comme un thermophile obligatoire anaérobie facultatif, mobile, avec des endospores terminales, avec une capacité de se développer dans la gamme de pH de 6 à 9. La température de croissance est comprise entre 30 et 70°C avec un optimum de croissance à 60°C. Cependant, les isolats obtenus à partir du lait en poudre ont tendance à avoir une température optimale de croissance comprise entre 50 et 65°C (Burgess et al., 2010). Les membres du genre *Bacillus* et les bacilles thermophiles obligatoires ont généralement des besoins nutritionnels simples ; par conséquent, ils ne nécessitent pas des acides aminés spécifiques pour leurs croissances et sont capables de croître

sur des milieux simples tels que le milieu tryptone soja agar (TSA) (**Ronimus et al., 2003 ; Burgess et al., 2010**).

4.2. *Geobacillus*

Au cours des dix dernières années, une attention particulière a été accordée à la systématique des bacilles, en particulier aux bacilles thermophiles du groupe génétique cinq (**kuisieneet et al., 2004**). Après 1980, d'autres espèces thermophiles ont été proposées sur la base d'analyses phénotypiques, puis l'application ultérieure du séquençage du gène de la sous unité 16S de l'ARN ribosomal. Des membres du genre *Bacillus* tels que *B.stearotherophilus*, *B.kaustophilus*, *B.thermoglucosidasius*, *B.thermocatenulatus* et *B.thermoleovorans* formaient une lignée génétique, appelée groupe cinq (**Ash et al., 1991**).

En 2001, après la découverte de deux nouvelles espèces aérobies thermophiles formant des spores dans les réservoirs de pétrole. **Nazina et al., (2001)** proposèrent que les espèces du groupe cinq soient classées dans un nouveau genre appelé *Geobacillus*. La température de croissance optimale de ce genre est au-dessus de 55°C. Les bactéries appartenant au genre *Geobacillus* ont été isolées à partir des zones de haute température, ainsi que les environnements chauds, tels que les sources d'eau chaude, mer profonde sédiments, et les usines laitières (**Nazina et al., 2001**).

4.2.1. Intérêt biotechnologique de *Geobacillus*

Les caractéristiques des bacilles thermophiles rendent la bactérie *Geobacillus* (*geobacilli*) attrayante pour l'industrie biotechnologique en tant que sources d'enzymes thermostables et de produits naturels. Des enzymes d'importance industrielle Provenant de *Geobacillus* spp. comprennent des lipases des glycosides hydrolases, l'ADN polymérase et la protéase. Les avantages de l'utilisation des bactéries thermophiles comme biocatalyseurs à cellules entières comprennent un risque réduit de contamination, accélération des processus biochimiques et maintenance plus facile des conditions anaérobies (**David, 2014**). Par contre, *Geobacillus* spp. sont des germes d'altérations et des contaminants communs dans les industries des produits laitiers et alimentaires (**Burgess et al., 2010**).

5. Propriétés des spores des bacilles thermophiles

5.1. Définition

Certaines bactéries à Gram positif telles que *Bacillus* et *Clostridium* spp. ont la capacité de former une structure dormante appelée endospores, ou simplement : Les spores, lorsqu'elles rencontrent des stratégies de stress environnementales, comme le manque de nutriments dans le milieu (**Leggett et al., 2012**). Les spores bactériennes sont un type de cellules différenciées, métaboliquement inactives et très résistantes à la dessiccation, la chaleur, les UV et les radiations, ou encore les produits chimiques (**Setlow, 2006**). Les mécanismes de sporulation, processus de germination et de résistance sont *mieux* connus chez les bacilles mésophiles que chez les thermophiles (**Postollec, 2012**).

5.2. Structure des spores des bacilles thermophiles

La structure et la composition chimique des spores de *Bacillus* diffèrent considérablement des cellules végétatives. Ces différences reflètent en grande partie les propriétés de résistances uniques de la spore aux contraintes environnementales, y compris la chaleur, les rayonnements, les désinfectants et les stérilisants (**Sella et al., 2014**). La spore dormante peut survivre pendant de longues périodes, même dans un état hydraté (**Setlow, 2007 ; Leggett et al., 2012**). La spore est souvent décrite comme un empilement de couches de membranes et enveloppes. De l'extérieur en passant vers l'intérieur les couches de spores comprennent, la couche la plus externe nommé l'exosporium, le manteau, le cortex, la membrane interne et le noyau central ou le protoplaste (**Figure 01**) (**Setlow, 2006**).

L'exosporium est une large structure retrouvée chez la plupart des espèces, en particulier celles du groupe *Bacillus* comme *B.anthraxis*, *B.cereus* mais est absente chez les spores de *B.subtilis*. Cependant, dans les spores de *B.anthraxis* l'exosporium peut agir comme une barrière de perméabilité (**Stelow, 2014**). Elle joue un rôle dans la résistance à des traitements chimiques. De plus, il améliore les propriétés d'adhésion des spores aux différentes surfaces (**Faille et al., 2007**). Sous l'exosporium, les spores formées par *Bacillus* sont enfermés dans un réseau de protéines appelés tuniques. Ils jouent un rôle dans la protection des spores, ils confèrent à la spore une résistance contre les enzymes, également sont impliquées

dans la germination des spores (Setlow, 2006). En dessous de la tunique, se retrouve le cortex qui est composé de peptidoglycane, qui est bien conservée chez *B.subtilis*, *B.cereus* et à l'intérieur de cortex se trouvent les derniers couches de spores la membrane interne et protoplaste (Setlow, 2014).

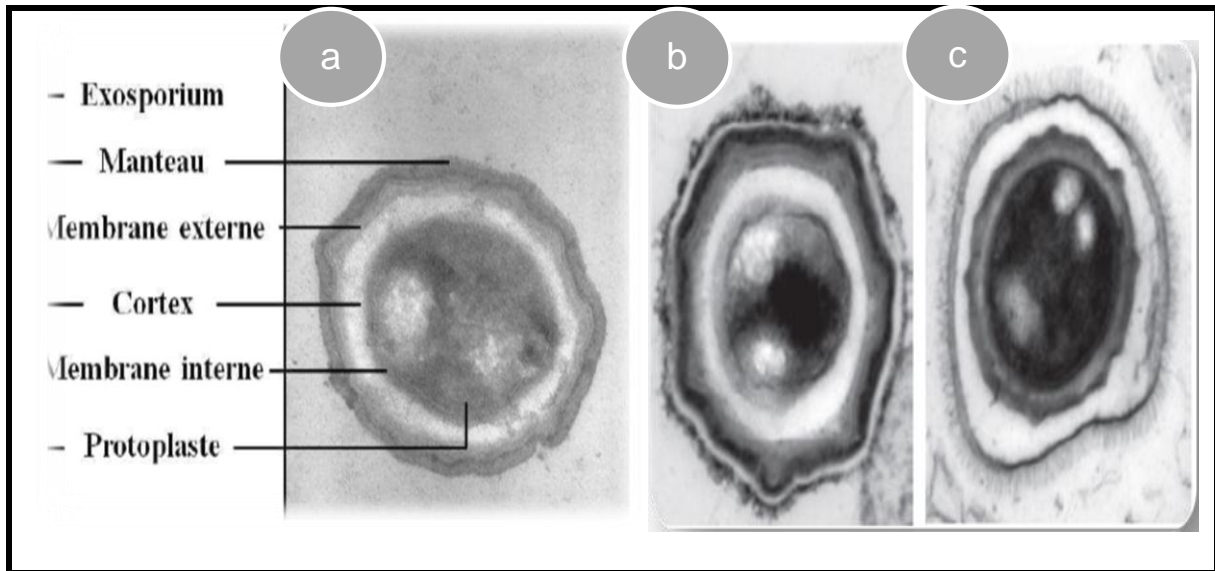


Figure 01 : Photographie en microscopie électronique à transmission d'une spore de *B.Licheniformis* produite à 45°C (a, x72 000), de *B.subtilis* (b) et de *B.anthraxis* (c) (Bernard, 2009 ; Abbas, 2014).

La plupart des espèces celles du groupe *Bacillus* tels que *B.cereus*, *B.megaterium* sont caractérisés par une apparition de trois motifs de localisation des spores dans leurs corps bactériens : spore terminale, sub-terminale et centrale (figure02) (Hitchins, 1976).

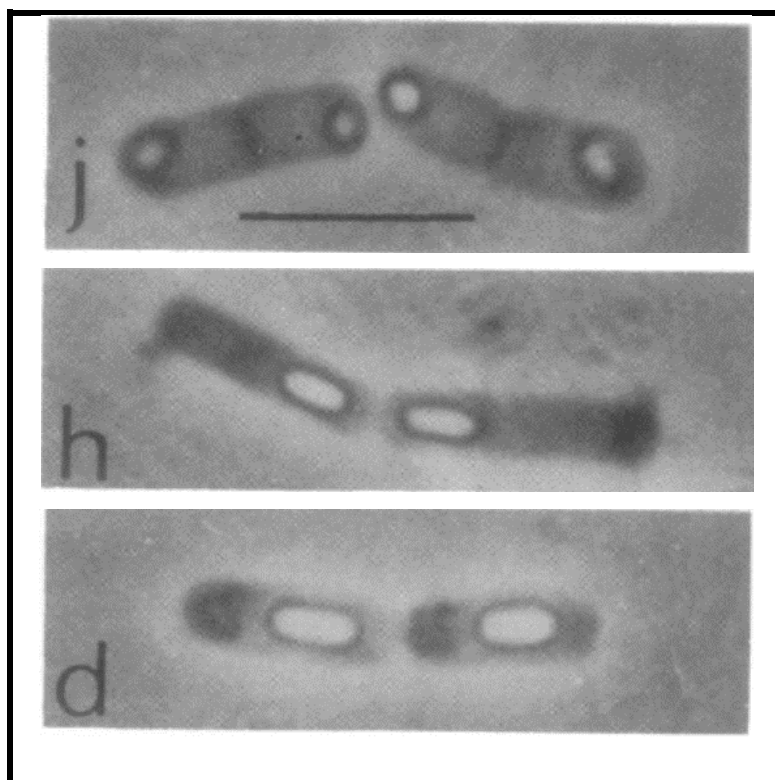


Figure 02 : Photomicrographies des motifs de localisation des spores de *B.cereus* et de *B. megaterium*. **J** : spore terminale ; **h** : spore sub-terminale ; **d** : spore centrale (**Hitchins, 1976**)

5.3. Propriétés de thermo résistances des bacilles thermophiles

Les bactéries formant des endospores de la famille Bacillaceae sont considérées comme des facteurs majeurs de la qualité et de sécurité des produits laitiers qui dépend à une stratégie dont le traitement thermique pour détruire la cellule végétative et choisir la forme sporulée. En outre, les spores bactériennes diffèrent entre elle par rapport à la résistance thermique. Les spores des bactéries thermophiles sont sélectionnées lors du processus de fabrication des poudres laitiers modérés tels que la pasteurisation, car leurs spécifications en poudre sont de plus en plus strictes. Les spores des bactéries thermophiles telles que *Geobacillus* spp. sont plus résistantes que les spores des bactéries mésophiles comme *Bacillus licheniformis* (**kent, 2016**). Et sont une préoccupation majeure en industrie agro-alimentaire à cause de leur extrême résistance (**Nicholson et al., 2000**). Elles sont capables de survivre aux contraintes environnementales, y compris le PH, la chaleur les agents chimiques et les rayonnements (**kent, 2016**) ce qui rend très difficile leur

destruction dans les produits laitiers par les procédés de fabrication (Ponce et al., 2008).

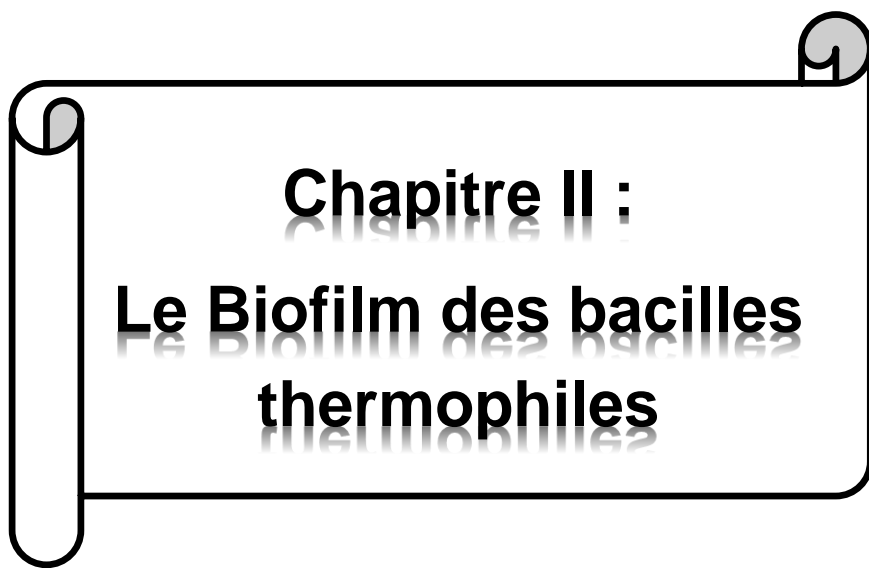
Plusieurs propriétés participent à la résistance des spores de *Bacillus*, y compris, leur faible teneur en eau, de petites protéines (PAS) solubles dans l'acide et l'acide dipicolinique (DPA) (Ponce et al., 2008 ; Stelow, 2014). Le principal facteur qui détermine la résistance des spores à la chaleur humide est la teneur en eau du cœur. Chez *Bacillus*, plus la teneur en eau est faible, plus les spores sont résistantes à la chaleur humide (Setlow, 2006). Un autre facteur semble être important dans la résistance des spores à la chaleur humide, il s'agit de l'acide dipicolinique (DPA), constituant important du cœur de la spore. Il a été montré que les spores avec un faible taux de DPA étaient plus sensibles à la chaleur humide que celles avec un taux élevé (Setlow, 2006). Le cœur de la spore contient également un taux extrêmement élevé de minéraux sous la forme de cations divalents principalement Ca^{+2} et Mg^{+2} . En général, plus la concentration de ces cations est élevée, plus les spores sont résistantes à la chaleur humide (Nicholson et al., 2000).

6. Les conditions de germinations des spores des bacilles thermophiles en industrie laitière

La germination des spores dormantes des espèces de *Bacillus* est la première étape cruciale dans le retour des spores à la croissance végétative est induite par des nutriments (Setlow, 2003). Les spores peuvent rester en sommeil pendant des périodes prolongées et possèdent une résistance remarquable aux dommages environnementaux, tels que la chaleur, les rayonnements, les produits chimiques toxiques. Dans des conditions environnementales favorables, la spore interrompt la dormance et redémarre la croissance dans un processus appelé germination et croissance de spores (Setlow, 2003).

La germination est un processus essentiellement biophysique aboutissant la perte des propriétés spécifiques des spores telles que leur structure unique, leur extrême résistance et leur dormance. Elle se produit sans nécessité de synthèse de nouvelles macromolécules car l'appareil de germination est déjà présent dans la spore mature en dormance (Moir, 2006). Le processus de germination se produit dans les trois étapes suivantes : l'activation, l'initiation et l'excroissance (Setlow, 2003 ; Burgess et al., 2010).

1. Activation : Elle se réalise par des agents capables de détruire les tuniques sporales tels que la chaleur.
2. Initiation :
 - Débute dans des conditions favorables d'hydratation et de nutrition qui pénètrent à travers les enveloppes endommagées et déclenchent un processus auto lytique.
 - Dégradation des constituants sporaux par des enzymes hydrolytiques.
3. Excroissance :
 - Emergence d'une nouvelle cellule végétative
 - Reprise des activités de biosynthèse (protéine, ADN).



Chapitre II :
**Le Biofilm des bacilles
thermophiles**

Chapitre II : Le biofilm des bacilles thermophiles

1. Généralité sur les biofilms

La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. On estime d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme de ce qu'on appelle biofilm (**Filloux & Vallet, 2003**), y compris différents types de micro-organismes tels que ceux qui causent des altérations alimentaires et les espèces pathogènes qui sont responsables de nombreuses infections (**Srey et al., 2013**). En outre, ce mode de vie est un mécanisme qui permet la croissance des micro-organismes dans des milieux différents, et permet par le biais de la coopération bactérienne une protection importante contre les facteurs environnementaux (défenses de l'hôte et des prédateurs, substances toxiques, la dessiccation et contre les agents antimicrobiens). Il permet aussi la fabrication et la capture de nutriments par alimentation croisée entre bactéries. Enfin, il est capable de créer en son sein un environnement physicochimique favorable à la croissance des différentes espèces qui le composent (**Dufour & Svoboda, 2005**).

Les biofilms sont généralement définis en tant que des agrégats de cellules bactériennes croissant activement à une surface naturelle ou artificielle et enrobé d'une matrice polymérique (**Filloux & Vallet, 2003 ; Tremblay et al., 2015**). Les bactéries en biofilm peuvent tout aussi bien adhérer à une surface biotique (ex : cellules de la muqueuse) qu'à une surface abiotique (canalisations, coques des navires et cathéters) (**Figure 03**), comme il est possible à un biofilm d'adhérer sur des matériaux « anti-adhésifs » tels que le polytétrafluoroéthylène (ou téflon) (**Uhlich et al., 2006 ; Tremblay et al., 2015**). De plus, les biofilms adultes sont des structures bien organisées dans lesquelles les canaux d'eau sont dispersés et peuvent fournir des passages à l'échange d'aliments, métabolites et produits inutilisés (**Akbas, 2015**). En outre, les bactéries présentes dans un biofilm possèdent des propriétés très différentes de leurs homologues planctoniques (bactéries libres en suspension) parmi lesquelles des modifications structurales telles que la disparition des flagelles, la synthèse d'exopolymères, la mise en place d'un système de communication chimique quorum sensing (**Flemming, 1990 ; Costerton et al.,**

1995). Ces bactéries expriment un phénotype différent de celles en suspension dans lequel entre 3 et 50% du protéome total est modifié par rapport à celui des cellules planctoniques (Sauer, 2003 ; Jouenne *et al.*, 2004).

La formation et le développement de biofilms sont affectés par multiples facteurs comme les propriétés de surface des matériaux, et les paramètres environnementaux (tels que le pH, la teneur en éléments nutritifs et la température) (Sirey *et al.*, 2013).

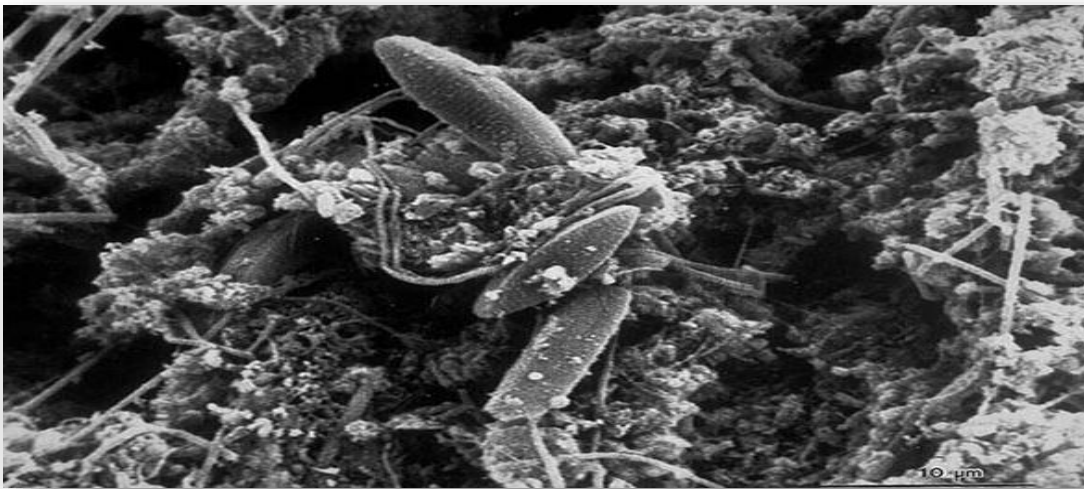


Figure 03 : Micrographe électronique de balayage d'un biofilm qui s'est développé sur une surface d'acier pendant huit semaines dans un circuit de refroidissement industriel (Donlan, 2002).

2. Composition

Selon Costerton (1999), le biofilm est composé essentiellement de la matrice qu'ils synthétisent et de microorganismes. La matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée du biofilm bien que les microorganismes représentent 2 à 5 % de la matrice du biofilm selon l'espèce impliquée.

2.1. Les microorganismes

Un biofilm est composé de communautés complexes des bactéries au sein desquelles on peut trouver des multiples espèces attachées à différents matériels (Akbas, 2015).

Dans des conditions naturelles, les biofilms mono espèce sont relativement rare dans le milieu industriel en raison pression de la sélection exercer par les conditions de processus technologique (**Sutherland, 2001 ; Malek et al., 2013**). En effet, la plupart des biofilms sont souvent composés de différents types de microorganismes : bactéries, algues, protozoaires, mycètes, dans lequel chaque groupe exécutant des fonctions métaboliques spécialisées (**Branger et al., 2007 ; Alnnasouri, 2010**).

2.2. La matrice(EPS)

La formation de la matrice est un processus dynamique qui dépend de la disponibilité nutritive, la synthèse et la sécrétion de matière extracellulaire (**Flemming et al., 2016**). Cette matrice peut être constituée non seulement de polysaccharides, mais elle comprend aussi des protéines, des acides nucléiques, des agents tensioactifs, des lipides, des glycolipides et des cations. Cette composition est variée selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (**Tremblay et al., 2014**). Elle fournit aux microorganismes des avantages structurels et fonctionnels, tels que :

1. L'hydratation.
2. La capture de ressources.
3. La capacité digestive.
4. La protection et la résistance aux agents antimicrobiens.
5. Les interactions réciproques intercellulaires qui peuvent améliorer la capacité du métabolisme de cellules dans le biofilm (**Flemming et al., 2016**).

3. Etapes de formation du biofilm

La formation d'un biofilm se fait en plusieurs étapes selon un modèle bien établi (**Figure 04**) : (**Marchand et al., 2012**).

1. Adhésion réversible des bactéries.
2. Adhésion irréversible.
3. Formation des micro-colonies et production d'EPS.
4. Maturation du biofilm.
5. Détachement et dispersion du biofilm.

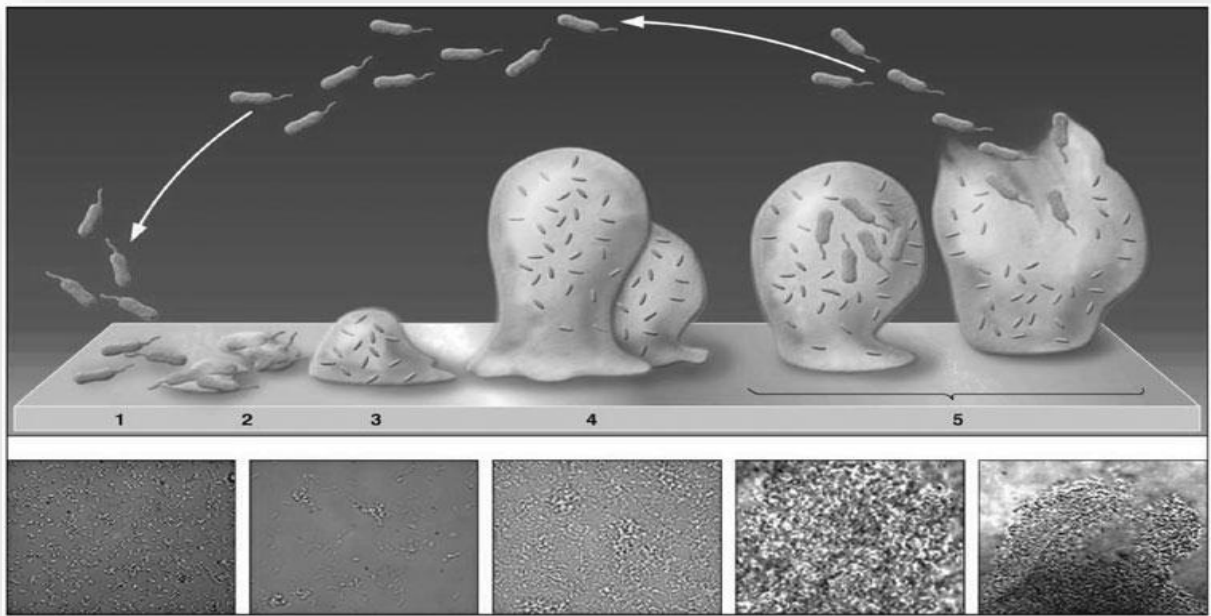


Figure 04 : Les étapes de développement biofilm bactérien (Marchand et al., 2012).

3.1. Attachement réversible des bactéries

Dans un premier temps, les cellules bactériennes sous forme planctonique vont venir s'associer à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire de transport passif (ex : Sédimentation) ou alors de transport actif en faisant notamment intervenir des structures particulières de la surface de la bactérie tels que : flagelles chez *Pseudomonas aeruginosa*, et PNAG ou PIA qui présentent la molécule d'adhésion la plus importante chez les staphylocoques (Goetz et al., 2016). En outre, dans le cas de *B.cereus*, il a été montré que les flagelles ont aussi un rôle important dans l'initiation du biofilm dans des conditions statiques à l'interface air-liquide (Houry et al., 2010). Il s'en suivra une adhésion réversible correspondant à un attachement faible des cellules bactériennes à la surface déclenchée, lorsque les microorganismes arrivent sur le support à une certaine distance, et faisant intervenir des forces non covalentes ou des interactions faibles de type forces de Van der Waals et liaisons électrostatiques (Bos et al., 1999 ; Akbas, 2015 ; Goetz et al., 2016).

3.2. Adhésion irréversible

Dans un deuxième temps, grâce à la sécrétion d'exopolymères par les bactéries qui leur permettent de renforcer leur fixation au support, l'adhésion devient

irréversible (**Branger et al., 2007**). Dans ce cas, interviennent des interactions fortes et de courte distance qui apparaissent lorsque la distance devient inférieure à 3 nm, et comprennent les interactions hydrophobes, acides-base de Lewis, la formation de dipôle, les liaisons covalentes et les interactions d'hydrogène (**Malek, 2013 ; Akba, 2015**).

3.3. Formation des micro-colonies et production d'EPS

Durant cette étape, lorsque les bactéries sont irréversiblement attachées à la surface sera définitif, elles vont s'agréger entre elles et se diviser en utilisant les nutriments présents dans le film de conditionnement et l'environnement liquide. Ceci mène à la formation des micro colonies qui s'élargissent et s'unissent pour former une couche cellulaire couvrant la surface (**Otto, 2013 ; Mogha et al., 2014 ; Goetz et al., 2016**). Il y aura alors une phase durant laquelle la densité bactérienne atteint un certain seuil, qui permettra au quorum sensing de participer à la maturation du biofilm (**Otto, 2013**). Une fois l'intensité de ses signaux abouti un niveau précise, les mécanismes génétiques contrôlant la production d'EPS sont activés (**Costerton et al., 1999**). Ces EPS jouent un rôle immense dans la protection des biofilms contre les agressions extérieures, qu'elles soient mécaniques, physiques, chimiques ou cellulaires ainsi que dans l'ancrage de cellules à la surface (**Lebeaux et al., 2014 ; Mogha et al., 2014**).

3.4. Maturation du biofilm

Par la suite la croissance exponentielle de biofilm se traduisant par une augmentation favorable de son épaisseur jusqu'à la formation d'un film hétérogène tridimensionnel (**Costerton et al., 1995**). Le biofilm mature se caractérise par la formation des canaux aqueux, qui vont entraîner la séparation des microorganismes d'une part, et permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments dans les parties enfuies du biofilm d'autre part, ainsi que l'évacuation des déchets (**figure 05**). Le biofilm se développe, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique, en présence des conditions optimales (**Filloux &Vallet, 2003**).

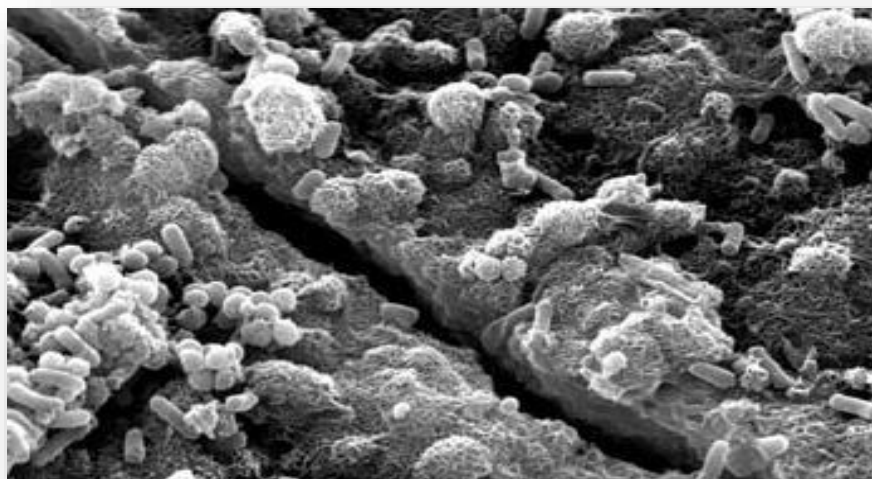


Figure 05 : Photographie en microscopie électronique d'un canal de transport des nutriments dans un biofilm (Stickler, 2008).

3.5. Détachement et dispersion du biofilm

Une fois la taille maximale du biofilm atteinte, les bactéries jointes afin de survivre et coloniser de nouveaux créneaux doivent pouvoir se détacher et se disperser du biofilm (Mogha *et al.*, 2014). Le détachement de cellules de surface peut être régulé par le quorum sensing, et qu'a également ceci aura une influence sur les différentes étapes de la formation du biofilm (Tremblay *et al.*, 2014 ; Akbas, 2015). Principalement, les cellules filles sont détachées en premier du biofilm, suite à divers facteurs tels que : perturbation mécanique (ex : forces de cisaillement), les dynamiques des fluides, une dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire (ex : DNase) (Mogha *et al.*, 2014 ; Goetz *et al.*, 2016). Le détachement de biofilm a été divisé en trois processus : érosion, abrasion et sloughing :

1. L'érosion : est le résultat des forces de cisaillement en milieu liquide.
2. L'abrasion (la collision de particules) : Se réfère au détachement continu de cellules simples ou bien des petits groupes cellulaires et affecte la surface totale du biofilm.
3. Sloughing : Correspond à la perte instantanée des grandes parties du biofilm, affectant non seulement le biofilm entier mais aussi la surface de biofilm (Mogha *et al.*, 2014).

Les bactéries détachées retournent à l'état planctonique trouvent de nouvelles surface et recommencent un nouveau cycle de formation de biofilm (Srey et al., 2013 ; Akbas, 2015).

4. Biofilm dans l'industrie laitière

La capacité de certains micro-organismes à former des biofilms continue d'entraîner un problème majeur pour différentes industries. Cependant toutes les branches de l'industrie alimentaire, y compris les secteurs des produits laitiers sont remis en cause par les problèmes des biofilms en libérant des bactéries qui compromettent la sécurité et la qualité du produit fini (Parkar et al., 2004 ; Srey et al., 2013). En effet, les principales sources de contamination des produits laitiers sont souvent dues au manque de désinfection d'équipement et/ou au mauvais nettoyage (Srey et al., 2013).

Dans les conditions favorables, un biofilm dans un environnement de traitement de lait se développe initialement par le biais de l'accumulation de la matière organique sur une surface en métal, qui est alors colonisée par les bactéries (Marchand et al., 2012), bien que le lait est considéré comme un meilleur milieu pour la croissance des micro-organismes en raison de son pH (presque neutre) et sa large variété en éléments nutritifs disponibles, ainsi que la présence des stimulants de croissance (Mogha et al., 2014). Le biofilm laitier se développe très rapidement (8-12 h), avec des nombres bactériens souvent supérieurs à 10^6 bactérie/cm² (Malek, 2013).

5. Les biofilm des bacilles thermophiles

5.1. Caractéristiques du Biofilm des bacilles thermophiles

Un réservoir important de contamination microbienne dans l'industrie laitière est le biofilm microbien, qui constitue une source possible d'altération des produits finis pouvant raccourcir la durée de conservation ou faciliter la transmission des maladies (Marchand et al., 2012). Un des groupes les plus communs d'organismes formant de biofilm dans la fabrication laitière sont les bacilles thermophiles, principalement *Anoxybacillus* et *Geobacillus* sont considérés comme les contaminants les plus importants. Ce groupe de bactéries est capable de grandir dans les sections des usines, telles que le préchauffage et sections d'évaporation d'usines

de lait en poudre, dans lequel les températures sont convenables pour leur croissance (40–65°C) (**Burgess et al., 2014**).

Les biofilms des bacilles thermophiles sont désignés comme des biofilms de process. Ces biofilms particuliers sont généralement dominés par une seule espèce en raison des pressions sélectives (peuvent inclure chaleur, composition du produit, pH et activité de l'eau) de l'environnement.

Ce sont des Biofilms monocouche qui sous forme dans les sections régulièrement nettoyées et/ou la fore de cisaillement empêchent le développement du biofilm en hauteur (**Burgess et al., 2010**).

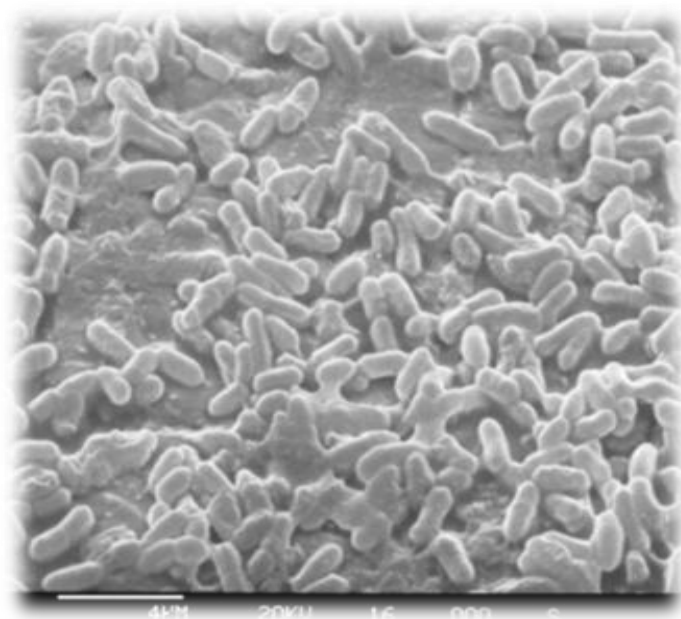


Figure 06 : Micrographie électronique à balayage d'un biofilm de *A.flavithermus* (18h sur la surface d'acier inoxydable (**Burgess et al., 2010**)).

5.2. Développement du biofilm des bacilles thermophiles

Le développement d'un biofilm des bacilles thermophiles est susceptible d'être initiée par l'attachement des deux types de cellules : les spores et les cellules végétatives (**Burgess et al., 2014**). Des travaux ont montré qu'une variété d'espèces des bacilles thermophiles, y compris *Geobacillus*, *B.licheniformis*, *B.Anoxybacillus*, *B.coagulans* et *B.pumilus*, pouvaient s'attacher à la surface d'acier inoxydable. Les spores adhérentes peuvent atteindre approximativement le nombre de cellules $6-7 \log/cm^2$ tandis que les cellules végétatives attachées atteignent approximativement $4-5 \log UFC/cm^2$ (**Parkar et al., 2001**).

Les spores ont une plus grande propension que cellules végétatives pour l'attachement (**Burgess et al., 2014**). Sous les conditions favorable (température, pH et AW), et à la suite de l'attachement, les spores thermophiles germent et les cellules

végétatives se reproduisent et forment un biofilm (**Flint et al., 2001; Burgess et al., 2009**). A moins de 6-8h, les bacilles thermophiles peuvent former un biofilm de processus qui semble être beaucoup plus rapide que chez les bacilles mésophiles (**Burgess et al., 2014**). Cependant, il est également possible qu'un biofilm de *Anoxybacillus flavithermus* peut être développé sur acier inoxydable, en présence de lait écrémé reconstitué, de plus de 32 heures. En outre, les deux souches de *A. flavithermus* et *Geobacillus* spp. au bout de 6 heures peuvent atteindre une densité de cellules en biofilm de 6-7 log UFC/cm² (**Parkar et al., 2003 ; Burgess et al., 2009**).

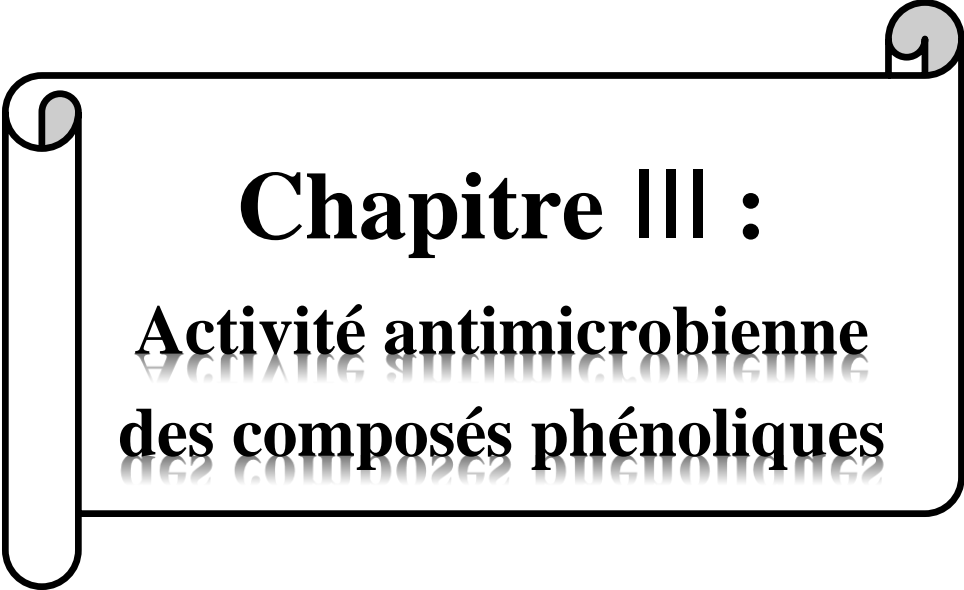
6. La résistance du biofilm aux agents antimicrobiens

Une propriété importante des biofilms est la capacité accrue de survivre à l'exposition aux composés antimicrobiens, y compris les désinfectants, les métaux toxiques et les antibiotiques, qui peuvent se produire par plusieurs mécanismes (**Flemming et al., 2016**). En effet, les bactéries dans un biofilm ont des mécanismes intrinsèques qui les protègent contre les conditions environnementales les plus agressives, incluant l'exposition aux agents antimicrobiens (**Marchand et al., 2012**). Par conséquent, les microorganismes en biofilm sont des moins sensibles aux agents antimicrobiens et aux désinfectants et nécessitent des doses de 10 à 1000 fois plus importante qu'à l'état libres (**Xu, 2000 ; Tremblay et al., 2014**). Cette résistance accrue, multifactorielle, est en relation avec les conditions de vie dans un biofilm (accès aux nutriments, hétérogénéité, oxygène etc), qui modifient les propriétés physiologiques des micro-organismes et induisent des mécanismes de résistance spécifiques (**Roux et al., 2006**). Plusieurs facteurs peuvent expliquer la plus grande tolérance des biofilms aux agents antimicrobiens, y compris (**Tremblay et al., 2014**).

1. La matrice extracellulaire interagit avec des agents antimicrobiens et protège les cellules, soit en empêchant l'accès aux composés et la dessiccation létale dans certains biofilms naturels, soit en réduisant efficacement leur concentration (**Sutherland, 2001 ; Flemming et al., 2016**).
2. Le métabolisme des bactéries d'un biofilm joue également un rôle très essentiel. Etant donné, certaines cellules du biofilm seront peu actives

métaboliquement et pourront même être sous forme dormante, à cause de la carence nutritionnelle et le gradient en oxygène (**Tremblay et al., 2014**).

3. L'existence d'une sous-population de bactéries en état de dormance, appelées bactéries persistantes, sont d'ailleurs considérée comme responsables d'une grande partie de la tolérance associée aux biofilms.
4. Certaines bactéries au sein d'un biofilm mature sont capables d'exprimer des gènes responsables de mécanismes de résistance, comme des pompes d'efflux, capables de rejeter les antibiotiques à l'extérieur de la bactérie (**Lebeaux, et al., 2014**).



Chapitre III :
Activité antimicrobienne
des composés phénoliques

Chapitre 03 : Activité antimicrobienne des composés phénoliques

Les plantes médicinales restent le premier réservoir de nouveaux médicaments. Elles sont considérées comme une source de matière première essentielle pour la découverte des molécules bioactives nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**). En effet, une des originalités majeures des plantes réside dans leur capacité de produire des substances très diversifiées dont : les métabolites secondaires, qui sont classés selon leur appartenance chimique en alcaloïdes, huiles essentielles et les composés phénoliques (**Jeun et al., 2005**). Ces derniers, également appelés les polyphénols sont un groupe largement distribués dans toutes les parties des plantes tels que les tannins, les flavonoïdes et les acides phénoliques et présentent de nombreuses activités biologiques dont l'activité antimicrobienne (**Cowan, 1999 ; Basli et al., 2012**).

1. Les tannins

1.1. Généralités sur les tannins

Tannin est un terme qui provient d'une pratique ancienne utilisant des extraits des plantes pour tanner les peaux d'animaux (**Hopkins, 2003**). Historiquement, l'importance des drogues à tannins est liée à leurs propriétés tannantes, c'est-à-dire à la propriété qu'ils ont de transformer la peau fraîche en matériaux imputrescible : le cuir. Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau (**Bruneton, 1999**). D'un point de vue thérapeutique, les plantes riches en tanins sont utilisées pour rendre les tissus souples et pour traiter certains symptômes comme les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure, elles rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal (**Iserin et al., 2001**).

1.2. Définition des tannins

Les tannins (ou tanins) sont des substances d'origine végétale non azotées, ce sont des composés phénoliques, ayant une saveur astringente. D'un point de vue biochimique, les tannins sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Da (**Brunet, 2008**), ils se

caractérisent par une propriété spéciale telle que l'aptitude à la précipitation des alcaloïdes, de la gélatine et des protéines (Sereme et al., 2008).

1.3. Structure et Classification

Selon la nature des assemblages moléculaires, les tannins sont classés en deux groupes : Les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Sereme et al., 2008). Les figures (07) et (08) représentent les structures chimiques de ces molécules présentées dans quelques plantes.

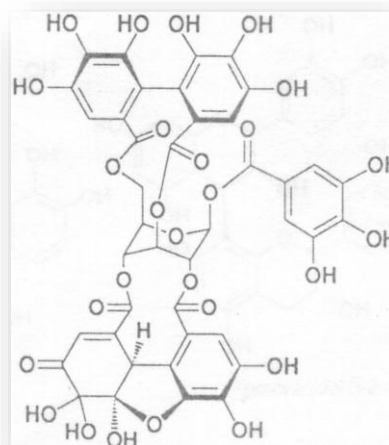


Figure 07 : Drogue à tannins hydrolysables (*Hamamelis virginiana*) (Sereme et al., 2008)

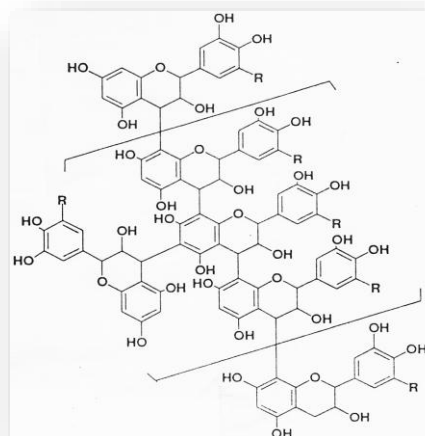
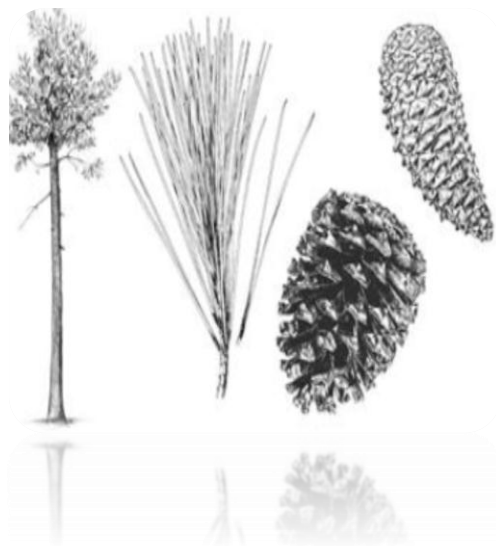


Figure 08 : Drogue à tannins condensés (*Pinus maritima*) (Sereme et al., 2008).

1.4. Propriétés physico- chimiques des tannins

1.4.1. La solubilité

Ce sont des corps généralement amorphes, solubles dans l'eau, dans l'alcool, et l'acétone. Ils sont insolubles dans les solvants organiques apolaires (Atefeibu, 2002).

1.4.2. Réaction de précipitation

Les tannins forment des précipités avec les sels, des métaux lourds tels que : Fer, Zinc, Phosphore, Cuivre. Ils forment également des précipités avec les protéines, cette action est responsable de l'effet de tannage sur le cuir, des effets anti diarrhéiques et astringents. En outre, dans certaines réactions ils forment avec les alcaloïdes des combinaisons tanniques. (Atefeibu, 2002).

1.5. Intérêt

Les tannins sont utilisés à des fins thérapeutiques et industrielles à cause de leurs nombreuses propriétés (Atefeibu, 2002).

1.5.1. Usages thérapeutiques

- Propriétés astringente et cicatrisante

Appliquée sur les muqueuses et la peau, il se produit une sorte de tannage. Il s'y ajoute une action vasoconstrictrice sur les petits vaisseaux ; ce qui complète cette activité. Cette propriété explique leur emploi sur les blessures superficielles.

- Propriétés anti diarrhéiques

Ils diminuent la perméabilité de la muqueuse intestinale.

- Propriétés antimicrobiennes

Les tannins sont doués de propriétés antimicrobiennes qui expliquent leurs usages pour le traitement de certaines maladies infectieuses. Dans les infections pulmonaires ils agissent grâce à une action inhibitrice sur la croissance des bactéries, champignons et des virus.

1.5.2. Usages industriels

Dans l'industrie de tannage, on utilise des extraits des plantes plus ou moins purifiés. Ils sont utilisés dans l'industrie du cuir, et se combinent sous forme de complexe aux protéines et rendent imputrescibles les peaux. A cause de leur nature, les tannins sont antifongiques et antibactériens. Ils sont utilisés pour la protection des filets de pêche contre la prolifération des germes producteurs de cellulases qui sont des enzymes responsables de la destruction de la cellulose des filets (**Atefeibu, 2002**).

1.6. Rôle des tannins dans les plantes

Les tannins jouent un rôle dans la défense des plantes contre les agressions des prédateurs tels que les insectes. D'une manière générale, la synthèse des tannins est l'un des mécanismes de défense des plantes contre les attaques des phytopathogènes (**Feucht et al., 1997**). En outre, leurs présences rend les plantes moins appétentes pour les mammifères herbivores à cause de la sensation d'astringence résultant de leur consommation, cette astringence conduit alors à un arrêt de la consommation et protège les végétaux d'une prédation excessive (**Jean-Blain, 1998 ; Bennick, 2002**).

1.7. Activité antimicrobienne des tannins

L'activité antimicrobienne des tannins isolés à partir d'une espèce végétale *Solanum trilobatum* Linna ont été testés contre plusieurs bactéries et ont donné les diamètres des zones d'inhibitions montrés dans **le tableau (03) (Doss et al., 2009)**.

Tableau 03 : Activité antimicrobienne des tannins isolés à partir de *S.trilobatum* (**Doss et al., 2009**).

CON (mg/ml)	Diamètre moyen de la zone d'inhibition (mm)					
	<i>S. aureus</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. pyogens</i>	<i>E. coli</i>
0.5	8.3	IN	IN	IN	IN	IN
1	8.6	7.8	IN	8.5	9.6	IN
1.5	10.5	7.83	8.0	9.13	9.6	8.8
2	11.5	8.83	7.83	10.5	10.5	8.8
2.5	13.5	9.66	8.73	10.8	11.5	10.5

IN : inactive.

2. Les catéchines

2.1. Généralités

Les catéchines sont des polyphénols, caractérisés par la présence dans leur structure de noyaux phénoliques. Elles appartiennent au groupe des flavonoïdes et au sous-groupe des flavanols, qui peuvent être à leur tour des monomères ou des polymères (Leverve, 2008) (Figure 09). Ce sont des composés qui sont particulièrement abondants dans les feuilles de thé vert, d'autres aliments tels que le thé noir mais en quantités plus faibles, dans des fruits comme le raisin et la pomme, dans le cacao et dans les produits transformés tels que le chocolat (Leverve, 2008). La quantité des catéchines est influencée par différents facteurs, elle diffère pour une espèce végétale donnée en fonction de la variété cultivée mais également selon les conditions de culture, le degré de maturité à la récolte, les conditions de stockage et les méthodes de transformation des aliments (Leverve, 2008).

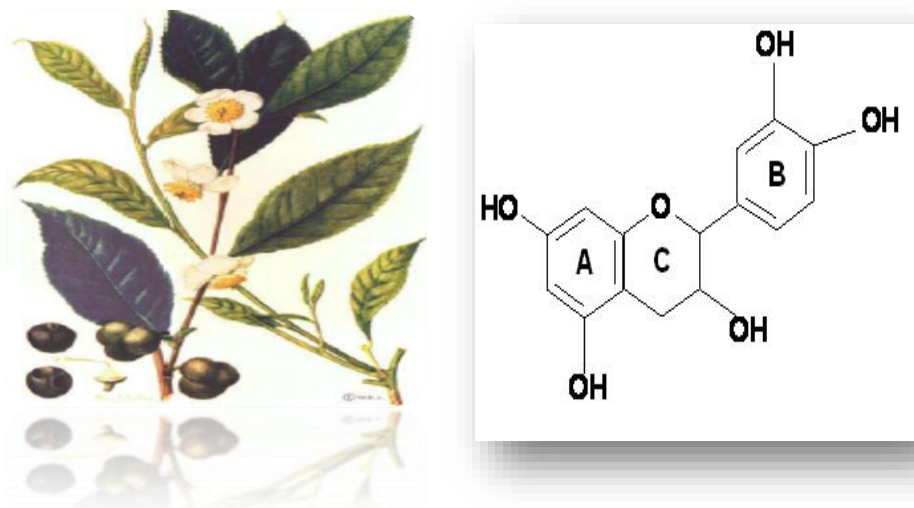


Figure 09 : La plante *Camellia sinensis* (catéchine) (Ashida et al., 2004 ; Benaraba, 2007).

2.2. Différents types des catéchines

Les catéchines diffèrent par le degré d'hydroxylation des noyaux phénoliques (Leverve, 2008). Les principales catéchines présentes dans l'alimentation sont la catéchine elle-même, l'épicatéchine, épigallocatechine et les mêmes catéchines galloylées (par exemple l'épigallocatechine gallate, ou EGCG, principale catéchine du thé vert) (Leverve, 2008).

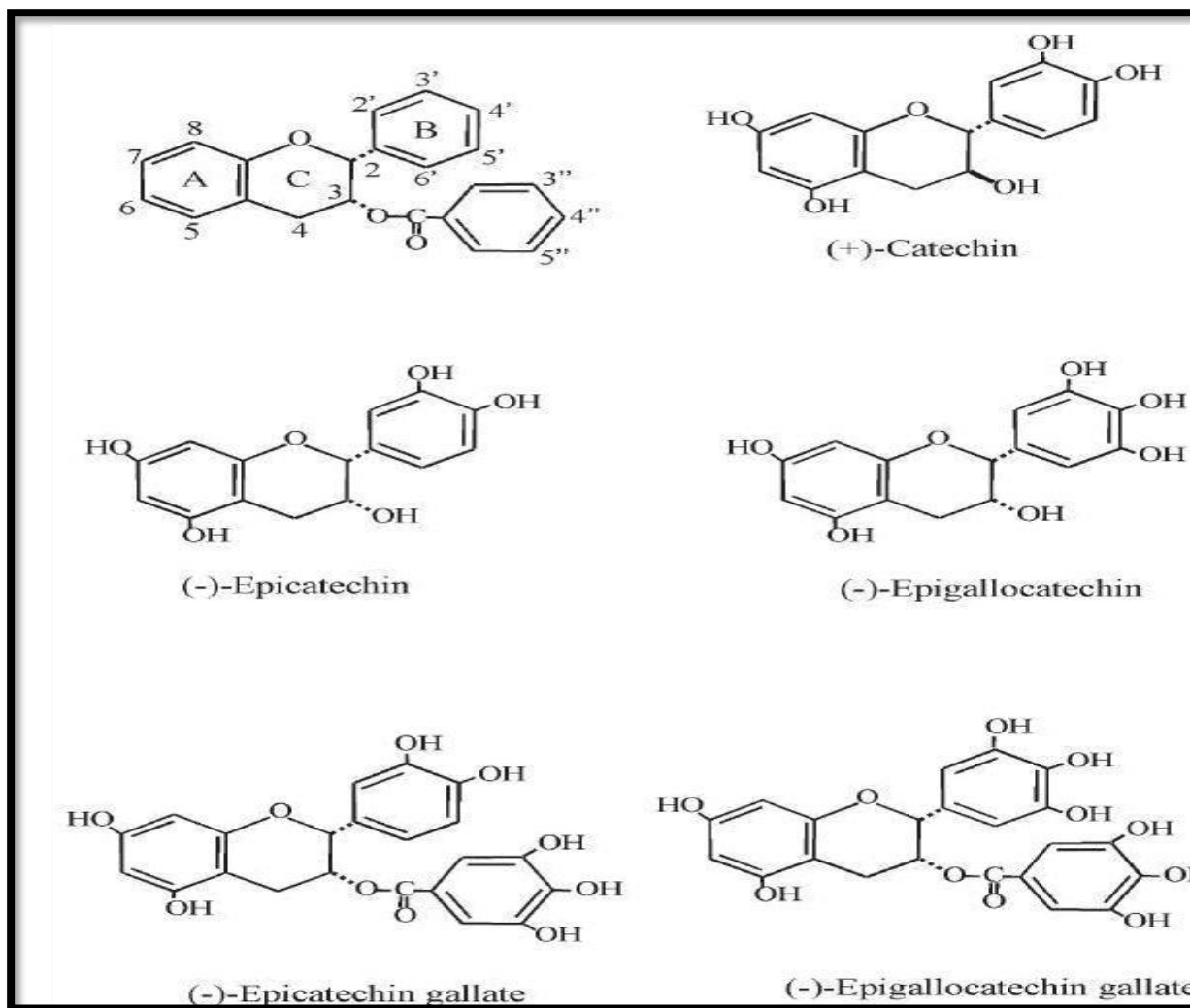


Figure 10 : La structure des différents types de catéchines (Benaraba, 2007).

2.3. Les Bienfaits des catéchines

Les catéchines peuvent avoir de nombreux effets bénéfiques sur la santé. En effet, elles jouent un rôle particulièrement important dans la prévention du syndrome métabolique de la photo vieillissement, du cancer et des maladies cardio-vasculaires (Mattias, 2010). Cet effet préventif est attribué à leur activité antioxydante puissante qui joue un rôle important dans le piégeage des radicaux libres, ces derniers qui donnent des composés oxydant réactifs dangereux, ainsi qu'une grande activité antimicrobienne (Zhao et al., 1989).

2.4. Biosynthèse des catéchines de thé vert

Le schéma de la figure (11) résume les voies de synthèse des principales catéchines du thé vert. Ces molécules sont issues de la condensation de la molécule d'acide shikimique. L'acide gallique présent dans les feuilles de *Camillia sinensis*

est produit par la voie de l'acide shikimique. La (-)-épigallocatechine est produite par hydroxylation de la molécule (-)-épicatéchine alors que la (-)-épicatéchine gallate et l'épigallocatechine gallate sont synthétisées par estérification de la (-)-épicatéchine avec l'acide gallique (**Hara, 2001**).

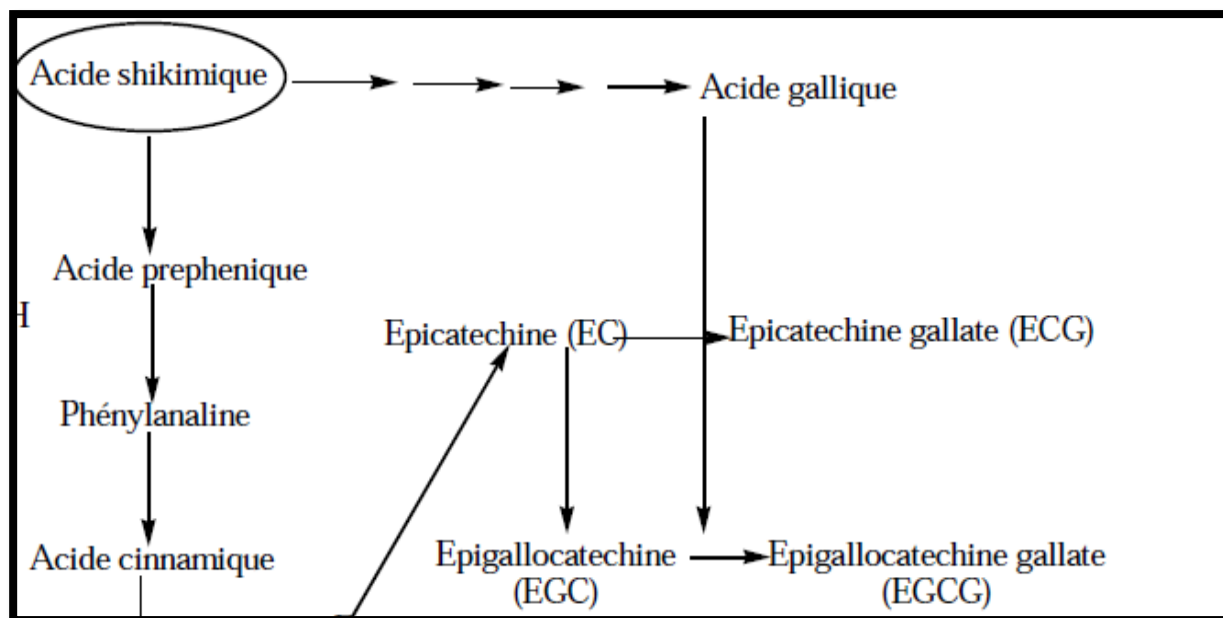


Figure 11 : Biosynthèse des catéchines dans les feuilles de thé vert « *Camellia sinensis* » (**Nkhili, 2009**).

3. L'acide gallique

3.1. Origine

L'acide gallique (GA) est un composé phénolique botanique naturel qui est impliqué dans des processus ayant des impacts industriels et environnementaux importants, et dans un grand nombre d'applications dans les sciences biomédicales (**Barcelo et al., 2014 ; Perazzoli et al., 2017**). Dans la nature, ce métabolite secondaire est largement distribué dans les plantes il se trouve abondamment dans des plusieurs sources alimentaires tels que les légumes, le thé, les raisins et autres fruits, on le trouve aussi également dans certains espèces de bois dur tels que le chêne (**Verma et al., 2013 ; Fernandes et al., 2015**). Dans les extraits des plantes, l'acide gallique existe en tant qu'un composé phénolique moléculaire libre ou comme un composant d'acide tannique (**Barcelo et al., 2014**).

3.2. Structure

L'acide gallique ou acide 3,4,5- tri hydroxy-benzoïque, sa formule chimique dérivée ($C_6H_2(OH)_3COOH$) issus de la voie de l'acide shikimique est un membre de la classe des acides hydroxy-benzoïques (DE Beer et al., 2003).

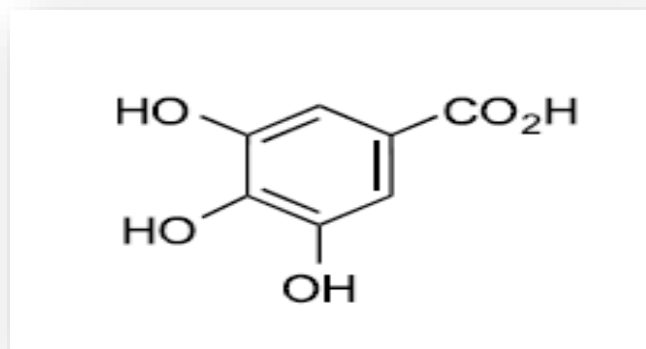


Figure 12 : Structure chimique de L'acide gallique (Agarwal et al., 2006).

3.3. Caractéristiques de L'acide gallique

L'acide gallique est caractérisé par une structure cristallisée, d'un blanc-jaunâtre pour une masse molaire de 170,12 g / mol, avec un point de fusion de 250°C et une solubilité dans l'eau de 1,1% à 20 ° C (Verma et al., 2013).

L'acide gallique est considéré comme un antioxydant potentiel, et un inhibiteur puissant des champignons, des bactéries, et de certains virus (Silva et al., 2017). Il possède également de nombreuses propriétés thérapeutiques, y compris des propriétés anti-cancéreuses, antimutagènes et anti-inflammatoires (Ow et al., 2003), en plus, de son utilisation dans le traitement des maladies chroniques comme la dépression, le cancer, et les infections microbiennes (Choubey et al., 2015). Cependant, ces dérivés peuvent également exercer des effets nocifs comme la mutagénéité et la cytotoxicité (Silva et al., 2017). L'acide gallique connaît également la propriété pro-oxydante qui induit l'apoptose et inhibe la prolifération dans les lignées cellulaires cancéreuses humaines (Sourani et al., 2016) et par la régulation de la voie mitochondriale (Perazzoli et al., 2017). En outre, l'acide gallique provoque la fragmentation de l'ADN, il est également responsable de la suppression de l'angiogenèse tumorale, conduisant à une inhibition de la métastase tumorale (Sourani et al., 2016). De plus, l'acide gallique à des propriétés

antimicrobiennes contre plusieurs souches bactériennes, des recherches récentes ont étudié leur mécanisme de son action bactéricide (Barcelo et al., 2014).

3.4. Activité antimicrobienne de l'acide gallique

De nombreux travaux ont montré l'efficacité de l'acide gallique en tant qu'agent antimicrobienne contre de nombreux pathogènes alimentaires et chimiques (Agarwal et al., 2006 ; Borges et al., 2013 ; Barcelo et al., 2014).

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'acide gallique en utilisant l'indice physiologique bactérien : Concentration minimale inhibitrice (MIC), testées sur diverses bactéries pathogènes, a donné les valeurs qui sont portés dans le tableau (04) (Borges et al., 2013).

Tableau 04 : Concentration minimale inhibitrice (MIC) de l'acide gallique (Borges et al., 2013).

	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<u>G.A</u>	<u>1500</u>	<u>500</u>	<u>1750</u>	<u>2000</u>
F.A	100	100	1100	1250

GA : acide gallique ; FA : acide ferulique



Partie II :
Matériel et
méthodes

Notre travail a été effectué au niveau de laboratoire des pédagogues : Microbiologie (département de biologie) Faculté SNV-STU, Université de Tlemcen.

1. Isolement des souches

1.1. Prélèvement

Le prélèvement des bactéries a été effectué à partir de différents sachets de lait pasteurisé recombine et frais (lait de vache) avec ou sans enrichissement.

1.2. Préparation des dilutions décimales

Aseptiquement, à l'aide d'un ciseau stérile on coupe l'une des extrémités du sachet du lait, une fois ouvert à l'aide d'une micropipette on aspire 10 ml de lait, puis on le verse dans un tube à essai stérile.

1.3. Isolement des bacilles thermophiles/mésophiles

1.3.1. Sans enrichissement

Les tubes contenant 10 ml de lait sont soumis à un traitement thermique dans un bain marie à 80°C pendant 10 mn, ce qui permet de tuer les formes végétatives et l'isolement sélectif des formes sporulés. A l'issue du traitement thermique les tubes sont refroidis immédiatement en les plongeant dans un b cher qui contient d'eau glacée.

1.3.1.1. Ensemencement

Après avoir préparé des dilutions décimales jusqu'à la dilution 10^{-3} , l'ensemencement s'effectue en surface sur le milieu TSA (Tryptophane Soja —agar) coulé dans des boites de pétri. A l'aide d'une micropipette 100 μ l de la solution mère et de chaque dilution sont déposés dans les boites de pétri préparées qui contiennent le milieu. A l'aide des pipettes pasteurs en forme râteau, l'inoculum est étalé sur la gélose. Les boites seront incubées à 30°C pendant 72h.

1.3.2. Après enrichissement

Des tubes assai contenant 10 ml de lait sont incubés pendant 24h à 55  C. Après l'incubation, le lait étant déjà coagulé, on procède à une agitation au vortex.

L'isolement est effectué suivie le même protocole précédent. L'incubation est réalisée à la même température d'enrichissement pendant 24h. La figure 13 présente le protocole de la mise en culture des bacilles mésophiles et thermophiles.

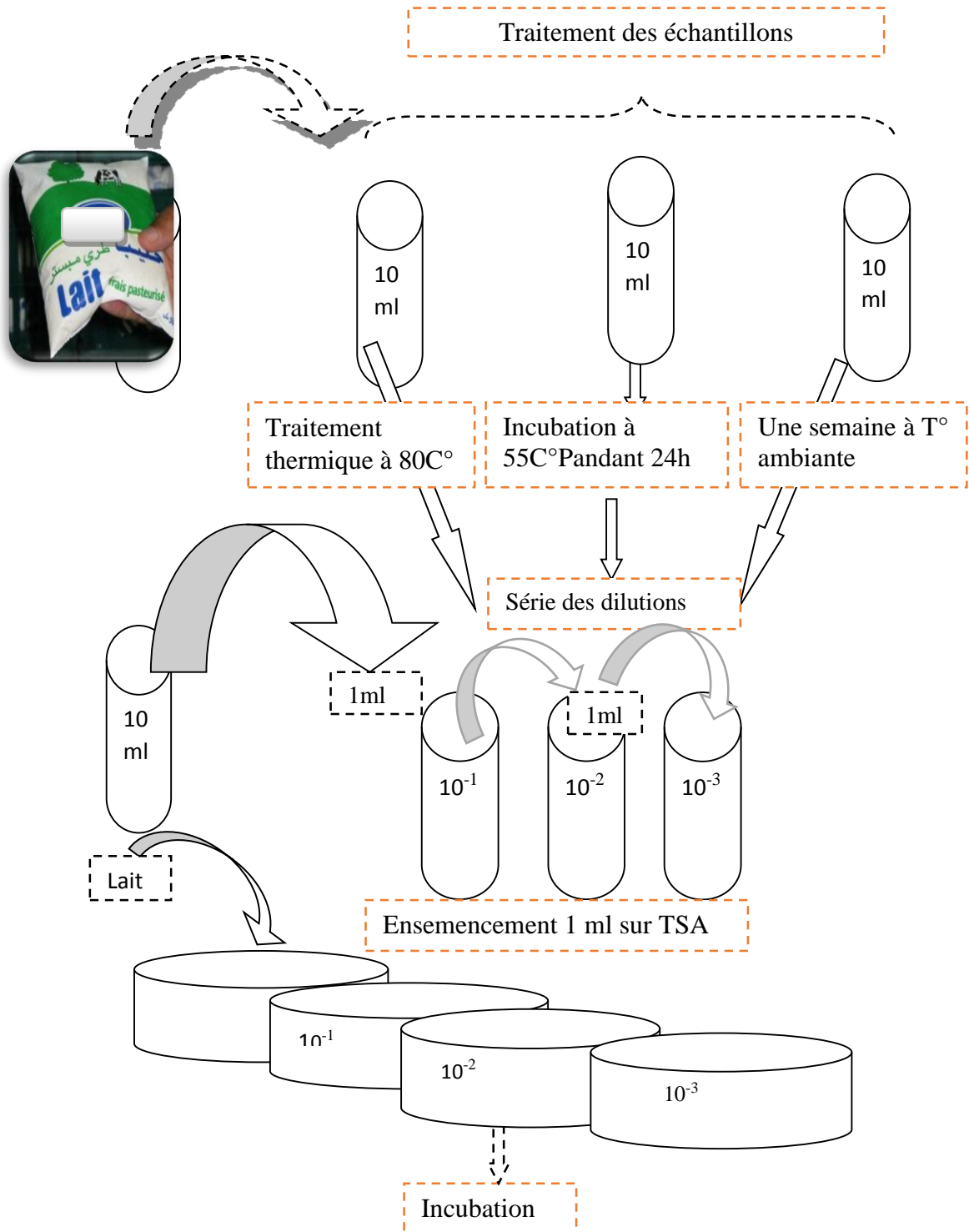


Figure 13 : Le protocole de la mise en culture des bacilles mésophiles et thermophiles.

2. Identification des isolats

L'identification phénotypique des souches isolées porte sur l'étude d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

2.1. Critères morphologiques

2.1.1. Examen macroscopique

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement et après 48h d'incubation. Cette étude consiste à l'observation directe à l'œil nu l'aspect morphologique des colonies obtenues sur milieu TSA en tenant compte des critères suivants :

- **La taille** : diamètre des colonies.
- **La forme avec vue de profil** : Bombée, plate, ombiliquée, à bords surélevés ou en œuf au plat et **avec vue de dessus** (ronde, bords dentelés, en étoile, ovoïde).
- **L'aspect de la surface** : lisse, rugueuse, brillante
- **L'opacité** : Les colonies opaques ne laissent pas passer la lumière contrairement aux translucides. Certaines sont très transparentes.
- **La consistance** : Elle se juge au moment du prélèvement. On distingue les colonies crémeuses des sèches et des muqueuses.
- **La couleur**

2.1.2. Examen microscopique

L'examen microscopique de culture jeune après la coloration de Gram permet de donner des informations sur la morphologie cellulaire (la forme, la taille...), la pureté de la souche et le mode de groupements. En plus la position de la spore et les inclusions cellulaires.

2.1.3. Coloration de Gram

Après être passé par les différentes étapes de coloration de Gram, les lames sont observées Au microscope optique (objectif x 100 à l'immersion), en se basant sur les bâtonnets, Gram positif.

2.1.4. Observation de la spore

La recherche des spores a été effectuée sur des cultures âgées après coloration au violet de Gentiane.

2.2. Critères biochimiques

2.2.1. Test de catalase

Le test catalase sert à démontrer si la bactérie possède l'enzyme catalase servant à décomposer le peroxyde d'hydrogène. Sur une lame en verre bien nettoyée, dégraissée et sèche on a déposé à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée et cotonnée l'inoculum bactérien et puis on ajoute une goutte d'eau oxygénée.

Le dégagement d'oxygène se traduit par effervescence qui est un résultat positif visible à l'œil nu, l'absence d'effervescence est un résultat négatif.

3. Conservation des souches

La conservation des souches s'effectue dans des tubes à essai contenant de milieu (TSA) Incliné. Les souches sont ensemencées sur la pente des tubes par des stries et incubées à 55°C pour les thermophiles et à 30°C pour les mésophiles pendant 24h, puis conservées à 4°C.

4. Formation de biofilm

Le potentiel de formation de biofilm chez les bactéries testées est déterminé par la méthode de cristal violet selon la technique **d'Auger et al, (2006)**.

4.1. Inoculation des microplaques

À partir de souches repiquées sur les boîtes, nous avons préparé une pré-culture de 24 h dans le TSB. Après 24h une dilution décimale a été préparée pour avoir une densité optique (D.O) comprise entre 0.6 à 1 à 595 nm. Ensuite, 100 µl de suspension bactérienne sont déposés dans chaque puits de la plaque de micro titration stérile sachant que la première rangée est laissé vide pour le control du lecteur et la deuxième est rempli par le milieu non ensemencé utilisé comme un contrôle négatif. Chacune des plaques est incubée à 3 températures : 37°C, 45°C et 55° C pendant 24h (**Figure14**).

4.2. Coloration au cristal violet

Après le temps d'incubation, les biofilms formés sur les parois des puits sont mis en évidence par coloration au cristal violet. Pour cela les plaques subissent le traitement suivant :

- Les plaques sont d'abords vidées avec la micropipette.
- Rinçage par l'eau distillée (EDS) trois fois pour éliminer les cellules non adhérentes.
- Laisser sécher 10 à 15 min.
- Remplir les puits avec 100 µl de cristal violet à 1% qui permet la fixation de biofilm.
- Le temps de coloration est environ de 10 min
- Rinçage à l'EDS 3 fois.
- Séchage des plaques en position renversée
- Lecture visuelle des plaques, appréciation de l'intensité de la coloration au cristal violet.

4.3. Lecture des plaques

Avant la mesure de la D.O au spectrophotomètre muni d'un lecteur de microplaque (ELISA) à 630 nm les puits sont remplis avec une solution dissolvante constituée de l'acide acétique à 33% préparé à partir de l'acide acétique glacial dilué dans l'eau distillée.

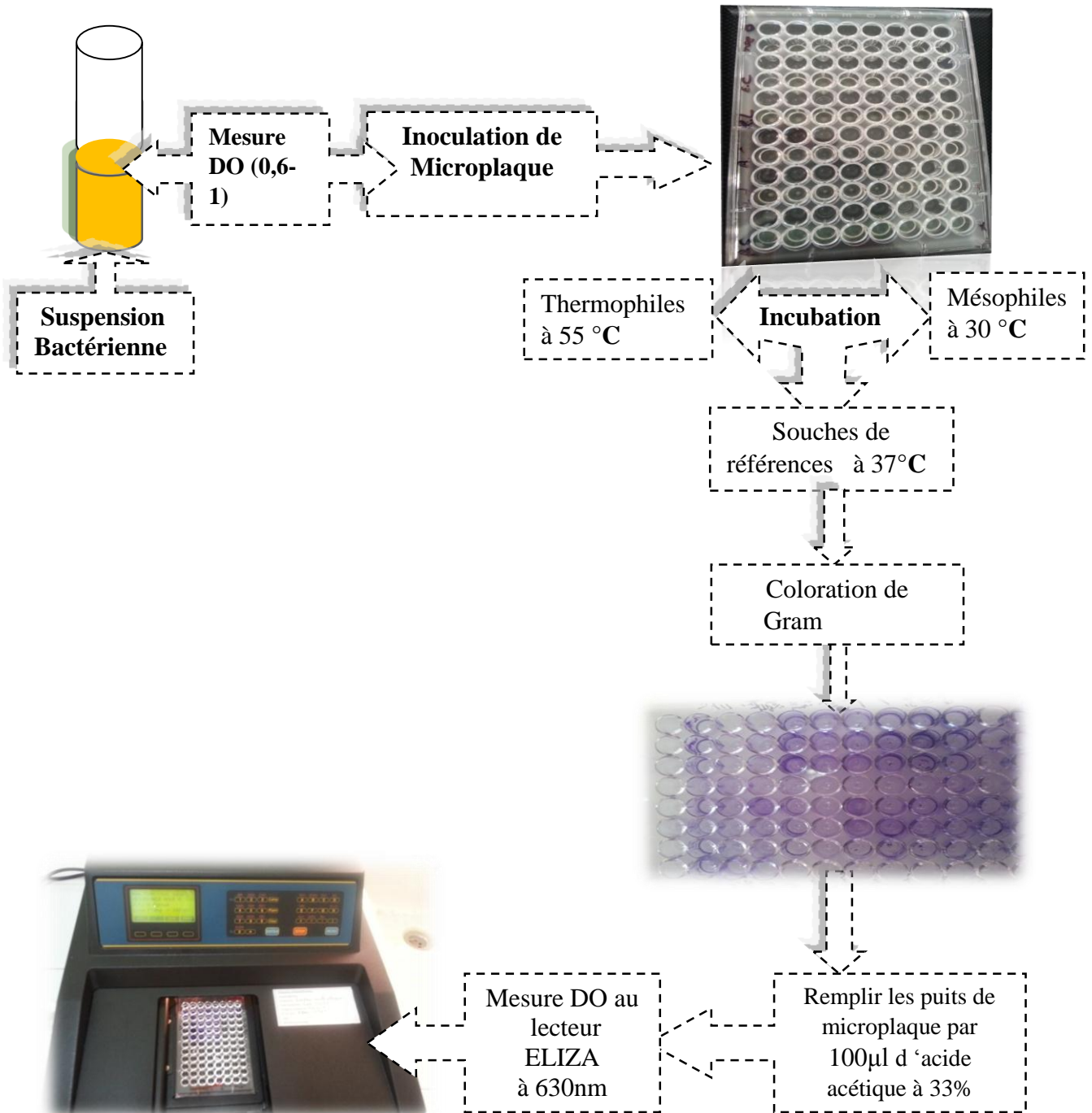


Figure 14 : Schémas représentant le protocole de formation des biofilms par la méthode au cristal violet

5. Détermination de l'activité antimicrobienne des composés phénoliques

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des molécules bioactives : acide tannique, acide gallique et catéchine, a été réalisée par deux méthodes : méthode de diffusion sur gélose et méthode des puits, pour étudier la résistance ou la sensibilité des souches à partir d'une gamme de concentrations.

5.1. Préparation des solutions des molécules bioactives

Les molécules bioactives ont été dissoutes dans l'eau distillée (EDS) stérile pour préparer des dilutions successives pour aboutir aux différentes concentrations étudiées (**tableau05**).

Tableau 05 : Préparation des solutions des molécules bioactives

Vsm	V .D	C.F	V.T
30 µl	270 ml	10 mg/ml	300 µl
60 µl	240 ml	20 mg/ml	300 µl
120 µl	180 ml	40 mg/ ml	300 µl
180 µl	120 ml	60 mg /ml	300 µl
240 µl	60 ml	80 mg/ml	300 µl

Vsm : volume de la solution mère

V.D : volume de diluant

V.T : volume totale

C.F : concentration finale

5.2. Préparation des cultures

L'activité antimicrobienne des molécules bioactives a été réalisée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé « Mueller Hinton (MH)» utilisant les disques ou les puits qui permet de déterminer l'activité inhibitrice des composés phénoliques par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque imprégné de celle-ci, où autour du puits. Cinq concentrations ont été testées (10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, 60 mg/ml, 80mg/ml), sur dix souches bactériennes qui ont été choisies : 5 souches isolées (S1, Y, G'', D', 24), et 5 souches de références : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* (**tableau 06**).

Un disque de 6 mm de diamètre en papier Whatman stérile est imprégné de molécules bioactives est déposé à la surface de la gélose «MH» de 4 mm

d'épaisseur, préalablement ensemencé par écouvillonnage avec l'inoculum. Ce dernier est préparé à une D.O de 0,6 à 1 pour chaque souche.

Un disque imprégné avec l'EDS est appliqué dans les boîtes comme un témoin, trois répétitions sont réalisées pour chaque essai. Les boîtes de Pétri sont incubées pendant 24 h à 37°C pour les souches de références et 55°C pour les thermophiles et 30°C pour les mésophiles.

Tableau 06 : Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.

	Microorganismes	Gram	Code	Origine
Bactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853	MNHN
	<i>Escherichia coli</i>		ATCC 8739	MNHN
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		IBMC Strasbourg	MNHN
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 6538	MNHN
	<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6633	LAPSAB M. RAHMOUN N.
	<i>Bacille mésophiles</i>		Y	LAIT
	<i>Bacille mésophiles</i>		G''	LAIT
	<i>Bacille mésophiles</i>		D'	LAIT
	<i>Bacille thermophiles</i>		S	LAIT
	<i>Bacille thermophiles</i>		24	LAIT

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris) ; **LAPRONA** : Laboratoire des Produits Naturels (Université de Tlemcen) ; **LAPSAB** : Laboratoire antibiotiques antifongiques, physicochimie synthèse et activité biologique.


6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice de biofilm (CMIB)

Les essais antibactériens ont été réalisés selon la méthode de dilution en milieu liquide. Les puits de microplaques sont remplis par l'inoculum bactérien (90 µl) avec un D.O comprise entre (0.6-1). Ensuite, les molécules bioactives sont ajoutés (10 µl) de la plus faible concentration à la concentration plus élevée (1-8mg/ml). De

plus, 100 µl de TSB stérile mis dans des puits ont servi de témoin négatif et les puits de culture ont servi de témoin positif.

Après incubation à 3 températures en fonction des souches, les microplaques subissent le même protocole mentionné dans **la figure 14**.

La densité optique des puits est mesurée à une longueur d'onde de 630 nm au lecteur ELIZA. Par conséquent, la valeur CMIB représente la plus faible concentration à laquelle les bactéries sessiles ne parviennent pas à repousser.



Partie III :
Résultats et
discussions

Résultats

1. Identification phénotypique des souches isolées

Les souches isolées à partir de différents types de laits : lait pasteurisé recombinaé et frais (lait de vache), ont été réalisées à la température d'incubation 30°C pendant 24h sans enrichissement afin de favoriser la sélection de bactéries mésophiles et 55°C après enrichissement afin de favoriser la sélection des bactéries thermophiles. L'identification a porté sur l'étude des caractères macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

1.1. Les caractères cultureux

L'aspect des colonies sur le milieu TSA des bacilles mésophiles (D, Y, G'') et thermophiles (24, S) permet de distinguer différents types de colonies tels que montrés par **la figure (15) et le tableau (07)**.

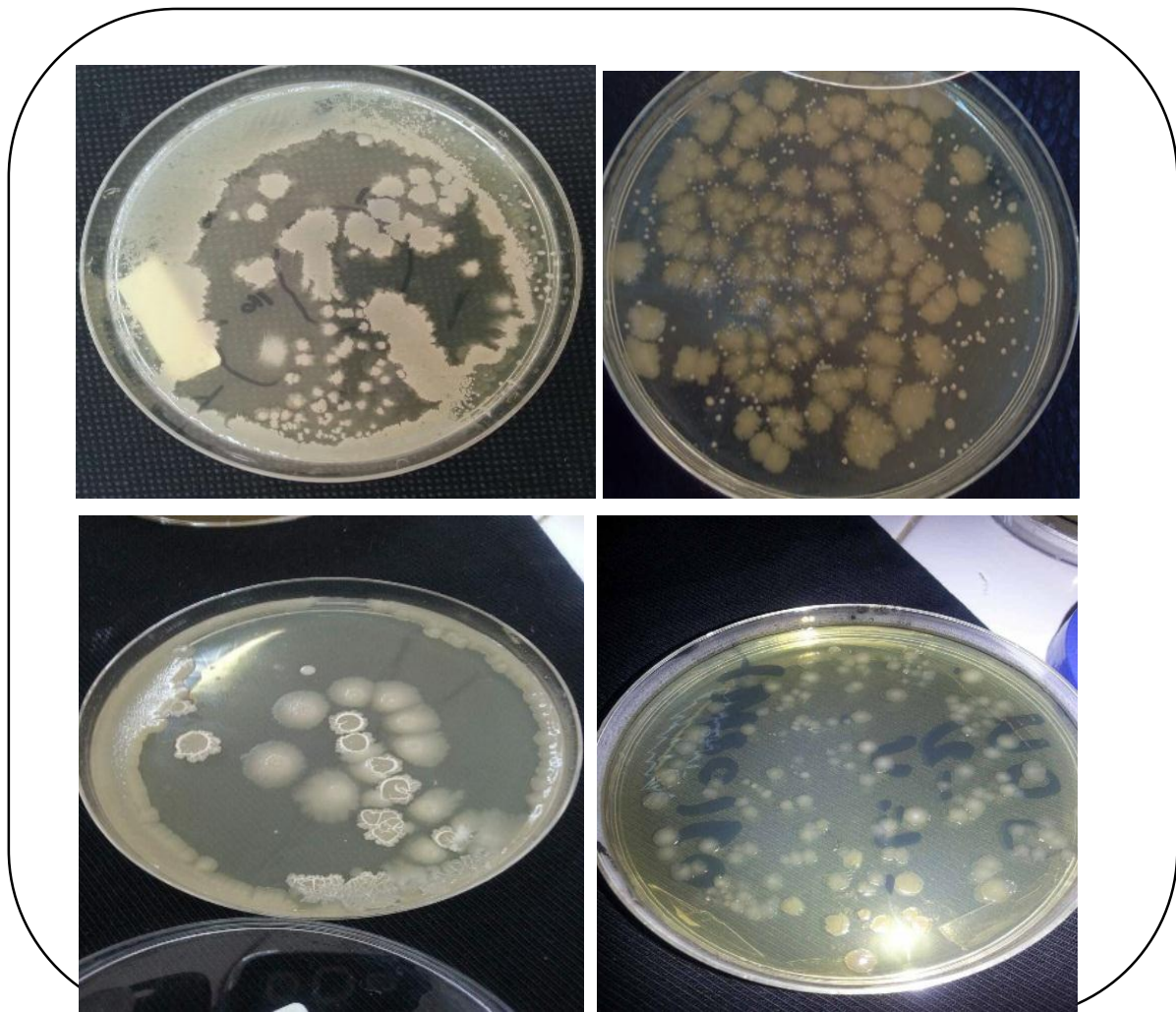


Figure 15 : Aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA.

Tableau 07 : Aspect morphologique des colonies obtenues sur gélose TSA après 24h d'incubation.

Souche	Taille (mm)	Forme	Elévation	Opacité	Consistance	Couleur
D'	4	Irrégulière	Demi Bombé	Opaque	Visqueuse	Blanchâtre
Y	14	Irrégulière	Plate	Opaque	Lisse et crémeuse	Blanchâtre
G''	2	Convexe	Demi Bombé	translucide	Visqueuse et lisse	Blanchâtre
24	6	Irrégulière	Plate	Opaque	Visqueuse	Blanchâtre
S	3	Convexe	Bombé	Opaque	Visqueuse et lisse	Blanchâtre

1.2. Les caractères microscopiques

L'observation microscopique après coloration de Gram a permis de révéler que les souches isolées se présentent sous forme de bâtonnets à Gram positif, de tailles différentes, regroupés en diplobacilles, ou en chainettes **figure (16)**, mobiles ou immobiles avec une endospore ovale centrale ou sub-terminale non déformante.

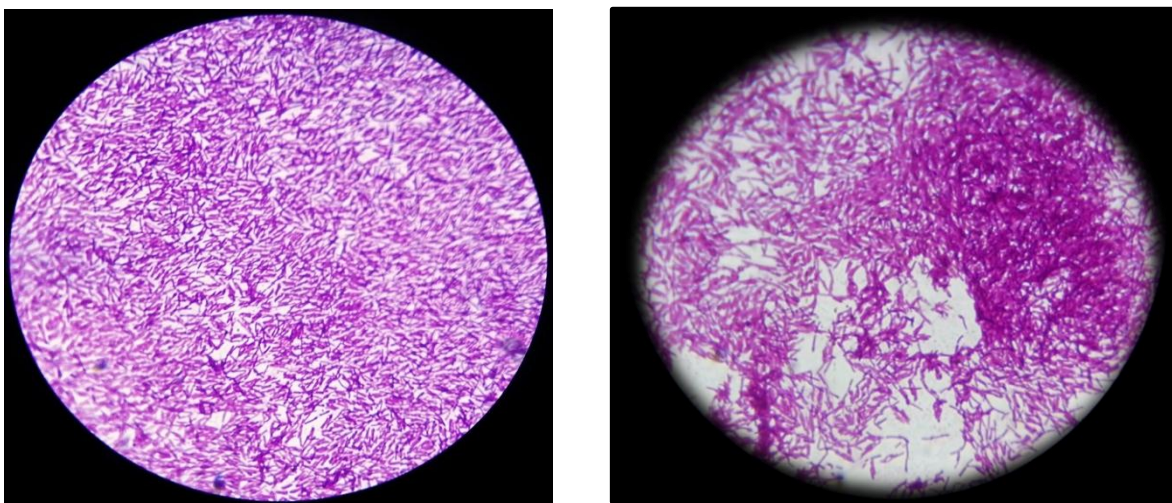


Figure 16 : Observation microscopique des bacilles thermophiles après la coloration de Gram (G x 100 a immersion).

1.3. Les caractères biochimiques

La recherche de la catalase est un critère important d'identification au groupe des bacilles sporogènes aérobies (le genre *Bacillus* et les genres voisins).

Les résultats du test de la catalase ont montré que toutes les souches isolées sont catalase positives, la réaction se traduit par le dégagement immédiat des bulles d'oxygène.

2. Evaluation du potentiel de formation de biofilm

La formation de biofilm dans les microplaques de titration à 96 puits, est analysée par une simple observation à l'œil nu des puits après une coloration au cristal violet.

Cette coloration est considérée comme l'une des techniques indirectes d'estimation de la production de biofilm sur des différents types de substrats (**Djordjevic et al., 2002**). La coloration développée reflète directement la masse du biofilm, et sa solubilisation permet de la quantifier (**Musk et al., 2005**).

Après 24 heures d'incubation à différentes températures 30 °C, 37°C et 55°C, la formation des biofilms a été exprimée en DO mesurées à 630 nm. Les résultats obtenus (**Figure 18,19**) ont permis de mettre en évidence la capacité de formation de biofilms de toutes les souches de bacilles thermophiles et mésophiles isolées ainsi les souches de références sur une surface hydrophobe (polystyrène) après culture dans le (TSB).

2.1. Lecture directe

L'observation visuelle des microplaques montre que la formation du biofilm a eu lieu préférentiellement sur les bordures des puits, se caractérisent par la formation d'un anneau variable d'une souche à l'autre à l'interface air –liquide (**figure 17**). La densité du biofilm est en relation avec l'intensité de l'anneau formé (une couleur foncée indique que les souches sont fortement productrices de biofilm et vice versa).

Les résultats obtenus sont conformes à ceux trouvés par **Wijman et al., (2007)**, concernant d'autre bacille sporogène aérobies mésophiles notamment le groupe *Bacillus cereus*.

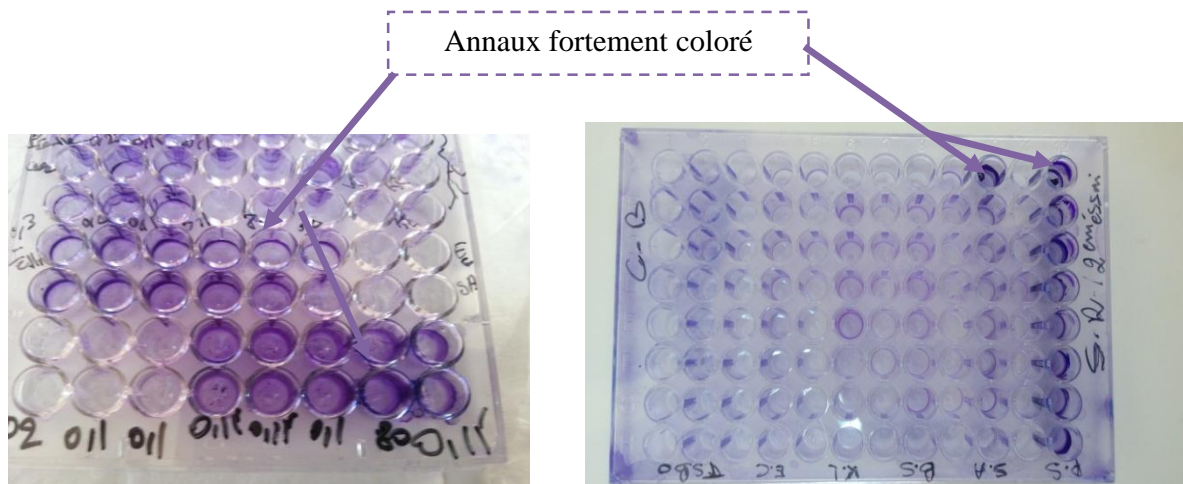


Figure 17 : Formation de biofilm dans les microplaques de titration.

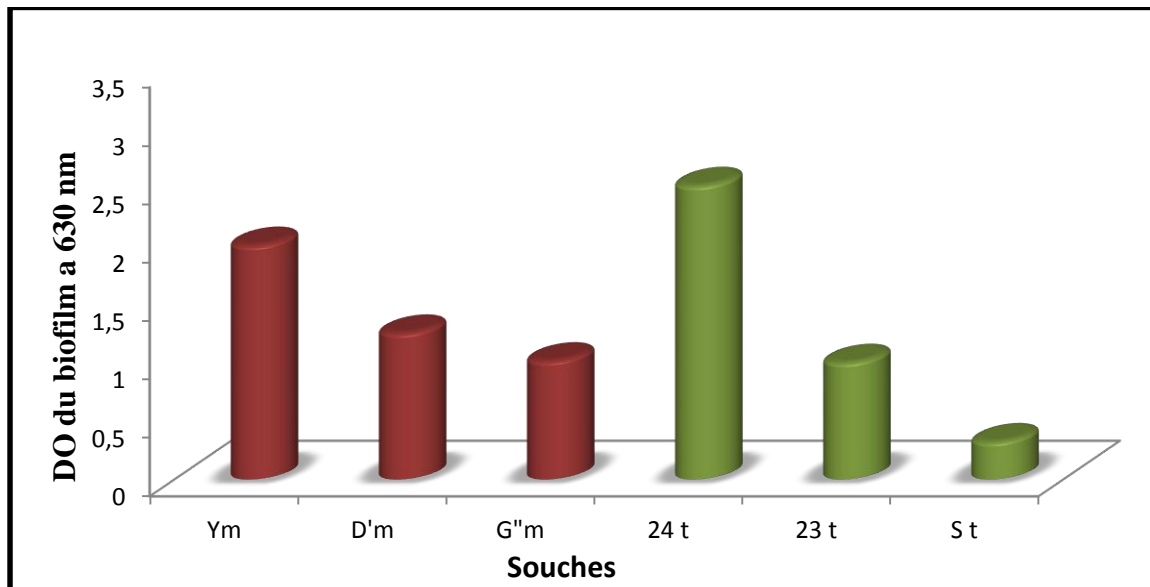
2.2. Lecture indirecte

L'estimation quantitative du taux de formation de biofilm par les mésophiles et thermophiles et les souches de références est obtenue par la mesure de la DO à 630 nm au lecteur de microplaque (ELIZA). Les résultats obtenus sont présentés dans les **figures (18 et 19)**.

D'après **Auger et al., (2009)**, une DO de 0,5 est la valeur seuil d'estimation du potentiel de formation du biofilm chez *B.cereus*. Si on considère cette échelle, chez les souches testées il est possible de former 4 classes :

- Classe 1** : $DO < 0,5$: Faiblement productrice du biofilm.
- Classe 2** : $0,5 < DO < 1,5$: Moyennement productrice du biofilm.
- Classe 3** : $1,5 < DO < 2,5$: Fortement productrice de biofilm.
- Classe 4** : $2,5 < DO$: Hyper productrice.

2.2.1. Formation de biofilm des bacilles thermophiles et mésophiles



m : mésophiles t : thermophiles

Figure 18 : Biomasse des biofilms formés par les bacilles mésophiles et thermophiles.

2.2.1.1. Les bacilles thermophiles

Comme le montre la figure (18), les bacilles thermophiles se répartissent en 3 catégories : la première comprend la souche (S) dont la DO de formation de biofilms est $< 0,5$, elle peut être considérée comme faiblement productrice de biofilm, par contre la souche (23) est moyennement productrice du biofilm avec un DO (1), tandis que la souche (24) dont la DO de formation du biofilm est supérieure à 2 (2,5) est hyper productrice de biofilm.

Les résultats obtenus par les souches (23) et (24) sont conformes aux données de la littérature. Selon Burgess et al., (2010), une formation importante de biofilm est obtenue aux températures élevées (40–65°C), ce qui n'est pas le cas de la souche (S). Cette différence peut être expliquée par l'effet des souches.

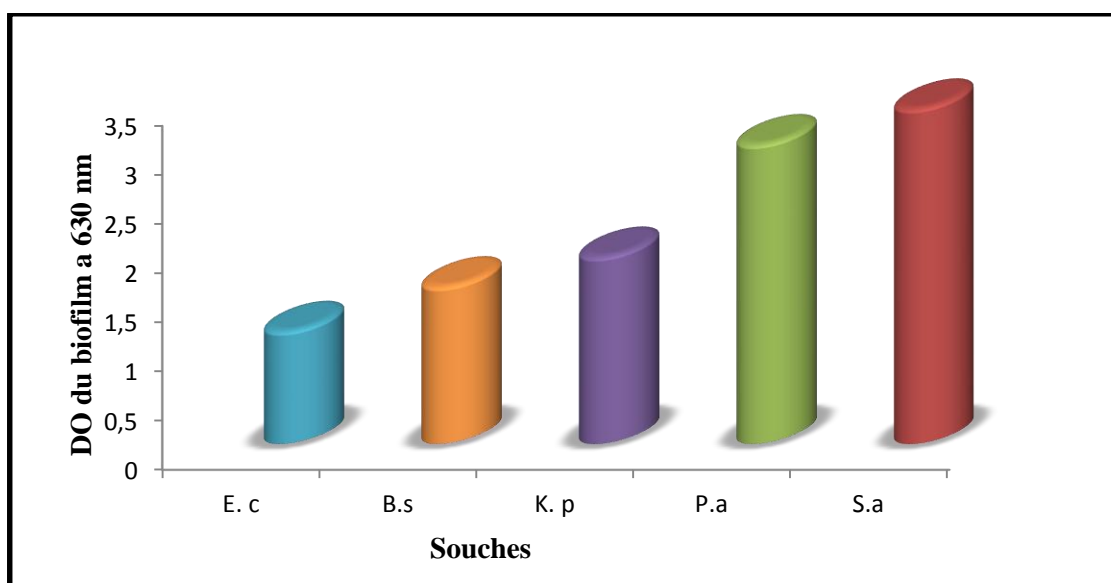
En effet, le potentiel de formation du biofilm est contrôlé génétiquement mais peut être aussi influencés par les conditions environnementales (Filloux &Vallet, 2003 ; Wijman et al., 2007). D'après, Wijman et al., (2007), la formation de biofilm de

B.cereus dépend fortement de la souche, l'essai et les conditions environnementales utilisées, comme le milieu de culture et la température.

2.2.1.1. Les bacilles mésophiles

Comme le montre la **figure (18)**, les bacilles mésophiles se répartissent en deux catégories, la première qui est caractérisée par des valeurs de $DO > 1,5$ comprend les souches fortement productrices de biofilm telles que la souche (Y) avec une DO_f égale à 2, alors que les souches (D' et g") ayant des DO_f respectives de 1,25 ; 1,01 peuvent être considérées comme des producteurs moyens de biofilm. Il est important de remarquer que les bacilles mésophiles (DO_f : 1,28) et les bacilles thermophiles (DO_f : 1,42) enregistrent des moyennes de formation du biofilm proche.

2.2.2. Formation du biofilm des souches de références



E.c: *E. coli* B.s: *B. subtilis* K.p: *K. pneumoniae* P.a: *P. aeruginosa* S.a: *S. aureus*

Figure 19 : Biomasse des biofilms de cinq souches de référence

D'après les résultats obtenus dans la **Figure (19)**, on remarque que toutes les souches de références testées sont de fortement productrice de biofilm ($DO > 1,5$). Néanmoins, les valeurs obtenues varient d'une souche à l'autre. Nous signalons que *S. aureus* est hyper productrice de biofilm, avec la plus grande valeur de DO (3,4) suivie par *P. aeruginosa* avec une DO égale à 3,04 puis par *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *E. coli* avec des DO respectives de l'ordre de 1,9 ; 1,6

et 1, 4. Les résultats sont conformes à la littérature ce qui concerne *P.aeruginosa* et *S.aureus* qui sont considérées comme des organismes modèles de la formation du biofilm (**Filloux &Vallet, 2003**).

3. Evaluation de l'activité antimicrobienne des composés phénoliques

L'activité antimicrobienne des acides phénoliques et de la catéchine sur les bactéries testées : Les bacilles thermophiles (24,S1), les bacilles mésophiles (D',Y ,G'') et sur les souches de références est réalisée par la méthode de l'aromatogramme et la méthode des dilutions utilisant les microplaques de titrations a 96 puits. La sensibilité des souches est évaluée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition et la détermination des valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

3.1. Détermination des diamètres d'inhibition

Les résultats de l'évaluation antimicrobienne sont repris dans **les tableaux (08 et 09)**. Dans ces tableaux sont inclus d'une part les valeurs en (mm) diamètres de zones d'inhibition et d'autres parts les valeurs de différents concentrations minimales inhibitrices (CMI). **La figure (20)** donne une illustration des zones d'inhibition développées sur milieu Muller-Hinton par certaines des souches testés.

D'après les résultats du **tableau (08)**, nous remarquons que les souches a Gram positif : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* sont les souches les plus sensibles a l'acide tannique avec des zones d'inhibition qui varient entre 16 et 18 mm. Nous constatons également que l'acide gallique montre un effet vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* avec un diamètre d'inhibition de 15 et 24 mm. En revanche, ces souches ont manifestés une résistance vis-à-vis de la catéchine (aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée).

Concernant, les souches a Gram négatif : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, elles ont montré une résistance avec des zones d'inhibition qui varient entre 10 et 12 mm pour l'acide tannique et 5 et 12 mm pour l'acide gallique. Alors que, la catéchine n'a donné aucun effet sur les 3 souches de références. Les bacilles thermophiles et mésophiles ont également montré une sensibilité vis-à-vis à l'acide tannique et l'acide gallique avec des diamètres

d'inhibition qui varie entre 15 et 20 mm. Par contre, la catéchine n'a également donné aucun effet sur ces bactéries.

Tableau 08: Diamètre d'inhibition des acides phénoliques et de la catéchine sur les souches testées.

Molécules	Diamètres des zones d'inhibition (mm)								
	Acide tannique (mg/ml)			Acide gallique (mg/ml)			Catéchine (mg/ml)		
	40	20	10	40	20	10	80	60	40
Souches									
24	18	15	12	15	12	10	0	0	0
S1	17	12	9	20	14	10	0	0	0
D'	16	13	9	15	9	7	0	0	0
Y	17	14	10	13	12	0	0	0	0
G''	15	10	6	0	0	0	0	0	0
S.A	18	15	9	24	18	12	0	0	0
E.C	12	10	6	12	10	0	0	0	0
P.S	13	10	8	0	0	0	0	0	0
K.P	10	9	6	0	0	0	0	0	0
B.S	16	13	9	15	9	7	0	0	0

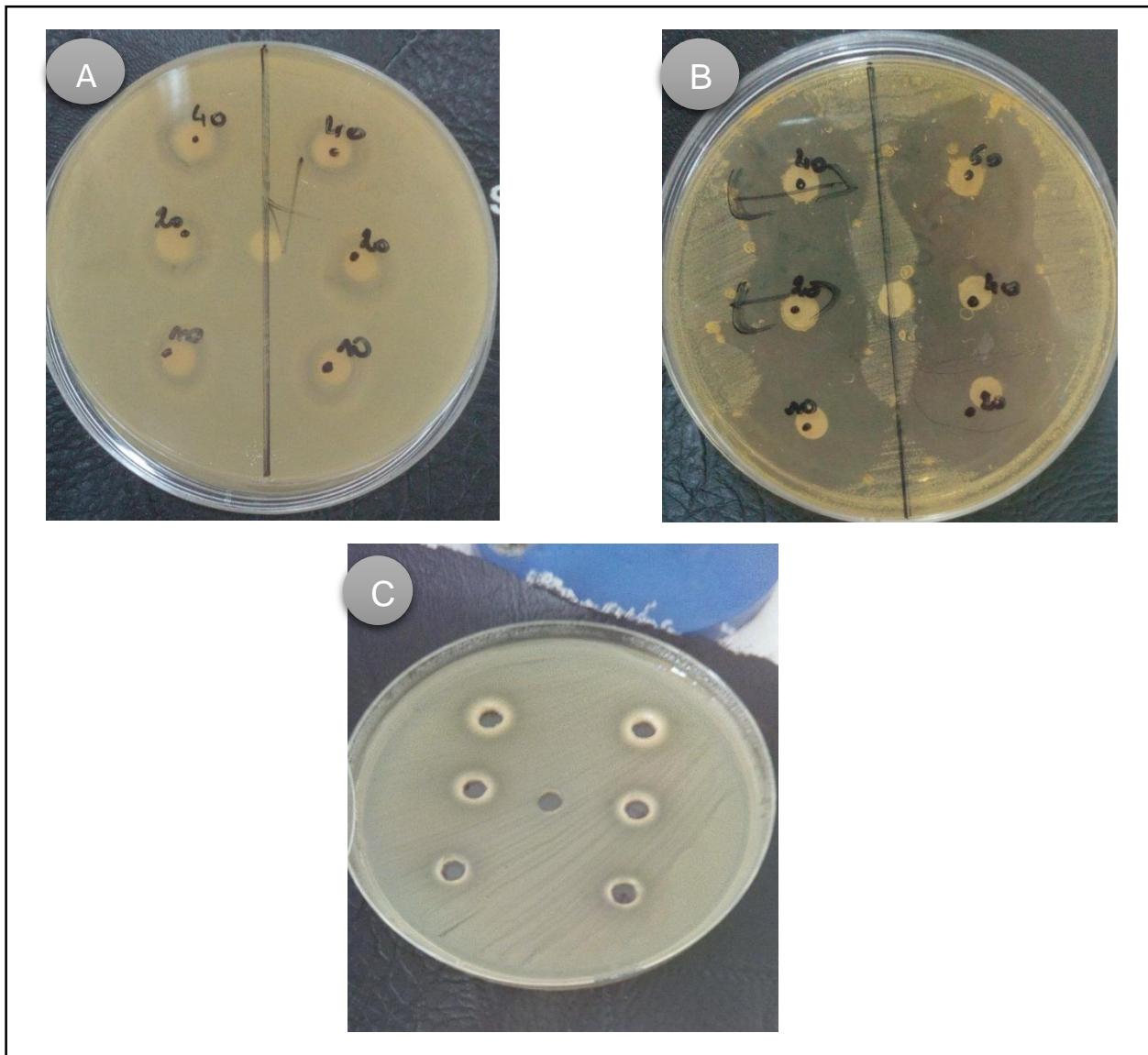


Figure 20 : Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode des disques et des puits .

(A) : Effet de l'acide tannique sur la croissance de *bacillus* spp (G'').

(B) : Effet de l'acide gallique sur la croissance de *S.aureus*.

(C) : Effet de la catéchine sur la croissance de *E.coli* .

3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

On a déduit les intervalles des concentrations minimales inhibitrices (CMI) a partir des diamètres d'inhibition obtenus sur gélose MH pour les dix souches testées comme le montre **le tableau (09)**.

Nous remarquons que l'acide tannique est plus actif sur les bactéries a Gram positif que sur les bactéries a Gram négatif bien que leur concentration minimale inhibitrice

était la même pour toutes les souches ≤ 10 . Concernant l'acide gallique, il présente des résultats intéressants qui diffèrent en fonction des souches : une faible CMI a été enregistrée pour *S.aureus*, pour un bacille thermophile (24) et pour autre bacille mésophile (D') avec une CMI ≤ 10 , tandis que pour les deux autres souches *E.coli* et bacille mésophile (Y) la CMI est plus importante de ≤ 20 . Les CMI les plus élevées sont obtenues pour *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, ainsi que pour un bacille thermophile (S1) et un mésophile (G''). On peut signaler de plus, que toutes les souches présentent une résistance vis-à-vis la catéchine à la concentration 80mg/ml.

Tableau 09 : Activité antimicrobienne des acides phénoliques et de la catéchine exprimée en concentration minimale inhibitrice (mg/ ml).

Souches \ CMI (mg/ml)	Acide tannique	Acide gallique	Catéchine
24	≤ 10	≤ 10	≥ 80
S1	≤ 10	≤ 40	≥ 80
D'	≤ 10	≤ 10	≥ 80
Y	≤ 10	≤ 20	≥ 80
G''	≤ 10	≤ 10	≥ 80
S.A	≤ 10	≤ 10	≥ 80
E.C	≤ 10	≤ 20	≥ 80
P.S	≤ 10	≤ 40	≥ 80
K.P	≤ 10	≤ 20	≥ 80
B.S	≤ 10	≤ 20	≥ 80

3.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice du biofilm (CMIB)

Nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices de la formation de biofilms (CMIB) par la mesure de la D.O à 630 nm des biofilms colorés au cristal violet, des acides phénoliques : acide tannique, acide gallique et de la catéchine. Les résultats obtenus sont enregistrés et illustrés dans les figures (21, 22, 23, 24,25).

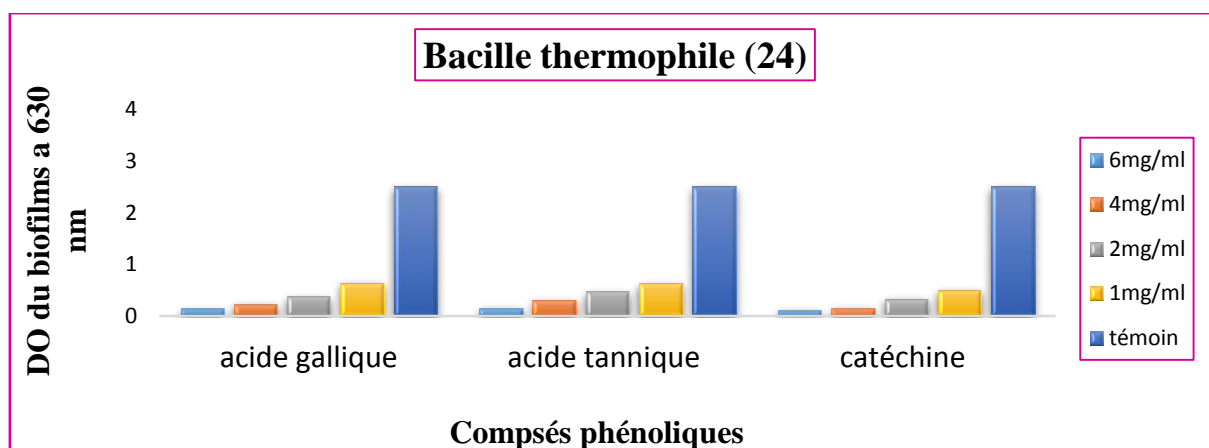


Figure 21 : Effet inhibiteur des composés phénoliques sur la formation de biofilm du bacille thermophile (24).

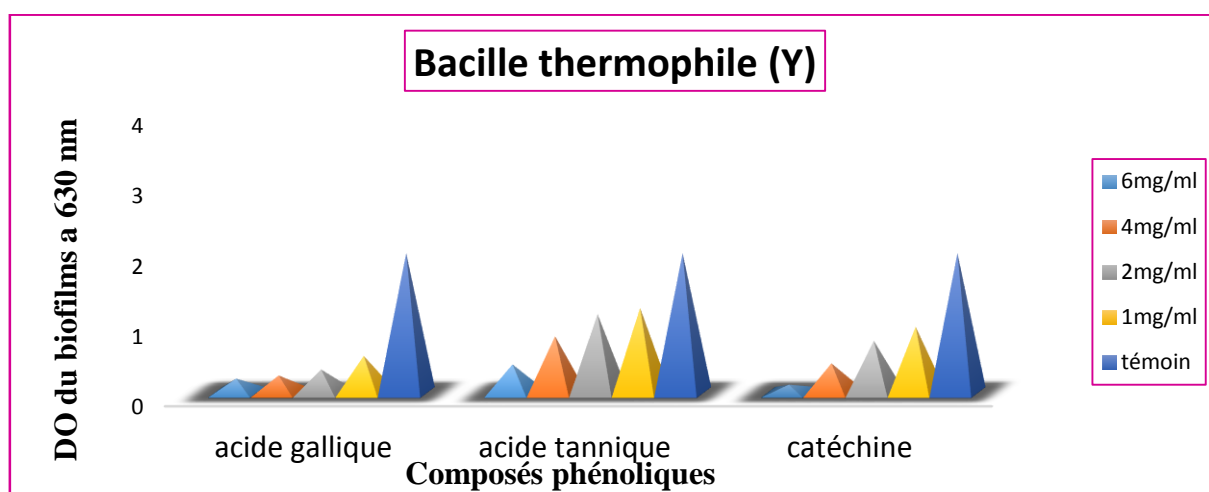


Figure 22 : Effet inhibiteur des composés phénoliques sur la formation de biofilm du bacille mésophile (Y).

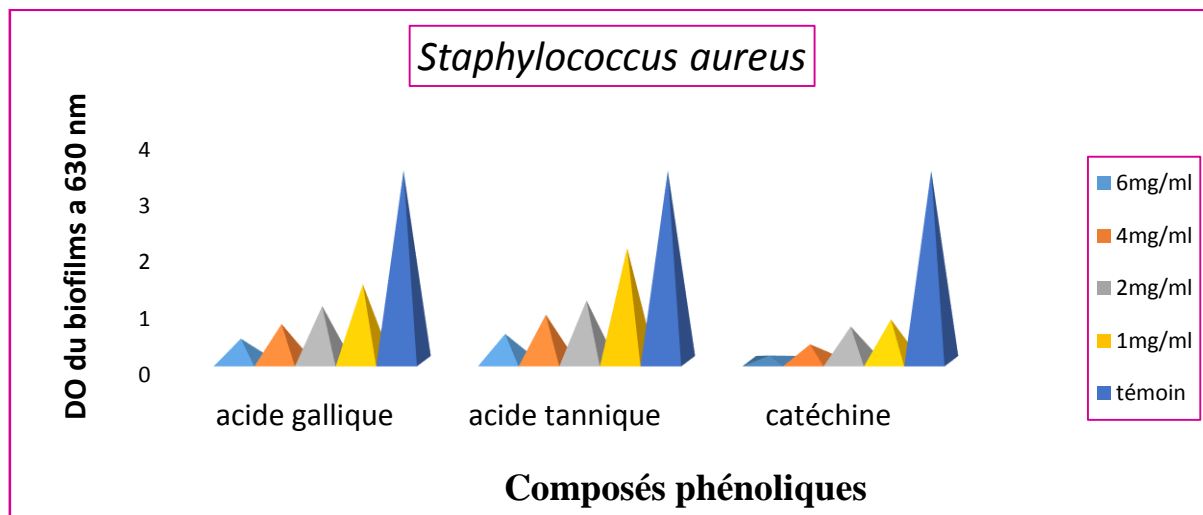


Figure 23 : Effet inhibiteur des composés phénoliques sur la formation de biofilm de *S.aureus*.

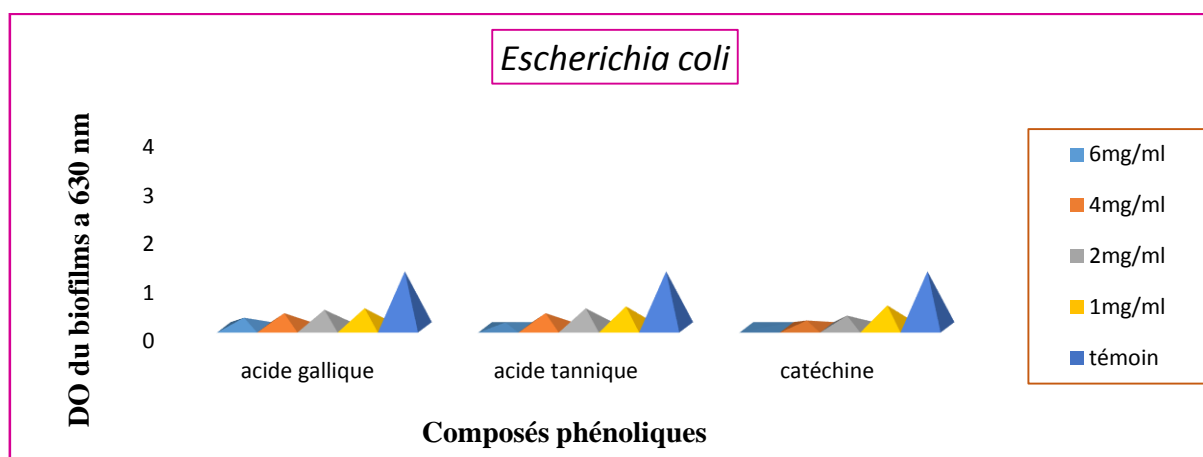


Figure 24 : Effet inhibiteur des composés phénoliques sur la formation de biofilm de *E. coli*.

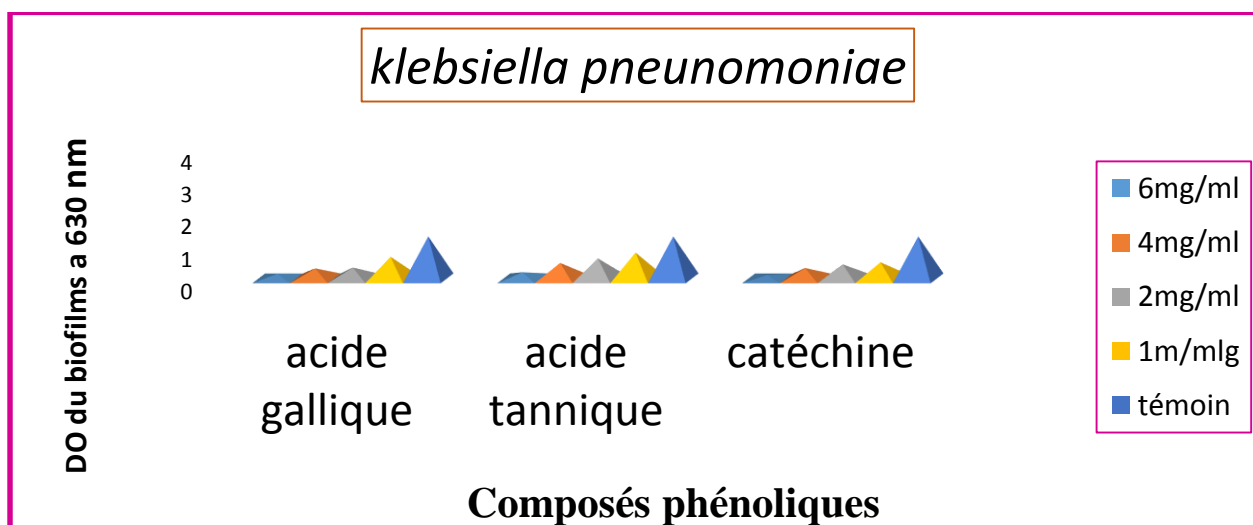


Figure 25 : Effet inhibiteur des composés phénoliques sur la formation de biofilm de *K. pneumoniae*.

D'après les figures (21, 22, 23, 24, 25), nous constatons qu'avec l'augmentation des concentrations des acides phénoliques et de la catéchine, il y a une diminution de la formation de biofilm des bactéries testées : bacille thermophile (24), bacille mésophile (Y), *S.aureus*, *E. coli*.et *K. pneumoniae*.

L'effet inhibiteur le plus important est remarqué pour l'acide gallique à une concentration maximale de 6 mg/ml pour toutes les souches testées avec des DO égales à 0.13, 0.14, 0.19, 0.19, 0.40 respectivement. De même, Nous avons mentionné l'effet inhibiteur le plus important de l'acide tannique à une même concentration maximale 6 mg/ml pour *E. coli* avec une DO de 0.1. Une inhibition relativement plus faible est obtenue pour les autres souches testées : 24, Y, *S.aureus*, *K. pneumoniae* avec des DO égales à 0.12, 0.40, 0.48, 2.01.

Enfin, la catéchine présente l'effet inhibiteur le plus actif sur toute les souches testées à la concentration maximale de 6 mg / ml avec des DO égales à 0.01, 0.10, 0.11, 0.11, 0.11 respectivement.

Discussion

Ce travail a porté sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne et anti-biofilm de trois composés phénoliques : acide tannique, acide gallique et de la catéchine sur la flore sporulée aérobie mésophile et thermophile en comparaison avec des souches de références à Gram positif et négatif.

Doss et al., (2009), ont évalué l'activité antimicrobienne des tannins isolée à partir d'une espèce végétale *solanum trilobatum linn* et testés contre plusieurs bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella typhi* et *Proteus vulgaris* par la méthode de diffusion de disque (détermination de diamètre de zone d'inhibition). Les résultats ont montré que les tannins possèdent la plus forte activité contre *S.aureus*. Par contre, ils étaient moins actifs sur *S.pyogenes*, *S.typhi*, *P.aeruginosa* et *E.coli*. Nos résultats sont comparables à ceux obtenues par cette étude.

D'après ces auteurs, la capacité des tannins à provoquer une désintégration des colonies bactériennes résulte de leur interférence avec la paroi cellulaire bactérienne, inhibant ainsi la croissance bactérienne.

Contrairement à nos résultats, **Al-Ani et al., (2008)**, ont étudié l'activité antibactérienne des tannins extraits à partir des plantes médicinales (*pimpinella anisum*, *punica granatum*, *nigella sativa*) contre diverses souches bactériennes. D'après cette étude les résultats des tests de diffusion en milieu gélosé ont montré, que le tannin qui a été extrait de *pimpinella anisum* a un effet plus actif contre *E. coli* que *S.aureus*. Les composés de tannins en générale ont une bonne activité contre la croissance bactérienne parce qu'ils contiennent de l'acide tannique actif grâce à sa capacité à dissoudre la couche d'acide gras de la paroi bactérienne ce qui provoque une fuite de fluide cellulaire dans la cellule et la détruit.

Buzzini et al (2008), ont démontré un effet de l'acide tannique (tannins hydrolysables) sur un ensemble d'espèces bactériennes : *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*. Cette molécule agit par une interaction avec les protéines ou l'acide lipotechoïque de la surface cellulaire, une inhibition des enzymes extra cellulaires microbiennes et inhibition de la glucose transférase.

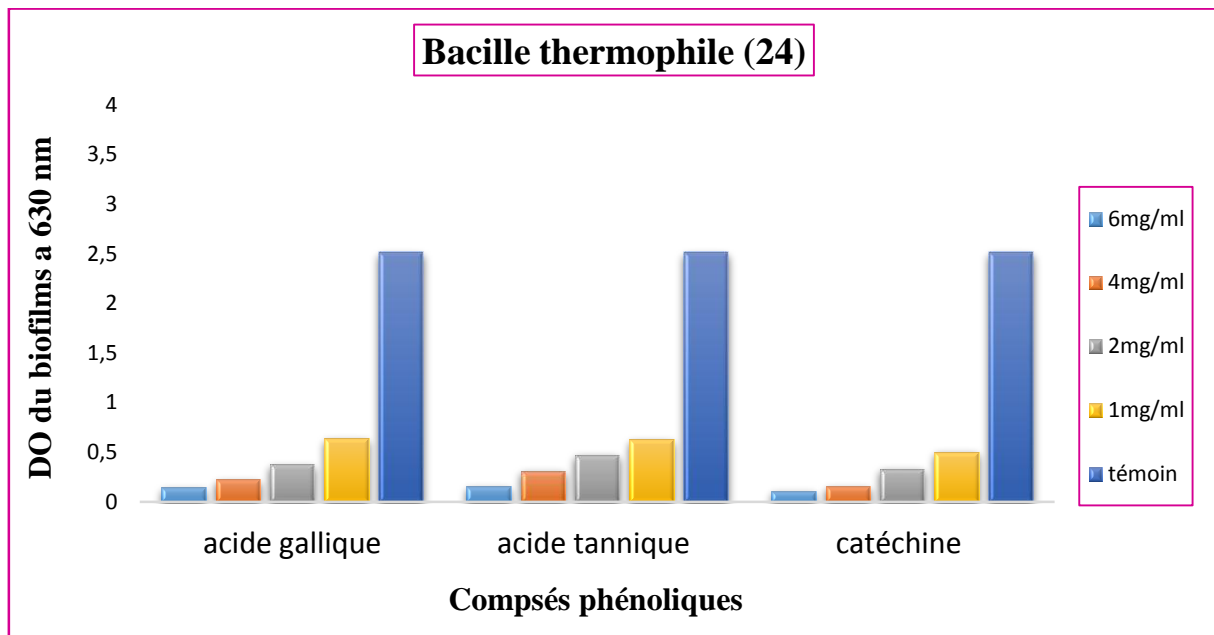
D'après d'autres travaux **Daglia (2011)**, l'effet des polyphénols (flavonols et les tannins) sur l'inhibition de la formation du biofilm est dû à la réduction des ligands d'adhésion, la neutralisation des toxines bactériennes et montre une synergie avec les antibiotiques.

Contrairement à nos résultats, **Daglia (2011)**, a démontré que la catéchine est efficace contre les bactéries a Gram positif et négatif. Certains catéchines du thé vert (*Camélia sinensis*) telles que : épicatechine, gallocatéchine et épigallocatechine sont actives contre d'autres bactéries pathogènes transmissibles par les aliments : *Bacillus cereus*. La plupart de ces composés exercent une activité en modifiant le niveau de résistance aux antibiotiques (tétracycline, vancomycine), et en modifiant l'expression des gènes associée à la virulence bactérienne (**Shah et al., 2007**, **Miklasińska et al., 2016**).

D'après d'autres travaux de **Vandal et al., (2015)**, ont évalué l'activité antimicrobienne de plusieurs substances naturelles dont l'acide gallique qui proviennent des plantes originaires du nord de l'Ontario (*Chimaphila umbellata*, *Betula payrifera*, *Rhus typhina* et *Fraxinus pennsylvanica*) contre des bactéries pathogènes en utilisant la technique de dosage sur microplaque. Ces résultats montrent que l'acide gallique possède une activité antimicrobienne contre *S.aureus*, *E.coli* et *P.aeruginosa*. De meme, ces auteurs ont remarqué que l'acide gallique de l'extrait de la plante *Rhus typhina* n'était pas efficace contre les bactéries testées, lorsqu'une concentration initiale de 1000 µg /ml était utilisée. Par contre, lorsque la concentration a été augmenté à 10000 µg/ml ce composé a montré une activité antimicrobienne. En conséquence, il est possible que la concentration de l'acide gallique dans l'extrait de cette plante ait été augmentée à un niveau auquel il est efficace.

De même, les travaux de **Borges et al., (2013)**, ont montré une activité antimicrobienne de l'acide gallique et l'acide férulique contre *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *E.coli* aux des différentes concentrations de 500 µg, 1500 µg, 1750 µg. Ces composés ont conduit à des changements irréversibles dans les propriétés de la membrane, charge intra et extracellulaire, perméabilité et propriétés physico-chimiques grâce à des changements d'hydrophobicité, à une diminution de la charge

négative de la surface et à l'apparition d'une rupture locale ou d'une formation de pores dans les membranes cellulaires.



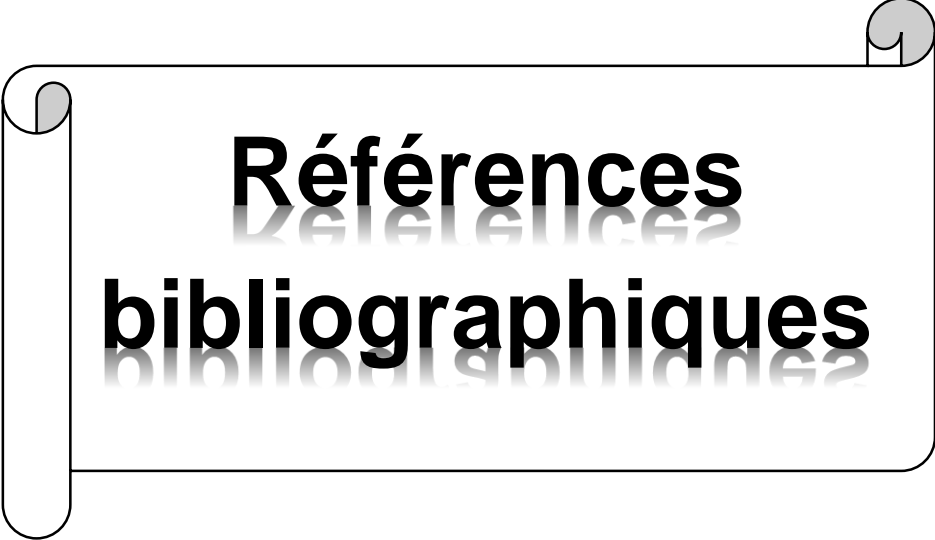
Les bacilles thermophiles sont des contaminants importants capables de former des biofilms sur tous les types de surface des systèmes technologiques de l'industrie laitière. Ces biofilms constituent une source potentielle de contamination du lait pasteurisé et menacent sa qualité microbiologique et sa durée de vie et montrent une grande résistance aux produits chimiques. De ce fait, l'utilisation des produits naturels pourrait constituer une approche intéressante pour lutter contre les biofilms du milieu laitier.

Dans notre étude, nous avons pu isoler des bacilles thermophiles en plus des mésophiles à partir du lait pasteurisé recombinaison ou provenant du lait de vache local. Les souches isolées sont caractérisées par des potentiels importants de formation de biofilm tels que montré par la technique au cristal violet.

Nous nous sommes intéressés aux effets antimicrobiens et anti biofilms des composés phénoliques purs : acide tannique, acide gallique et de la catéchine qui ont été testés sur les bacilles thermophiles, et mésophiles isolés en comparaison avec quelques souches de références.

Les résultats obtenus montrent, que l'effet inhibiteur le plus actif sur la formation de biofilm est obtenu par la catéchine vis-à-vis de l'ensemble des souches testées par rapport à l'acide gallique et l'acide tannique. En revanche, l'effet inhibiteur de cette molécule révélé par la technique de l'aromatogramme n'a également donné aucun effet sur les bactéries testées. Les résultats de notre recherche permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives, nous proposons :

- Identification moléculaire des souches isolées.
- Evaluation des effets biologiques d'autres composés bioactifs des plantes
- Etude des mécanismes d'action de chaque molécule phénolique.



**Références
bibliographiques**

Références bibliographique

1. **Abbas, A. A. (2014, July)**. Effet de l'absence d'oxygène sur la capacité de sporulation et les propriétés des spores de *Bacillus cereus*. Avignon.
2. **Agarwal, C., Tyagi, A., & Agarwal, R. (2006)**. Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 via ATM-Chk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induces apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells. *Molecular cancer therapeutics*, 5(12), 3294-3302.
3. **Akbas, M. Y. (2015)**. Bacterial biofilms and their new control strategies in food industry. PP 383-394.
4. **Alnnasouri, M. (2010)**. Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France *Appl. Environ. Microbiol.* 52 :1242-1246.
5. **Al-Ani, R. T., Mohammed, N., Alhameed, A., & Mohammed, S. (2008)**. Antibacterial Activity of Tannins Extracted from Some Medicinal Plants in vitro. *Iraqi Academy Scientific Journal*, 6(1), 1-7.
6. **Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D. 1991**. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Letters in Applied Microbiology*, 13, 202-206.
7. **Ashida H, Furuyashiki T, Nagayasu H, Bessho H, Sakakibara H, Hashimoto T, Kanazawa K. Anti-obesity actions of green tea (2004) : possible involvements in modulation of the glucose uptake system and suppression of the adipogenesis-related transcription factors. Biofactors. 22 (1- 4):135-40.**
8. **Atefeibu, E. S. I. (2002)**. Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne d'*Acacia nilotica* var *adansonii* (Doctoral dissertation, Thèse de pharmacie Université de Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal, 37p.
9. **Auger, S., Krin, E., Aymerich, S., & Gohar, M. (2006)**. Autoinducer 2 affects biofilm formation by *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 937-941.
10. **Auger, S., Ramarao, N., Faille, C., Fouet, A., Aymerich, S., & Gohar, M. (2009)**. Biofilm formation and cell surface properties among pathogenic and nonpathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Applied and environmental microbiology*, 75(20), 6616- 6618.
11. **Bennick, A. (2002)**. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 13 (2), 184-196.

Références bibliographique

12. **Bernard, (2009) KHERBOUCHE EL HOUARIA** influence d'un traitement a ultrason sur la thermorésistance de spores de bacille sp .isolées de poudre de lait 2014.université aboubekr belkaid tlemcen.
13. **Bos, R., Mei, H. C., & Busscher, H. J. (1999).** Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions–its mechanisms and methods for study. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), 179-230.
14. **Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007).** Quelque système microbien : les biofilms. Dans : *Microbiochimie et alimentation*. Educagri éditions, Dijon. p.131-164.
15. **Bremer, P. J., Seale, B., Flint, S., Palmer, J., Fratamico, P., & Annous, B. (2009).** Biofilms in dairy processing. *Biofilms in the food and beverage industries*, 396-431.
16. **Burgess, S., Lindsay, D., Flint, S,H.,2010.** Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* 144:215-225.
17. **Burgess, S. A., Flint, S. H., & Lindsay, D. (2014).** Characterization of thermophilic bacilli from a milk powder processing plant. *Journal of applied microbiology*, 116(2), 350-359.
18. **Burkholder, W.F., Grossman, A.D. 2000.** Regulation of the initiation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. In: Brun, Y.V., Shimkets, L.J., (Eds.), *Prokaryotic Development*. ASM Press, Washington DC.
19. **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.
20. **Brunet. (2008).** Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants. En vue de l'obtention du Doctorat, spécialité : Pathologie et Nutrition. Université De Toulouse. 246p.
21. **Buzzini, P., Arapitsas, P., Goretti, M., Branda, E., Turchetti, B., Pinelli, P., & Romani, A. (2008).** Antimicrobial and antiviral activity of hydrolysable tannins. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 8 (12), 1179-1187.
22. **Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995).** Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 711-745.

Références bibliographique

23. Costerton J.W. (1999). Introduction to biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents. 11:217-721.
24. Costerton J. W.,! Philip S. Stewart, E. P. Greenberg., 1999. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. American Association for the Advancement Of Science. 1318-1322.
25. Choubey, S., Varughese, L. R., Kumar, V., & Beniwal, V. (2015). Medicinal importance of gallic acid and its ester derivatives: a patent review. Pharmaceutical patent analyst, 4(4), 305-315.
26. Coppo, E., & Marchese, A. (2014). Antibacterial activity of polyphenols. Current pharmaceutical biotechnology, 15(4), 380-390.
27. Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. Current opinion in biotechnology, 23(2), 174-181.
28. David J. Studholme.2014. Some (bacilli) like it hot: genomics of *Geobacillus* species. *Microbial Biotechnology*, 8, 40–48.
29. de Hoon, M.J.L., Eichenberger, P., Vitkup, D., 2010. Hierarchical Evolution of the Bacterial Sporulation Network. *Current Biology* 20, R735-R745.
30. Djordjevic D., Wiedmann M. and Mclandsborough L.A. (2002). Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), 2950– 2958.
31. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8(9).
32. Doss, A., Mubarack, H. M., & Dhanabalan, R. (2009). Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian Journal of Science and Technology*, 2(2), 41-43.
33. Dufour, T., & Svoboda, J. M. (2005). Pathogénie bactérienne des parodontolyses. *EMC-Odontologie*, 1(1), 46-57.
34. Faille, C., Tauveron, G., Le Gentil-Lelievre, C., & Slomianny, C. (2007). Occurrence of *Bacillus cereus* spores with a damaged exosporium: consequences on the spore adhesion on surfaces of food processing lines. *Journal of food protection*, 70(10), 2346-2353.
35. Fernandes, F. H. A., & Salgado, H. R. N. (2016). Gallic acid: review of the methods of determination and quantification. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(3), 257-265.

Références bibliographique

36. Feucht, W., Treutter, D. et Christ, E. (1997). Role of flavanols in yellowing beech trees of the Black forest. *Tree Physiol.* p17, 335-340.
37. Flemming H.C (1990). Introduction: biofilm as a particular form of microbial life. in *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Stuttgart.
38. Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575.
39. Flint, S.H., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., Crawford, R., 2001. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology* 90, 151-157.
40. Filloux, A., & Vallet, I. (2003). Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *médecine/sciences*, 19(1), 77-83.
41. Goetz, C., Dufour, S., Archambault, M., Malouin, F., & Jacques, M.(2016). Importance et contrôle de biofilms formés par les staphylocoques lors d'infections intra-mammaires chez la vache laitière : une revue bibliographique. PP 215-229.
42. Hara, Y. (2001). *Green tea: health benefits and applications*. CRC press.
43. Hilbert, D.W., Piggot, P.J., 2004. Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 234- 262.
44. Hitchins, A. D. (1976). Patterns of spore locations in pairs of *Bacillus cereus* sporangia. *Journal of bacteriology*, 125(1), 366-368.
45. HOPKINS W. G., 2003. *Physiologie végétale*. 2ème édition américaine, de Boeck et Lancier SA, Paris : 514.
46. Houry, A., Briandet, R., Aymerich, S., & Gohar, M. (2010). Involvement of motility and flagella in *Bacillus cereus* biofilm formation. *Microbiology*, 156(4), 1009-1018.
47. Jean-Blain, C. (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tanins. *Rev.Méd. Vét.* p149, 911 920.
48. Jeun, J. M., Annie. F., Chrystian. J. L. (2005). les composés phénoliques des végétaux, p203- 204.

Références bibliographique

49. Jonathan M. Barcelo, Mildiamond Guieb, Anderson Ventura, Aryza Nacino, Herminia Pinasen, , Trishia Yodong, Bianca Lou Estrada, DANIEL Valdez, Thresha Binwag.(2014). Antibacterial, Prooxidative And Genotoxic Activities Of Gallic Acid And Its Copper And Iron Complexes Against Escherichia Coli. Asia Pacific Journal Of Multidisciplinary Research, 2(6), 2350-7756.
50. Jouenne T.; Vilain S., Cosette P., Junter G-A.. 2004. Proteomics of biofilm bacteria. Curr.Proteomics 1, 211-219.
51. Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 73(2), 310-347.
52. Kent, D. J., Chauhan, K., Boor, K. J., Wiedmann, M., & Martin, N. H. (2016). Spore test parameters matter: Mesophilic and thermophilic spore counts detected in raw milk and dairy powders differ significantly by test method. Journal of dairy science, 99(7), 5180-5191.
53. Keynan, H.S., Sandler, N., 1983. Spore research in a historical perspective, p2-42. In A. Hurst and G.W. Gould (ed.), the Bacterial Spore, vol. 2. Academic Press, London and New York.
54. KHERBOUCHE, E. H. (2014). *Influence d'un traitement à Ultrason sur la thermorésistance de spores de Bacilles sp. isolées de poudre de lait* (Doctoral dissertation).
55. Kuisiene, N., Raugalas, J., & Chitavichius, D. (2004). Geobacillus lituanicus sp.nov. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 54(6), 1991-1995.
56. Leggett, M.J., McDonnell, G., Denyer, S.P., Setlow, P., Maillard, J.Y., 2012. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance. Journal of Applied Microbiology 113, 485-498.
57. Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & LUCET, J. C. (2014). Physiopathologie et prévention des infections liées aux dispositifs médicaux implantés. La Revue du praticien, 64(5), 620-625.
58. Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in microbiology, 9(1), 34-39.

Références bibliographique

59. MALEK .F, 2013. Le biofilm en industrie laitière : caractérisation facteur de développement et élimination cas du biofilm de *Bacillus cereus* dans quelques laiteries de la région de Tlemcen.
60. Malek, F., Boudjemaa, B. M., Aouar-Métri, A., & Kihal, M. (2013). Identification and genetic diversity of *Bacillus cereus* strains isolated from a pasteurized milk processing line in Algeria. *Dairy Science & Technology*, 93(1), 73-82.
61. Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., & Herman, L. (2012). Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 133-147.
62. MATTIAS R(2010). Lettre d'information sur la santé substances phytobiologiques (phytobiologicals) .5ème partie : l'epigallocatechine gallate (EGCG).
63. Maurice N (1997). L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed. Lavoisier, Paris, p. 12-14.
64. **Microbial biofilms.** *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711-745.
65. Mikłasińska, M., Kępa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., Dziedzic, A., & Wąsik, T. J. (2016). Catechin Hydrate Augments the Antibacterial Action of Selected Antibiotics against *Staphylococcus aureus* Clinical Strains. *Molecules*, 21(2), 244.
66. Milane, H. (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres ; études et applications thérapeutiques (Doctoral dissertation, Université Louis Pasteur (Strasbourg)).
67. Mogha, K. V., Shah, N. P., Prajapati, J. B., & Chaudhari, A. R. (2014). Biofilm a threat to dairy industry. *Indian Journal of Dairy Science*, 67(6).
68. Moir, A., 2006. How do spores germinate? *Journal of Applied Microbiology* 101, 526-530.
69. Musk D.J., Banko D.A., and Hergenrother P.J. (2005). Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*; Vol. 12: 789– 796.

Références bibliographique

70. Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. And *Geobacilluszenensis* sp. nov. *from* petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus thermoleovorans*, *Geobacillus kaustophilus*, *Geobacillus thermoglucosidasius* and *Geobacillus thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 433-446.
71. Nicholson, W.L., 2002. Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cell. Mol. Life Sci.*59, 410-416.
72. Otto, M. (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*, 64, 175-188.
73. Oral, N. B., Vatansever, L., Aydin, B. D., Sezer, Ç., Guven, A., Gumez, M., ... & Kurkcuoglu, M. (2010). Effect of oregano essential oil on biofilms formed by Staphylococci and *Escherichia coli*. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 16(Suppl-A), S23-S29.
74. Ow, Y. Y., & Stupans, I. (2003). Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. *Current drug metabolism*, 4(3), 241-248.
75. Parkar, S. G., Flint, S. H., Palmer, J. S., & Brooks, J. D. (2001). Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90(6), 901-908.
76. Parkar, S. G., Flint, S. H., & Brooks, J. D. (2003). Physiology of biofilms of thermophilic bacilli—potential consequences for cleaning. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(9), 553-560.
77. Parkar, S. G., Flint, S. H., & Brooks, J. D. (2004). Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 110-116.

Références bibliographique

78. Perazzoli, M. R. A., Perondi, C. K., Baratto, C. M., Winter, E., Creczynski-Pasa, T. B., & Locatelli, C. (2017). Gallic Acid and Dodecyl Gallate Prevents Carbon Tetrachloride-Induced Acute and Chronic Hepatotoxicity by Enhancing Hepatic Antioxidant Status and Increasing p53 Expression. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(4), 425-434.
79. Ponce, Adrian, Stephanie A.Connon, And Pun To Yung,(2008)"detection and viability assessment of endospore forming pathogens." Principales Of Bacterial Detection Biosensors,Recognition Receptors And Microsystems.Spring New York,78-88.
80. Postollec, F., Mathot, A,G.,Bernard ,M., Divanac'h, M,L., Pavan, S., Sohier ,D.,2012. Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. *International Journal of Food Microbiology* 158: 1-8.
81. ROUX, A., & GHIGO, J. M. (2006). Les biofilms bactériens 261-268.
82. Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, HW. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International journal of food microbiology*, 85(1), 45-61.
83. Sauer. K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 4, 219.
84. Sella, S. R., Vandenberghe, L. P., & Soccol, C. R. (2014). Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological research*, 169(12), 931-939.
85. Setlow, B., Cowan, A.E., Setlow, P., 2003. Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *Journal of Applied Microbiology* 95, 637-648. Sereme, A., Milogo-Rasolodimby, J., Guinko, S., & Nacro, M. (2008). Propriétés thérapeutiques des plantes a tanins du Burkina Faso. *Pharmacopée et médecine traditionnelle africaine*, 15,41-49.
86. Setlow, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514-525.
87. Setlow, P., Johnson, E.A., 2007. Spores and Their Significance. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. (Eds.), *Food Microbiol. Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington DC, pp. 35-68.

Références bibliographique

88. Setlow, P. (2014). Germination of spores of Bacillus species: what we know and do not know. *Journal of bacteriology*, 196(7), 1297-1305.
89. Shah, S., Stapleton, P. D., & Taylor, P. W. (2008). The polyphenol (-) - epicatechin gallate disrupts the secretion of virulence-related proteins by Staphylococcus aureus. *Letters in applied microbiology*, 46(2), 181-185.
90. Sirey, J. A., Greenfield, A., Weinberger, M. I., & Bruce, M. L. (2013). Medication beliefs and self-reported adherence among community-dwelling older adults. *Clinical therapeutics*, 35(2), 153-160.
91. Stickler DJ (2008). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters *Nat Clin Pract Urol* doi: 10.1038/ncpuro1231.
92. Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572-585.
93. Sourani, Z., Pourgheysari, B., Beshkar, P., Shirzad, H., & Shirzad, M. (2016). Gallic Acid Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Lymphoblastic Leukemia Cell Line (C121). *Iranian Journal of Medical Sciences*, 41(6), 525.
94. Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3-9.
95. Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014). Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116.
96. Uhlich, G. A., Cooke, P. H., & Solomon, E. B. (2006). Analyses of the red-dry-rough phenotype of an Escherichia coli O157: H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Applied and environmental microbiology*, 72(4), 2564-2572.
97. Vandal, J., Léo, G., Garry Ferroni, G., & Abou-Zaid, M. (2015). Activité antimicrobienne de produits naturels originaires du Nord de l'Ontario.
98. Verma, S., Singh, A., & Mishra, A. (2013). Gallic acid: molecular rival of cancer. *Environmental toxicology and pharmacology*, 35(3), 473-485.
99. Vlková, H., Babák, V., Seydlová, R., Pavlik, I., & Schlegelova, J. (2008). Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms-a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(5), 309-323.
100. Wijman, J. G., de Leeuw, P. P., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of Bacillus cereus: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and environmental microbiology*, 73 (5), 1481-1488.

Références bibliographique

101. **Xavier Lerverve, (2008).** Les catéchines et la santé ; Nutrition humaine et Sécurité des aliments.
102. **Xu, K. D., McFeters, G. A., & Stewart, P. S. (2000).** Biofilm resistance to antimicrobial agents. *Microbiology*, 146(3), 547-549.
103. **Zhao B , Li X , He R , Cheng S , Wenjuan X(1989).** Scavenging effect of leah Viernes extracts of green tea and natural antioxidants on active oxygen radicals. *Cell Biophysics* Vol 14.
104. **Zhao, X. Y. (2014).** *A study of the effects of temperature cycling on thermophilic biofilms* (Doctoral dissertation, Auckland University of Technology).
105. [http:// textbookofbacteriology.net/Bacillus.html](http://textbookofbacteriology.net/Bacillus.html).



Annexes

Milieux de culture

➤ Composition du milieu TSA (Tryptic Soy Agar)

Eléments	Quantité (g/L)
Hydrolysats enzymatique de caséine	17,0g/litre
Peptone de soja	3,0g/litre
D-Glucose	2,50g/litre
Chlorure de sodium	5,0g/litre
Hydrogénophosphate dipotassique	2,50g/litre

pH final : 7,3±0,2

➤ Bouillon tryptic soy broth TSB (1 Litre)

Eléments	Quantité (g/L)
Bacto Tryptone (digestion pancréatique de caséine)	17,0g/litre
Bacto Soytone (digestion peptique de semoule de soja)	3,0g/litre
Glucose (dextrose)	2,50g/litre
Chlorure de sodium	
Hydrogénophosphate bipotassique	2,50g/litre

pH final : 7,3±0,2

Bouillon nutritive

Eléments	Quantité (g/L)
Peptone	15 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	6 g
D (+) –glucose	1 g
Eau distillée	1000 ml

PH=7,5 -/+ 0,2 (37°C).

➤ **Solution dissolvent**

Eau distillé	250 ml
Acide acétique glacial 33%	50 ml

❖ **Eau physiologique**

Eau distillé	1000 ml
Na Cl	1g

❖ **Cristal violet**

Eau distillé	1000 ml
Cristal violet	1g